



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESIS

**OBTENCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS PURIFICADOS A
PARTIR DE EXTRACTO DE YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*)
CONCENTRADO MEDIANTE DOS SISTEMAS DE CULTIVO CON
*Zymomonas mobilis***

**PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIA
Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

AUTOR

Br. JOSE GABRIEL BARAZORDA CARRILLO

ASESORA

Dra. YOLANDA CALLO CHOQUEVILCA

ORCID: 0000-0001-9543-8547

CUSCO – PERU

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: *Obtención de Fructo oligosacáridos purificados a partir de Extracto de Yacón (Smilax sonchifolius) Concentrado mediante dos sistemas de cultivo con Zymomonas mobilis*

Presentado por: *José Gabriel Barazorda Carrillo* DNI N° *31174435*
presentado por: DNI N°:

Para optar el título profesional/grado académico de *Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos*

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por *dos* veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de *100*.....%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** las primeras páginas del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, *03* de *septiembre* de 20*25*

Y. Callo

Firma

Post firma *Yolanda Callo Choquevika*

Nro. de DNI *23.845.920*

ORCID del Asesor *0000-0001-9543-8547*

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: **oid:** *27259-490839437*

José Gabriel Barazorda Carrillo

Obtención de fructooligosacaridos purificados a partir de extracto de Yacón (*Smallanthus sanchifolius*) concentrado me...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::27259:490839437

114 páginas

Fecha de entrega

2 sep 2025, 10:20 p.m. GMT-5

21.497 palabras

Fecha de descarga

3 sep 2025, 12:08 a.m. GMT-5

119.644 caracteres

Nombre del archivo

Obtención de fructooligosacaridos purificados a partir de extracto de Yacón (*Smallanthus sanchi*....pdf

Tamaño del archivo

1.4 MB

10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 4%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
ESCUELA DE POSGRADO

INFORME DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES A TESIS

Dra. NELLY AYDE CAVERO TORRE, Directora (e) General de la Escuela de Posgrado, nos dirigimos a usted en condición de integrantes del jurado evaluador de la tesis intitulada **OBTENCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS PURIFICADOS A PARTIR DE EXTRACTO DE YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*) CONCENTRADO MEDIANTE DOS SISTEMAS DE CULTIVO CON *Zymomonas mobilis***. de la Br. Br. JOSE GABRIEL BARAZORDA CARRILLO. Hacemos de su conocimiento que el (la) sustentante ha cumplido con el levantamiento de las observaciones realizadas por el Jurado el día **QUINCE DE OCTUBRE DE 2024**.

Es todo cuanto informamos a usted fin de que se prosiga con los trámites para el otorgamiento del grado académico de MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Cusco, 01 de setiembre de 2025

DRA. AMANDA ROSA MALDONADO FARFAN
Primer Replicante

DRA. HELDY YIYI ESPINOZA CARRASCO
Segundo Replicante

DR. LEONCIO SOLIS QUISPE
Primer Dictaminante

MGT. EMMA JESUS URZUNAGA DE ROZAS
Segundo Dictaminante

Dedicatoria

A:

Dios nuestro creador, por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en todas las acciones positivas que doy sea en la vida profesional, familiar y personal.

Mis padres Ruth Consuelo y Juan Ruperto, por ser ejemplos de constancia, dedicación, fortaleza e inspiración diaria.

Mi esposa Rosalinda, por sus palabras y confianza, por su amor y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

Mi hija Rous Gabriela, por todo el amor que me profesa y el aliento incondicional en la culminación de este proyecto de subir un peldaño más en la vida académica.

Agradecimiento

A :

Mi asesora la Dra. Yolanda Callo Choquevilca, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su amplia experiencia y capacidad científica en un marco de respeto, confianza y amistad, que fueron el pilar para la culminación de este proyecto.

Todos los docentes de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Mi gran amigo el Dr. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca por su constante apoyo en la concretización de la presente tesis.

A La Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga, por haberme facilitado las instalaciones de la planta piloto de jugos y conservas y el laboratorio de Biotecnología a cargo de la Dra. Paula Godoy en las que se realizaron la parte experimental de la presente tesis.

Índice general

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras.....	ix
Siglas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN	xiii
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.1. Situación Problemática.....	16
1.2. Formulación del problema	18
1.3. Justificación de la investigación.....	19
1.4. Objetivos de la investigación	21
CAPITULO II: MARCO TEORICO CONCEPTUAL.....	22
2.1. Bases teóricas	22
2.1.1. Prebióticos.....	22
2.1.2. Fructooligosacáridos	25
2.1.3. Importancia de los Fructooligosacáridos en la salud	26
2.1.4. Análisis y caracterización de carbohidratos prebióticos.....	27

2.1.5. Cromatografía líquida de alta performance	30
2.1.6. <i>Samolanthus sonchifolius</i> “yacón”	32
2.1.7. Beneficios del <i>Samolanthus sonchifolius</i> “yacón”	35
2.1.8. <i>Zymomonas mobilis</i>	37
2.2. Antecedentes empíricos de la investigación.....	40
2.3. Hipótesis.....	44
2.3.1. Hipótesis general.....	44
2.3.2. Hipótesis específicas	44
2.4. Identificación de variables	44
2.5. Operacionalización de variables.....	45
CAPITULO III: METODOLOGIA	47
3.1. Ámbito de estudio: localización política y geográfica	47
3.2. Tipo y nivel de investigación	47
3.3. Unidad de análisis	47
3.4. Población de estudio.....	47
3.5. Tamaño de muestra	47
3.6. Técnicas de selección de muestra.....	47
3.7. Técnicas de recolección de información	48
4.6.1. Materiales.....	48
4.6.2. Reactivos.....	49
4.6.3. Instrumentos y equipos	50

4.6.4. Material biológico.....	51
4.6.5. Proceso de obtención del extracto de yacón concentrado.....	51
4.6.6. Proceso de fermentación con célula libre	54
4.6.7. Proceso de fermentación con célula inmovilizada.....	55
3.8. Técnicas de análisis e interpretación de la información.....	56
3.9. Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas	61
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION	61
4.1. Procesamiento, análisis, interpretación y discusión de resultados	61
4.1.1. Caracterización del extracto de yacón	61
4.1.2. Rendimiento de la obtención del extracto de yacón concentrado.....	61
4.1.3. Identificación de la cepa de Zymomonas mobilis.....	64
4.1.4. Cuantificación de azúcares reductores, sacarosa y FOS en el extracto de yacon.....	68
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	82
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	92

Índice de cuadros

Tabla1 Operacionalización de variables	45
Tabla2 Características fisicoquímicas del extracto de yacon antes de su concentración.....	61
Tabla 3 Rendimiento de los extractos de yacón concentrado	63
Tabla 4 Características bioquímicas de <i>Zymomonas mobilis</i>	66
Tabla 5 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 15 °Brix en función del tiempo.....	69
Tabla 6 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 20 °Brix en función del tiempo.....	70
Tabla 7 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 25 °Brix en función del tiempo.....	71
Tabla 8 Variación de las concentraciones de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula libre de <i>Zymomonas mobilis</i>	72
Tabla 9 Porcentaje de reducción de la concentración de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula libre de <i>Zymomonas mobilis</i>	72
Tabla 10 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 15 °Brix en función del tiempo.....	73
Tabla 11 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 20 °Brix en función del tiempo.....	74
Tabla 12 Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 25 °Brix en función del tiempo.....	75
Tabla 13 Variación de las concentraciones de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula inmovilizada de <i>Zymomonas mobilis</i>	76
Tabla 14 Porcentaje de reducción de la concentración de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula inmovilizada de <i>Zymomonas mobilis</i>	77

Tabla 15 Concentración de fructooligosacaridos (FOS) transcurrido 96 horas de fermentación
.....77

Índice de figuras

Figura1 Estructura química de los FOS	26
Figura2 Raíces reservantes de yacón	32
Figura3 Metabolismo central de <i>Z. mobilis</i> para la producción de etanol (ruta de Entner-Doudoroff).	39
Figura4 Diagrama de flujo cualitativo para la obtención del extracto de yacón concentrado	52
Figura 5 Diagrama de flujo cuantitativo de la obtención del extracto concentrado de yacón	62
Figura 6 <i>Zymomonas mobilis</i> en agar WL	65
Figura 7 Observación microscópica (100 %) de <i>Zymomonas mobilis</i>	65
Figura 8 Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 15 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre	69
Figura 9 Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 20 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre	70
Figura 10 Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 25 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre	71
Figura 11 Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 15 oBrix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.	74
Figura 12 Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 20 oBrix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.	75
Figura 13 Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 25 oBrix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.	76
Figura 14 Comparación de los dos sistemas de fermentación (célula libre e inmovilidad) del proceso de concentración de los fructooligosacáridos.....	78

Siglas

FOS	: Fructooligosacaridos
GRAS	: Sustancias generalmente reconocidas como seguras
HMO	: Organización para el mantenimiento de la salud
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pcrihidracilo
GOS	: Galactooligosacaridos
HPLC	: Cromatografía liquida de alta eficiencia
HILC	: Cromatografía liquida de interacción hidrófila
FAO	: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
CIP	: Centro Internacional de la papa
FTasas	: Fructosil transferasas

Resumen

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal la purificación de fructooligosacáridos (FOS) a partir de extracto concentrado de yacón, empleando dos sistemas de cultivo de *Zymomonas mobilis*: libre e inmovilizado. La metodología comprendió tres etapas secuenciales. Primero, se obtuvieron extractos concentrados de yacón a 15, 20 y 25 °Brix. Segundo, estos extractos se sometieron a fermentación durante 96 horas utilizando ambos sistemas de cultivo (libre e inmovilizado). Tercero, se analizaron muestras tomadas a lo largo del proceso fermentativo para determinar la reducción de azúcares reductores y evaluar la concentración de FOS purificados. Los resultados demostraron una eficacia significativamente mayor del sistema inmovilizado para concentrar y purificar los FOS. Este sistema produjo incrementos relativos del 149.17% (15 °Brix), 141.38% (20 °Brix) y 202.01% (25 °Brix) en la concentración de FOS. En contraste, el sistema libre generó aumentos menores: 16.67% (15 °Brix), 15.86% (20 °Brix) y 17.45% (25 °Brix). Consecuentemente, se concluye que el sistema de fermentación con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* utilizando un extracto de yacón concentrado a 25 °Brix es el más recomendable para optimizar la purificación y concentración de FOS.

Palabras clave: *Zymomonas mobilis*, inmovilización celular, Fructooligosacáridos (FOS), yacón, fermentación.

Abstract

This research study primarily aimed to purify fructooligosaccharides (FOS) from concentrated yacon extract utilizing two *Zymomonas mobilis* culture systems: free-cell and immobilized-cell. The methodology comprised three sequential stages. First, concentrated yacon extracts were prepared at 15, 20, and 25 °Brix. Second, these extracts underwent fermentation for 96 hours using both culture systems (free-cell and immobilized-cell). Third, samples collected throughout the fermentation process were analyzed to quantify the reduction in reducing sugars and assess the concentration of purified FOS. The results demonstrated significantly higher efficacy of the immobilized-cell system for concentrating and purifying FOS. This system yielded relative increases in FOS concentration of 149.17% (15 °Brix), 141.38% (20 °Brix), and 202.01% (25 °Brix). In contrast, the free-cell system generated substantially lower increases: 16.67% (15 °Brix), 15.86% (20 °Brix), and 17.45% (25 °Brix). Consequently, it is concluded that the fermentation system employing immobilized *Zymomonas mobilis* cells with a concentrated yacon extract at 25 °Brix is the most recommended approach for optimizing FOS purification and concentration.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, Cell immobilization, Fructooligosaccharides (FOS), Yacon, Fermentation.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la mayoría de los países europeos consideran los fructooligosacáridos (FOS) componentes alimentarios naturales. Los FOS se clasifican como prebióticos debido a sus efectos favorables en la promoción de las bifidobacterias en el colon humano. Hasta el momento se han escrito numerosas evaluaciones sobre su aparición, preparación y características.

Las condiciones ideales para la generación de FOS, la especificidad del sustrato, la regioselectividad (proceso que favorezca la formación de enlaces en un átomo en particular en vez de otros átomos posibles), el peso molecular y el grado de glicosilación son sólo algunos ejemplos de las características catalíticas y fisicoquímicas de las fructosiltransferasas (FTasas) y Furanosidasas (FFasas) que varían de una fuente a otra e incluso de una cepa a otra. Se sabe que las diferentes fructosiltransferasas vegetales tienen regioselectividades variadas y que pueden crear individualmente oligosacáridos con estructuras únicas (Alvares et al., 2019).

Los factores estacionales afectan a la síntesis de FTasas vegetales, y a la cantidad de FOS que pueden producir utilizando estas enzimas no es muy elevada.

La mayor parte de la investigación sobre las fructosiltransferasa microbiana se centra en las enzimas que producen fructooligosacaridos.

Almeida et al. (2015), representan las características más significativas de los fructooligosacáridos. La relevancia, las características catalíticas y fisicoquímicas y las técnicas de purificación de las enzimas que producen fructooligosacáridos.

Los oligosacáridos cortos denominados fructooligosacáridos forman parte del grupo de hidratos de carbono fructanos.

Un término genérico para los polímeros de fructosa con una estructura general de glucosa conectada a muchas unidades de fructosa es fructano. Los fructanos se presentan en diversas formas en la naturaleza. Las conexiones glucosídicas que conectan los residuos de fructosa entre sí sirven de base para diferenciar estos tipos. Se pueden distinguir tres grupos. La primera categoría consiste en los fructanos lineales llamados inulinas, en los que las unidades de fructosa están unidas (normalmente) por un enlace β (2-1). La segunda categoría de fructanos lineales se conoce como levanos, y (normalmente) tienen un enlace β (2-6) que une las unidades de fructosa. Los fructanos de tipo mixto, también conocidos como fructanos de tipo graminano, constituyen la tercera categoría. Estos fructanos tienen ramificaciones porque las unidades de fructosa están unidas entre sí por enlaces β (2-1) y β (2-6). La palabra fructooligosacáridos (FOS) se utiliza para describir los fructanos cortos de tipo inulina con glucosa terminal, que incluyen de 2 a 4 unidades de fructosilo unidas por enlaces β (1-2)-glucosídicos (Catenza & Donkor, 2021).

Se han realizado numerosas investigaciones para determinar si los fructooligosacáridos son peligrosos tanto para el ser humano como para los animales. Los resultados no han demostrado que los FOS tengan componentes tóxicos o cancerígenos. En la mayoría de los países europeos, los FOS están reconocidos formalmente como componentes naturales de los alimentos, y EE.UU. les ha concedido la clasificación GRAS (generalmente considerados seguros).

Las bifidobacterias crecen en el colon cuando hay incluso una pequeña cantidad de FOS. Por otro lado, se ha demostrado que las bacterias patógenas y putrefactivas como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* y otras son incapaces de utilizar los FOS. Cuando los FOS se convierten en ácidos grasos de cadena corta, el pH del colon disminuye, lo que inhibe el desarrollo de bacterias nocivas. Los prebióticos se caracterizan por

tener efectos favorables sobre las bifidobacterias que se están multiplicando (Grancieri y otros, 2017).

Debido a la indigestibilidad de los FOS en el intestino delgado y a la fermentación en el colon, tienen un modesto efecto laxante, y los pacientes que reciben FOS suelen experimentar una leve flatulencia. Este efecto se aplica a todos los carbohidratos dietéticos no digeridos/fermentados y no sólo a los FOS específicamente.

Se llegó a la conclusión de que es posible una dosis diaria máxima de 20 a 30 g de FOS, cuando la cantidad se reparte a lo largo del día en unas pocas comidas separadas, basándose en los datos disponibles relativos a los síntomas de malestar intestinal dependientes de la dosis. En Japón, líder mundial en la producción industrial de FOS y su uso como aditivos alimentarios, ha considerado adecuado un consumo diario de aproximadamente 0,8 g por kg de peso corporal (Carlson y otros, 2018). En la presente investigación se logró purificar los fructooligosacaridos (FOS) a partir de los extractos de yacón, como una propuesta de prebióticos.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Situación Problemática

Las raíces de la planta *Smallanthus sonchifolius* que se conoce como Yacon, es una hierba nativa de los Andes y posee la particularidad de que en contraste con la mayoría de raíces comestibles que almacenan almidón, el yacón almacena sus carbohidratos en forma de β (2- 1) oligofructanos. Las raíces del yacón se consumen como alimento dietético, y las hojas se usan en la medicina popular para el tratamiento de trastornos como en el caso de la hiperglucemia de diabetes mellitus. Estos tubérculos contienen en su estructura varios azúcares como fructosa, glucosa, sacarosa y oligofructanos lineales. Los fructooligosacáridos (FOS) son solubles en agua, y su bajo peso molecular dificulta la separación por operaciones de diálisis, pero se separan fácilmente por técnicas de ultrafiltración. Los fructanos entre ellos el FOS tienen propiedades interesantes como inmuno moduladores y no son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, por lo tanto, son consideradas como una fibra dietética, porque pasan a través del tracto gastrointestinal sin cambios significativos en su estructura (Kim y otros, 2020).

Las bifidobacterias, microorganismos residentes en el intestino, los transforman en ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), ácido láctico, dióxido de carbono e hidrógeno. Los fructanos se emplean habitualmente como aditivos alimentarios funcionales porque parecen beneficiar al sistema digestivo humano. Debido a sus cualidades prebióticas, los fructanos -también conocidos como azúcares inusuales- se consideran un ejemplo de componente funcional. Los fructanos son una forma excelente de mejorar la funcionalidad de un producto o su rentabilidad para el negocio alimentario, pero la agroindustria del país no los utiliza plenamente porque no hay estudios que faciliten su empleo.

Las raíces de yacón se utilizan con seguridad desde hace mucho tiempo en Sudamérica y otras partes del mundo, por lo que, pueden ofrecer cualidades benéficas para la salud, como actividades prebióticas, antidiabéticas, antioxidantes y antibacterianas. La producción de yacón se ha incrementado en la región andina y otras naciones debido a las supuestas propiedades medicinales de las raíces y hojas (Campos y otros, 2012), pero en Perú no se le da la importancia debido al desconocimiento de su uso como alimento funcional. El cultivo del yacón se ha extendido recientemente a varios países, entre ellos Nueva Zelanda, Japón y Brasil.

A diferencia de otras raíces comestibles, del 85 a 90% del peso fresco de las raíces del yacón corresponden al agua; los carbohidratos representan el 90% del peso seco de las raíces recién cosechadas, de los cuales entre el 50 al 70% son fructooligosacáridos (FOS), el resto de los carbohidratos lo conforman la sacarosa (disacárido), la fructosa y la glucosa (azúcares reductores).

Los azúcares simples, que suelen acompañar a la extracción de FOS, determinan la necesidad de posteriores operaciones de purificación, ya que su presencia puede causar problemas de transformación tecnológica como por ejemplo reacciones de pardeamiento no enzimáticas (reacción de Mayllard principalmente), este factor limita la industrialización de los FOS del yacón.

Por el momento, todos los prebióticos tienen carbohidratos de cadena más bien corta. Los fructooligosacáridos (FOS), un tipo único de prebiótico vinculado a la estimulación selectiva de la actividad de ciertos tipos de bacterias colónicas, constituyen una categoría importante.

Los FOS tienen una función bifidogénica documentada, además de tener un impacto favorable y útil sobre la microbiota intestinal, lo que disminuye la frecuencia de las enfermedades gastrointestinales. En el pasado, se han extraído de diversas plantas sustancias

químicas prebióticas. Sin embargo, en la actualidad existen procedimientos fermentativos y biotecnológicos modernos que pueden producir FOS para ser usado en la industria de los alimentos nutraceuticos (Granciery et al., 2017).

Los parámetros de cultivo pueden optimizarse para aumentar el rendimiento y la productividad de los FOS. Otra forma de producir FOS a gran escala que se ha sugerido como eficiente y asequible es el uso de enzimas y células inmovilizadas. A la luz de la investigación actual sobre la biosíntesis, las características fisicoquímicas, las fuentes, la producción biotecnológica y los usos de los FOS.

Las cepas de *Zymomonas* son inofensivas para los humanos y a menudo utilizado como inóculo natural para hacer procesos de fermentación alcohólica, la mayoría (90%) de las cepas de *Zymomonas* pueden crecer a pH 3.5, y a temperaturas entre 30° y 38 ° C, (Yanase et al. 2014); las *Zymomonas* solamente fermenta la glucosa, fructuosa y la sacarosa, dando como producto alcohol, dióxido de carbono y formación mínima de subproductos (Leveau, 2000); sin embargo no existen estudios de diversificación de su aprovechamiento distinto al de producción de alcohol.

En la actualidad existen tres sistemas de cultivo, el sistema libre, el de adhesión a superficies y el sistema inmovilizado, sin embargo, existen pocos estudios que comparen las eficiencias de estos tres sistemas en procedimientos de purificación de FOS, esta purificación se da al consumirse por acción de bacterias o levaduras los azúcares simples (di y monosacáridos).

1.2. Formulación del problema

a. Problema general

¿La fermentación del extracto de yacón con los sistemas de cultivo libre e inmovilizado de *Z. mobilis* permiten separar FOS de azúcares reductores (glucosa y fructosa) y sacarosa?

b. Problemas específicos

b.1. ¿Qué características fisicoquímicas presenta el extracto concentrado de yacón?

b.2. ¿Cuál de los sistemas de fermentación, utilizando cultivo libre e inmovilizado de *Z. mobilis* son adecuados para separar fructooligosacáridos de los azúcares reductores (fructosa, glucosa) y sacarosa del extracto concentrado de yacón?

1.3. Justificación de la investigación

La ingestión de FOS favorece el desarrollo de bacterias ventajosas en el colon, concretamente *Bifidus* y *Lactobacillus*, aumenta la absorción de minerales, mejora el metabolismo gastrointestinal y contribuye al control de los niveles de azúcar y colesterol en sangre.

Al carecer de las enzimas necesarias para romper los enlaces -glicosídicos que mantienen unidas las moléculas de fructosa, los FOS, al igual que otros fructanos, no pueden ser digeridos directamente por el sistema digestivo humano. Así pues, los FOS pasan casi por completo el sistema digestivo sin sufrir alteraciones cuando se consumen. Un grupo bacteriano específico que forma parte de la microflora intestinal fermenta los FOS cuando entran en el colon, la última sección del intestino grueso. Estas bacterias se denominan prebióticos y tienen una serie de beneficios para la salud humana. La fermentación de los FOS da lugar a la producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato, propionato y acetato, que disminuyen el pH del colon e impiden el crecimiento de bacterias patógenas y flora de putrefacción en el mismo.

Los FOS tienen el efecto contrario al de los carbohidratos ordinarios, que tienden a alimentar a las bacterias poco saludables del colon. Se considera un prebiótico, lo que significa que proporciona alimentos a los probióticos, o las bacterias buenas de nuestro colon. Los probióticos lo "comen" selectivamente allí y lo utilizan como alimento y fuente de energía.

Dado que el FOS es fundamentalmente una fibra soluble, su concentración en el jarabe de yacón debe considerarse como la concentración de fibra y no de azúcar. La cantidad de FOS en el jarabe puede variar del 10% al 50%, dependiendo del tipo de planta de yacón utilizada en su fabricación (Delgado, et al. 2012).

Además, la literatura informa que el consumo de algunos prebióticos podría promover una modulación positiva de una serie de biomarcadores relacionados con el tracto digestivo (p. ej., grelina) o la reserva de energía (p. ej., insulina y leptina) y la supresión de estas hormonas puede contribuir al desequilibrio energético (campos et al. 2000).

En la actualidad el reto principal de la industria y la agroindustria se basa en el aprovechamiento de los recursos naturales para generar productos con atributos de valor que puedan fácilmente ingresar a mercados, existen muchas maneras y los procesos de fermentación o cultivo de células que logra la bioconversión de las materias primas es una de ellas que necesita ser más explorado, por lo que las materias vegetales han adquirido una importancia enorme en estos procesos así aprovechar los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos existentes a través de la biorrefinería a niveles industriales, se hacen necesarias cultivos con altas rendimientos de producción y a diferentes condiciones de temperatura y pH.

Es aquí donde el yacón podría ser considerado como una fuente de ingredientes para alimentos funcionales, ya que al ser rico en fructooligosacáridos es un buen candidato para competir con la achicoria y dalia, pues como se sabe, estos dos últimos son los más usados para la extracción y comercialización de inulina, que, a su vez, se degrada con inulinasa para obtener oligofruktuosas.

En el caso del yacón ya no sería necesaria la degradación con inulinasa, si se llegase a purificar los FOS reduciendo el contenido de azúcares (mono y di sacáridos) con la acción de *Zimomonas mobilis*, convirtiéndola así esta materia prima en potencial fuente de extracción,

lo cual llevaría al incremento de beneficios económicos, no solamente a los productores agrarios, industrializadores y comercializadores de esta materia prima.

De lo revisado se puede sacar la interrogante ¿Es el jarabe de yacón rico en fructosa? ¿O se trata simplemente de un típico concepto erróneo provocado por los "fructooligosacáridos" y otra jerga científica con la que los consumidores no están familiarizados?; es así que, se quiere dar respuesta a estas interrogantes, siendo negativo, es decir el yacón no es rico en fructuosa, este azúcar simple es procesado por el hígado y si bien es cierto los fructooligosacáridos son también un tipo de azúcar este tipo que no son digeribles y por ende no son procesados por el hígado. Los FOS recorren el sistema digestivo sin ser alterados y no brindan calorías al cuerpo humano.

1.4. Objetivos de la investigación

a. Objetivo general

Obtener Fructooligosacáridos purificados a partir de extracto concentrado de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) mediante dos sistemas de cultivo con *Zymomonas mobilis*.

b. Objetivos específicos

b.1. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el extracto concentrado de yacón

b.2. Evaluar el efecto de los sistemas de fermentación libre e inmovilizado con *Z. mobilis* para separar fructooligosacáridos de azúcares reductores (fructosa, glucosa) y sacarosa a partir del extracto concentrado de yacón.

CAPITULO II: MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. Bases teóricas

2.1.1. *Prebióticos*

Las fibras vegetales especializadas se denominan prebióticos, estos componentes favorecen el desarrollo de bacterias beneficiosas en el estómago actuando como sustratos de carbono para las bacterias (Días et al. 2019).

Muchas frutas y verduras, sobre todo las que contienen hidratos de carbono complejos como fibra y almidón resistente, son ricas en prebióticos. Estos carbohidratos viajan a través de su sistema digestivo como alimento para las bacterias y otros gérmenes, ya que no pueden ser digeridos por su cuerpo (Alvares et al. 2019).

Entre los alimentos prebióticos se incluyen desde los espárragos hasta los boniatos. En Internet se pueden encontrar rápidamente numerosos ejemplos, y hablar con un nutricionista titulado también puede ser de ayuda (FAO, 2007).

La lista de suplementos prebióticos disponibles en la actualidad puede ser mucho más amplia, pero suelen incluir un carbohidrato complejo como la fibra. Las empresas que venden suplementos afirman que los componentes de sus productos favorecen el desarrollo de determinados tipos de bacterias. Dirigen sus productos a dolencias como el control del peso y la salud ósea (Buitron y otros, 2018).

Debido a que se consideran alimentos funcionales que incorporan polisacáridos oligosacáridos y no digeribles, que son ventajosos para la salud humana y especialmente para las personas mayores, su incorporación en alimentos formulados es particularmente ventajosa para los consumidores, el uso de oligosacáridos y polisacáridos no digeribles es cada vez más importante a nivel mundial (Illanes, 2015).

Además de los oligosacáridos de la leche humana, otros prebióticos son los fructo-, galacto-, manano- y xilo-oligosacáridos, así como la inulina, la lactulosa y la povidex. Estos son actualmente los prebióticos más utilizados (Gullón y otros, 2009).

Los investigadores de los campos de la nutrición, la biología y la industria alimentaria se interesan cada vez más por los prebióticos, aunque sigue habiendo desacuerdo sobre si las clasificaciones recogen adecuadamente todos sus beneficios potenciales. El estudio inicial sobre los prebióticos comenzó en la década de 1980, cuando científicos japoneses demostraron que los fructooligosacáridos eran fermentados preferentemente por las bifidobacterias y tenían el poder de promover su desarrollo en cultivos in vitro utilizando excrementos humanos como inóculo. Gibson y Roberfroid propusieron la primera definición de prebiótico, afirmando que se trata de "un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de especies bacterianas en el colon y, por tanto, mejora la salud".

Los resultados de estas investigaciones fueron confirmados por ellos mismos (Gibson & Roberfroid, 1995). En 2004, los investigadores describieron los prebióticos como "ingredientes que, cuando se fermentan de forma selectiva, provocan cambios particulares en la composición y/o la actividad de la microbiota intestinal que aportan ventajas tanto para la salud como para el bienestar de la persona". (Gibson y otros, 2004). Posteriormente, los prebióticos se definieron como "ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o un número limitado de géneros/especies de microorganismos de la microbiota intestinal que confieren beneficios para la salud del huésped", con la idea de que el efecto prebiótico debería utilizarse para identificar o indicar cambios específicos en la microbiota intestinal y beneficios fisiológicos tanto en humanos como en animales (Robertfroid y otros, 2010).

Por otra parte, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, 2008) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2007) definieron los prebióticos como "ingredientes alimentarios que, al ser fermentados selectivamente, producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal que confieren beneficios para la salud del individuo". Por último, pero no menos importante, los prebióticos son descritos por la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO, 2011) como "sustancias dietéticas (principalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por las enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas frente a bacterias perjudiciales."

Requisitos para ser considerado como prebiótico

Los prebióticos se definen como sustancias que cumplen los siguientes requisitos: i) deben ser resistentes al ácido estomacal, no pueden ser hidrolizados por enzimas de mamíferos y no pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal; ii) deben ser fermentables por la microbiota intestinal; y iii) deben ser capaces de estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales.

Los colónicos (fibra dietética) y los prebióticos son dos categorías de hidratos de carbohidratos no digeribles. Los ingredientes colónicos incluyen polisacáridos estructurales vegetales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, gomas, oligosacáridos derivados de la soja, glucooligosacáridos, arabinooligosacáridos, etc. que llegan al colon y actúan como sustratos para los microorganismos que viven allí, produciendo energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para el huésped.

Los prebióticos no sólo realizan las tareas mencionadas, sino que también promueven la proliferación específica de las bacterias lácticas en la microbiota intestinal. Actualmente

existen pruebas científicas de sus efectos en los seres humanos en forma de lactulosa, oligosacáridos de la leche humana, FOS, GOS y fructanos de tipo inulina (Rastall, 2010).

2.1.2. Fructooligosacáridos

Carlson et al. (2018), son carbohidratos que no pueden descomponerse ni absorberse en el sistema digestivo; en su lugar, atraviesan el tracto intestinal intactos y son fermentados por la microbiota del colon. Son sustancias que están presentes de forma natural en una amplia gama de alimentos, como frutas, verduras, cereales, legumbres y algas, por lo que su inclusión en las comidas procesadas sirve como suplemento dietético.

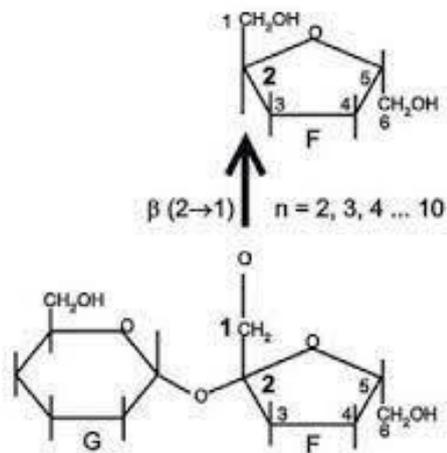
Los polímeros de fructosa que resultan de este proceso se conocen como oligofructanos, y tienen un grado de polimerización entre tres y nueve unidades de monosacáridos (Flores y otros, 2016). Los FOS se encuentran en diversas especies vegetales, como la remolacha, la alcachofa y el yacón. Estos compuestos químicos se crean por hidrólisis enzimática de la inulina, entre otros, o por procesos de síntesis que implican la actividad de transferasas e invertasas en una solución rica en sacarosa (Rubio y otros, 2012). Entre los residuos terminales de los FOS destacan: 1-kestosa (GF2), 1-nistosa (GF3) y 1F-fructosilnistosa (GF4). Mediante este bioproceso se producen FOS y glucosa libre, siendo esta última inversamente proporcional al proceso de transfructosilación (Álvarez y otros, 2019)

La fórmula global (figura 1) de los oligofructanos es GF_n o FF_n, dependiendo de si hay varias unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal por enlaces β (2,1) glucosídicos o si existen unidades de fructosa unidas entre sí por los mismos enlaces. Los oligosacáridos y polisacáridos mayoritariamente estructurados que componen la inulina varían en grado de polimerización (DP) de 2 a 65 unidades, con un valor medio de 10. Dado que la inulina y los FOS no son digeridos por las bacterias intestinales del colon, no se degradan ni se absorben en el tracto gastrointestinal superior. Es por eso que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas

digestivas humanas debido a la forma del carbono anomérico de la fructosa en la posición 2-1.
(Gibson y otros, 2000).

Figura1

Estructura química de los FOS



Nota. En la figura se expresa la estructura química, según (Buitron et al. 2018)

2.1.3. Importancia de los Fructooligosacáridos en la salud

Los FOS tienen una serie de cualidades interesantes, como una baja intensidad de dulzor, además de no tener calorías, no ser cariogénicos y estar clasificados como fibra dietética soluble. Además, los FOS ofrecen importantes ventajas fisiológicas, como una carcinogenicidad mínima, un impacto prebiótico, una mayor absorción de minerales y una reducción de los niveles sanguíneos de fosfolípidos, triacilglicerolos y colesterol. Debido a su acción prebiótica, los FOS se añaden cada vez en mayor cantidad a los alimentos y preparados para bebés. Este efecto favorece la formación de una microbiota intestinal no patógena. Su ingestión aumenta el bolo fecal y la frecuencia de las deposiciones, mientras que las personas sanas que reciben una dosis de 4-15 g/día observan una disminución del estreñimiento -una de las enfermedades más prevalentes en la sociedad contemporánea-, así como en los lactantes durante los primeros meses de vida.

Dado que los adultos mayores son más susceptibles a las enfermedades gastrointestinales debido a un desequilibrio en la diversidad y cantidad de los microorganismos presentes en el intestino, la adición de fructooligosacáridos (FOS) a su dieta es de relevancia para poder prevenir y revertir los cambios negativos en la microbiota intestinal derivados del proceso de envejecimiento (Vera y otros, 2020).

Según Carlson et al. (2018), el consumo de fructooligosacáridos favorece una mayor saciedad, la pérdida de peso corporal, la absorción de minerales, mejora el sistema inmunitario y aumenta la producción de la hormona leptina. Los fructooligosacáridos también reducen el estreñimiento, el riesgo de contraer cáncer de colon y los niveles sanguíneos de colesterol, triglicéridos y glucosa; favoreciendo una menor incidencia de enfermedades coronarias.

Por otro lado, debido a lo anterior y a que la producción está ligada a la revalorización de residuos y/o subproductos del sector, los FOS son atractivos para la industria alimentaria, promoviendo el desarrollo de procesos de economía circular (Buitron et al. 2018).

2.1.4. Análisis y caracterización de carbohidratos prebióticos

Las combinaciones complejas de isómeros con diversos grados de polimerización (DP), unidades de monosacáridos y/o conexiones glucosídicas constituyen los carbohidratos, y más especialmente los prebióticos. La búsqueda de nuevos productos y la evaluación de su actividad biológica son las principales áreas de atención. Para saber más sobre los carbohidratos en general y comprender mejor los procesos que subyacen a su impacto metabólico, es esencial investigar su estructura molecular.

Comprender la estructura espacial de una molécula de carbohidratos no identificada es de gran importancia para poder entender los procesos metabólicos en el cuerpo; La composición monomérica de los hidratos de carbono puede variar, por ejemplo, glucosa, fructosa y galactosa. Estos constituyentes se unen mediante conexiones alfa o beta- glicosídicas

para crear cadenas lineales o ramificadas de disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Pueden existir como oligosacáridos libres o unirse covalentemente a proteínas o lípidos como glicanos. Además, muchos metabolitos vegetales son moléculas no carbohidratadas que han sido glicosiladas. Además de fabricarse comercialmente, las mezclas de oligosacáridos también pueden encontrarse en la naturaleza, como en la leche de los mamíferos, o en sustancias prebióticas como los galacto- y fructo-oligosacáridos. Para (optimizar) las cualidades funcionales de estas mezclas, a menudo es esencial conocer su estructura exacta así poder ver los procesos de síntesis y transformación de estos (Alvares et al. 2019).

La estructura de los prebióticos, es decir, la composición en monosacáridos, el tipo de enlace glucosídico y el peso molecular, tiene un gran impacto en las propiedades que pueden presentar. En general, para la síntesis enzimática o la extracción de fuentes naturales de prebióticos se obtienen mezclas complejas que pueden presentar carbohidratos con diversos grados de polimerización e incluso isómeros que dificultan su caracterización.

Los prebióticos deben describirse teniendo en cuenta su origen (procedencia y fuente), pureza y composición química para poder evaluarlos y verificar su uso en la industria alimentaria, según la FAO. Para aislar, identificar y caracterizar los carbohidratos prebióticos y revelar al mismo tiempo su composición estructural, se requieren procedimientos analíticos. Se necesitan metodologías de fraccionamiento y purificación. Se utilizan técnicas como la cromatografía de exclusión molecular (SEC) o la cromatografía de intercambio iónico, tratamientos con carbón activado o microorganismos, u otros métodos de fraccionamiento (Sanz y otros, 2010).

Para determinar los azúcares totales en los oligosacáridos se utilizan técnicas enzimáticas antrona-sulfúrica y dinitro-salicílica. Sin embargo, los métodos que se utilizan con más frecuencia para la evaluación cualitativa (estructura) y cuantitativa (concentración) de

prebióticos incluyen enfoques cromatográficos de gases líquidos, electroforéticos, espectrométricos o espectroscópicos. La alta sensibilidad, selectividad y poder de resolución son características del método de cromatografía de gases (CG), lo que unido a la conexión con espectrómetros de masas lo convierte en un método flexible para el estudio de los prebióticos (Hernández y otros, 2012).

Los tetrasacáridos, que son carbohidratos de bajo peso molecular, se analizan por cromatografía de gases utilizando columnas de metilpolisiloxano (Cardelle y otros, 2009). También se utiliza para determinar la composición monomérica de oligo- y polisacáridos mediante procesos de hidrólisis ácida y enzimática seguidos de derivatización de los monosacáridos liberados. Sin embargo, el uso de columnas con grupos carbonados presentes en la estructura principal de polisiloxano, resistentes a altas temperaturas, permite extender su aplicación a oligosacáridos con DP (grado de polimerización) hasta 8 (Marry y otros, 2003)

Cabe destacar el uso de la cromatografía de gases para la investigación estructural de prebióticos de alto peso molecular. La derivatización de los carbohidratos no es necesaria para el análisis por HPLC, ya que puede realizarse tanto en precolumna como después de la separación (postcolumna) para facilitar su detección (inclusión de grupos cromóforos o fluoróforos) con luz ultravioleta o fluorescencia e incluso la separación. La cromatografía líquida es la técnica utilizada para el análisis de oligosacáridos prebióticos debido a su gran versatilidad y múltiples modos de operación (mayor retención y resolución).

Además, se utilizan la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC) y la cromatografía de intercambio iónico-cromatografía de exclusión molecular. Para el análisis de oligosacáridos prebióticos se utilizan detectores de índice de refracción (RID), detectores de dispersión de luz

por evaporación (ELSD) y detectores amperométricos de pulso (PAD), este último empleado para la HPAEC (Hernández et al., 2012).

El grado de polimerización de los oligosacáridos y sus enlaces glicosídicos pueden evaluarse mediante HPLC y espectrometría de masas en combinación (Hernández et al., 2012). La espectrometría de masas (EM), un método para caracterizar los prebióticos, se utiliza junto con la GC o la HPLC (Dreisewerd y otros, 2006).

Un método para caracterizar las características estructurales de los carbohidratos prebióticos es la resonancia magnética nuclear (RMN). Los carbohidratos prebióticos pueden caracterizarse de forma precisa y eficaz mediante varias formas de RMN basadas en la relajación de espín nuclear, constantes de acoplamiento escalares o dipolares y simulaciones de dinámica molecular (Kajihara & Sato, 2003).

2.1.5. Cromatografía líquida de alta performance

La cromatografía líquida de alta resolución se conoce como HPLC. La cromatografía es un proceso de separación, un cromatograma es el producto final y un cromatógrafo es el equipo utilizado para llevar a cabo la cromatografía.

Algunos de los elementos esenciales de los cromatógrafos son bombas de alto rendimiento para suministrar disolvente a un caudal constante y dispositivos específicamente diseñados para la separación molecular denominados columnas. La tecnología antes conocida como cromatografía líquida de alto rendimiento se denominaba más a menudo "LC" a medida que avanzaban las tecnologías relacionadas. En los últimos años también se ha popularizado un método analítico de alta velocidad conocido como cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC).

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) sólo es capaz de evaluar sustancias disueltas en disolventes. Para analizar los componentes y las cantidades de cada

componente presentes en la muestra a nivel cualitativo y cuantitativo, la cromatografía líquida separa las sustancias químicas que están disueltas en una muestra. Tras atravesar el lecho de partículas y entrar en la columna por la izquierda, la fase móvil sale por la derecha. Las flechas verdes indican la dirección del flujo. La imagen superior, que representa la columna en el momento cero [la inyección], cuando la muestra entra en la columna y empieza a formar una banda, es lo primero que hay que tener en cuenta. En la entrada de la columna puede verse una única banda negra en la muestra, que es una mezcla de colores amarillo, rojo y azul. En realidad, la muestra puede ser cualquier cosa que pueda disolverse en un disolvente; normalmente, los compuestos serían incoloros y la pared de la columna opaca, por lo que necesitaríamos un detector para observar los compuestos separados a medida que eluyen.

Cuando la fase móvil ha pasado por las partículas del material de relleno de forma constante y continua durante unos minutos se puede observar que los colorantes individuales se han desplazado en bandas distintas a diferentes velocidades. Esto se debe a la rivalidad entre la fase estacionaria y la fase móvil por la capacidad de arrastrar cada uno de los colorantes o analitos. La banda del colorante amarillo es la que se desplaza más rápidamente y está lista para abandonar la columna. Más que los otros colores, el colorante amarillo prefiere o es atraído por la fase móvil. Como resultado, viaja más rápidamente, asemejándose más a la fase móvil. La banda de colorante azul prefiere el material de relleno a la fase móvil. Se desplaza más lentamente debido a la mayor atracción que ejerce sobre las partículas. En otras palabras, es el componente de esta combinación de muestras que más se mantiene. La banda de colorante rojo atraviesa la columna a una velocidad moderada porque tiene una atracción moderada por la fase móvil. Podemos separar cromatográficamente cada banda de colorante porque cada banda de colorante viaja a un ritmo distinto contando con tiempos de retención diferenciados, esto es en cromatografía líquida.

2.1.6. *Samallanthus sonchifolius* “yacón”

El yacón, un cultivo domesticado originario de los Andes, se describe como una planta herbácea de hasta 2 metros de altura con tallos cilíndricos, hojas enteras, inflorescencias pecioladas e inflorescencias capitulares. También contiene raíces tuberosas (figura 2) que almacenan azúcares muy útiles para la salud (Álvarez y otros, 2019). Los valles interandinos son los de mayor producción porque ofrecen suelos francos, con buen drenaje, altos niveles de materia orgánica y temperaturas entre 14 °C y 20 °C. Esta especie puede ser cultivada en pequeños huertos familiares sin un manejo agronómico complejo y es susceptible de ser cultivada en diferentes pisos ecológicos de costa, sierra y selva (Valderrama, 2005). El yacón es propagado históricamente por los agricultores mediante propágulos o rizóforos, los cuales son recuperados después de las cosechas y extraídos de las partes que deben tener cuatro o más brotes (Ministerio de Agricultura y Riego, 2019).

Figura2

Raíces reservantes de yacón



Taxonomía

Su clasificación botánica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Género: *Smallanthus*

Especie: *Smallanthus sonchifolius*

(Poepp. y Endl.) H. Rob., 1978

Nombre vulgar: “yacón” ó “llacón”

Se han identificado más de 25 especies en todo el continente americano, incluido el sur de México, América Central y los Andes (Colombia, Ecuador, México, Perú, Bolivia y Argentina).

Yacón es el nombre dado a la planta *Smallanthus sonchifolius*, un alimento popular en Sudamérica y un tubérculo vegetal (similar a la patata). Tiene aspecto de patata dulce y sabor a pera. Mientras que el tubérculo se utiliza en la cocina, el sirope de yacón, elaborado a partir del tubérculo, es un edulcorante sustitutivo.

Debido a su contenido en fructooligosacáridos (FOS), esta hortaliza recibe a veces el nombre de "patata dietética". Los FOS tienen un efecto prebiótico, mejoran la salud intestinal y pueden tener un pequeño efecto supresor del apetito en las personas obesas, lo que disminuye el consumo de alimentos. Se considera un suplemento dietético beneficioso y, dado que el sirope de yacón es naturalmente dulce, puede ser una de las fuentes más viables

económicamente de FOS dietéticos debido a sus bajos costes de fabricación y su alto rendimiento.

Actualmente existen pocas investigaciones sobre el yacón en humanos. Una investigación sugiere que el yacón tiene un impacto en la pérdida de peso, que puede ser provocada por una disminución de la ingesta calórica, mientras que otro encontró que el yacón tiene una función antimotilidad (ralentizando el tiempo de tránsito intestinal), que se sabe que suprime ligeramente el apetito. Se supone que estas características, comparables a las ventajas de los FOS de otras fuentes, están relacionadas con la composición de los FOS.

Los estudios realizados en roedores indican una mayor absorción de minerales por el colon, lo que es favorable para la salud ósea, así como una proliferación de las bacterias "buenas" del colon en consonancia con los efectos prebióticos del yacón. Estas características aún no se han demostrado en los seres humanos, pero se supone que existen ya que se ha informado de ellas en individuos expuestos a FOS de cualquier otra fuente.

Las hojas de yacón se utilizan para preparar un té que algunos afirman que tiene propiedades antidiabéticas. No existen pruebas humanas que respalden esta afirmación y, dado que se supone que la lesión renal es la causa de las supuestas propiedades antidiabéticas del té (el daño renal tiende a reducir los niveles de glucosa en sangre), no se aconseja beber el té.

Por su contenido en fructooligosacáridos (FOS), el yacón (*Smallanthus sonchifolius*), un tubérculo de sabor dulce cultivado en la cordillera de los Andes, se considera una comida funcional (Simanca y otros, 2021). Pertenece a la familia botánica de las asteráceas y se cree que es una fuente de prebióticos porque contiene sustancias bioactivas como los fructooligosacáridos (FOS), que han demostrado tener efectos positivos sobre el intestino y la salud de animales con cáncer colorrectal inducido (Fernández y otros, 2013).

El yacón, que significa agua insípida en quechua, también se conoce como "patata dietética" en Brasil, "aricoma" o "jícama" en Perú y Ecuador, y "yacón fresa" en Estados Unidos (Almeida y Abranches, 2015). Se cultiva en países sudamericanos como Brasil, Argentina, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. Además, se cultiva en EE.UU., China, Japón, Nueva Zelanda, Filipinas, Rusia, Corea del Sur y la República Checa (Kim et al., 2012).

La piel de la fruta puede ser marrón, rosa, violeta, crema, blanco marfil o blanca con estrías púrpuras. Las raíces de los frutos pueden ser blancas, crema, blancas con estrías moradas, blancas, rosadas o amarillas (Huaycho y otros, 2016). Las hojas se toman crudas y se añaden a ensaladas, jugos, copos secos, harinas y jarabes. También se utilizan en la medicina tradicional china para tratar enfermedades hiperglucémicas de diabetes mellitus (Costa y otros, 2020).

Dado el valor nutricional de las raíces de yacón, su composición en cuanto a FOS, puede ascender del 40-70% de la materia y dentro de estos el FOS esencial es la inulina, que alcanza el valor del 20% en peso seco; el yacón es un producto potencial que se está posicionando en el mercado de los alimentos funcionales (Paredes y otros, 2018).

2.1.7. Beneficios del *Smallanthus sonchifolius* "yacón"

La creciente preocupación por la salud pública y planetaria en relación con un suministro sostenible de alimentos está impulsada por la cultura alimentaria, las prácticas alimentarias y los hábitos dietéticos. El consumo de alimentos vegetales con efectos fisiológicos y bioquímicos beneficiosos está aumentando en todo el mundo (Días et al 2019).

Los tubérculos y las hojas del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) se utilizan para elaborar diversos productos, como jarabe, polvo y tisanas. Estos productos están avalados por la investigación científica. El yacón se considera un alimento funcional debido a la presencia de componentes biológicamente activos que pueden proporcionar ventajas fisiológicas superiores

a las de las necesidades nutricionales básicas para reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Buitron et al., 2018).

El yacón es una fruta sudamericana que actualmente se consume en varias naciones, entre ellas China, Japón y Corea del Sur, aunque sigue siendo un producto relativamente nuevo en el mercado internacional. Sus numerosos componentes bioactivos están estrechamente relacionados con sus cualidades saludables.

Los beneficios biológicos del yacón sobre la gestión de la glucemia, así como su disminución del colesterol plasmático y de las lipoproteínas de baja densidad, han sido demostrados en estudios in vivo en modelos animales. Actualmente existen pocas investigaciones clínicas con sujetos humanos. Algunos estudios han demostrado que el consumo de yacón tiene efectos beneficiosos para la salud, como la mejora de la inmunidad en niños pequeños, el control de la diabetes en ancianos, el control del peso y la prevención de la obesidad en adultos con sobrepeso. Todos estos efectos se han relacionado con la presencia de fructooligosacáridos (FOS) e inulinas. Además, el yacón tiene perspectivas potenciales en la creación de alimentos frescos y usos dietoterápicos novedosos (Días et al., 2019).

El yacón es un vegetal con mínimo contenido graso y calórico que se clasifica como alimento dietético por contener 49% de inulina y 25% de fructosa (Velásquez, 2011). La capacidad de nutrir y prevenir enfermedades hace necesaria la revalorización de las raíces y hojas, clasificadas como alimento funcional y/o nutracéutico por sus cualidades antioxidantes, hipoglucemiantes y antibacterianas (Gil y otros, 2019). Otros beneficios terapéuticos son la reducción del colesterol y la prevención de la producción de radicales libres por su alto contenido en antioxidantes (Díaz y otros, 2019).

Además, hace que el páncreas produzca más insulina y disminuye los niveles de glucosa en sangre (González, 2017). Son beneficiosas para personas con diabetes, obesidad y

problemas de osteoporosis debido a los hidratos de carbono no digeribles que contienen, como los fructooligosacáridos, que también permiten bajar los niveles de glucosa en sangre. Se ha demostrado que los fructooligosacáridos actúan como alimentos prebióticos al promover el crecimiento de microbios sanos en el tracto digestivo, regular los niveles de colesterol en sangre, favorecer la absorción del calcio y reforzar el sistema inmunitario. Se considera un cultivo prometedor, y como resultado de la creciente demanda de los consumidores, la producción se ha expandido (Magallanes y otros, 2017) (Ministerio de Agricultura y Riego, 2019)

2.1.8. *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis, es una α -proteobacteria que interesa a la industria de los biocombustibles por sus rendimientos altos de fermentación de etanol. Desde su primera descripción como aislado bacteriano en bebidas alcohólicas fermentadas ha sido estudiado. La vía glucolítica de Entner-Doudoroff en la *Z. mobilis* ha permitido realizar estudios bioquímicos, despertando el interés en el procesamiento de etanol para la fabricación de productos químicos de valor agregado como los bioles.

El modelado metabólico del comportamiento de la *Z. mobilis* ha logrado la optimización de los circuitos bioquímicos esto ha logrado que se establezcan los rendimientos deseables del producto final. Es importante resaltar en esta bacteria la capacidad que presenta sus paredes celulares sobre la tolerancia al estrés oxidativo del alcohol, determinando el rendimiento biocatalítico importante. A nivel genético, los avances en la ingeniería genética de la *Z. mobilis* ha hecho que se establezcan manipulaciones beneficiosas, por ejemplo, silenciamiento y sobreexpresión de genes, con el objetivo de ampliar el repertorio metabólico y aumentar la robustez de sus paredes celulares (Kalnieks y otros, 2020).

Z. Mobilis, son bacterias gram (-) anaeróbicas capaces de degradar azúcares en productos como etanol, ácido láctico y dióxido de carbono a partir de la síntesis del piruvato, el cual, mediante la ruta metabólica de Entner-Doudoroff (figura 3), ésta se encarga del catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa, en piruvato el cual mediante un proceso de descaboxilación desarrollado por la enzima piruvato descaboxilasa, pasa a formar etanol. Este metabolismo central de la biosíntesis de *Z. mobilis* provee dos moles de Adenosina trifosfato (ATP) por cada mol de glucosa consumida para el proceso de fermentación.

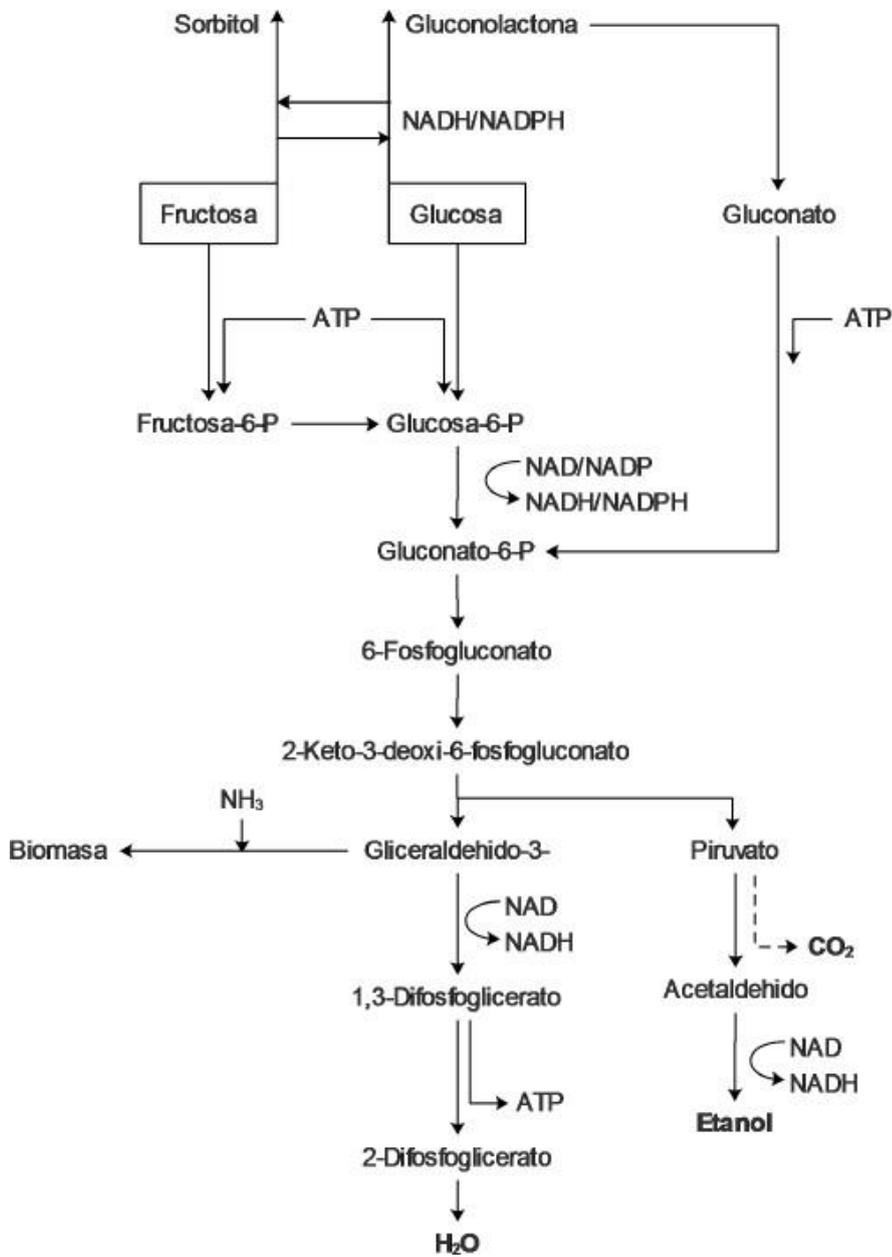
Z. Mobilis tiene varias ventajas sobre la levadura *S. cerevisiae*, incluyendo condiciones anaeróbicas que aseguran la viabilidad del microorganismo, mayor eficiencia en el consumo del sustrato limitante y en la generación de productos, y una mayor tolerancia al etanol. El promedio reportado para el cultivo en modo continuo es de 85 g/L y la productividad estimada para este tipo de cultivo está en el rango de 120-200 g/h comparado con el rango de 30-40 g/h reportado para las levaduras.

Zymomonas mobilis incluye dos subespecies; *Z. mobilis* y *Z. mobilis pomacea* y fue descubierto por primera vez en 1911 por Barker y Hillier. Son bacterias anaerobias selectivas y Gram (-), crecen a una temperatura de 25-31 ° C y su crecimiento disminuye a 15 ° C. La bacteria *Z. mobilis* se utiliza en la producción de etanol en los últimos años y hay estudios que indican que esta bacteria reemplazó a la *S. cerevisiae* en la producción de bioetanol (Hassan & Gddoa, 2021).

La tasa de producción de etanol se ve afectada por varios factores, como la acidez, la temperatura y la concentración del sustrato en el medio de fermentación. Se ha observado en algunos estudios la posibilidad de crecimiento bacteriano en un rango de temperatura de 25-42 ° C (Farkas y otros, 2020)

Figura3

Metabolismo central de Z. mobilis para la producción de etanol (ruta de Entner-Doudoroff).



Síntesis del piruvato por la ruta de Entner-Doudoroff adaptado de (Veeramallu & Agrawal, 1990)

2.2. Antecedentes empíricos de la investigación

Catenza y Donkor (2021) realizaron un estudio con el objetivo de efectuar el análisis cuantitativo de oligosacáridos funcionales utilizados en la industria alimentaria, en donde los oligosacáridos funcionales son varias clases de carbohidratos con acción prebiótica que proporcionan una serie de ventajas para la salud. Los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos, dos oligosacáridos muy utilizados, se emplean en diversos productos, desde lácteos y panadería hasta componentes alimentarios para imitar la acción prebiótica de los oligosacáridos de la leche humana (HMO) en los preparados para bebés. Aunque su consumo se relaciona con una serie de beneficios para la salud, una ingesta excesiva puede provocar dolor intestinal y empeorar los síntomas del síndrome del intestino irritable. Por lo tanto, es crucial proporcionar métodos rápidos y fiables de cuantificación de los oligosacáridos para el control de calidad y la evaluación precisa de su rendimiento en alimentos y productos alimentarios.

Reis et al. (2021) en su estudio Efecto de los métodos de procesamiento en raíces de yacón y propiedades de sus compuestos que promueven la salud, se plantearon como objetivo evaluar los efectos de los métodos de procesamiento sobre los componentes beneficiosos para la salud en raíces de yacón, donde demostraron que las raíces de yacón contienen cantidades importantes de fructanos que son sustancias prebióticas y además compuestos fenólicos que son antioxidantes. Los alimentos de origen vegetal presentan una vida útil corta. En el caso del yacón, el almacenamiento en fresco provoca una rápida despolimerización de los fructanos. Por ello, en los últimos años se han hecho muchos intentos de prolongar la vida útil de las raíces del yacón. Además, analizaron las propiedades saludables de los productos a base de yacón, como la actividad enzimática, la cantidad de antioxidantes, la inhibición de la peroxidación lipídica y otros parámetros metabólicos que reflejan la salud intestinal. El referido estudio ofrece una visión general del impacto del procesado en la retención/concentración de

compuestos beneficiosos para la salud. Los productos a base de yacón con valores más altos de propiedades beneficiosas para la salud. Los resultados muestran que la retención de fructanos fue superior cuando se utilizó el secado por aire caliente precedido del escaldado con sales y ácidos. El contenido fenólico en sólidos fue mayor cuando se utilizó el secado por atomización. El contenido fenólico en líquidos fue mayor cuando se utilizó el escaldado combinado con adición de ácido lactobiónico al zumo. Además, los productos a base de yacón, especialmente las harinas, promueven la salud intestinal al afectar a parámetros metabólicos como el recuento microbiano, el contenido de ácidos grasos de cadena corta, la expresión de enzimas antioxidantes y la respuesta glucémica postprandial.

Peña & Zavaleta (2020), en la investigación optimización de la producción de fructooligosacáridos a partir del extracto de algarrobo utilizando fructosiltransferasas, para lo cual se optimizó los parámetros que afectan la producción como: tiempo, temperatura y extracto de algarrobo; en el proceso de biosíntesis de FOS se realizó con extracto de algarrobo a las concentraciones de 20, 35 y 50 °Brix, pectinasa a 10, 35 y 61

mg, a 45, 55 y 65 °C durante 0,5; 9,5 y 18 h, con agitación a 150 rpm., siendo las condiciones óptimas extracto de algarrobo 35 °Brix, pectinasa 35 mg, 54 °C, 150 rpm y

12 h y el rendimiento experimental en el extracto transformado fue FOS 16,1 % cuantificados por HPLC.

Wienberg et al. (2020) realizaron un estudio con el objetivo de aplicar el método de alta resolución para el análisis isocrático por HPLC de fructooligosacáridos de tipo inulina, en donde las estrategias para mejorar la salud humana modificando la microbiota intestinal han evolucionado rápidamente en las últimas décadas. La síntesis de oligosacáridos prebióticos implica una amplia investigación sobre métodos de fabricación eficaces, incluida la utilización de enzimas microbianas. Existen numerosas inulosucrasas del género *Lactobacillus* que pueden

producir fructooligosacáridos prebióticos del tipo inulina (inulina-FOS). En este trabajo, se logró la síntesis eficiente de inulina-FOS utilizando una forma acortada de la inulosucrasa de *Lactobacillus gasser* DSM 20604. La inulina-FOS puede analizarse rápidamente en modo isocrático utilizando un enfoque de HPLC que ahorra tiempo y recursos y que permite el análisis separado de la línea base de la inulina-FOS hasta un grado de polimerización de cinco en menos de seis minutos. El análisis de inulina-FOS de cadena larga con 17 requiere menos de 45 minutos. El nuevo

método ofrece las ventajas de los análisis isocráticos por HPLC, como los bajos caudales, la excelente sensibilidad y el uso de una configuración cromatográfica sencilla y asequible. Además, ofrece una separación de inulina-FOS de cadena larga con gran resolución, lo que normalmente sólo es posible con técnicas de gradiente.

Aponte (2000), evaluó *in silico*, la dinámica del crecimiento y competencia de dos cepas del organismo *Zymomonas mobilis* en un proceso fermentativo, desarrollo un modelo matemático multipoblacional basado en la transferencia de masa del quimiostato para un proceso fermentativo denominado modelo A, su implementación para dos cepas de *Zymomonas mobilis* (ZM1 y ZM4) y las posibles implicaciones en la estabilidad y el control del proceso. En el estudio fue sobre producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas por *Zymomonas mobilis* y utilizado en la producción de vinagre. (falta resultado)

Mientras que, Hassan y Gddoa. (2021), utilizaron residuos agrícolas ricos en azúcares y carbohidratos complejos lo que los convierte en una fuente adecuada para realizar el proceso de fermentación, para ello utilizaron la bacteria *Zymomonas mobilis* para la producción de bioetanol, produciendo 5 a 10 veces más capacidad para producir bioetanol en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Tian et al. (2019) investigaron un método enzimático eficaz para producir jarabe con alto contenido en fructooligosacáridos (FOS) y altamente antioxidante utilizando la raíz de bardana como materia prima. Resultados: El pretratamiento con tanasa multiplicó por 2,8 la producción de FOS, mientras que la endo-inulinasa aumentó drásticamente por 2,4 el rendimiento de FOS. Otras enzimas, como la endo-poligalacturonasa, la endo- glucanasa y la endo-xilanasa, aumentaron el rendimiento de azúcar soluble total en un 11,1% (p/p). Este procedimiento condujo al desarrollo de un nuevo método enzimático para elaborar jarabe de bardana, que aumentó su rendimiento en un 25% (p/p). En cambio, los FOS aumentaron las cantidades de azúcares solubles totales, proteínas solubles totales y polifenoles solubles totales hasta el 28,8%, 53,3%, 8,9% y 3,3% (p/p), respectivamente. Además, la capacidad antioxidante total del jarabe aumentó un 35,4%, un 51,8% y un 23,7%, respectivamente, al igual que su capacidad para eliminar los radicales hidroxilos y DPPH. Concluyeron que sus hallazgos podrían utilizarse para crear estrategias eficaces mediadas por enzimas para la extracción de compuestos valiosos a partir de recursos agrícolas. (confusión)

Kuhn et al. (2014) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la separación de fructooligosacáridos mediante una columna de lecho fijo con carbón activado, en donde el uso de carbón activado, un material potencial de bajo coste para la separación de azúcares, incluidos los fructooligosacáridos, puede mejorar la separación cromatográfica de mezclas de sacáridos. En este trabajo se propone una tecnología para emplear una columna de lecho fijo rellena de carbón activado para separar los fructooligosacáridos de la glucosa, la fructosa y la sacarosa. Para mejorar la eficacia de la separación y la pureza de los fructooligosacáridos, se investigaron los gradientes de paso, la temperatura y la concentración de eluyente. El grado final de purificación de fructooligosacáridos y la eficacia de separación, utilizando una concentración de gradiente de etanol que oscilaba entre el 3.5% y el 15% (v/v) a 40 °C, fueron de aproximadamente el 94.0% y el 3.03 %, respectivamente. Así quedó demostrado que la

columna de lecho fijo rellena de carbón activado es una opción potencial para la separación de azúcares, particularmente para soluciones con niveles aceptables de contenido de fructooligosacáridos.

Benkeblia (2013) realizó un estudio con el objetivo de analizar los fructooligosacáridos y fructanos en plantas y cultivos alimentarios, es este estudio se puede apreciar numerosas técnicas cromatográficas conjuntamente con sus parámetros de trabajo y así obtener los FOS; sin embargo, la mayoría de estas técnicas son costosas por el componente de equipamiento, requieren mucho tiempo y suponen un mano de obra capacitada.

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

Los sistemas de fermentación del extracto concentrado de yacon utilizando cultivos libre e inmovilizado de *Z. mobilis* permiten obtener FOS purificados.

2.3.2. Hipótesis específicas

El extracto concentrado de yacon presenta características fisicoquímicas propias

Existe diferencia entre los sistemas de fermentación con cultivo libre e inmovilizado de *Z. mobilis* en la separación de los FOS con menor concentración de azúcares reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa.

2.4. Identificación de variables

VARIABLES INDEPENDIENTES

Extracto de yacon concentrado con 15, 20 y 25 oBrix

Sistema de cultivo: libre e inmovilizado

VARIABLE DEPENDIENTE

Concentración de azúcares reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa

VARIABLE INTERVINIENTE

Grado de purificación de los fructooligosacáridos

2.5. Operacionalización de variables

Tabla1

Operacionalización de variables

VARIABLES		DEFINICION	INDICADORES	INDICE
VARIABLE INDPENDIENTE	Extracto concentrado de yacon (ECY)	El extracto concentrado de yacon es el resultado de evaporar agua mediante el rotavapor para incrementar su concentración	15, 20 y 25	°Brix
	Sistema de cultivo inmovilizado	Sistema de producción de metabolitos por fermentación del (ECY) utilizando precultivo de bacterias inmovilizadas en alginato de sodio	Rendimiento del consumo de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa)	Batch
	Sistema de cultivo libre	Sistema de producción de metabolitos por fermentación del (ECY) utilizando precultivo de bacterias sueltas en un medio de cultivo	Rendimiento del consumo de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa)	Batch

VARIABLE DEPENDIENTE	Concentracion de azucares reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa	Solucion que contiene cantidades suficientes de azucares reductores y sacarosa como fuentes de carbono para las bacterias <i>Zymomonas mobilis</i> en el proceso de fermentación del ECY, con 15, 20 y 25 °Brix	Disminucion de la concentracion de azucares reductores y sacarosa. Glucosa Fructosa Sacarosa	g/100 mL g/100 mL g/100 mL
VARIABLE INTERVINIENTE	Grado de purificación de FOS	Grado de purificación de FOS por efecto de la disminución de azucares reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa	FOS purificados	g/100 mL

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1. Ámbito de estudio: localización política y geográfica

La investigación de desarrollo en las instalaciones de la Planta Piloto de Jugos y conservas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

El proceso de fermentación y la cuantificación de los azúcares reductores se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Biología en la Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Tipo y nivel de investigación

Con el fin de purificar el extracto de yacón concentrado para obtener fructooligosacáridos utilizando *Zymomonas mobilis*, se realizó un estudio experimental con dos sistemas de cultivo (cultivo libre e inmovilizado), con un diseño comparativo sobre la eficiencia de consumo de azúcares reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa por la bacteria antes mencionada.

3.3. Unidad de análisis

3.4. Población de estudio

Raíces de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) obtenidas del Centro Internacional de la Papa.

3.5. Tamaño de muestra

Para este estudio se utilizó 5 kg de *Smallanthus sonchifolius*.

3.6. Técnicas de selección de muestra

Diseño de la investigación

El diseño comparativo para cuantificar la concentración de los fructooligosacáridos

CEY1 CL FOS1 CAR1

CEY2	CL	FOS2	CAR2
CEY3	CL	FOS3	CAR3
CEY1	CI	FOS1	CAR1
CEY2	CI	FOS2	CAR2
CEY3	CI	FOS3	CAR3

CEY : Concentración de sólidos solubles en el extracto de yacon (°Brix)

CL : célula libre

CI : célula inmovilizada

CAR : concentración de azúcares reductores y sacarosa

1 : 15 oBrix

2 : 20 oBrix

3 : 25 oBrix

3.7. Técnicas de recolección de información

Materiales, reactivos e instrumentos de laboratorio

4.6.1. Materiales

Algodón

Asa de Kolle

Balón de gas propano

Erlenmeyers de 250 mL.

Frascos de vidrio con tapón de jebe y precinto de seguridad de 1000 mL.

Gradillas.

Jeringas estériles de 1 mL

Mechero

Pipetas de 5 y 10 mL

Termómetro

Tubos de prueba de 10 y 20 mL

4.6.2. Reactivos

Ácido ascórbico (Sigma Aldrich)

Agar (Merck).

Agua destilada

Alginato de sodio (Sigma Aldrich)

Bisulfito de sodio (Merck).

Cloruro de calcio (Baker T)

Cloruro de sodio (PharmaGen)

D(+) fructosa anhidra (Sigma Aldrich)

D(-) glucosa anhidra (Merck)

Dinitro salicílico 3,5 (DNS) (Sigma Aldrich)

Enzima inulinasa (Merck)

Extracto de levadura (Merck)

Fosfato dibásico de potasio (Sigma Aldrich)

Hidróxido de sodio (Merck)

Peptona de caseína (Difco)

Placas cromatográficas de aluminio. TLC 25. Silicagel 60 F254.

Sulfato de amonio (Sigma Aldrich)

Sulfato de magnesio heptahidratado. PharmaGen

Tartrato de sodio y potasio (Riedel de Haen)

4.6.3. Instrumentos y equipos

Agitador magnético (CAT M6/1).

Autoclave vertical (Fimet).

Balanza analítica (Ohaus).

Baño maría (Mettler).

Bomba de vacío (Vacubrand)

Bomba peristáltica (Masterflex L/S).

Cámara de flujo de aire laminar C4 (Modelo Flor 100V).

Centrífuga con sistema de autorrefrigeración modelo Mikro 22R. (Hettich Zentrifugen).

Cromatografo liquido de alta performance HPLC Agilent 1260 infinity, con automuestreador.

Columna AMINO APS para carbohidratos FASE REVERSA 25 cm tamaño de partícula de 5 μm

Cocina eléctrica (Insegesa).

Estufa al vacío (Labor Muszeripari. Muveck. Tipo LP 400).

Estufa (Mettler).

Micropipeta 100 – 1000 μL . Brand.

Micropipeta 5 – 50 μL . Wheaton. Aldrich.

Potenciómetro digital (Hanna Instruments. Modelo 8417).

Refrigeradora – congeladora (Coldex).

Concentrador de Bolas de 50 litros con columna de condensados de acero inox (Rossi catelli)

4.6.4. Material biológico

Zymomonas mobilis (Cepa identificada de acuerdo al manual de Bergey, s en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga), con las siguientes características:

Características macroscópicas: colonias incoloras circulares y cremosas. Características microscópicas: Coco bacilos formado en pares e impares Producción de olor a fruta en medio Estándar.

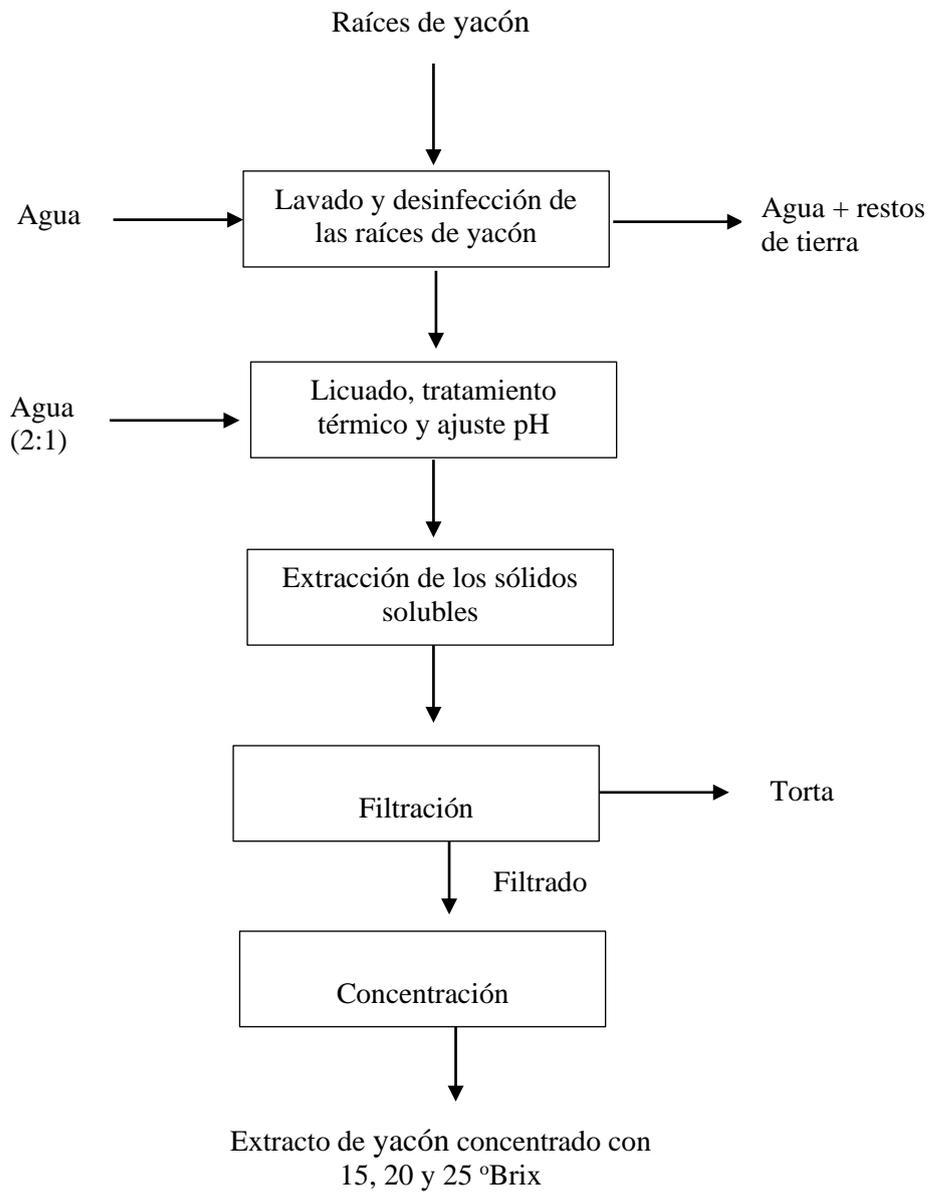
Fuente de carbono: D-glucosa, D-Fructosa.

4.6.5. Proceso de obtención del extracto de yacón concentrado

La descripción del proceso de obtención del extracto de yacón es de acuerdo al siguiente diagrama de flujo cualitativo (figura 4)

Figura 4

Diagrama de flujo cualitativo para la obtención del extracto de yacón concentrado



Lavado y desinfección de raíces. Las raíces de yacón enteras se lavaron con agua para eliminar residuos de tierra y otras impurezas. Las raíces de yacón sin pelarlas, se cortan en pequeños cubos de aproximadamente 2 cm.

Licuada, tratamiento térmico y ajuste de pH. Antes de someter los trozos al licuado, se prepara una solución que consiste en:

Agua destilada : debe duplicar la cantidad de la materia prima.

Ácido ascórbico : 0.25 %

Bisulfito de sodio : 0.01 %

En la solución preparada se sumergieron los pequeños trozos, y se procedió con la licuación hasta obtener una suspensión homogénea. La suspensión se calienta hasta 90 °C, y se mantuvo a esta temperatura 1 min. Luego de enfriar la suspensión, se proceda a ajustar el pH a 6.5.

Extracción de sólidos solubles. La extracción se realizó en una tina de lavado de acero inoxidable de capacidad de 50 L, donde por medio de agitación continua 120 rpm y a una temperatura de 70 °C durante 10 min.

Filtración. Luego de enfriar la suspensión se procedió a filtrar, utilizando papel y una malla metálica de tamaño de poro de 0.04 mm

Concentración. El producto filtrado fue alimentado a un rotavapor, donde se aplicó vacío y se trabajó por espacio de dos a tres horas a una temperatura de 50 °C hasta obtener las tres concentraciones de 15, 20 y 25 °Brix.

4.6.6. Proceso de fermentación con célula libre

Ajuste de pH. Al extracto de yacón (con 15, 20 y 25 oBrix) se le ajustó el pH a la operación de fermentación (pH = 6.5).

Pasteurización. El concentrado se calentó hasta 85 °C, y se mantuvo a esta temperatura 5 minutos, para eliminar cualquier microorganismo presente, para poder posteriormente inocular con la cepa de *Z. mobilis*. El concentrado se atemperó hasta 37°C que fue la temperatura de operación de la fermentación.

Fermentación. El proceso de fermentación con célula libre de *Zymomonas mobilis* se realizó en tres etapas: Preparación de precultivo, inoculación del cultivo y finalmente la Fermentación.

a) Primera Etapa: Preparación del precultivo

Para esta primera etapa se hizo un crecimiento de la biomasa de la bacteria con este fin se siguieron los siguientes pasos:

a.1. Preparación de Medio de crecimiento. El medio de crecimiento para *Zymomonas mobilis* consistió en: Glucosa 100 g/L; extracto de levadura, caseína pancreática, MgSO₄.MgSO₄.7H₂O, (NH₄)₂ SO₄, K HPO₄.3H₂O (2g/L).

a.2. Esterilización. El medio de crecimiento se esterilizó a 121 °C durante 15 min previa regulación del pH a 6.5.

a.3. Atemperado. El medio de crecimiento (caldo de cultivo) se atemperó hasta la temperatura de incubación (37 oC).

a.4. Crecimiento de biomasa. Las *Z. mobilis* previamente activadas se inocularon en el medio de crecimiento y se procedió a fermentar a 37 °C por 12 horas.

a.5. Obtención del precultivo. Transcurrido las 12 horas de fermentación, las células se pudieron desarrollar, y quedaron listas para la fermentación del extracto de yacón.

b) Segunda etapa: Inoculación del precultivo.

A las muestras del extracto de yacón con 15, 20 y 25 °Brix se inocularon a una proporción de 5 % V/V, esto quiere decir, para una muestra de 100 mL de extracto de yacón se inocularon 5 mL de precultivo.

c) Tercera etapa: Proceso de fermentación

Se procedió con la fermentación a una temperatura de operación de 37 °C por 96 horas.

4.6.7. Proceso de fermentación con célula inmovilizada

Antes de proceder con la fermentación, en primer lugar, se obtuvieron las células inmovilizadas, de la siguiente manera:

a) Preparación del medio de crecimiento.

El medio de crecimiento para *Zymomonas mobilis* consistió en: Glucosa 100 g/L; extracto de levadura, caseína pancreática, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2 SO_4$, $K HPO_4 \cdot 3H_2O$ (2g/L).

b) Esterilización. El medio de crecimiento se esterilizó a 121 °C durante 15 min previa regulación del pH a 6.5.

c) Atemperado. El medio de crecimiento (caldo de cultivo) se atemperó hasta la temperatura de incubación de 37 °C.

d) Fermentación. Las *Z. mobilis* previamente activadas se inocularon en el medio de crecimiento y se procedió a fermentar a 37 °C por 12 horas. Transcurrido el tiempo de fermentación las células se desarrollaron hasta obtener formación de biomasa.

e) Centrifugación. La suspensión se centrifuga a 1500 rpm por 15 min, y finalmente se obtiene la biomasa.

f) Resuspensión en medio de inmovilización. Las células (biomasa) fueron resuspendidas en un medio de inmovilización. Este medio es idéntico al medio de crecimiento excepto por la reducción de glucosa a 50 g/L y la inclusión de 30 g/L de alginato de sodio.

g) Gelificación. Las células resuspendidas se añadieron gota a gota a una solución fría (aproximadamente 4 °C) de 30 g/L de cloruro de calcio. El alginato gelificó instantáneamente formando granos (perlas) de aproximadamente 3 mm de diámetro.

h) Fermentación. Las perlas se adicionaron al extracto de yacón en un porcentaje determinado (5 % P/V), y se procedió con la fermentación a la temperatura de operación de 37 °C por 96 horas.

3.8. Técnicas de análisis e interpretación de la información

a) Identificación de cepas de *Zymomonas mobilis*.

Para la identificación de la cepa siguió el procedimiento de Bergeys de 1994 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) que se basa en la clasificación por tinción Gram; identificando las características morfológicas macroscópicas y luego microscópicas del microorganismo.

1. Prueba de Indol. Se inoculó el caldo triptófano con el microorganismo en estudio y se incubó a 35 °C durante 24 horas. Al finalizar este periodo, se añadió 5 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interna del tubo. Interpretación: en caso de desarrollarse la coloración rojo intenso en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo, la prueba es positiva (+), de lo contrario, la prueba es negativa (-)

2. Prueba de citrato. Se inoculó la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico. Se utilizó un cultivo de 24 horas en un medio sólido y se incubó a 35 °C durante 4

días. Interpretación: El ensayo será positivo si se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no del viraje del indicador color azul y cuando el ensayo es negativo, hay un viraje a verde.

3. Producción de H₂S. Se inoculó los tubos de TSI (agar hierro triple azúcar) introduciendo la punta del asa recta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Luego se retiró la punta del fondo y se estrió el pico con un movimiento en zigzag. Se incubó a 35 °C durante 24 horas.

Interpretación: Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas, puede producirse H₂S por lo que la prueba será positiva (+).

4. Prueba de ureasa. Se inoculó el caldo con el cultivo puro de *Zymomonas mobilis* con la ayuda de un asa y se estrió la superficie del agar, luego se incubó a 35 °C durante 72 horas.

Interpretación: Si el caldo adquiere una coloración rojiza alcalinización e hidrólisis de urea. Si en el agar se forma una coloración rojiza indica hidrólisis de urea positiva.

5. Prueba de D-glucosa. Se inoculó el caldo con *Zymomonas mobilis* y se incubó a 35 °C durante 24 horas. Luego de la incubación se debe observar presencia de burbujas en el tubo Durham y al destapar el tubo se percibió un olor dulce intenso característico de la fermentación.

6. Prueba estándar al 0.5% de NaCl. Se inocularon los tubos estriando con movimiento en zigzag y se incubó a 35 °C por 24 horas. Interpretación: El ensayo es positivo si hay crecimiento de colonias.

7. Prueba de catalasa. Con un asa bacteriológica se extrajo de la parte central de una colonia tras 24 horas de incubación y se colocó sobre un portaobjeto. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre las bacterias. Interpretación: El ensayo es positivo si se observa formación de burbujas, por el contrario, si no hay formación de burbujas el ensayo es negativo.

b) Cuantificación de azúcares reductores, sacarosa y FOS Por HPLC

A las muestras (1.4 mL) que pasaron por el proceso de fermentación ya sea con célula libre e inmovilizado se añadió 100 µL de una mezcla de enzimas (inulina – invertasa) a la que se denominó muestra hidrolizada, por otro lado, al mismo volumen de fracción tomada (1.4 mL) se añadieron 100 µL de enzima inactiva a la que se le denominó muestra no hidrolizada, finalmente estas muestras hidrolizadas y no hidrolizadas se sometieron a baño maría a 60 °C con agitación durante tres horas. Transcurrido el tiempo de las tres horas las muestras fueron sometidas a una filtración utilizándose una membrana de PVDF Milipore antes de ser inyectadas al equipo de Cromatografía líquida de alta performance HPLC, cuyo equipo se encuentra equipado con un autoinyector, un detector de índice de refracción, una columna AMINO APS para carbohidratos fase normal de 250 mm de largo y tamaño de partícula de 5 µm y el software Empower. La fase móvil consistió en acetonitrilo al 72.5 % (v/v), a un flujo de 0.35 mL/min, durante 45 min.

Los azúcares reductores se cuantificaron por comparación de sus tiempos de retención con estándares conocidos que previamente fueron inyectados, por lo que, fue necesario el uso de curvas de calibración de glucosa, fructosa y sacarosa a diferentes concentraciones (0.125, 0.250, 0.500) y para la cuantificación de los fructooligosacáridos (FOS) se realizó en base a la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa; antes, durante y después de proceso de fermentación con célula libre e inmovilizado y fue calculada de acuerdo a lo reportado por Prosky y Hoebregs (1999).

$$F = \left[F_H - F_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right] (FC)$$

$$G = \left[G_H - G_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right] (FC)$$

$$(FOS)_T = K (G + F)$$

- F : fructosa total (g/100 mL)
- F_H : fructosa proveniente de la muestra hidrolizada por acción de la inulina (g/100 mL)
- F_{NH} : fructosa proveniente de la muestra no hidrolizada (g/100 mL)
- G : glucosa (g/100 mL)
- G_H : glucosa proveniente de la muestra hidrolizada por acción de la inulina (g/100 mL)
- G_{NH} : glucosa proveniente de la muestra no hidrolizada (g/100 mL)
- S/1.9 : fructosa liberada de la sacarosa (S)
- FC : factor de corrección (1.5/1.4)
- (FOS)_T : fructooligosacaridos totales purificados
- K : (0.925) Factor de corrección por pérdida de molécula de agua en la hidrólisis de la sacarosa.

c) Determinación de sólidos solubles

Se determinó el contenido de sólidos solubles en el extracto de yacón bruto y del extracto de yacón concentrado por el método 932.14-C de la AOAC (1995), reportándose los resultados en grados Brix. Para lo cual se colocaron unas gotas de los extractos de yacón sobre el prisma del refractómetro de mano, previamente calibrado con agua destilada y una solución de sacarosa conocida (p/p). La escala de medición muestra el porcentaje de concentración de los sólidos solubles totales contenidos en el extracto de yacón bruto y concentrados.

d) Determinación de pH

Se ajustó el pH de los extractos de yacon concentrados (con 15, 20 y 25 oBrix) para la etapa de fermentación ya sea con célula libre e inmovilizado, por el método 981.12 de la AOAC (1990). Para la obtención del valor de pH se utilizó un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 Y 10. Las mediciones fueron realizadas directamente sobre los extractos a 37 °C.

e) Determinación de acidez titulable (Método AOAC 942.15)

Una vez homogenizado el extracto de yacón, se colocó 2.00 g de este extracto en un matraz y se agregó 100 mL de agua destilada, se dejó en ebullición con agitación constante por una hora, se enfrió y se trasvasó a una fiola de 500 mL (completando con agua destilada) y se somete a una filtración. Del filtrado se tomó una alícuota de 20 mL y se valoró con solución de NaOH 0.01 N, usando 0.3 mL de indicador de fenolftaleína, observando el cambio de viraje incoloro a rosa.

f) Determinación de la biomasa libre

Para determinar la concentración de biomasa durante la fermentación se realizó por el método de pesos seco. Se tomó 10 mL de muestra (extracto de yacon con 15, 20 y 25 °Brix) en un tubo Falcon de capacidad 15 mL y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se mezcló la biomasa precipitada en el mismo tubo Falcon con 15 mL de solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %). Se homogenizó utilizando el vortex y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se mezcló la biomasa precipitada con 1 mL de solución salina. Finalmente se vertió la suspensión celular en una placa Petri de peso conocido y se colocó en una estufa (placa Petri más suspensión celular) manteniéndose a 105 °C durante 24 horas hasta obtener peso constante. La concentración celular se determinó utilizando la siguiente relación:

$$\text{g biomasa/100 mL} = \frac{(M_{p+s} - M_p)}{10 \text{ mL}} \left(\frac{1}{10} \right)$$

60

M_{p+s} : masa de la placa más suspensión microbiana después del secado (g)

M_p : masa de la placa vacía (g)

3.9. Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Procesamiento, análisis, interpretación y discusión de resultados

4.1.1. Caracterización del extracto de yacón

En la tabla 2 se muestra las características fisicoquímicas del extracto de yacón antes de su concentración.

Tabla2

Características fisicoquímicas del extracto de yacón antes de su concentración

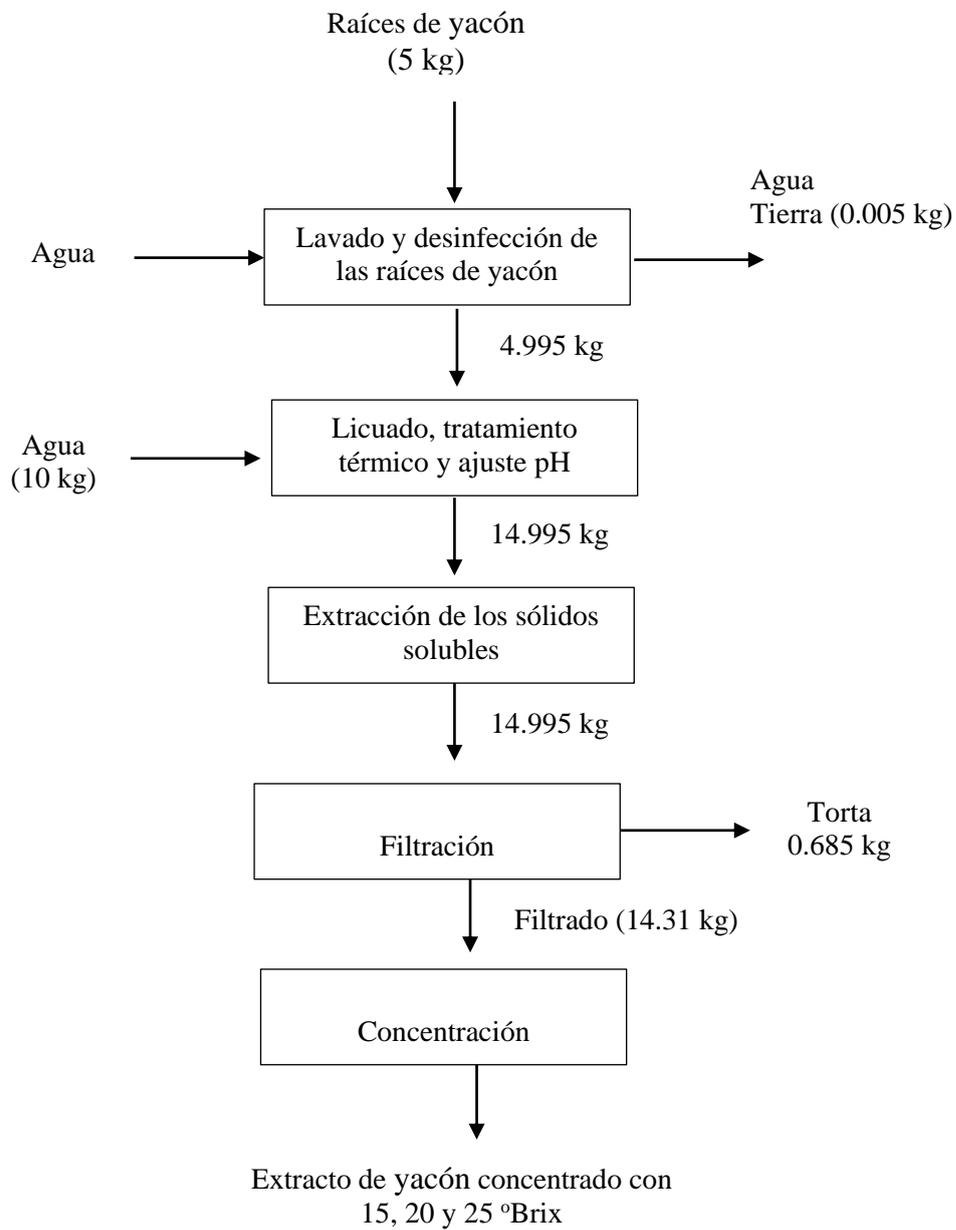
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS	VALOR NUMERICO
Sólidos solubles (°Brix)	3.50 ± 0.5
pH	6.5 ± 0.2
Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 mL)	0.34 ± 0.04

4.1.2. Rendimiento de la obtención del extracto de yacón concentrado

En el siguiente diagrama de flujo cuantitativo se muestra la obtención del extracto de yacón concentrado con 15, 20 y 25 °Brix.

Figura 5

Diagrama de flujo cuantitativo de la obtención del extracto concentrado de yacón



Balance de materia respecto a los sólidos solubles (°Brix) en el proceso de concentración para calcular la cantidad de extracto de yacón concentrado:

Para 15 °Brix

$$(14.31 \text{ kg})(3.50 \text{ °Brix}) = (A) (0) + (EY_1)(15 \text{ °Brix})$$

$$EY_1 = 3.339 \text{ kg (cantidad de extracto de yacón con } 15 \text{ °Brix)}$$

Para 20 °Brix

$$(14.31 \text{ kg})(3.50 \text{ °Brix}) = (A) (0) + (EY_1)(20 \text{ °Brix})$$

$$EY_2 = 2.504 \text{ kg (cantidad de extracto de yacón con } 20 \text{ °Brix)}$$

Para 25 °Brix

$$(14.31 \text{ kg})(3.5 \text{ °Brix}) = (A) (0) + (EY_1)(25 \text{ °Brix})$$

$$EY_3 = 2.003 \text{ kg Cantidad de extracto de yacón con } 25 \text{ °Brix}$$

Tabla 3

Rendimiento de los extractos de yacón concentrado

Extracto de yacón concentrado (°Brix)	Extracto de yacón antes de su concentración		Extracto de yacón después de su concentración	
	Cantidad (kg)	Rendimiento (%)	Cantidad (kg)	Rendimiento (%)
15	14.31	100	3.339	23.33
20	14.31	100	2.504	17.50
25	14.31	100	2.003	14.00

Al desarrollar los balances de materia con respecto a los sólidos solubles (°Brix), a partir una concentración inicial de 3.50 °Brix (sólidos solubles del extracto de yacón antes de su concentración) y una cantidad inicial de 14.31 kg, de tal forma, cuando se concentró hasta 15 °Brix se obtuvo un rendimiento de 23.33 % y la cantidad de agua liberado (evaporado) fue de 10.971 kg, finalmente, cuando se concentró hasta los 25 °Brix se alcanzó un

rendimiento de 14.00 % con una liberación de agua de 12.307 kg, en conclusión, a mayor concentración alcanzado, mayor cantidad de agua liberado, los rendimientos han disminuido tal como se aprecia en la tabla 3.

La extracción eficiente de compuestos bioactivos de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) es fundamental para aprovechar su potencial como fuente de fructooligosacáridos (FOS)., existen factores que Influyen en la Extracción de FOS, uno de ellos es el método de extracción, así la obtención de FOS requiere técnicas que preserven su integridad molecular. Métodos como extracción acuosa en frío, ultrasonido asistido o ultrafiltración minimizan la hidrólisis de estos oligómeros, para el yacón el contenido de rendimiento de extracto oscila valores entre 15-25% para extractos acuosos crudos. La pureza de FOS requiere etapas adicionales (ej. cromatografía), reduciendo el rendimiento final a 5-10% pero aumentando su valor funcional (Campos et al., 2012). Al respecto en este trabajo se obtuvo valores de 23, 17 y 14 % de rendimiento de extracto acuoso crudo, valores que se ajustan a lo reportado en la bibliografía.

4.1.3. Identificación de la cepa de Zymomonas mobilis.

Las *Zymomonas mobilis* como bacterias gram negativas alcanzaron dimensiones en longitud de 2 a 4 μm y un ancho de 1 a 1.5 μm , habitualmente se encuentran en pares y ocasionalmente de manera individual tal como se aprecia en la figura 7.

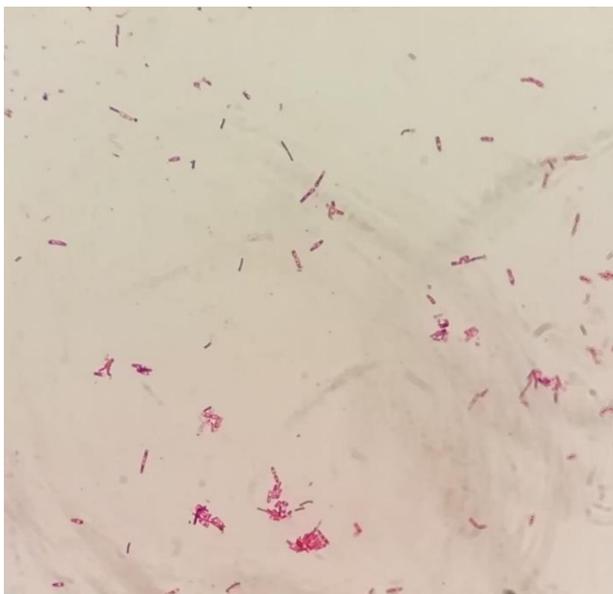
Figura 6

Zymomonas mobilis en agar WL



Figura 7

Observación microscópica (100 %) de *Zymomonas mobilis*



En la tabla 4, se detallan las características bioquímicas de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

Tabla ... Características bioquímicas de *Zymomonas mobilis*

CEPA : *Zymomonas mobilis*

Código : 2pzm

Tabla 4

Características bioquímicas de Zymomonas mobilis

Características Bioquímicas	Reacción
Características macroscópicas	Colonias incoloras y cremosas (Fig. 6)
Características microscópicas	Coco bacilos formado en pares e impares (Fig. 7)
Producción a olor a fruta en medio estándar	(+)
Crecimiento en agar malta	(+)
Tolerancia a la sal:	
0.5 % NaCl	(+)
1.0 % NaCl	(+)
Rango de pH:	
pH 3.0	(-)
pH 4.0	(+)
pH 7.5	(+)
pH 8.0	(-)
Temperatura:	
30 °C	(+)
38 °C	(+)

40 °C	(-)
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Producción de H ₂ S	(+)
Tolerancia al calor 60 °C por 5 min	(-)
Etanol: 5.5 %	(+)
Etanol: 7.7 %	(+)
Fuente de carbono: D-glucosa	(+)
Fuente de carbono: D-Fructosa	(+)
Citrato	(-)
Ureasa	(+)
Reducción de azul de metileno	(+)
Indol	(-)
Motilidad	(+)
(+) Fermentación positiva	
(-) Fermentación negativa	

La correcta identificación de cepas microbianas es fundamental para garantizar la reproducibilidad y eficiencia en procesos biotecnológicos. En este estudio, la cepa bacteriana empleada fue identificada como *Zymomonas mobilis* mediante análisis fenotípicos acordes al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sección 2). Las características observadas—colonias incoloras, circulares, cremosas y morfología de cocobacilos dispuestos en pares—son consistentes con los criterios taxonómicos establecidos para este género (Vilkyté y otros, 2016). Adicionalmente, la producción de un aroma frutal característico durante el cultivo

refuerza dicha identificación, ya que este fenotipo se asocia con la síntesis de ésteres volátiles durante la fermentación alcohólica (Panesar y otros, 2015)

La elección de *Z. mobilis* como biocatalizador se justifica por su perfil metabólico único (Figura 1). A diferencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, esta bacteria metaboliza glucosa, fructosa y sacarosa exclusivamente mediante la vía de Entner-Doudoroff, generando piruvato que deriva en etanol vía piruvato descarboxilasa (Kalnenieks et al., 2020). Esta ruta provee solo 2 moles de ATP por mol de glucosa, lo que explica su bajo rendimiento biomásico y alta tasa de producción etanólica (120-200 g/L·h vs. 30-40 g/L·h en levaduras), ventaja crítica para procesos de fermentación industrial (Hassan & Gddoa, 2021).

La identificación fenotípica reportada, aunque robusta, podría complementarse con métodos moleculares (ej: secuenciación del gen 16S rRNA) para descartar contaminantes y validar la subespecie (*mobilis* o *pomacea*), dado que esta última presenta mayor termotolerancia (25-42°C) según Farkas et al. (2020). La cepa estudiada mostró crecimiento óptimo a 25-31°C, rango compatible con *Z. mobilis subsp. mobilis*, subespecie preferida en biorreactores por su estabilidad metabólica.

En conclusión, la caracterización microbiológica realizada confirma la idoneidad de la cepa para procesos de fermentación. La integración de este protocolo de identificación con estudios de optimización metabólica (ej: ingeniería de pared celular para tolerancia a etanol) permitirá maximizar su potencial en biorefinerías sostenibles.

4.1.4. Cuantificación de azúcares reductores, sacarosa y FOS en el extracto de yacon

4.1.4.1. Fermentación con célula libre

Los datos de producción de biomasa en el sistema libre y las cinéticas del contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y FOS se muestran en la Tabla 05

Tabla 5

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 15 °Brix en función del tiempo

Tiempo (h)	Biomasa (g/100 mL)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.875± 0.05	0.900	0.900	3.500	1.200
18	0.880 ± 0.01	0.182	0.750	2.877	1.219
29	1.035 ± 0.07	0.125	0.480	2.741	1.301
43	1.978 ± 0.03	0.089	0.180	2.341	1.333
67	2.890 ± 0.02	0.079	0.180	2.291	1.345
96	2.850 ± 0.02	0.077	0.170	2.223	1.402

- Las DS de la generación de biomasa se evaluó con tres repeticiones.

Figura 8

Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 15 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre

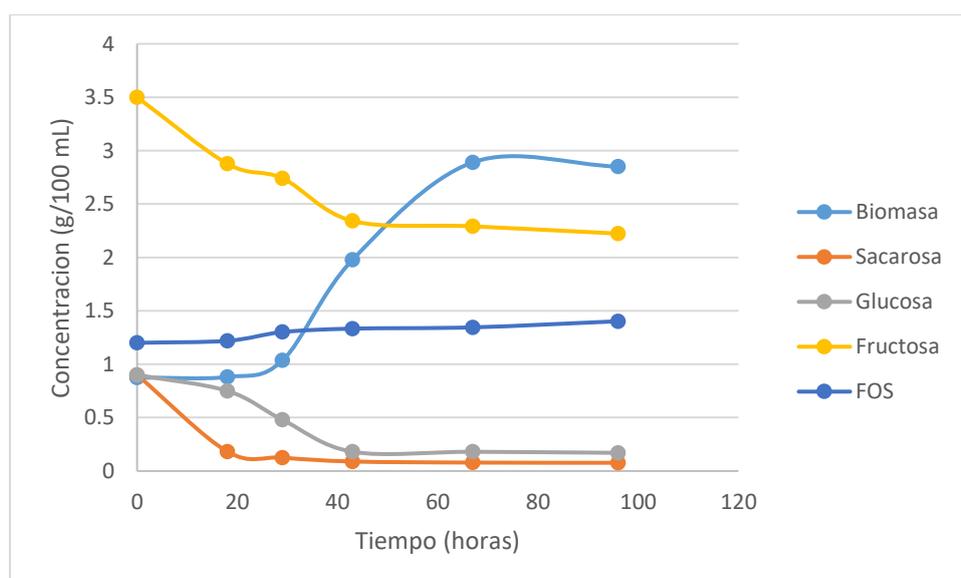


Tabla 6

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 20 °Brix en función del tiempo

Tiempo (h)	Biomasa (g/100 mL)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.875 ± 0.02	0.970	1.320	4.200	1.450
18	0.900 ± 0.03	0.219	0.900	3.452	1.463
29	1.037 ± 0.07	0.153	0.580	3.289	1.563
43	2.004 ± 0.04	0.110	0.210	2.809	1.610
67	3.025 ± 0.14	0.095	0.210	2.749	1.616
96	3.024 ± 0.09	0.092	0.200	2.670	1.686

Figura 9

Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 20 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre

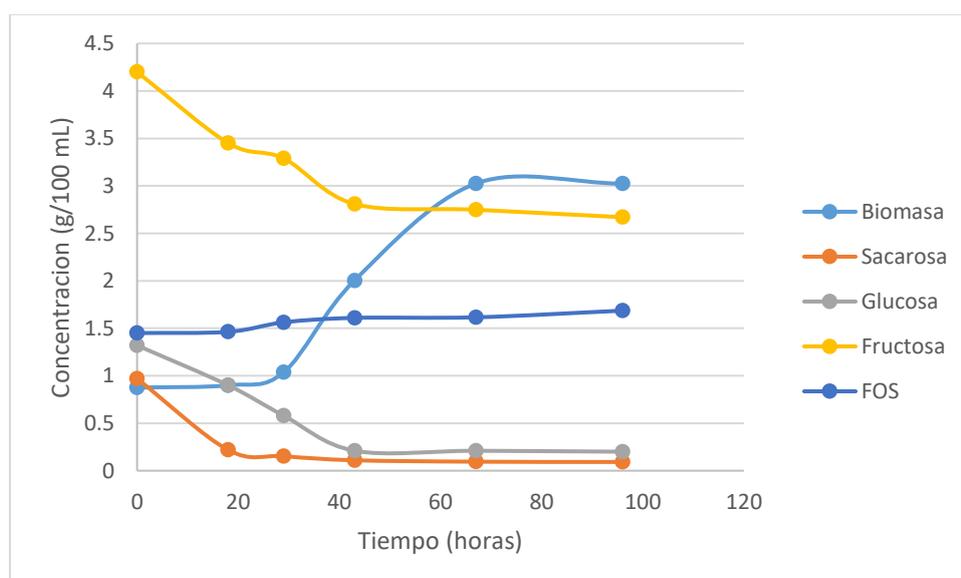


Tabla 7

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula libre en extracto de yacón con 25 °Brix en función del tiempo

Tiempo (h)	Biomasa (g/100 mL)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.875 ± 0.01	1.100	1.430	4.500	1.495
18	1.025 ± 0.06	0.228	0.941	3.596	1.524
29	1.095 ± 0.02	0.156	0.605	3.426	1.626
43	2.124 ± 0.04	0.111	0.221	3.026	1.671
67	3.110 ± 0.08	0.099	0.219	2.864	1.681
96	3.105 ± 0.07	0.096	0.212	2.779	1.753

Figura 10

Cinética de formación de biomasa y comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 25 oBrix en función del tiempo, utilizando célula libre

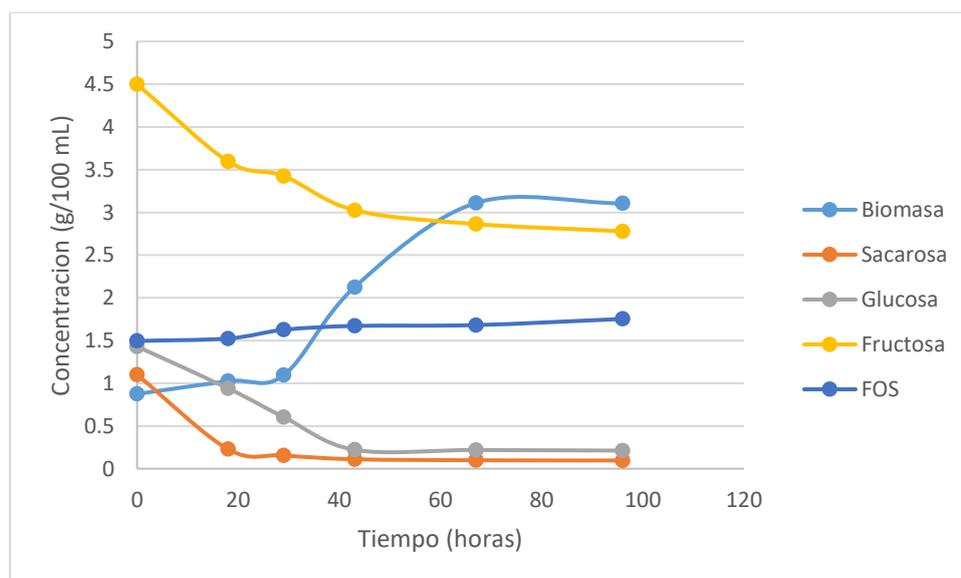


Tabla 8

Variación de las concentraciones de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula libre de Zymomonas mobilis

Azúcares	Variación de las concentraciones de azúcares (g/100 mL)		
	15 °Brix	20 °Brix	25 °Brix
	Glucosa	0.90 – 0.17	1.32 – 0.20
Fructosa	3.50 – 2.22	4.20 – 2.67	4.50 – 2.77
Sacarosa	0.90 – 0.07	0.97 – 0.092	1.10 – 0.096
Fructooligosacaridos	1.20 – 1.40	1.45 – 1.68	1.49 – 1.75

Tabla 9

Porcentaje de reducción de la concentración de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula libre de Zymomonas mobilis

Azúcares	Porcentaje de reducción (%)		
	15 °Brix	20 °Brix	25 °Brix
	Glucosa	81.11	84.85
Fructosa	36.57	36.43	38.44
Sacarosa	92.22	90.52	91.27

4.1.4.2. Fermentación con célula inmovilizada

Tabla 10

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 15 °Brix en función del tiempo

Tiempo (h)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.900	0.900	3.500	1.200
18	0.800	0.740	3.450	1.600
29	0.700	0.640	2.800	2.400
43	0.550	0.320	2.100	2.600
67	0.400	0.140	1.900	2.800
96	0.300	0.08	1.400	2.990

Figura 11

Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 15 oBrix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.

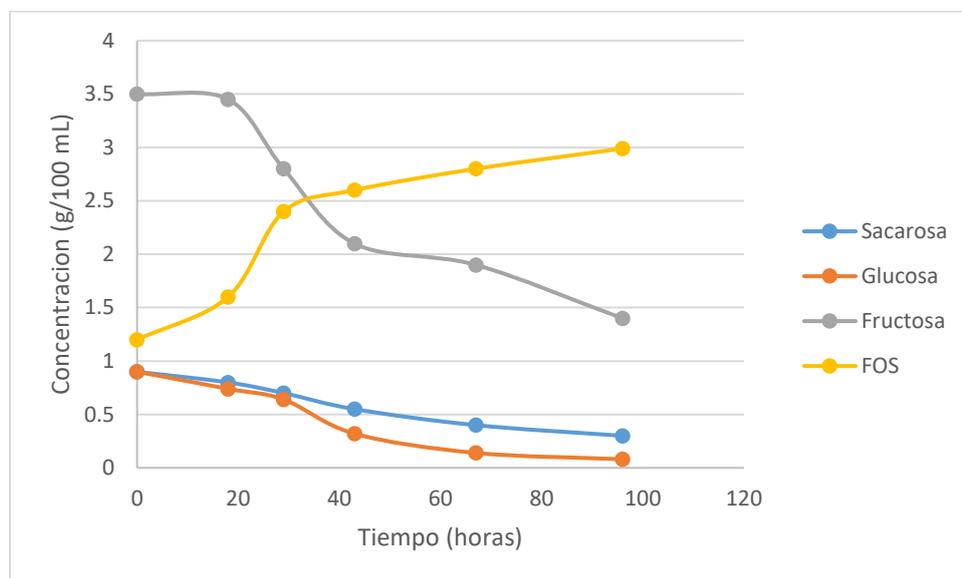


Tabla 11

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 20 °Brix en función del tiempo

Tiempo (h)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.970	1.320	4.200	1.450
18	0.700	1.130	4.100	1.740
29	0.420	1.100	3.500	2.200
43	0.360	1.045	3.200	2.260
67	0.200	0.916	1.900	3.000
96	0.100	0.812	1.700	3.500

Figura 12

Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 20 oBrix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.

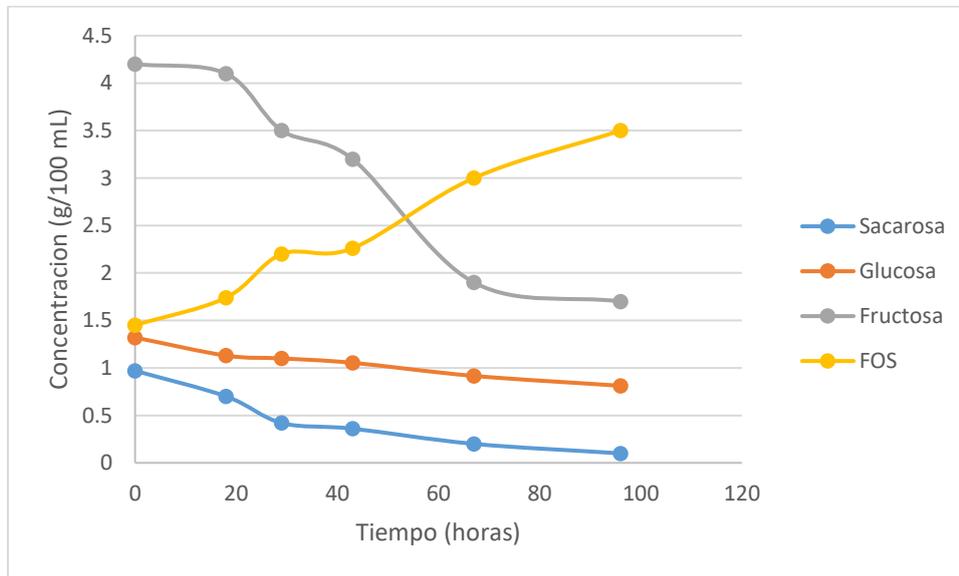


Tabla 12

Comportamiento de parámetros de la fermentación utilizando célula inmovilizada en extracto de yacón con 25 °Brix en función del tiempo.

Tiempo (h)	Sacarosa (g/100 mL)	Glucosa (g/100 mL)	Fructosa (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	1.10	1.430	4.500	1.495
18	0.890	1.240	4.100	2.101
29	0.510	0.850	3.120	2.602
43	0.200	0.340	2.850	3.800
67	0.120	0.130	1.940	4.101
96	0.05	0.700	1.700	4.500

Figura 13

Comportamiento de las concentraciones de azúcares en el extracto de yacón con 25 °Brix en función del tiempo, utilizando célula inmovilizada.

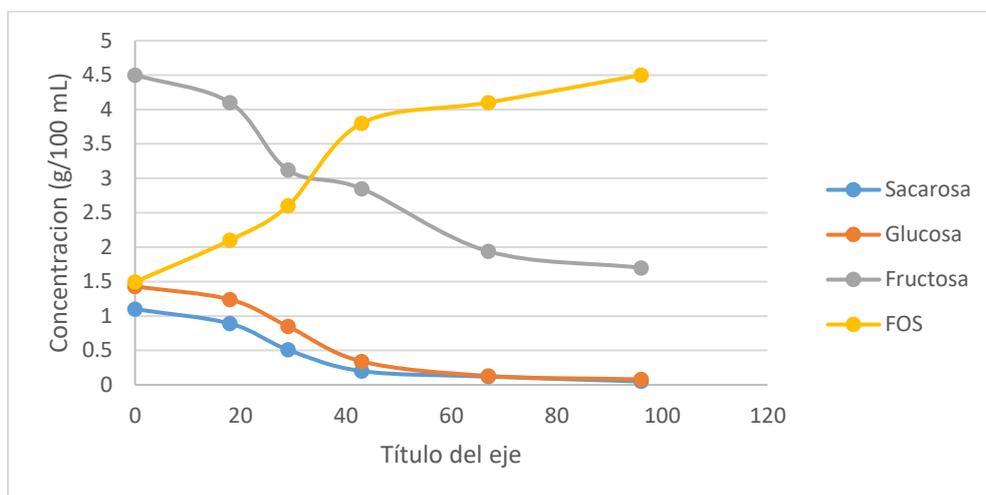


Tabla 13

*Variación de las concentraciones de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula inmovilizada de *Zymomonas mobilis**

Azúcares	Variación de las concentraciones de azúcares (g/100 mL)		
	15 °Brix	20 °Brix	25 °Brix
Glucosa	0.90 – 0.08	1.32 – 0.81	1.43 – 0.08
Fructosa	3.50 – 1.40	4.20 – 1.70	4.50 – 1.70
Sacarosa	0.90 – 0.30	0.97 – 0.10	1.10 – 0.05
Fructooligosacaridos	1.20 – 2.99	1.45 – 3.50	1.49 – 4.50

Tabla 14

Porcentaje de reducción de la concentración de azúcares transcurrido 96 horas de fermentación con célula inmovilizada de Zymomonas mobilis

Azúcares	Porcentaje de reducción (%)		
	15 °Brix	20 °Brix	25 °Brix
Glucosa	91.11	38.64	94.41
Fructosa	60.00	59.52	62.22
Sacarosa	66.67	89.69	95.45

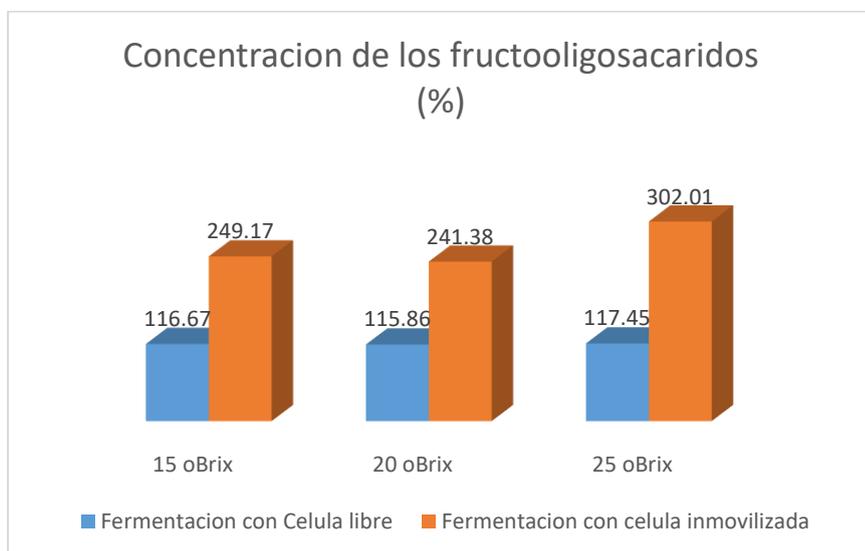
Tabla 15

Concentración de fructooligosacaridos (FOS) transcurrido 96 horas de fermentación

Sistema	Concentración de fructooligosacaridos (%)		
	15 °Brix	20 °Brix	25 °Brix
Fermentación con célula libre	116.67	115.86	117.45
Fermentación con célula inmovilizada	249.17	241.38	302.01

Figura 14

Comparación de los dos sistemas de fermentación (célula libre e inmovilidad) del proceso de concentración de los fructooligosacaridos.



El análisis de las Figuras 8 al 13 evidenciaron una reducción significativa de los azúcares reductores (glucosa, fructosa) y de la sacarosa durante la fermentación del extracto de yacón, comparando un sistema de células libres con un sistema de células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis*. La disminución de azúcares reductores presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas ($p = 0.0117$; Anexo III), siendo mayor en el sistema inmovilizado.

En el sistema de células libres, se registraron las siguientes reducciones:

- **Sacarosa:** 92.22% a 15 °Brix, 90.52% a 20 °Brix, 85.31% a 25 °Brix.
- **Glucosa:** 81.11% a 15 °Brix, 84.85% a 20 °Brix, 85.31% a 25 °Brix.
- **Fructosa:** 84.85% a 15 °Brix, 36.43% a 20 °Brix, 90.52% a 25 °Brix.

Además, el análisis estadístico confirmó que el tiempo de fermentación es una variable significativa ($p < 0.05$) en la reducción de estos azúcares, observándose un mayor consumo a tiempos más prolongados.

Respecto a la concentración de fructooligosacáridos (FOS), en el sistema libre se observaron incrementos relativos de 116.17%, 115.86% y 117.45% para las concentraciones iniciales de 15 °Brix, 20 °Brix y 25 °Brix, respectivamente. Sin embargo, el sistema inmovilizado demostró un rendimiento significativamente superior en la reducción de azúcares reductores y, consecuentemente, en la concentración final de FOS. En este sistema, los FOS alcanzaron concentraciones relativas de 249.17% a 15 °Brix, 241.38% a 20 °Brix y 302.01% a 25 °Brix.

Estos resultados demuestran claramente la mayor eficiencia del sistema inmovilizado para maximizar la concentración de FOS, un efecto directamente atribuible a su capacidad superior para reducir los azúcares reductores disponibles. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Flores et al. (2016), quienes también documentaron la capacidad de *Zymomonas mobilis* para reducir selectivamente azúcares reductores (glucosa, fructosa, sacarosa) sin consumir FOS, resultando en un incremento relativo de estos últimos. La mayor eficiencia observada en el sistema inmovilizado puede explicarse por su menor demanda energética para la síntesis de biomasa. Al estar confinadas en perlas de alginato, las células inmovilizadas limitan su crecimiento, canalizando una mayor proporción de la energía metabólica derivada de la fermentación hacia la producción de metabolitos. En este contexto, la energía se dirige predominantemente a la asimilación de azúcares reductores, lo que resulta en una disminución más pronunciada de su concentración y, por ende, en un incremento relativo de los FOS en los sólidos totales. Esta interpretación se sustenta en los datos cuantitativos obtenidos mediante cromatografía líquida.

Es relevante destacar que *Zymomonas mobilis* es una bacteria Gram-negativa que metaboliza glucosa y otros azúcares reductores mediante la vía de Entner-Doudoroff en condiciones anaeróbicas, produciendo etanol como metabolito principal. Esta cepa presenta especificidad sustrato, ya que solo asimila azúcares reductores simples (glucosa, fructosa, sacarosa) sin consumir polímeros complejos como fructooligosacáridos (FOS) o inulina. Los resultados demuestran que el sistema de células inmovilizadas exhibe un rendimiento significativamente superior en la reducción de azúcares fermentables comparado con el sistema libre.

Esta ventaja del sistema inmovilizado concuerda con lo reportado por Silbir et al. (2014), quienes destacan las siguientes ventajas de la inmovilización celular:

- (i) Facilidad de separación del producto,
- (ii) Reutilización del biocatalizador,
- (iii) Alta productividad volumétrica,
- (iv) Mejor control del proceso, y
- (v) Menor susceptibilidad a contaminación.

El encapsulado en perlas de alginato de calcio —empleado en este estudio— es el método preferido por su biocompatibilidad, condiciones de gelificación suaves y practicidad operativa, lo que explica la mayor eficiencia observada en la reducción de azúcares.

Adicionalmente, Palamaea et al. (2020) enfatizan las ventajas metabólicas de *Z. mobilis*:

- Es un anaerobio facultativo con genoma completamente secuenciado,
- Exhibe una productividad etanólica 3-5 veces superior a *Saccharomyces cerevisiae* debido a su mayor área superficial específica, que favorece la absorción de glucosa,
- Presenta alta tolerancia al etanol (hasta 16% v/v), y

- Alcanza rendimientos cercanos al 97% del máximo teórico (0.51 g etanol/100 g glucosa).

Estas características explican la drástica reducción de azúcares reductores observada en la Figura 7, donde los valores cuantitativos (e.g., glucosa reducida de 0.90 a 0.17 g/100 mL a 15 °Brix) son consistentes con su alta eficiencia catabólica.

Respecto a los FOS, las Figuras 8-13 evidencian que su concentración relativa aumenta significativamente (FOS purificado) durante la fermentación en ambos sistemas, particularmente en el inmovilizado. Este incremento se atribuye a la reducción diferencial de azúcares simples, no a la síntesis *de FOS*. En el sistema libre se observa:

- **15 °Brix:** Fructosa ↓ 3.50→2.22 g/100 mL; Glucosa ↓ 0.90→0.17 g/100 mL; Sacarosa ↓ 0.90→0.07 g/100 mL; FOS ↑ 1.20→1.40 g/100 mL
- **20 °Brix:** Fructosa ↓ 4.20→2.67 g/100 mL; Glucosa ↓ 1.32→0.20 g/100 mL; Sacarosa ↓ 0.97→0.09 g/100 mL; FOS ↑ 1.45→1.68 g/100 mL
- **25 °Brix:** Fructosa ↓ 4.50→2.77 g/100 mL; Glucosa ↓ 1.43→0.21 g/100 mL; Sacarosa ↓ 1.00→0.07 g/100 mL; FOS ↑ 1.20→1.80 g/100 mL

La concentración de FOS e inulina adquiere relevancia al considerar su estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) desde 2002 (Singh y otros, 2016). Estos compuestos, presentes en especies como el yacón, actúan como prebióticos de alto grado de polimerización con demostrados beneficios para la salud. El proceso de fermentación con *Z. mobilis* inmovilizada permite concentrar estos compuestos funcionales mediante la eliminación selectiva de azúcares reductores, superando además el problema de la rápida degradación postcosecha de FOS en tubérculos (5-10 °C). Esta estrategia facilita su incorporación en alimentos de consumo masivo (yogures, cereales, bebidas) para alcanzar los niveles diarios recomendados (5-8 g/día) que ejercen efectos prebióticos significativos.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Respecto al primer objetivo, se logró obtener zumo de yacón con un rendimiento de 73.33 % para el extracto con 15 °Brix, 55 % para el extracto con 20 °Brix y 44 % para el extracto con 20 °Brix, este extracto presentó características de color oscura, se encontró que el extracto tuvo un pH 5,6, una acides titulable de 0.34 g/100 gr muestra, Materia seca 11 %, una Humedad de 86% y un contenido de cenizas de 0.48%.
- Respecto a la evaluación de los sistemas de fermentación el mejor sistema de reducción de los azúcares reductores es el sistema por inmovilización, que tiene mejor concentración de FOS a las 96 horas de fermentación con 2.99 g/ 100 mL. para 15 °Brix; 3.50 g/ 100 mL para 20°Brix y 4.50 g/100 mL para 25°Brix, mientras que, para el sistema libre, 1.40 g/ 100 mL. para 15 °Brix; 1.68 g/ 100 mL para 20 °Brix y 1.75 g/100 mL para 25°Brix; habiendo diferencias significativas entre estos sistemas de fermentación.
- Con el sistema de fermentación inmovilizado se puede concentrar FOS en 249.17 % para la concentración de 15°Brix, 241.38 % para la concentración de 20°Brix y finalmente de 302.01 % mayor de FOS con 25°Brix de extracto de yacón, a comparación del sistema libre (fermentación con célula libre) que concentra 116.67 % a una concentración de 15°Brix, 115.86 % a una concentración de 20°Brix y 117.45 % para el caso de la concentración de 25 °Brix, por lo que es recomendable trabajar en un sistema inmovilizado a 25 °Brix de concentración de extracto de yacon para tener mejores resultados.

RECOMENDACIONES

- Probar sistema de cultivo de adhesión a superficies para comparar con estos dos sistemas y ver la mejor eficiencia en la concentración de FOS.
- Hacer una caracterización molecular del FOS que se obtiene para poder formular alimentos probióticos
- Hacer cinéticas de las propiedades antioxidantes en los sistemas de fermentación, para ver si este parámetro varío significativamente con los tratamientos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, H., Abranches, M., & Luces, C. (2015). Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions. *Food Science & Nutrition*, 55(1), 32-40. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.645259>
- Álvarez, R., González, H., & Montenegro, A. (2019). Extracción y determinación del contenido de fructanos del tipo inulina del yacón (*Smallanthus sonchifolius*): esquema tecnológico para su producción industrial. *Tecnología Química*, 39(1), 37-48. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852019000100037
- Benkeblia, N. (2013). Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Revista de cromatografía*, 1313(25), 54-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.013>
- Buitron, D., Sepúlveda, L., Martínez, T., Aguilar, C., Medina, D., & Rodríguez, R. (2018). Biotechnological approach for the production of prebiotics and search for new probiotics and their application in the food industry. *Biotecnología Alimentaria Aplicada*, 5(4), 185-192. <https://doi.org/https://doi.org/10.22037/afb.v5i4.20174>
- Campos, D., Betalleluz, I., Chirinas, R., Aguilar, A., Noratto, G., & Pedreschi, R. (2012). Efectos prebióticos del yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), fuente de fructooligosacáridos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante. *Química de los alimentos*, 135(3), 1592-1599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088>
- Cardelle, A., Martínez, C., Sanz, M., & Montilla, A. (2009). Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de derivados de galactosilo obtenidos por la acción de

- dos β -galactosidasas diferentes. *Química de los alimentos*, 114(3), 1099-1105.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.057>
- Carlson, J., Erickson, J., Lloyd, B., & Slavin, J. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Nutrición para el desarrollo de cursos*, 2(3), 1-8.
<https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>.
- Catenza, K., & Donkor, K. (2021). Recent approaches for the quantitative analysis of functional oligosaccharides used in the food industry: A review. *Química de los alimentos*, 355, 129-416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129416>
- Costa, A., Leite, J., Róvero, M., Vágula, C., Schimitt, C., Rizzi, P., . . . Correa, C. (2020). Yacón (*Smallanthus sonchifolius*) use as an antioxidant in diabetes, in: Victor R. Preedy . *Pathology Academic Press*, 379-386.
- Díaz, A., Martínez, M., Contreras, J., & Gallardo, C. (2019). Índice Glucémico in vitro, Contenido fenólico y Actividad Antioxidante de Snacks elaborados con harinas de plátano (*Musa paradisiaca*) y yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Información Tecnológica*, 30(5), 111-120. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642019000500111&script=sci_abstract
- Dreisewerd, K., Kolbl, S., Katalinic, J., Berkenkamp, S., & Pohlentz, G. (2006). Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *La revista oficial de la Sociedad Americana de Espectrometría de Masas*, 17(2), 139-150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.10.003>
- FAO. (2007). *Technical Meeting on prebiotics*. Food and Agriculture Organization of the United Nations . Food Quality and Standards Service .

- Farkas, A., Marova, L., & Dobрева, E. (2020). *Thermotolerant strains of Zymomonas mobilis for improved bioethanol production: Physiological and transcriptomic analysis*. Biotechnology Reports.
- Fernández, E., Rajchl, A., Lachman, J., Cizkov, H., Kyasnicka, F., Kotikov, Z., . . . Voldrich, M. (2013). Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short- and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots, *LWT Food Sci. Technol*, 54(1), 80-86. https://www.researchgate.net/publication/236894729_Impact_of_yacon_landraces_cultivated_in_the_Czech_Republic_and_their_ploidy_on_the_short-_and_long-chain_fructooligosaccharides_content_in_tuberous_roots
- Flores, D., Mussatto, S., Contreras, J., Rodríguez, R., Teixeira, J., & Aguilar, C. (2016). Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Crit Rev Biotechnol*, 36(2), 259-267. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.953443>
- Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gibson, G., Ottaway, P., & Rastall, R. (2000). *New developments in functional foods*. Chandos.
- Gibson, G., Probert, H., Loo, J., Rastall, R., & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrición Res Rev*, 17(2), 259-275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gil, A., López, E., Mostacero, J., & De la Cruz, A. (2019). Papas nativas con potencial antioxidante, cultivadas en el norte del Perú. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de*

Plantas Medicinales y aromáticas, 18(3), 289-324.
<https://doi.org/https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.3.19>

Grancieri, M., Brunoro, N., Tostes, M., Silva, D., Carvalho, L., Nadai, L., . . . Lomar, M. (2017). Yacón flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. *Revista de alimentos funcionales*, 37, 666-675.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.039>

Gullón, P., Gullón, B., Moure, A., Alonso, J., Domínguez, H., Parajó, J., . . . Rastall, R. (2009). *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology*. Springer.

Hassan, S., & Gddoa, M. (2021). *Zymomonas mobilis*: A novel bioethanol producer. *Bioresource Technology Reports*, 15.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100735>

Hernández, O., Calvillo, I., Moreno, F., & Sanz, M. (2012). Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic (HILIC) coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactoligosaccharides. *Revista de cromatografía*, 1220, 57-67.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.047>

Huaycho, H., Aruquipa, R., Mercado, G., Trigo, R., Bosque, H., & Condori, J. (2016). Traditional knowledge in yacon or aricomá (*Smallanthus sonchifolius*) in communities of Mocomoco, Coroico and Irupana from La Paz. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 3(2), 152-165.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182016000200005

ISAPP. (2008). *6th Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario*.

- Kajihara, Y., & Sato, H. (2003). Análisis estructural de oligosacáridos mediante resonancia magnética nuclear. *Tendencias en glicociencia y glicotecnología*, 15(84), 197-220. <https://doi.org/10.4052/tigg.15.197>
- Kalnenieks, U., Pentjuss, A., Rutkis, R., Stalidzans, E., & Fell, D. (2020). Metabolic modelling of *Zymomonas mobilis* for improved biochemical production. *Metabolic Engineering*, 62, 230-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.001>
- Kim, S., Jin, Y., Nam, J., Hong, S., Chang, D., Yoon, Y., . . . Jeon, J. (2020). Domestic and overseas status and future trends of yacon production. *Journal of the Korean Society of International Agriculture*, 24, 417-424. <http://www.intagrijournal.org/journal/article.php?code=14306>
- Kuhn, R., Mazutti, M., Buoro, L., & Maugeri, F. (2014). Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *Nueva Biotecnología*(3), 237-241. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.005>
- Magallanes, P., Flores, P., & Bello, L. (2017). Starch Structure Influences its Digestibility: A review. *Journal of Food Science*, 82(9), 2016-2023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13809>
- Marry, M., Cavalier, D., Schnurr, J., Netland, J., Yang, Z., Pezeshk, V., . . . Pauly, M. (2003). White Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Polímeros de carbohidratos*, 51(3), 347-356. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00189-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00189-3)
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2019). *Manual de manejo agronómico del yacón (Smallanthus sonchifolius Poepp. & endl.)*.

- Palamea, S., Choorita, W., Chatsungnoenc, T., & Yusuf, C. (2020). Simultaneous nitrogen fixation and ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 314-315, 41-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.016>
- Panesar, P., Kumari, S., & Panesar, R. (2015). Bioutilization of agro-industrial waste for the production of volatile aroma compounds by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Food Science and Technology*, 25(7), 4073-4081. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-014-1449-9>
- Paredes, L., Smiderle, F., Santana, A., Kimura, A., Lacomini, M., & Sasaki, G. (2018). Yacón fructans (*Smallanthus sonchifolius*) extraction, characterization and activation of macrophages to phagocyte yeast cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1074-1081. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.034>
- Rastall, R. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Revista Anual de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1, 305-339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100746>
- Reis, F., Marques, C., Sales, A., & Masson, M. (2021). Effect of processing methods on yacon roots health-promoting compounds and related properties. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 113, 346-354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.010>
- Robertfroid, M., Gibson, G., Hooyes, L., McCartney, A., Rastall, R., Rowland, I., . . . Meheust, A. (2010). Prebiotics effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*, 2:S1-63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>

- Rubio, C., Latina, A., & Antonio, N. (2012). Producción de fructooligosacaridos por invertasa de *Aspergillus niger* Ib56: un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. *Boletín Micológico*, 27(1), 18-23. <https://doi.org/https://doi.org/10.22370/bolmicol.2012.27.1.891>
- Sanz, M., Ruiz, A., Corzo, N., & Martínez, I. (2010). *Analysis of prebiotic Oligosaccharides. In: Prebiotics and Probiotics. Science and Technology (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall)*. Springer.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Sirma, Y., Taner, B., & Yekta, G. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems Carbohydrate Polymers. *Carbohidrato Polímero*, 99, 451-562. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.031>.
- Simanca, M., De Paula, C., Domínguez, Y., Pastrana, Y., & Álvarez, B. (2021). Physico-chemical and sensory characterization of sweet biscuits made with yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). *Revista NFS*, 22, 14-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.12.001>
- Singh, R., Kennedy, J., & Singh, P. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 85, 565-572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.026>
- Tian, K., Wang, J., & Zhang, Z. (2019). Expression and purification of a transcription factor StMsn2 from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*. *Revista electrónica de biotecnología*, 40, 65-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.04.008>
- Valderrama, M. (2005). *Manual del cultivo del yacón*. PYMAGROS.

- Veeramallu, U., & Agrawal, P. (1990). A structured kinetic model for *Zymomonas mobilis*. *Biotecnología Bioing*, 36(7), 694-704. <https://doi.org/10.1002/bit.260360707>
- Velásquez, J. (2011). *Evaluación química de inulina en yacón (Polymnia sonchifolia) para la preparación de hojuelas de uso dietético*. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Huacho, Perú. Tesis de maestría, Universidad nacional José Faustino Sánchez Carrión.
https://repositorio.unjfsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/193/EPG_76.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Vera, C., Ubilla, C., Guerrero, C., López, J., Florez, J., & Bustos, R. (2020). Oligosacáridos y polisacáridos no digeribles: una fuente de salud para los adultos mayores. *Revista chilena de nutrición*, 47(5), 848-864. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182020000500848>
- Vilkyté, F., Šipailienė, A., & Šalaševičienė, A. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Zymomonas mobilis* strains isolated from fermented beverages. *Food Technology and Biotechnology*, 54(3), 324-331. <https://doi.org/https://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4460>
- WGO. (2011). *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología.
- Wiemberg, F., Hovels, M., Kosciow, K., & Deppenmeier, U. (2020). High-resolution method for isocratic HPLC analysis of inulin-type fructooligosaccharides. *Revista de cromatografía B*, 1172, 122505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122505>

ANEXOS

Anexo I. Extracto de yacón

A continuación, se muestran los extractos con los que se trabajó en ambos sistemas de fermentación (libre e inmobilizado)

Figura 15 Imagen de Muestras de sustratos de extracto de yacón concentrado a diferentes concentraciones (15, 20 y 25 °Brix) para la fermentación.



Anexo II. Cuantificación de los fructooligosacáridos (FOS) en el proceso de fermentación

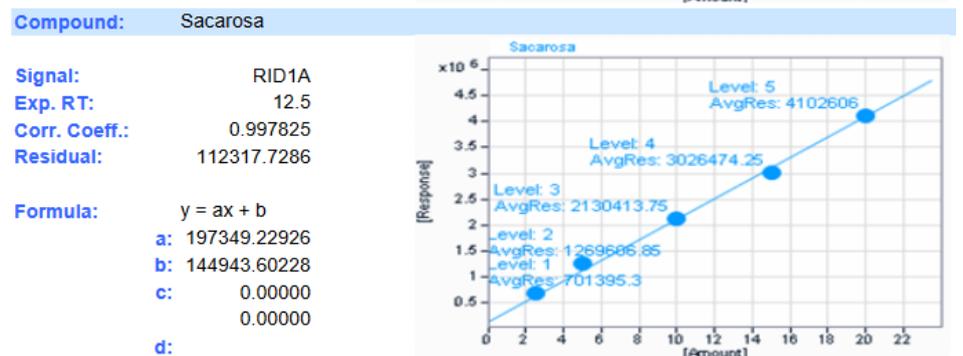
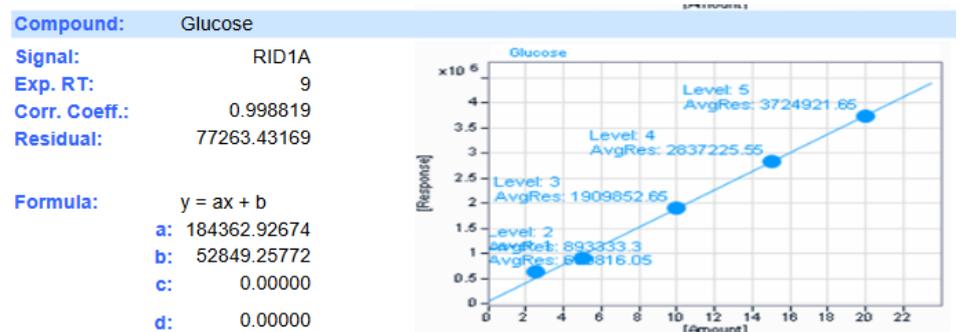
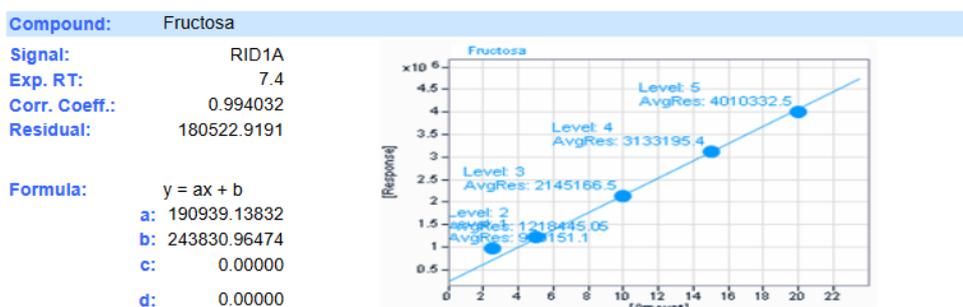
A partir de las siguientes curvas de calibración se calculan las concentraciones en (g/100 mL) de azúcares reductores (glucosa y fructosa), sacarosa y fructooligosacáridos en las diferentes concentraciones del extracto de yacón durante la fermentación ya sea con célula libre e inmobilizada de *Zymomonas mobilis*.

Figura 16 Curva de calibración de azúcares reductores y sacarosa con HPLC.

Quantification report based on Area

Sample name	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Sacarose (mg/ml)
S1	20.00	20.00	20.00
S2	15.00	15.00	15.00
S3	10.00	10.00	10.00
S4	5.00	5.00	5.00
S5	2.50	2.50	2.50

Calibration Curves:



II.1. Cuantificación de fructooligosacáridos por fermentación con célula libre de *Zymomonas mobilis*

a) Para concentración de 15 °Brix

Tabla 16 Áreas extraídas de la curva patrón HPLC (extracto de yacón con 15 °Brix, sistema célula libre)

Tiempo (h)	Área (sacarosa)	Área (glucosa)	Área (fructosa)
0	144945.38	52850.9	243837.648
18	144943.96	52850.6	243836.458
29	144943.85	52850.1	243836.199
63	144943.78	52849.6	243835.435
67	144943.76	52849.6	243835.339
96	144943.75	52849.6	243835.21

Cálculo de la concentración de fructosa antes de someter al hidrolizado el extracto (F_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$F_{NH} = \frac{243837.648 - 243830.96474}{190939.13832} (100000) = 3.5 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de glucosa antes de someter al hidrolizado el extracto (G_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$G_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$G_{NH} = \frac{52850.9 - 52849.25772}{184362.92674} (100000) = 0.9 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de sacarosa (S)

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$S = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$S = \frac{144945.38 - 144943.60228}{197349.22926} (100000) = 0.9 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

En la tabla 17 se muestran las concentraciones de la glucosa, fructosa y sacarosa, antes y después de someter al hidrolizado; asimismo las concentraciones de los fructooligosacáridos (FOS).

Tabla 17 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacón con 15 °Brix (sistema célula libre)

Tiempo (h)	S (g/100 mL)	G _{NH} (g/100 mL)	F _{NH} (g/100 mL)	G _H (g/100 mL)	F _H (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.900	0.90	3.500	2.108	4.45	1.200
18	0.182	0.75	2.877	1.299	3.75	1.219
29	0.125	0.48	2.741	0.985	3.68	1.301
43	0.089	0.18	2.341	0.627	3.33	1.333
67	0.079	0.18	2.291	0.406	3.50	1.345
96	0.077	0.17	2.223	0.407	3.48	1.402

Cálculo de la concentración de FOS, por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F = \left[F_H - F_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4}$$

$$F = \left[4.45 - 3.5 - \left(\frac{0.9}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 0.5103$$

$$G = \left[G_H - G_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right]$$

$$G = \left[2.108 - 0.9 - \left(\frac{0.9}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 0.7867$$

$$\text{FOS} = (G + F)(0.925) = (0.5103 + 0.7867)(0.925) = 1.2 \text{ g/100 mL}$$

b) Para concentración de 20 °Brix

Tabla 18 Áreas extraídas de la curva patrón HPLC (extracto de yacón con 20 °Brix, sistema célula libre)

Tiempo (h)	Area (sacarosa)	Area (glucosa)	Area (fructosa)
0	144945.52	52851.7	243838.984
18	144944.03	52850.9	243837.556
29	144943.9	52850.3	243837.245
63	144943.82	52849.6	243836.328
67	144943.79	52849.6	243836.214
96	144943.78	52849.6	243836.063

Cálculo de la concentración de fructosa antes de someter al hidrolizado el extracto (F_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$F_{NH} = \frac{243838.984 - 243830.96474}{190939.13832} (100000) = 4.2 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de glucosa antes de someter al hidrolizado el extracto (G_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$G_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$G_{NH} = \frac{52851.7 - 52849.25772}{184362.92674} (100000) = 1.32 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de sacarosa (S)

Por ejemplo, para el tiempo (0)

$$S = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$S = \frac{144945.52 - 144943.60228}{197349.22926} (100000) = 0.97 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Tabla 19 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacon con

20 °Brix (sistema célula libre)

Tiempo (h)	S (g/100 mL)	G_{NH} (g/100 mL)	F_{NH} (g/100 mL)	G_H (g/100 mL)	F_H (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	0.970	1.32	4.200	2.784	5.220	1.450
18	0.219	0.90	3.452	1.889	4.170	1.463
29	0.153	0.58	3.289	1.493	4.110	1.563
43	0.110	0.21	2.809	0.841	3.920	1.610

67	0.095	0.21	2.749	0.809	3.880	1.616
96	0.092	0.20	2.670	0.796	3.870	1.686

Cálculo de la concentración de FOS, por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F = \left[F_H - F_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4}$$

$$F = \left[5.220 - 4.200 - \left(\frac{0.97}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 0.546$$

$$G = \left[G_H - G_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right]$$

$$G = \left[2.784 - 1.32 - \left(\frac{0.97}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 1.0216$$

$$\text{FOS} = (G + F)(0.925) = (1.0216 + 0.546)(0.925) = 1.45 \text{ g/100 mL}$$

c) Para concentración de 25 °Brix

Tabla 20 Áreas extraídas de la curva patrón HPLC (extracto de yacón con 20 °Brix, sistema célula libre)

Tiempo (h)	Area (sacarosa)	Area (glucosa)	Area (fructosa)
0	144945.77	52851.9	243839.557
18	144944.05	52851	243837.831
29	144943.91	52850.4	243837.507
63	144943.82	52849.7	243836.552

67	144943.8	52849.7	243836.433
96	144943.79	52849.6	243836.271

Cálculo de la concentración de fructosa antes de someter al hidrolizado el extracto (F_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$F_{NH} = \frac{243839.557 - 243830.96474}{190939.13832} (100000) = 4.50 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de glucosa antes de someter al hidrolizado el extracto (G_{NH})

Por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$G_{NH} = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$G_{NH} = \frac{52851.9 - 52849.25772}{184362.92674} (100000) = 1.43 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Cálculo de la concentración de sacarosa (S)

Por ejemplo, para el tiempo (0)

$$S = \frac{\text{Area} - b}{a}$$

$$S = \frac{144945.77 - 144943.60228}{197349.22926} (100000) = 1.10 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Tabla 21 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacon con 20 °Brix (sistema célula libre)

Tiempo (h)	S (g/100 mL)	G _{NH} (g/100 mL)	F _{NH} (g/100 mL)	G _H (g/100 mL)	F _H (g/100 mL)	FOS (g/100 mL)
0	1.100	1.430	4.500	3.316	5.280	1.495
18	0.228	0.941	3.596	1.094	4.170	1.524
29	0.156	0.605	3.426	0.856	4.110	1.626
43	0.111	0.221	3.026	0.519	3.920	1.671
67	0.099	0.219	2.864	0.763	3.880	1.681
96	0.096	0.212	2.779	0.991	3.870	1.753

Cálculo de la concentración de FOS, por ejemplo, para el tiempo (0 h)

$$F = \left[F_H - F_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4}$$

$$F = \left[5.28 - 4.500 - \left(\frac{1.10}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 0.215$$

$$G = \left[G_H - G_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right]$$

$$G = \left[3.316 - 1.43 - \left(\frac{1.10}{1.9} \right) \right] \frac{1.5}{1.4} = 1.4008$$

$$\text{FOS} = (G + F)(0.925) = (1.4008 + 0.215)(0.925) = 1.495 \text{ g/100 mL}$$

Tabla 22. Áreas extraídas de la curva patrón HPL por fermentación con célula inmovilizada (extractos de yacón con 15, 20 y 25 °Brix)

Tiempo	Area	Area	Area
--------	------	------	------

(h)	(fructosa)	(glucosa)	(sacarosa)
Extracto de yacón con 15 °Brix			
0	243837.648	52850.9	144945.38
18	243837.552	52850.6	144945.18
29	243836.311	52850.4	144944.98
43	243834.975	52849.8	144944.69
67	243834.593	52849.5	144944.39
96	243833.638	52849.4	144944.19
Extracto de yacón con 20 °Brix			
0	243838.984	52851.7	144945.52
18	243838.794	52851.3	144944.98
29	243837.648	52851.3	144944.43
43	243837.075	52851.2	144944.31
67	243834.593	52850.9	144944
96	243834.211	52850.8	144943.8
Extracto de yacón con 25 °Brix			
0	243839.557	52851.9	144945.77
18	243838.794	52851.5	144945.36
29	243836.922	52850.8	144944.61
43	243836.407	52849.9	144944
67	243834.669	52849.5	144943.84
96	243834.211	52849.4	144943.7

Realizando los mismos pasos para calcular las concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS, tal como se hizo con la fermentación con celular libre los resultados son:

Tabla 23 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacon con 15 °Brix (sistema célula inmovilizada)

	S	G _{NH}	F _{NH}	G _H	F _H	FOS
Tiempo (h)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)
0	0.90	0.90	3.50	2.108	4.450	1.20
18	0.80	0.74	3.45	2.301	4.345	1.60
29	0.70	0.64	2.80	2.764	3.834	2.40
43	0.55	0.32	2.10	2.534	3.088	2.60
67	0.40	0.14	1.90	2.410	2.876	2.80
96	0.30	0.08	1.40	2.378	2.435	2.99

Tabla 24 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacon con 20 °Brix (sistema célula inmovilizada)

	S	G _{NH}	F _{NH}	G _H	F _H	FOS
Tiempo (h)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)
0	0.97	1.320	4.20	2.784	5.22	1.45
18	0.70	1.130	4.10	2.602	5.12	1.74
29	0.42	1.100	3.50	2.412	4.85	2.20
43	0.36	1.054	3.20	3.463	3.45	2.26
67	0.20	0.916	1.90	3.053	3.00	3.00
96	0.10	0.812	1.70	3.498	2.65	3.50

Tabla 25 Concentraciones de azúcares reductores, sacarosa y FOS para extracto de yacón con 25 °Brix (sistema célula inmovilizada)

	S	G _{NH}	F _{NH}	G _H	F _H	FOS
Tiempo (h)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)	(g/100 mL)
0	1.10	1.43	4.50	2.476	6.12	1.495
18	0.89	1.24	4.10	2.626	5.77	2.101

29	0.51	0.85	3.12	2.020	5.11	2.602
43	0.20	0.34	2.85	2.384	4.85	3.800
67	0.12	0.13	1.94	2.013	4.32	4.101
96	0.05	0.08	1.70	2.423	3.95	4.500

Anexo III. Análisis estadístico de los datos.

Selección de las pruebas estadístico

En la investigación realizada se utilizó la estadística descriptiva, debido a que se sacara promedios procedentes de los datos obtenidos en cada instrumento de medición y estadística inferencial para encontrar las variables que tengan significancia en la variable respuesta, se aplicara el Análisis de Varianza (ANVA), con una confiabilidad de 95%, para ver la interacción de las variables independientes en la dependiente; luego también se realizara una prueba de DUNCAN, para hacer un ranking de los tratamientos y escoger el mejor tratamiento de purificación de los FOS, Todos estos análisis se realizaran con el paquete estadístico de y Statgraphics plus.

El nivel de aceptación de error representa uno que se pueda admitir en el análisis y en todas las etapas de la experimentación, en este caso la evaluación se dará a un nivel de $\alpha = 5\%$ ($\alpha = 0.05$) g. Todas las pruebas de trabajo por triplicado.

Tabla 26 Análisis de Varianza para porcentaje de reducción de azúcares reductores, sacarosa –

Suma de cuadrados Tipo III.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
---------------	--------------------------	-----------	-----------------------	----------------	----------------

EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	768.242	5	153.648	3.96	0.0117
B:TIEMPO	15734.7	4	3933.66	101.38	0.0000
RESIDUOS	776.001	20	38.8		
TOTAL (CORREGIDO)	17278.9	29			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Indica que tratamiento sea libre o inmovilizado son significativos para la reducción de azúcar reductor, igual el tiempo es altamente significativo para reducir azúcares reductores.

Tabla 27 Pruebas de Rangos Múltiples para porcentaje de reducción por tiempo

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

TIEMPO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0 DIAS	6	0.0	2.54297	X
2 DIAS	6	43.192	2.54297	X
6 DIAS	6	55.5302	2.54297	X
8 DIAS	6	58.8075	2.54297	X
10 DIAS	6	62.2645	2.54297	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 DIAS - 10 DIAS	*	-62.2645	10.7648
0 DIAS - 2 DIAS	*	-43.192	10.7648
0 DIAS - 6 DIAS	*	-55.5302	10.7648
0 DIAS - 8 DIAS	*	-58.8075	10.7648
10 DIAS - 2 DIAS	*	19.0725	10.7648
10 DIAS - 6 DIAS		6.73433	10.7648
10 DIAS - 8 DIAS		3.457	10.7648
2 DIAS - 6 DIAS	*	-12.3382	10.7648
2 DIAS - 8 DIAS	*	-15.6155	10.7648
6 DIAS - 8 DIAS		-3.27733	10.7648

* indica una diferencia significativa.

Figura 17. Medias y 95 % de Tukey HSD por tiempo

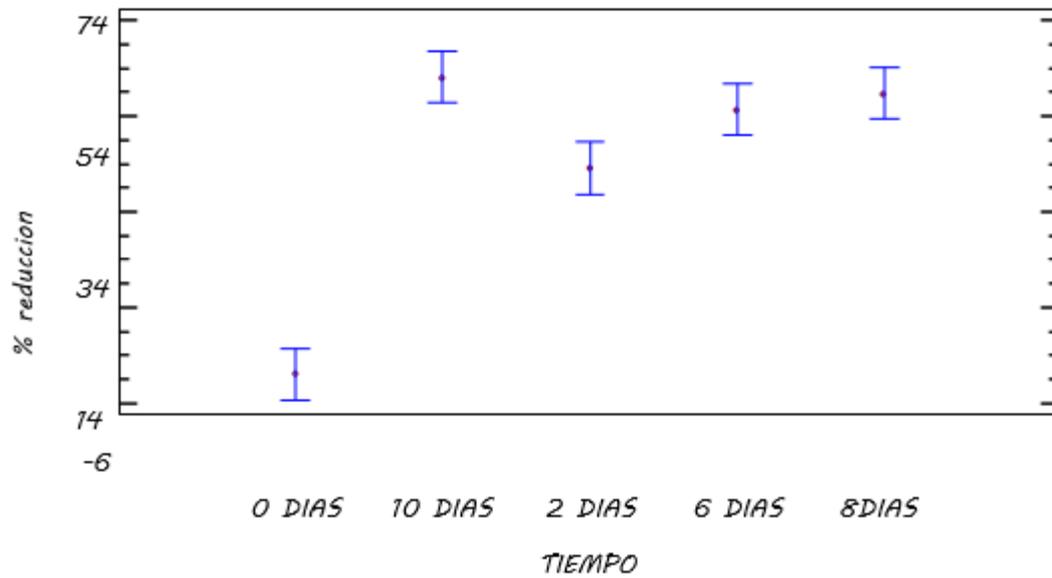


Tabla 8. Pruebas de Rangos Múltiples para porcentaje de reducción por tratamiento.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

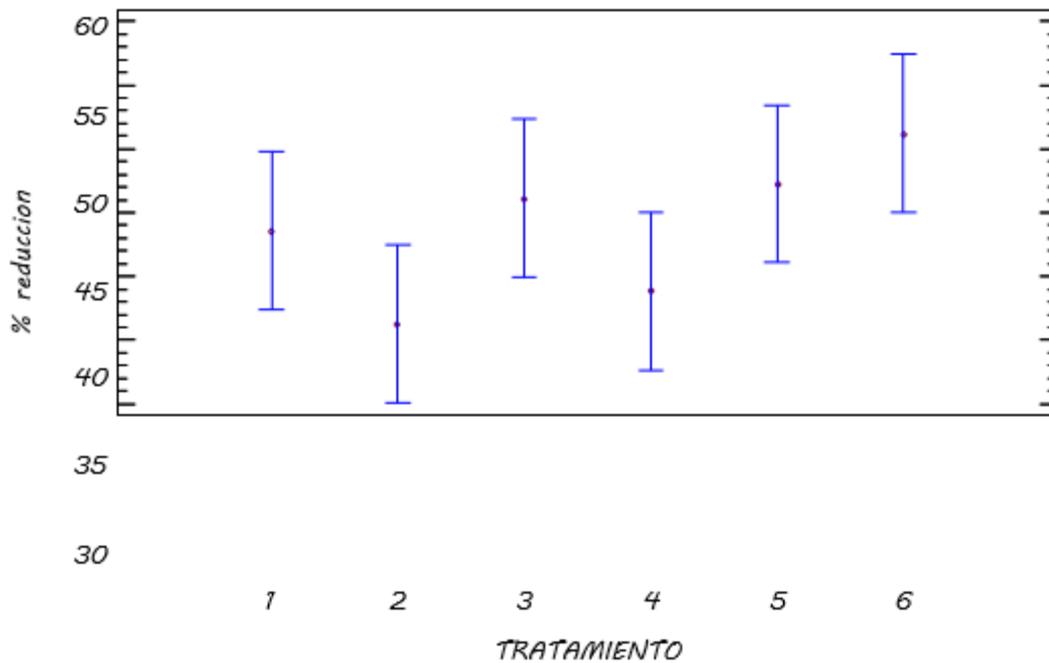
TRATAMIENTO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	5	36.329	2.78568	X
4	5	38.9346	2.78568	XX
1	5	43.6654	2.78568	XX
3	5	46.2092	2.78568	XX
5	5	47.3292	2.78568	XX

6	5	51.2856	2.78568	X
---	---	---------	---------	---

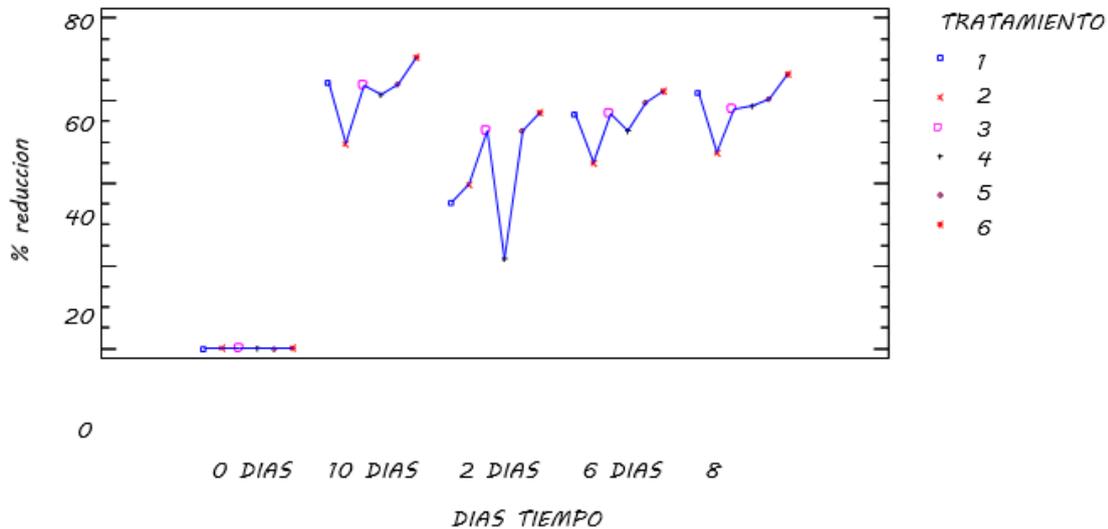
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2		7.3364	12.3866
1 - 3		-2.5438	12.3866
1 - 4		4.7308	12.3866
1 - 5		-3.6638	12.3866
1 - 6		-7.6202	12.3866
2 - 3		-9.8802	12.3866
2 - 4		-2.6056	12.3866
2 - 5		-11.0002	12.3866
2 - 6	*	-14.9566	12.3866
3 - 4		7.2746	12.3866
3 - 5		-1.12	12.3866
3 - 6		-5.0764	12.3866
4 - 5		-8.3946	12.3866
4 - 6		-12.351	12.3866
5 - 6		-3.9564	12.3866

* indica una diferencia significativa.

Figura 18. Gráfica Multi-variable para porcentaje de



reducción por tratamiento



Anexo IV: Protocolos de trabajo para lograr los sistemas de fermentación con los que se trabajó

FERMENTACIÓN

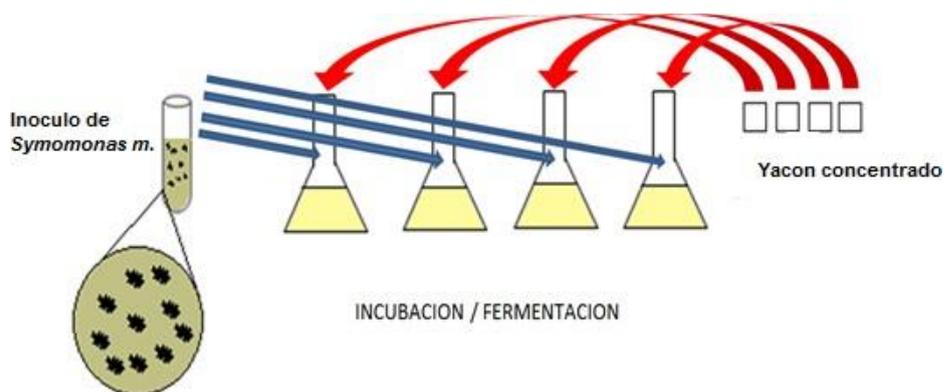
Para la fermentación y disminución de los azúcares reductores en el concentrado de yacón, se realizó dos tipos de fermentación: fermentación sumergida (sistema libre), y fermentación por inmovilización, en las dos fermentaciones se consideraron los parámetros iguales.

Se realizaron las fermentaciones durante distintos tiempos de acuerdo al diseño experimental, el procedimiento que se siguió es el siguiente:

A. FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Para la fermentación en sumergido, se tomaron 4 matraces de 250 ml contenían 100 ml del medio de cultivo y se inocularon el 3% v/v del inóculo preparado de *Zymomonas mobilis*, luego se incubaron a 30 °C. en agitación a 175 rpm por los tiempos indicados en el diseño experimental.

Figura 19 Fermentación sumergida

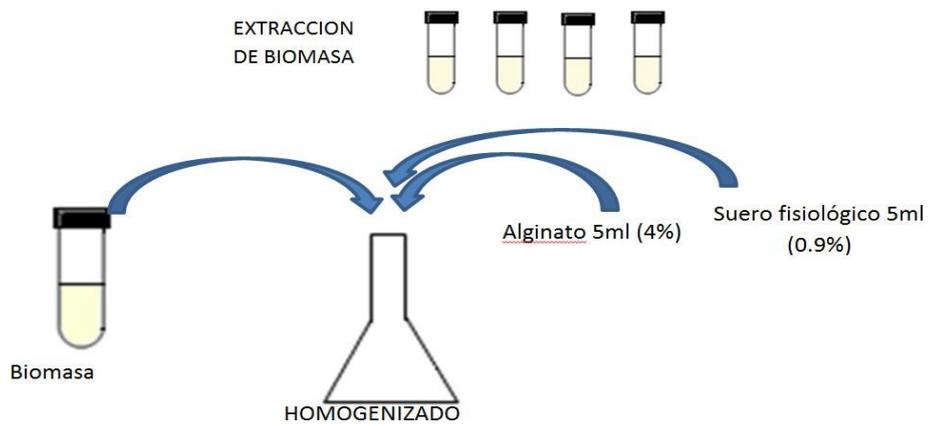


B. FERMENTACIÓN POR INMOVILIZACIÓN

La fermentación por inmovilización se realizó en 2 etapas: la primera fue obtener biomasa por una técnica de incorporación en un medio de producción y la segunda la fermentación por inmovilizado. Para este caso se siguió el siguiente protocolo:

En un matraz vacío estéril se colocó biomasa de *Zymomona mobilis*, en medio de producción 3% , luego se agregó una solución de alginato al 4% (5 ml) y finalmente la biomasa (pellets), todo esto se homogenizó; la mezcla se succionó con una jeringa estéril y luego se hizo hacer gotear en un matraz que contenía cloruro de calcio a 0.05M para permitir la formación de las perlas, se mantuvieron las esferas en el cloruro de calcio por media hora, pasado este tiempo y una vez polimerizadas, las perlas o esferas obtenidas se colocan en los matraces de 250 ml que contenían 100 ml del medio de cultivo (Ríos, Crespo, Terrazas y Alvares, 2007).

Figura 20 Esquema del proceso de Fermentación por inmovilización



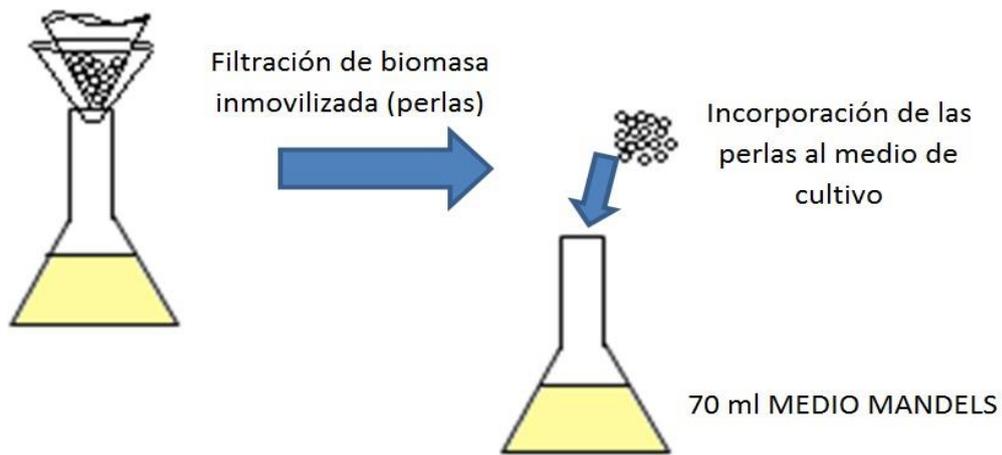
INCUBACION / FERMENTACION

28°C

175 RPM

X 72 Horas





Realizar este procedimiento para cada tubo de biomasa de la primera etapa.

Figura 21 Constancia de ejecución de la investigación en la UNSCH.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOTECNOLOGÍA

Av. Independencia s/n Huamanga Telf. 066-318553, 066-312510 Anexo 145



LA QUE SUSCRIBE, DOCENTE INVESTIGADORA RENACYT DEL ÁREA ACADÉMICA DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA:

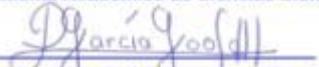
HACE CONSTAR:

Que el ingeniero **José Gabriel BARAZORDA CARRILLO**, ha desarrollado la parte experimental de su tesis titulada: "Obtención de fructooligosacaridos purificados a partir de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) concentrado mediante dos sistemas de cultivo con *Zymomonas mobilis*, durante el periodo del 01 de agosto del 2021 al 28 de febrero del 2022, donde demostró profesionalismo e interés por la investigación.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para fines que considere pertinentes.

Ayacucho, 09 de enero del 2023

c.c. A  **Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga**
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento Académico de Ciencias Biológicas


Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR
Docente - Investigadora

Firmado digitalmente por:
GARCIA GODOS ALCÁZAR
PAULA
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 09/01/2023 12:20:42-0500

Figura 22 Imagen de las raíces de yacón de las que se obtuvieron el extracto.



Figura 23 Imagen del tesista en laboratorio, realizando el proceso de inoculación del medio de cultivo



