Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Síntesis enzimática de fructooligosacáridos a partir de los frutos de algarrobo (*Prosopis pallida*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Carmen Gladys PEÑA SUASNABAR

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Peña C. Síntesis enzimática de fructooligosacáridos a partir de los frutos de algarrobo (Prosopis pallida). [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	20904674
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5061-4527
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Carlos Alejandro Bell Cortez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06091747
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Visitación Félix Veliz.
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07371298
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yadira Fernández Jerí
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	28307333
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.1. Biotecnología de enzimas
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Posgrado. 06369-R-17.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Edificio: Laboratorio de Biología Molecular – Facultad de Farmacia y Bioquímica. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jirón Puno 1002 Latitud: -12.0553931 Longitud: -77.021947
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2017 - diciembre 2019
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **17:00 hrs. del 16 de marzo de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por el Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dr. Luis Miguel Visitación Felix Veliz y Dra. Yadira Fernández Jeri; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE LOS FRUTOS DE ALGARROBO *(Prosopis pallida)*"**, presentado por la Magíster en Productos Naturales y Biocomercio **Carmen Gladys Peña Suasnabar.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

18 (DIECIOCHO) - MUY BUENO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Magíster en Productos Naturales y Biocomercio **Carmen Gladys Peña Suasnabar** el Grado Académico de **Doctora en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 18:50 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 18:50 hrs. del 16 de marzo de 2022.

Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez (P.P., T.C.)
Presidente

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P. P., T.C.)
Miembro - Asesora

Dr. Luis Miguel Visitación Felix Veliz (P. P., T.C.)
Miembro

Dra. Yadira Fernández Jeri (P.P., D.E.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email: upg.farmacia@unmsm.edu.pe

A Dios y la Virgen de Guadalupe por sus bendiciones.
A mis padres, Jesús y Dora, mi hermano Jony por todo su apoyo.
A mi bebe Mateo Thiago por cada sonrisa
que me alienta a terminar esta tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes, su apoyo constante en la ejecución de este trabajo de investigación.

A los miembros del grupo de investigación BIOMIAS de la FFyB de la UNMSM.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y a cada uno de sus miembros, que contribuyeron en la realización de esta investigación.

ABREVIATURAS

FOS : fructooligosacáridos

MSR : Metodología de Superficie de Respuesta

SST : 1-fructosiltransferasa

FFT : β- fructan-1-fructosiltransferasa

6G-FFT: 6G-fructosiltransferasa

6-SFT: 6-fructosiltransferesa

DP3: alactosil-melibiosa

DP5: fructosil-estaquiosa

DP6: difructosil-estaquiosa (DP6)

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

MOS: manooligosacáridos

GOS: galactooligosacáridos

GF3: 1-kestosa

GF4: nistosa

GF5: fructosilnistosa

DCC: Diseños centrales compuestos

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicilico

BSA: albumina de suero bovino

sc-FOS: fructooligosacáridos de cadena corta

GOD: glucosa oxidasa

POD: peroxidasa

Índice de tablas y figuras

Índice de Tablas		Pag.
Tabla 1.	Clasificación de los carbohidratos aceptados como prebióticos	19
Tabla 2.	Beneficios del consumo de alimentos prebióticos	23
Tabla 3	Oligosacáridos prebióticos distribuidos comercialmente	27
Tabla 4.	Variables a evaluar	34
Tabla 5.	Matriz diseño Box-Behnken	34
Tabla 6.	Actividades de glucosidasas comerciales	38
Tabla 7.	Determinación de la actividad enzimática y actividad específica de transfructosilación de las glicosidasas.	38
Tabla 8.	Análisis proximal de la harina de algarrobo	40
Tabla 9.	Caracterización de los carbohidratos de los frutos de algarrobo	41
Tabla 10.	Porcentajes de oligosacáridos, glucosa y azúcares reductores según MSR diseño Box - Behnken.	41
Tabla 11.	Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje FOS vs. tiempo y temperatura	44
Tabla 12.	Análisis de varianza del % de FOS	45
Tabla 13.	Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje de glucosa vs. Tiempo y temperatura	48
Tabla 14.	Análisis de varianza del porcentaje de glucosa libre	50
Tabla 15.	Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje de azúcares reductores (AR) vs. Tiempo (h), Temperatura.	53
Tabla 16.	Análisis de varianza del porcentaje de azúcares reductores (AR)	54
Tabla 17.	Parámetros de optimización de la respuesta para incrementar el porcentaje de FOS	56
Tabla 18.	Determinación de carbohidratos en el extracto de algarrobo mediante HPLC.	57
Tabla 19.	Determinación de minerales en el extracto de algarrobo biotransformado	58

Índice de Figuras Pag

Figura 1.	Estructuras de algunos fructooligosacáridos	20
Figura 2.	Productos de la fermentación de prebióticos.	22
Figura 3	Hidrólisis de la sacarosa por acción enzimática	25
Figura 4.	Transglicosicosilación de una molécula de fructuosa libre por acción enzimática a una sacarosa que actúa como aceptor.	26
Figura 5.	Mapa de ubicación del Algarrobo (Catacaos – Piura)	37
Figura 6.	Algarrobo (Catacaos – Piura)	38
Figura. 7.	Producción de FOS según tipo de enzima en extractos de algarrobo mediante cromatografía en capa fina	39
Figura 8.	Perfiles de FOS en extractos de algarrobo mediante cromatografía en capa fina.	40
Figura 9.	Histograma del porcentaje de FOS	46
Figura 10.	Histograma de residuos del porcentaje de FOS	46
Figura 11.	Distribución normal de residuos del porcentaje de FOS	47
Figura 12.	Gráfica de superficie de respuesta del porcentaje de FOS versus enzima y algarrobo	47
Figura 13.	Contornos del porcentaje de la producción de FOS versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo.	48
Figura 14.	Distribución normal de residuos para glucosa libre %	51
Figura 15.	Superficie de respuesta del porcentaje de glucosa producida versus tiempo y temperatura	52
Figura 16.	Contornos de glucosa porcentaje versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo	52
Figura 17.	Superficie de respuesta del porcentaje de azúcares reductores versus enzima y temperatura.	55
Figura 18	Contorno del porcentaje de azúcares reductores (AR) versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo.	55
Figura 19	Condiciones óptimas para el proceso de transfructosilación	56
Figura 19	Perfil cromatográfico (HPLC) del extracto biotransformado de algarrobo	57

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener fructooligosacáridos (FOS) por síntesis enzimática a partir de los carbohidratos presentes en los frutos de algarrobo (Prosopis pallida). Para ello, primero se evaluaron las enzimas comerciales inulinasa, invertasa y pectinasa con sacarosa al 30 % a 55 °C, 150 rpm y 60 min. Por otro lado, de los frutos de algarrobo se preparó la harina, realizó el análisis proximal, extrajeron y concentraron los carbohidratos hasta 20, 35 y 50 °Bx, para luego ser almacenados a 8 °C. Los parámetros de optimización considerados en la metodología de superficie de respuesta fueron: tiempo, temperatura, concentraciones de enzima y extracto acuoso de algarrobo; posteriormente estos parámetros se verificaron experimentalmente. La biosíntesis de FOS fue realizado mezclando extracto de algarrobo a las concentraciones de 20, 35 y 50 °Bx y pectinasa de Aspergillus aculeatus a 10, 35 y 61 mg, a 45, 55 y 65 °C durante 0,5; 9,5 y 18,0 h con agitación a 150 rpm. Los productos de la catálisis enzimática fueron tomados en diferentes tiempos; analizados inmediatamente por el método de la AOAC 999,03 y el programa informático Minitab 16. Las condiciones óptimas de reacción para la obtención de FOS fueron: concentración de extracto de algarrobo 38 °Bx, enzima 31 mg, 54 °C, 150 rpm y 12 h. El rendimiento experimental para FOS en el extracto concentrado de algarrobo fue 16,10 % por HPLC. Con esta investigación se valoriza a los frutos del algarrobo por la generación de un producto alimenticio funcional sobre la base de un proceso enzimático limpio y sostenible y de fácil escalamiento industrial.

Palabras clave: fructooligosacaridos, fructosiltransferasas, algarrobo, método de superficie de respuesta.

SUMMARY

The objective of the present work was to obtain fructooligosaccharides (FOS) by enzymatic synthesis from the carbohydrates present in the fruits of the carob tree (Prosopis pallida). For this, the commercial enzymes inulinase, invertase and pectinase were first evaluated with 30% sucrose at 55 °C, 150 rpm and 60 min. On the other hand, the flour was prepared from the carob fruits, the proximal analysis was carried out, the carbohydrates were extracted and concentrated up to 20, 35 and 50 °Bx, and then stored at 8 °C. The optimization parameters considered in the response surface methodology were: time, temperature, concentrations of enzyme and aqueous extract of carob; subsequently these parameters were verified experimentally. FOS biosynthesis was performed by mixing carob extract at concentrations of 20, 35 and 50 °Bx and Aspergillus aculeatus pectinase at 10, 35 and 61 mg, at 45, 55 and 65 °C for 0.5; 9.5 and 18.0 h with stirring at 150 rpm. The products of enzyme catalysis were taken at different times; analyzed immediately by the AOAC 999.03 method and the Minitab 16 computer program. The optimal reaction conditions for obtaining FOS were: carob extract concentration 38 °Bx, enzyme 31 mg, 54 °C, 150 rpm and 12 noon The experimental yield for FOS in the concentrated carob extract was 16.10% by HPLC. With this research, the fruits of the carob tree are valued for the generation of a functional food product based on a clean and sustainable enzymatic process that is easy to scale up industrially.

Keywords: fructooligosaccharides, fructosyltransferases, carob, response surface method

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han incrementado la demanda de carbohidratos con bajo aporte calórico y alto poder edulcorante, como son los fructooligosacaridos (FOS). Los FOS e inulinas son carbohidratos tipo fructanos, formados por polímeros de fructosa, unidos mediante enlaces glucosídicos de tipo β (2-1). La inulina posee un grado de polimerización superior a 10 unidades, mientras que los FOS, tienen un grado de polimerización inferior de 3 y 9 unidades de monosacáridos. Los FOS pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática de inulina y levano, o por reacciones de transfructosilación enzimática mediante la acción de transferasas e invertasas en un medio rico en sacarosa.[1,2]

Hasta el momento se han descrito enzimas que presentan actividad fructosiltransferasa, tales como invertasas, inulinasas, pectinasas, entre otras. Así, la pectinasa de *Aspergillus aculeatus* presenta actividades de pectinatranseliminasa, poligalacturonasa, pectinesterasa, β-galactosidasa, fructosiltransferasa, hemicelulasa y celulasa. Esta enzima, por presentar alta actividad fructosiltransferasa, es utilizada en la producción de FOS a partir de sacarosa. La eficiencia de conversión se mejora mediante la eliminación simultánea de glucosa a través de una reacción enzimática.

Por otro lado, debemos mencionar que nuestro país posee una gran biodiversidad y muchos de estos productos pueden ser utilizados como materia prima para generar productos nutracéuticos. Es así que, "El algarrobo" *Prosopis pallida* es una especie vegetal que crece desde tiempos ancestrales en las regiones áridas del Perú, de manera silvestre. La variedad pallida es típica del norte peruano. Produce frutos grandes denominada algarroba, con elevado contenido de azúcares. Los frutos del algarrobo presentan en su composición 46 % sacarosa, 32 % fibra, 8 % proteínas y 0.7 % grasas[3]. Los frutos de algarrobo al poseer gran cantidad de sacarosa constituye el sustrato ideal para la síntesis de fructooligosacaridos (FOS), un edulcorante con bajo aporte calórico que tienen gran demanda en la industria alimentaria y es considerado un prebiótico responsable de diferentes efectos biológicos como inmunoestimulante, protector de cáncer de colon entre otros.

En este aspecto, la disponibilidad del extracto de algarrobo con alta concentración de carbohidratos motivó la producción de FOS con el propósito de poner en valor a los frutos subutilizados de esta leguminosa. Es por ello que se planteó realizar la síntesis de FOS en

el extracto acuoso de algarrobo utilizando enzimas con actividad hidrolítica y de transfructosilación.

1.1. Situación problemática

El Perú posee abundantes recursos de la biodiversidad, sin embargo, actualmente hay pocos estudios de investigación sobre los contenidos nutricionales, compuestos secundarios y desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento sostenible de estos recursos.

Los FOS son carbohidratos conformados por monómeros de fructosa y una glucosa terminal unidas por enlace glucosídico β (2—>l), este tipo de enlace lo define como oligosacáridos no digeribles, ya que no puedan ser degradados por las enzimas digestivas humanas, que solo reconocen enlaces α (1→4).[4]

Estos oligosacáridos son considerados prebióticos y promueven el crecimiento de la microbiota intestinal como las bifidobacterias, estas últimas fermentan los FOS y de esta manera previenen las infecciones intestinales; reducen los niveles de lípidos; estimulan la absorción de calcio y magnesio; así mismo se ha demostrado que disminuye el desarrollo de cáncer al colon en ratas.[5,6] Debido a que los FOS poseen propiedades beneficiosas para la salud y su efecto prebiótico, se ha incrementado la demanda de FOS para la elaboración de alimentos funcionales. El consumo recomendado de FOS según la OMS es de 8 g diarios para que las diferentes propiedades nutricionales se manifiesten en el organismo.

De forma natural se puede encontrar inulina y FOS en diversas especies vegetales como achicoria (*Cichoriumintybus*), alcachofa (C*ynarascolymus*), alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), alcachofa globo (Cynara cardunculus) y el yacón (*Smallanthus sonchifolius*)[7.] Sin embargo, las cantidades disponibles para la industria alimentaria aún son insuficientes, por lo que se buscan fuentes alternativas para la obtención de FOS, a partir de sacarosa o extractos vegetales ricos en sacarosa y enzimas con actividad fructosiltransferasa.

En nuestro país el algarrobo (*Prosopis pallida*), es una especie vegetal propia del norte peruano, a los frutos que poseen se le atribuye propiedades nutritivas y medicinales, por la variedad de aminoácidos, vitaminas (principalmente C y E) y minerales que contiene, además de su alto contenido de carbohidratos (principalmente sacarosa), a pesar de estos atributos más del 50 % del fruto de algarrobo se pierde en el campo. Es en este sentido que se propuso en este trabajo la obtención de fructooligosacáridos (FOS) a partir de los carbohidratos presentes en el algarrobo.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son los parámetros óptimos de transfructosilación para la biosíntesis de FOS en el extracto acuoso de algarrobo a partir de azúcares simples?

1.3. Justificación teórica

En Perú, muchas especies vegetales que crecen de manera silvestre y cultivada, se les atribuyen propiedades biológicas de manera tradicional. Sin embargo, las investigaciones con respaldo científico y tecnológico que sustentan estas propiedades son escasas.

En el 2012 en un informe de Perubiodiverso reporto que *"anualmente son depredadas unas 10 mil hectáreas de bosques, que son destinadas básicamente para carbón de leña. Más del 50 % del fruto se pierde en el campo, un 15 % se consume como alimento para ganado y el 35 % restante va a los mayoristas que lo venden para diversos usos"* [8]. Entre estos está el alimento para animales; con los frutos se elaboran extractos, refresco o jarabe reconstituyente (algarrobina) y la harina de la pulpa tostada, se utiliza como sucedáneo del café [9,10]. Es por ello que en este proyecto se planteó desarrollar un producto con respaldo científico y tecnológico que daría un valor agregado al algarrobo y de esta forma promover el uso sostenible de este, por los productores de la zona. Los FOS obtenidos por este proceso además constituyen una importante alternativa para ser utilizada como edulcorante en diferentes alimentos nutracéuticos.

1.4. Justificación práctica

La síntesis de FOS en el extracto acuoso de algarrobo mediante un proceso enzimático permite la obtención de productos con valor agregado, que beneficien a cada uno de los eslabones de la cadena productiva.

Además, el proceso de transfructosilación desarrollado se podrá utilizar en las mejoras de productos ricos en carbohidratos procedentes de otras especies vegetales nativas y domesticadas.

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Producir fructooligosacáridos (FOS) a partir de los frutos de algarrobo por síntesis enzimática

1.5.2. Específicos

1) Seleccionar y determinar actividad enzimática de las glicosiltransferasas
2) Extraer y caracterizar los carbohidratos presentes en los frutos del algarrobo

3) Determinar las condiciones óptimas de la actividad enzimática de la glucosilsiltransferasa utilizando el método de superficie de respuesta (MSR).
4) Producir FOS de algarrobo por síntesis enzimática con los parámetros óptimos establecidos previamente con MSR

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

En Perú, no existen estudios relacionados con la síntesis enzimática de fructooligosacaridos a partir de los frutos de algarrobo utilizando procedimientos enzimáticos. Sin embargo, se han reportado trabajos destinados a la obtención de jarabes de algarrobo (algarrobina), galletas, caramelos, miel sintética, entre otros, siendo muchos de ellos comercializados en mercados y ferias locales como productos energizantes, nutritivos y medicinales.[11,12,14]

En el 2006 Bernardi *et al*.[11], formularon galletas utilizando pulpa de algarrobo como ingrediente alimentario debido a su poder edulcorante. Este formulado tuvo una composición proximal de 8,9 g/100 g de proteínas, 7,2 g/100 g de fibra dietética, 25 g/100 g de azúcar total y 18,5 g/100 g de grasa cruda, hierro y calcio contenido de 30 ppm y 340 ppm, respectivamente de los ácidos ascórbico (AA) y ácido cítrico (AC) los que fueron añadidos para incrementar la biodisponibilidad del Fe y Ca, la formulado resultante se realizó una evaluación sensorial, la prueba de aceptabilidad mostró que 77,65 % de la población (<25 años 41,76 %, 25 a 50 años 20,00 % y > 50 años 15,89 %) que degusto las galletas formuladas indicaron que "les gusta mucho" o "les gusta moderadamente" y no había consumidores que rechazan el producto.[11]

En otro trabajo realizado por Escobar et al.[12], se utilizó la harina de algarrobo como fuente de proteínas y fibra dietética en aperitivos dulces y salados. Los formulados finales de galletas y papas utilizando como ingrediente harina de algarrobo al 0 %, 10 % y 20 %, mostraron gran cantidad de proteínas, lípidos, cenizas, fibra cruda (63,6; 10,2; 4,3 y 4,2 g/100 g , respectivamente), lisina disponible (62.4 mg / g proteína) y fibra dietética total (24,2 g/100 g DMB) . Todos los ensayos galletas fueron bien aceptados ("me gusta mucho"); chips con el 10% de la harina de algarrobo presentaron la mayor aceptación ("me gusta"). A partir de los resultados concluyeron que el uso de harina de algarrobo como ingrediente alimentario aumenta el aporte de lisina disponible; su contenido en proteínas y fibra dietética.[12]

Mientras que Petit et al.[13], evaluaron la producción y purificación de un jarabe de azúcar a partir de vainas de algarrobo obteniendo una concentración de azúcares, cerca de 580 g / kg, 62 ° Brix y 93 % de pureza, mientras que el rendimiento de la caña de azúcar es de 200 g/kg. A partir de los resultados de las investigaciones de extracción concluyeron que un sistema de 10 columnas conectadas en serie es la más ventajosa para la eficiencia y automatización de la extracción de azúcar, obteniéndose un rendimiento de al menos 90%.[13]

Por otro lado Quispe et al.[14], evaluaron el efecto antioxidante y caracterizaron el jarabe extraído de las vainas del genero Prosopis sudamericanos conocidas como "algarrobina" o "arrope de algarrobo", usado en los países andinos, en pastelería y cocina local para preparar dulces y cócteles. Los principales compuestos fenólicos en los jarabes de algarrobo fueron la apigenina derivado C -glicosil flavonoides, incluyendo 6,8 - C -pentoside- C -hexoside, 6,8-dihexoside y quercetina glucósidos, siendo C –glicosylflavonoide conocido por su efecto antiinflamatorio y antioxidante.[14]

Otro estudio realizado por Bigne F.[15], donde evaluó la harina de algarrobo en la elaboración de productos de panificación demostró que la sustitución de un 15 % de harina de trigo por harina de algarroba dio lugar a panes con un contenido de fibra cercano al 7 %, que califica al producto como “rico en fibra”, además de incrementar significativamente el contenido de minerales.[15]

Por otro lado, los FOS que se utilizan en procesos industriales son obtenidos principalmente por hidrólisis de inulina, síntesis enzimática a partir de la sacarosa empleando microorganismos inmovilizados o enzimas fructosiltransferasas. En los últimos años, enzimas que presentan actividad fructosiltransferasa se han descrito tales como invertasas, inulinasas, pectinasas, entre otras. Así, la pectinasa de *Aspergillus aculeatus* presenta actividades de pectinatranseliminasa, poligalacturonasa, pectinesterasa, β-galactosidasa, fructosiltransferasa, hemicelulasa y celulasa. Esta enzima por presentar alta actividad fructosiltransferasa es utilizada en la producción de FOS a partir de sacarosa. Durante la biosíntesis de FOS se produce una mezcla con diferente número de fructosas tales como: 1-kestosa (GF3), nistosa (GF4), fructosilnistosa (GF5), siendo 1-kestosa la de mayor valor comercial por su gran poder edulcorante.

Existen diferentes trabajos de investigación donde se evalúan diferentes enzimas con actividad fructosiltransferasa. Monsan et al.[16], describen dos tipos de enzimas para la obtención de FOS: enzimas hidrolíticas (glicosidasas) que catalizan la hidrólisis inversa mediante control termodinámico y cinético; y las enzimas transferasas que usan hidratos de carbono simples de origen agrícola.[16]

Perez-Cruz et al.[17], describen el escalado de la reacción de síntesis de FOS a partir de sacarosa, biosintetizada por fructosiltransferasas obtenidas de células recombinantes de *Pichia pastoris* e inmovilizadas en alginato de calcio, utilizando un biorreactor de 5 L con escalado de 5 a 50 L. En estas condiciones lograron producir 322 g/L de 1-kestosa en el modelo 5 L y 320 g/L en el prototipo de 50 L.[17]

Vega et al.[18], emplearon el MSR como una herramienta de optimización para la producción de FOS de cadena corta (sc-FOS) utilizando enzimas celulolíticas comerciales. Las variables independientes analizadas fueron: temperatura, concentraciones de sacarosa y enzima. Las respuestas del diseño fueron: rendimiento (g sc-FOS/100 g de sacarosa inicial), 1-kestosa (g/100 g sc-FOS) y volumétrica de la productividad (g sc-FOS / h L). Las condiciones costo-efectivas fueron de 50 ºC, 6,6 TU / ml de enzima, 2,103 M de sacarosa en 50 mM de tampón acetato a pH 5,5 con un tiempo de reacción de 5 h; en estas condiciones se obtuvieron 63,8 % de rendimiento.[18]

Montilla et al.[19], describen las condiciones de reacción para la síntesis de oligosacáridos a partir de estaquiosa utilizando un preparación enzimática comercial proveniente de *Aspergillus aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L). Galactosil-melibiosa (DP3) se sintetizó como un resultado de la actividad fructosidasa, mientras que fructosil-estaquiosa (DP5) y difructosil-estaquiosa (DP6) se formaron como consecuencia de la actividad fructosiltransferasa de Pectinex Ultra SP-L. El tiempo de reacción juega un papel importante en la reacción, así como la composición de la mezcla de oligosacáridos constituido por DP5 20 %, DP6 0,7 %, estaquiosa 55 %, galactosil-melibiosa 21 %, y monosacáridos 1%. La estaquiosa podría ser utilizada como un sustrato en la síntesis enzimática de oligosacáridos generando oportunidades comerciales en el desarrollo de prebióticos.[19]

Vega-Paulino et al.[20], estudiaron la actividad de transfructosilación de 25 enzimas comerciales de uso alimentario, pero solo tres enzimas mostraron actividad de transfructosilación a partir de sacarosa, los sc-FOS no fueron hidrolizados después

de 12 h. La productividad fue de 58,8 a 62,6 % (g sc-FOS/100 g de sacarosa inicial) y de 52,5 a 55,9 g sc-FOS / h L, respectivamente.[20]

Santos et al.[21], caracterizó una levansacarasa de *Z. mobilis* con actividad de transfructosilación usando sacarosa, los productos generados fueron analizados por cromatografía de intercambio aniónico con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). La optimización del proceso se realizó inmovilizando la enzima por atrapamiento en geles de alginato cálcico y las esferas obtenidas se deshidrataron para formar DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes).[21]

Hernandez et al.[22], obtuvo enzimas modificadas productoras de FOS. Los genes que codifican las enzimas fructosidasa (BfrA, EC 3.2.1.26) de la bacteria *Thermotoga maritima* y sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99) de la planta *Schedonorus arundinaceus* se modificaron mediante mutagénesis y se expresaron en *Pichia pastoris.* Se generó 3 mutantes BfrA (W14Y, W14Y-N16S y W14Y-W256Y) que mostraron un incremento en actividad hasta 4 veces la relación transferasa/hidrolasa. La reacción con sacarosa rindió 37 % (p/p) FOS con un mayor porcentaje de 6-kestosa y neokestosa. Por otro lado, 1-SST produjo 1-kestosa y nistosa en proporción 9:1, cuya suma representó de 55 % a 60 % (p/p) del contenido de carbohidratos.[22]

Surin et al.[23], estudiaron la optimización de la producción enzimática de fructooligosacáridos en el jarabe de Logan, (Dimocarpus logan L.) utilizando dos enzimas comerciales Pectinex Ultra SP-L y glucosa oxidasa, encontrando que los valores óptimos para el proceso de transfructosilación son Pectinex Ultra SP-L 3.3 U g-1 de sacarosa, 8 h 41 min de tiempo de reacción y glucosa oxidasa 1022 U g-1 de sacarosa. Como resultado se genera oligofructanos de cadena corta como nistosa y 1-kestosa en concentraciones de 28 – 30 g L-1 y 119 – 123 g L-1 respectivamente.[23]

Muñoz et al.[24] , en su investigación para obtener FOS utilizó jugo de caña y células permeabilizadas de *candida apícola* obtuvo concentraciones de 45,53 y 25,92 gr/L de FOS, a 70 °Brix.[24]

Ozge *et al.*[25], utilizó Zymomonas mobilis levansucrase para la producción de 6-kestosa en la melaza de algarroba. La kestosa producida se mantuvo estable a 20 ° C durante 4 meses. Se evaluó el color del producto, el índice de pardeamiento no enzimático y la acidez titulable durante el almacenamiento y se encontró que la calidad del producto era comparable a la del control. Además, la cantidad reducida de

sacarosa dio como resultado la prevención de la formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) durante el almacenamiento. Como resultado, la melaza de algarrobo se convirtió en un producto prebiótico de alta calidad.[25]

Una alta producción de FOS (aproximadamente 60 %) de cadena corta se puede controlar con el tiempo de reacción, enfatizando que la 1-kestosa tiene mayor poder edulcorante que los otros FOS de cadena corta, por lo que un extracto rico en 1-kestosa se puede utilizar como edulcorante alternativo para diabéticos.

2.2. Aspectos teóricas

2.2.1. Marco histórico

Cuando se habla del algarrobo se debe mencionar que históricamente es considerado, un árbol emblemático para la cultura judía y católica. En ambas, según fuentes bíblicas, el algarrobo es considerado un árbol sabio y fiel, capaz de dar alimento a las tribus de Israel. Además, es el árbol que Dios deja nacer incluso en el desierto, para nutrir a quién lo atraviese. El algarrobo aparece en el evangelio de Lucas (15, 1-3. 11-32) y Mateo como fuente de alimento, en este último menciona que San Juan sobrevivió en el desierto comiendo miel y algarrobas. [26]

El texto bíblico señala que en las antiguas civilizaciones del Mediterráneo, era considerado símbolo de nutrimento, tenacidad y memoria colectiva. Por ello eran usadas en celebraciones realizadas en los jardines de la memoria, para conmemorar el genocidio judío del siglo XX. [27]

Según Elisa Carati, autora de Historia cultural del algarrobo, el nombre "algarrobo" podría ser más bien un término genérico que incluye a plantas biológicamente diferentes como la ceratonia siliqua del Mediterráneo, y prosopis pallida, chilensis, julinflora, affinis, de Sudamérica. Parece ser que, a través de distintas culturas, se mantiene un significado simbólico similar, ya que estas especies han representado al árbol de la vida, del conocimiento, a seres divinos y a la sabiduría.

En el Perú hablar de un bosque seco piurano parece casi una contradicción, pero no lo es, en esta zona del país, en que el algarrobo ha crecido y se ha expandido de forma silvestre a lo largo de los años a pesar de la sequedad de la tierra, la escasez de lluvias y el implacable sol. El secreto para su subsistencia son sus larguísimas raíces, que le permiten obtener del subsuelo el agua. De hecho, investigadores como Antonio Brack Egg, alegan que la harina que se obtiene de su fruto (vaina), es tan nutritiva que podría servir como solución frente a la desnutrición mundial.

2.2.2. **Alimentos Funcionales**. "*Son aquellos alimentos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos y nutricionales básicos en una o varias funciones del organismo y que permiten mejorar la salud o contribuyen a disminuir el riesgo a sufrir enfermedades"* [28]. Hoy en día gran parte de la población ha tomado conciencia de la importancia de los beneficios que tiene el consumo de este tipo de alimentos, por lo que existe una demanda creciente de productos alimenticios con esta característica. Pueden encontrarse como alimentos naturales o alimentos que han sido modificados donde se les añade o quita algún componente. Entre los ejemplos de alimentos funcionales podemos mencionar los que están enriquecidos con vitaminas, minerales, ácidos (grasos omega 3) o fibra, como cereales y derivados lácteos o suplementos nutricionales diseñados para diferentes grupos etarios. Los alimentos funcionales ejercen su acción en múltiples sistemas, especialmente en el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular y el sistema inmunológico.

2.2.3. **Fibra Dietética**.

Se refiere a diversos carbohidratos y la lignina que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas de los seres humanos, pero que pueden ser fermentados por la microflora colónica o son parcialmente eliminados por las heces. Dentro de este grupo de carbohidratos encontramos a los polisacáridos no amiláceos (celulosas, hemicelulosas, pectinas, gomas y mucílagos), la inulina, los FOS y los GOS, que no son digeridos en el intestino humano. Sin embargo, solo algunos cumplen con los criterios para ser considerados como prebióticos (Inulina, FOS, GOS, oligosacáridos derivados de la soja, xilooligosacáridos, pirodextrinas e isomaltooligosacáridos). [29]

Los criterios que debe cumplir un ingrediente alimentario para ser considerado prebiótico debe ser [30]:

- Producto natural o modificado que no es hidrolizado por las enzimas digestivas humanas y resiste al HCl.
- Capaz de modificar la composición de la microbiota intestinal del colon tras ser selectivamente fermentada por una o varias bacterias.
- Estimulación selectiva de bacterias intestinales e inducción de beneficios para la salud.

2.2.4. **Prebióticos**. Según la World Gastroenterology (WGO) en el 2011 definió a los prebióticos como: *"sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no*

amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas".

En los últimos años se ha demostrado que los prebióticos cuando son incorporados en la dieta alteran la microbiota intestinal disminuye la cantidad de bacterias patógenas (coliformes, bacteroides y cocos) y aumenta el número de las bifidobacterias hasta en diez veces. Otros efectos atribuidos a los prebióticos están relacionados con su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal para modular la respuesta inmune del huésped, entre otros. [28,32]

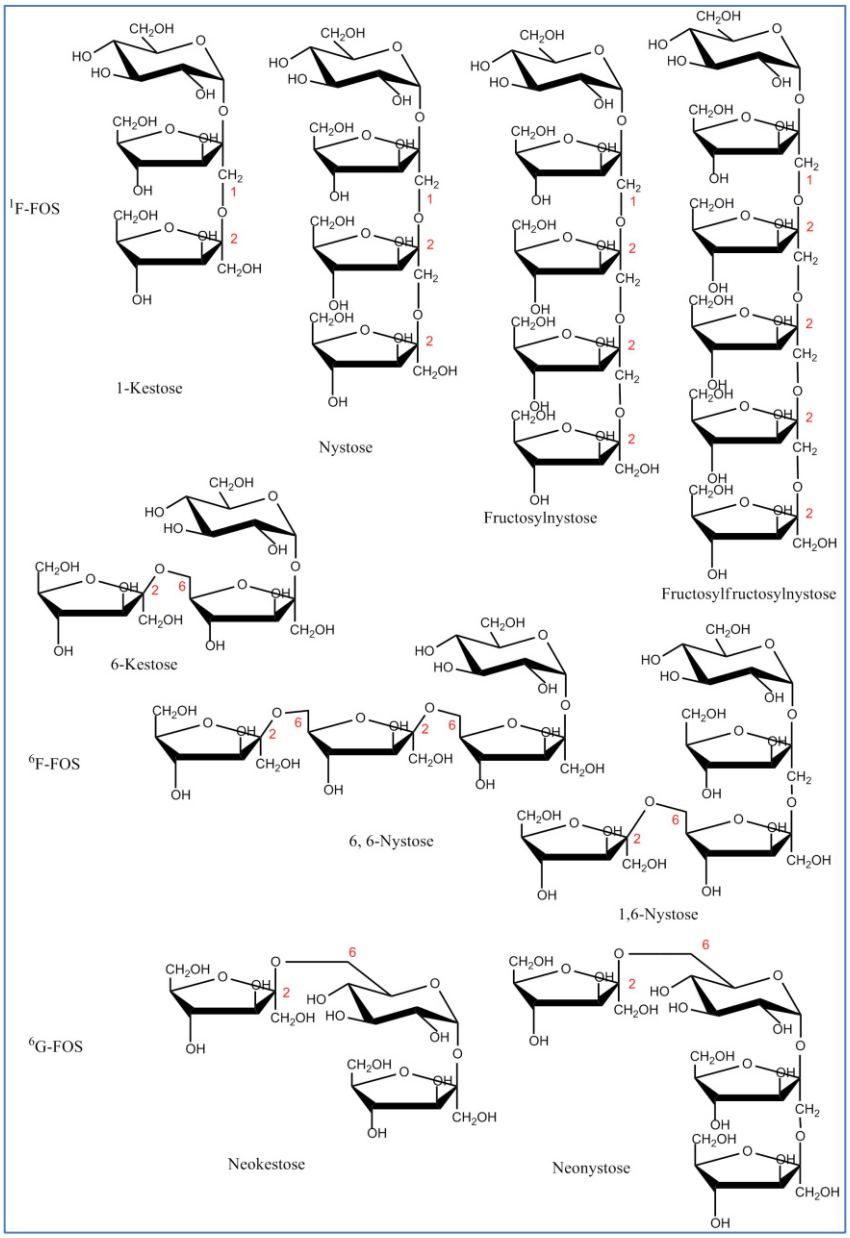
Tabla 1. Clasificación de los carbohidratos aceptados como prebióticos[21]

Prebiótico	Grado de polimerización	Nombre comercial	Producción (Tm/año)	Enzima utilizada
Inulina $(Fru)_n$-Glc	n = 2-60	Raftiline	> 20 000	Extracción directa
FOS **Oligofructosa** $(Fru)_n$-Glc	n = 2-9	Actilight Raftilosa	12 000	Fructosiltransferasa Inulinasa
GOS $(Gal)_n$-Glc	n = 2-5	Oligomate 50	15 000	β-galactosidasas
Lactulosa Gal-Glc	-	MLS-50	20 000	Catalizador básico

Fuente: Santos-Moriano

2.2.5. **Fructooligosacaridos (FOS)**

Considerados oligosacáridos indigeribles presentan como fórmula general FF_n y GF_n, donde "G" representa a una molécula de glucosa y "F" representa el número de moléculas de fructosas, las cuales están unidas por enlaces glicosídicos β-(2→1) o β-(2→6).[33] Son generalmente producidos por plantas y hongos, presentan un grado de polimerización de 2 a 10 unidades. Los más comunes en la naturaleza son el trisacárido 1-kestosa (GF2), el tetrasacárido nistosa (GF3) y el pentasacárido fructosilnistosa (GF4), en los cuales las unidades de fructosa están unidas por enlaces ß (2-1). Siendo el GF2 el que presenta mayor poder edulcorante. [32]



Fuente: Santos-Moriano P. (2015)

Figura 1. Estructuras de algunos fructooligosacáridos[21]

La presencia del enlace β(2→1) y β(2→6) impide la hidrolisis de los FOS por las enzimas digestivas (reconocen solo enlaces α(1→4) y α(1→6))en las partes altas del tracto gastrointestinal y es responsable de su reducido valor calórico y efectos parecidos a la fibra dietética.[34,35] Si bien los FOS de origen natural presentan polímeros de fructosa en algunas ocasiones presenta una glucosa terminal; en tanto que en las moléculas de FOS obtenidas por biosíntesis siempre presenta una glucosa terminal.[7] En los últimos años el consumo de los FOS ha recibido un particular interés debido a las múltiples propiedades biológicas y funcionales

como prebiótico que se han podido identificar.

2.2.5.1. Propiedades Físicas de los FOS

Los FOS se presentan como polvo blanco, incoloro, sin olor y de sabor neutral, presenta mayor solubilidad y dulzor que la inulina, así como un efecto sinergístico con edulcorantes como el aspartame. Son estables a altas temperaturas de hasta 140°C, con propiedades humectantes, reduce la actividad de agua y por tanto propicia la estabilidad microbiológica. A pH menores de 4, los enlaces glicosídicos tipo β (2→1) o β-(2→6) de las unidades de fructosa, se hidrolizan con la consecuente liberación de fructosa. Por ello, estos compuestos no pueden ser utilizados para la elaboración de alimentos muy ácidos. [36,37]

2.2.5.2. Propiedades fisiológicas de los FOS

Los FOS una vez ingeridos no pueden ser degradados por las enzimas digestivas humanas siendo fermentados en el colon. Como resultado de esta fermentación bacteriana selectiva por la microbiota intestinal (bifidobacterias y lactobacillus), se produce H^+, CO_2, CH_4 y ác. grasos de cadena corta (AGCC) como los ác. acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:20, esto tiene como consecuencia un descenso del pH del tracto digestivo y con ello la disminución de la población de bacterias patógenas del intestino ya que son sensibles a la acidificación del medio (Ej.: E. coli, Salmonella spp., entre otras) [32]. Estos AGCC presentan importantes efectos sobre las células del colon (el colonocito), ya que inducen al crecimiento y reparación del colon. El butirato es el substrato energético de los colonocitos. Los AGCC se generan en el metabolismo del piruvato producido por oxidación de la glucosa. Existen dos vías para metabolizar del piruvato, en una se genera propionato, a través del succinato y en la otra se convierte el piruvato en acetil CoA que posteriormente formara acetato o butirato. [37]

2.2.5.3. Efecto prebiótico de los FOS

La fermentación de los FOS producen AGCC, estos son absorbidos modificando la composición lipídica de la sangre, lo que contribuye a la reducción de los niveles de colesterol en sangre. [32] La presencia de estos ácidos grasos disminuye el pH del medio intestinal que favorece la absorción de Fe, Mg y Ca. El incremento en la absorción de minerales, especialmente el calcio, permite un aumento de la mineralización de los huesos. Este efecto es importante en la

prevención de enfermedades como la osteoporosis.[39] Además la actividad metabólica también incluye la producción de las vitaminas: K, B12, biotina, ác. Fólico, ác. pantoténico y la síntesis de aminoácidos. [21]

Los efectos beneficiosos de los prebióticos son atribuidos a un incremento de la flora principalmente bifidogénica y se dividen en tres acciones: inmunoprotectora, metabólica (producción de AGCC) y nutricional ya que favorecen la síntesis de algunas vitaminas como B6, B12 entre otras y ayudan a la absorción de minerales. [31] Al ser una fibra dietética los FOS permite el alivio de enfermedades como el estreñimiento. Por sus propiedades como edulcorantes de bajo aporte calórico, los FOS ayudan en la prevención de diferentes enfermedades cardiovasculares e hipertrigliceridemia, las cuales están asociadas a dietas hipercalóricas. Al mismo tiempo al no aportar calorías disminuye el riesgo a desarrollar enfermedades como la obesidad y diabetes tipo II.[40]

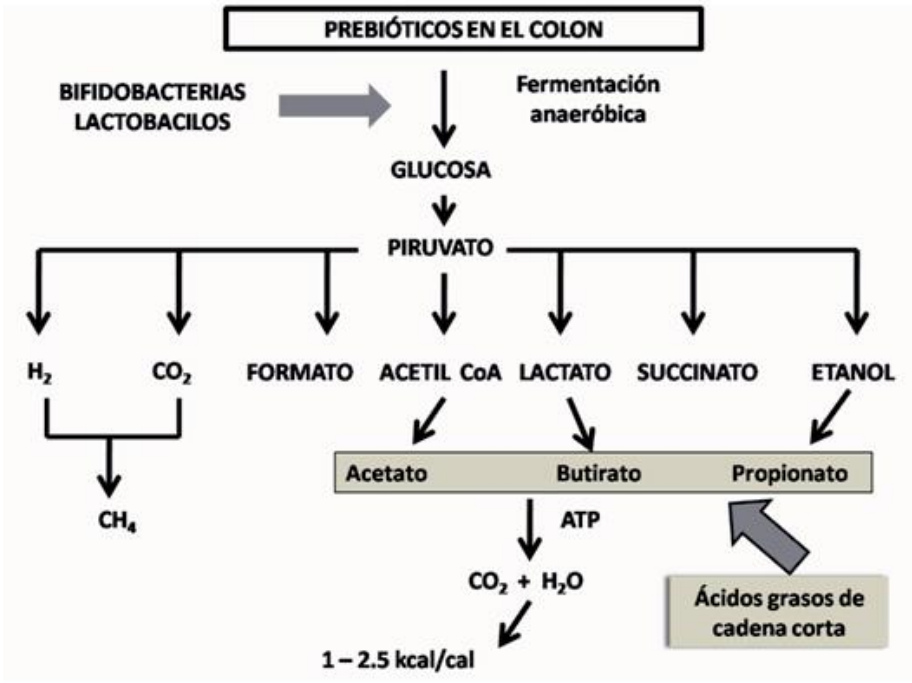


Figura 2. Productos de la fermentación de prebióticos[31].

El aporte energético de los FOS que alcanzan el colon, esta entre 1 - 2,5 Cal/g, hecho que depende del grado de fermentabilidad del tipo de GFs, ya que no todas las fibras producen la misma cantidad de AGCC. [37]

Por otro lado, algunos estudios realizados en animales de experimentación

demostraron que el consumo de grandes cantidades de FOS disminuye la actividad glucuronidasa beta, enzima del intestino que puede convertir a los procarcinógenos en carcinógenos. [41]

Tabla 2. Beneficios del consumo de alimentos prebióticos
• Mejora la absorción de Ca y Mg, por lo tanto favorece la salud de huesos y dientes
• Mejora la respuesta del sistema inmune
• Permite conservar la integridad intestinal al disminuir la presencia de las bacterias patógenas
• Ayuda a disminuir los niveles de colesterol al incrementar su eliminación por las heces

Fuente: propia

2.2.5.4. Aplicaciones de los FOS.

De manera natural se puede encontrar FOS en diversas especies vegetales como la cebolla, los espárragos, el centeno, la avena, las alcachofas, los plátanos y la chicoria. El contenido de FOS en los alimentos mencionados es muy variable, en el trigo se ha encontrado de 1 a 4 %, mientras que en la chicoria un 20 %. Existen diferentes tipos de FOS y es debido a su grado de polimerización. Siendo utilizados en diferentes productos alimentarios, ya sea por sus propiedades tecnológicas como nutricionales como texturizantes, ligantes de agua, sustitutivos de las grasas y azúcares, lo que sirve para dar consistencia a distintos «productos bajos en calorías». Podemos encontrar FOS en derivados lácteos, galletas, helados, salsas light, suplementos nutricionales entre otros. [41]

2.2.5.5. Obtención de FOS

En nuestra actualidad la producción de los FOS está centrada en los microorganismos y/o las enzimas que producen, ya que la extracción de estos oligosacáridos a partir de plantas o la utilización de sus enzimas no resulta rentable debido a que está ligada al ciclo estacional de las mismas, se extraen pocas enzimas y el rendimiento de las síntesis es bajo. [42]

- **Por fuentes naturales**

Las principales familias de especies vegetales incluyen a los fructanos en su composición son las Liliaceae, Gramineae, Poaceae y Solanaceae. Es por ello que podemos encontrar FOS en alimentos como el trigo. Las gramíneas contienen entre 0,38 g/100g y 0,96 g/100g de oligofructanos.[7] Además encontramos importante cantidad de fructanos en: ajo (*Allium sativum*L.),

cebolla (*Allium cepa* L.), cebada (*Hordeum distichum*, *Hordeum tetrastichum*), maní (*Arachis hypogaea*L.), espárrago (*Asparagus officinalis* L.), y banana (*Musa* sp.). En estos vegetales los fructanos presentan entre 1 y 1,5 kcal/g. Sin embargo, se encuentran mayores concentraciones de FOS en diversos vegetales como achicoria *(Cichoriu mintybus*), alcachofa *(Cynaras colymus),* alcachofa de Jerusalén *(Helianthus tuberosus),* alcachofa globo (*Cynara cardunculus*) y yacón (*Smallanthus sonchifolius*), entre otros. [7]

- **Por síntesis**

Los FOS pueden ser obtenidos por dos mecanismos síntesis química o enzimática, el primero presenta desventajas debido a la formación de FOS con enlaces α y β y a la formación de compuestos indeseables, obteniendo un bajo rendimiento. En tanto que, por síntesis enzimática se producen FOS con enlaces glicosídicos β, con un rendimiento mayor al 70% de transformación de sustrato en producto. [2]

Los FOS también pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática de la inulina y levano, o por reacciones de síntesis enzimática por acción de transferasas, inulinasas, pectinasas e invertasas [43,44]

- **Fructosiltransferasas**

Las fructosiltransferasas son producidas por diversos microorganismos y vegetales. Siendo las primeras las que poseen mayor estabilidad a pH 5 y 6,5, su temperatura óptima es 45 ºC; y un punto isoeléctrico pH de 4,7; estas β - D fructofuranosidasas utilizan cofactores como: Ca2+, Mg2+, Co y Li; además de altas concentraciones de sacarosa. Por otro lado, las fructosiltransferasas pueden ser inhibidas en presencia de minerales como: Pb, Hg, Al y Ag, así como por altas concentraciones de glucosa. Generalmente estas enzimas presentan una actividad específica de 1,260 μmol/mg y pesos moleculares de aproximadamente 69-77 kDa. [45,1]

Dependiendo de su origen esta gran familia de fructosiltransferasas está conformada en las plantas por la 1 - fructosiltransferasa (1 - SST) (EC 2.4.1.9), β-fructan-1-fructosiltransferasa (1-FFT)(EC2.4.1.100), 6G-fructosiltransferasa (6-SFT) (EC 2.4.1.243),sacarosa-6-fructosiltransferasa (6-SFT) (EC 2.4.1.10) y en los microorganismos encontramos a la sacarosa-sacarosa fructosiltransferasas (SST) (EC 2.4.1.99).

La forma en que se suelen obtener estas enzimas es por precipitación en sulfato de amonio y depuración por cromatografía de intercambio iónico. [45]

Además de estas enzimas de origen natural con propiedades específicas de transfructosilación, recientes investigaciones han demostrado que enzimas hidroliticas también poseían capacidad fructosiltransferasas, como por ejemplo celulasas, pectinasas, invertasas e inulinasas [20,46].

Las celulasas (EC.3.2.1.4) son glicosidasas que degradan y transforman los residuos celulolíticos, son utilizadas en diversas industrias tales como: la alimentaria en el procesamiento de jugos de fruta, extracción de aceites comestibles, etc.; la farmacéutica en preparados que mejoran la calidad nutricional y la digestibilidad del alimento; la textil en procesos de biopulido y suavizante; en la fabricación de detergentes; elaboración de bioetanol, etc. Las celulasas son de tres tipos: endo β-1,4 glucanasa, exo β-1,4 celobiohidrolasa y β-1,4 glucosidasa [47].

En los últimos años, las glicosidasas son utilizadas en hidrólisis reversa como transferasas en la síntesis de oligosacáridos cuando existen en el medio de reacción concentraciones altas de sacarosa. Este bioproceso tecnológico es limpio y sostenible, de gran interés industrial en la elaboración de oligosacáridos que se usan como ingredientes alimenticios, nutracéuticos y farmacéuticos.[47] En la biosíntesis de FOS a nivel industrial se utiliza sacarosa como sustrato. La reacción enzimática para la síntesis del FOS se divide en dos fases:

1era fase. Partiendo de la molécula de sacarosa, la enzima rompe el enlace glucosídico para obtener la molécula de fructosa aislada.

2da fase. Se transfiere la fructosa liberada a una molécula aceptora (sacarosa o un FOS), mediante una reacción de transglicosidación.

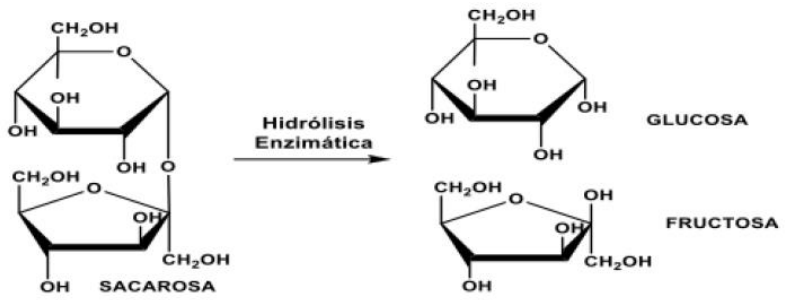


Figura 3: Hidrolisis de la sacarosa por acción enzimática[68]

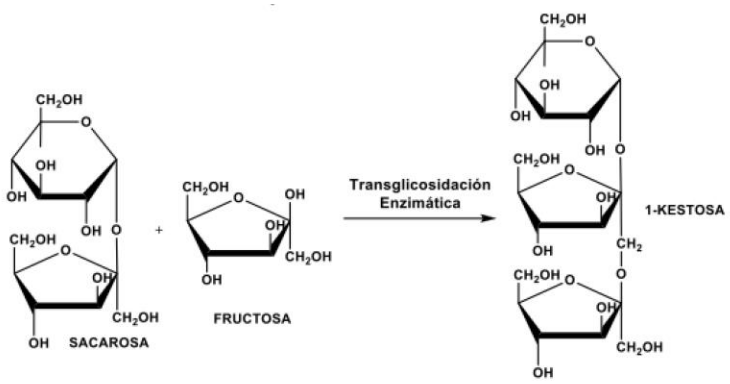


Figura 4. Transglicosicosilación de una molécula de fructuosa libre por acción enzimática a una sacarosa que actúa como aceptor[68].

Muchos de los FOS comercializados para la industria alimentaria y farmacéutica son generados a partir de sacarosa por síntesis enzimática. En los últimos años los avances en enzimología industrial, han permitido la obtención de frútanos a gran escala. [44,17]

En el mercado globalizado existe una gran demanda de productos funcionales. Así, se han elaborado alimentos conteniendo FOS con isoflavonas de la soya, FOS con fenólicos de frutas como la ciruela, el higo entre otros, FOS con manooligosacáridos (MOS), y FOS con galactooligosacáridos (GOS), todos con el fin de restablecer y promover la absorción de minerales, densidad ósea en casos de osteoporosis, mejora de propiedades prebióticas e inmunológicas. [7]

Tabla 3 Oligosacáridos prebióticos distribuidos comercialmente[31]

Nombre	Nombre comercial	Estructura química y tipo de enlace glucosídico
Inulina	Raftiline®	α-D-Glu (1→2)-[β-D-Fru]$_n$ -(1→2) β-D-Fru (n=10→60)
Oligofructosa	Raftilose®	β-D-Fru (1→2)-[β-D-Fru]$_n$ -(1→2) β-D-Fru (n=2→10)
Fructooligosacáridos de cadena corta	Actilight® Neosugar®	α-D-Glu (1→2)-[β-D-Fru]$_n$ -(1→2) β-D-Fru (n=1→3)
Galactooligosacáridos	Oligomate®	α-D-Gal (1→6)-[β-D-Gal]$_n$ -(1→4) β-D-Glu (n=1→5)
Galactotriosa/TOS	Cup-Oligo®	α-D-Gal (1→6)-[β-D-Gal]$_n$ (n=2)
Soyaoligosacáridos	Soya-Oligo®	[α-D-Gal (1→6)]$_n$-α-D-Glu-(1→2) β-D-Fru (n=1→3)
Xylooligosacáridos	-	[β-D-Xyl-(1→4]$_n$ (n=2→9)
Lactulosa	Duphalac®	β-D-Gal-(1→4)-β-D-Fru

Glu = Glucosa, Fru = Fructosa, Gal = Galactosa, Xyl = Xylosa

Fuente: Melendez N.

Hoy en día se han reportado trabajos destinados a la obtención de jarabes, mieles, zumos, néctares, hojuelas y caramelos de la raíz de yacón, siendo muchos de ellos comercializados en mercados y ferias locales como productos para diabéticos, adelgazantes y inmunoestimulantes [48]. Por otro lado, los FOS que se utilizan en procesos industriales se importan y son obtenidos principalmente por tres vías: hidrólisis de inulina, síntesis enzimática a partir de la sacarosa empleando microorganismos inmovilizados o enzimas glicosidasas o fructosiltransferasas. Durante la biosíntesis de FOS se produce una mezcla con diferente número de fructosas tales como: 1-kestosa (GF2) más de 55 %, nistosa (GF3) 25 %, fructosilnistosa (GF4) 5 %, siendo 1-kestosa la de mayor valor comercial por su gran poder edulcorante. [1]

2.2.6. Algarrobo *(Prosopis pallida)*

El algarrobo es una especie vegetal que crece en los bosques secos, se encuentran distribuidos en mayor proporción en América y África. "*Según dato, del Ministerio de Ambiente de Perú (MINAM), en el país hay más de 3 600 000 hectáreas entre Piura, Tumbes, Lambayeque, La Libertad, Cajamarca y Áncash*". [49]

El algarrobo del norte del Peruano, llamado por los españoles *Ceratonia siliqua* por su similitud con el algarrobo mediterráneo. En esta zona se pueden encontrar dos especies cuyo nombre científico son: *Prosopis pallida y Prosopis juliflora*. Estos árboles poseen un sistema radicular que les permite absorber agua a distintas profundidades así como raíces laterales que captan las lluvias con gran facilidad; esta es una de las características principales que las hacen capaces de sobrevivir en condiciones extremas de sequía. [50,51]

Del algarrobo en la actualidad se aprovecha la madera y su fruto (vainas) que posee un alto contenido de azúcares, llamadas comúnmente algarroba. La especie predominante de la zona es la *Prosopis pallida*; tarda 4 años en crecer y se extiende hasta 20 años normalmente. La cosecha de las algarrobas (vainas maduras) se realiza de diciembre a marzo. [51]

Las leguminosas del género Prosopis de diversas variedades (*Prosopis alba, Prosopis nigra, Prosopis panta*) son utilizadas en la alimentación humana en distintos países de América Latina, así podemos encontrarlas en galletas, pan, tortas o pasteles[9].

Con un proceso de tostado y molienda de las semillas se puede obtiene un sucedáneo de café. En el proceso de tostado las harinas sufren cambios internos y externos que se producen ante pequeños incrementos de la temperatura. A los 100 ºC se produce la caramelización de los azúcares y la pirolisis del volumen celular de las harinas. [9,12]

Hoy en día existen aproximadamente 1'200,000 Ha de bosques de algarrobo silvestre, con 200,000 Ton de algarrobo disponibles cada año, de los cuales solo 12,000 Ton de algarrobo es comercializada (registradas).[8]

2.2.7. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

- **Definición.**

"*La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema".* [53]

- **Principios básicos**

El propósito de MSR es optimizar la variable de interés determinando las condiciones óptimas de los factores en el sistema. [54]

Para el desarrollo del proceso de MSR se requiere realizar varios pasos de experimentación y análisis: determinar los factores críticos del proceso, diseño estadístico, ejecutar el experimento y recolectar los datos de respuesta, análisis del MSR en base a datos experimentales obtenidos, gráficos de superficie o de contornos y optimizar la respuesta.

- **Tipos de diseño**

  a. Diseños centrales compuestos (DCC)

  "Los DCC se recomiendan con frecuencia cuando el plan del diseño requiere de un experimento secuencial ". [54]

  b. Diseños de Box-Behnken

  "Los diseños Box-Behnken son utilizados cuando se ejecutan experimentos no secuenciales. Es decir, se planifica y ejecuta el experimento una sola vez. Estos diseños permiten una estimación eficiente de los coeficientes de primer orden y de segundo orden. En virtud de que los diseños Box-Behnken tiene menos puntos de diseño, la aplicación de este tipo de diseños podría resultar menos costosa que ejecutar DCC con el mismo número de factores". [54]

  Los diseños de Behnken es útil si se conoce la zona de operación segura de un proceso. Mientras que los diseños centrales compuestos tienen puntos axiales fuera de la zona de operación segura. Estos puntos pudieran no encontrarse en la región de interés, o pudiera ser imposible ejecutarlos porque se encuentra más allá de los límites de operación segura.

- **Aplicaciones del MSR**

  El Método de Superficie de Respuesta (MSR) se ha utilizado para generar prototipos de productos donde se pueden modelar los efectos de los niveles de los factores que intervienen en el procesamiento. El MSR se utiliza principalmente para economizar dinero y reducir el tiempo de pruebas al disminuir el número de ensayos que se llevan a cabo. [55]

III. HIPOTESIS

En condiciones óptimas de transfructosilación se produce la biosíntesis de FOS a partir de azúcares simples presentes en el extracto de algarrobo.

IV. VARIABLES

Variable Dependiente

Concentración de fructooligosacáridos

Variable Independiente

- Temperatura
- Concentración de enzima
- Concentración de sustrato
- Tiempo de reacción

V. METODOLOGIA DE TRABAJO

5.1 Tipo y diseño de investigación

Investigación adaptativa (FAO/IAEA 2008)

5.2 Selección de la enzima y determinación de la actividad enzimática.

- **Selección de la enzima**

Se evaluaron 3 glicosiltransferasas comerciales: invertasa (Sigma-Aldrich), inulinasa (Sigma-Aldrich) y pectinasa de Aspergillus aculeatuns (Sigma-Aldrich), para ello se adicionaron 10 mL de sacarosa a 300 g/L y 100 µL de enzima a un matraz de 100 mL, se llevó a incubación a 55 °C por 60 min a 150 rpm. Finalmente se cuantificó la glucosa libre y azúcares reductores en el medio de reacción utilizando el método de glucosa oxidasa y DNS respectivamente. Por otro lado se evaluó en forma cualitativa los productos de biosíntesis de FOS utilizado la cromatografía en capa fina.

D**eterminación de azúcares reductores.** A 400 µl, de la muestra tomada de la reacción de biocatálisis o su dilución se le adicionó igual volumen DNS. La mezcla se incubó a 100 ºC por 10 min, posteriormente se enfrió a 4 ºC por 5 min. Se tomó 100 µl, y se coló en una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. Se utilizó como patrón una curva de glucosa. [56]

Determinación de glucosa.

Se utilizó *"el método enzimático colorimétrico según Trinder. El método en que la glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa a ácido glucoronico y agua oxigenada; este último en presencia de la peroxidasa produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona, dando lugar a la formación de un cromógeno rojo con absorbancia máxima a 505nm*". Para el ensayo se utilizó 10 µl del producto de biocatálisis se incubó con el reactivo enzimático. [45]

Separación de productos de la biocatálisis en cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina se realizó en placas de sílica-gel 60. Las muestras se diluyeron hasta 5 ºBx. y se aplicó 1 µl, a la placa, como solvente de corrida se utilizara acetona 95 % (v/v). Se realizaron 5 corridas y los compuestos fructosados se observaran después de esparcir la placa con una

solución saturada de 1- butanol, urea 3 % (p/v) y etanol absoluto 5 % (v/v) e incubarla a 100ºC por 15 min.

Se realizó una recta patrón utilizando diferentes cantidades conocidas de glucosa, lo que permitió relacionar la absorbancia a 505 nm con la concentración de glucosa. La liberación de glucosa libre es equivalente a la cantidad de fructuosa liberada y transferida, este ensayo se utiliza para evaluar la "actividad global" de la enzima.

La actividad de la glicosiltransferasa se calculó como la diferencia entre la cantidad de azucares reductores menos la glucosa libre, lo que indica la cantidad de fructosa involucrada en la reacción de hidrolisis. La actividad hidrolítica se definió en UI como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 µmol de sacarosa por minuto por mililitro bajo las condiciones ensayadas o 1 µmol de glucosa liberada por minuto durante el proceso hidrolítico. La actividad específica se definió como "unidades por mg de proteína".

La concentración de proteína soluble en el preparado enzimática se determinó utilizando el método de Bradford, para este ensayo la albúmina de suero bovino (BSA) se utilizó como estándar. La actividad específica se definió como unidades por miligramo de proteína.

5.3 Preparación de harina de algarroba [52,57]

Para la elaboración de la harina, se utilizaron las algarrobas (vainas de algarrobo), las mismas que fueron sometidas a una molienda fina.

En el proceso para la producción de harina de algarroba se consideró las siguientes etapas:

- **Recolección.** Se empleó accesiones de algarrobo procedente de Piura.
- **Acopio y selección de vainas.** Se separaron aquellas algarrobas que se encuentren descompuestas parcialmente o picadas.
- **Almacenamiento de la algarroba. U**na vez seleccionado, se sometió a un proceso de pre-secado al sol. En estas condiciones se procedió a almacenar, de manera que se conserve la calidad durante un tiempo de almacenamiento.
- **Lavado.** Las algarrobas se lavaron con agua para eliminar las sustancias adheridas a ellas.

- **Secado** Donde se disminuyó el contenido de humedad de las algarrobas a 6 % (a 42 °C por 7 días), para facilitar la operación de molienda.
- **Molienda.** Se realizó en dos etapas: primero se molió las algarrobas enteras colocando en el molino la malla de poro de 4 mm; luego, el producto se molió por segunda vez, usando para ello la malla de abertura de poro de 1 mm.
- **Tamizado.** El producto pulverizado anteriormente se pasó a través de tres tamices (6, 10 y 100 ASTM), con el fin de separar la harina fina. Esta última es la fracción pasante por la malla N° 100 (ASTM).
- **Envasado** Se envasó en bolsas de polietileno de 0,500 kg de capacidad.

5.4 Análisis químico de la harina de algarrobo

Composición centesimal. La determinación del contenido de humedad, proteínas, extracto etéreo, cenizas, fibra alimentaria total (FA), fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI) se realizó de acuerdo con la metodología especificada por la AOAC.

Azúcares. El contenido de azúcares fue determinada utilizando el método de Somogy-Nelson. Para ello, se mezcló por duplicado 2 ml de cada muestra problema con 2 ml de Reactivo de Somogy, se homogenizó las disoluciones con ayuda de un vórtex y se incubó en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar y añadió 2 ml de Reactivo de Nelson y 4 ml de agua destilada. Finalmente se homogenizó y evaluó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 540 nm.[58]

5.5 Extracción y caracterización de los carbohidratos de los frutos de algarrobo

En un recipiente de acero inoxidable se mezcló la harina de algarroba con agua en una relación de 1:5 (p/v) y se calentó a 80 °C por 2 h. Después, la mezcla se filtró y el extracto se concentró a 50 °Brix. Finalmente se cuantificó la glucosa libre y azúcares reductores en el medio de reacción utilizando el método de glucosa oxidasa y DNS respectivamente.

- **Determinación de azúcares reductores.** Se utilizó "el método DNS descrito anteriormente.
- **Determinación de glucosa.** Se utilizó "el método enzimático colorimétrico según Trinder, descrito anteriormente.

- **Determinación de la actividad del agua.** Para evaluar la conservación del extracto se realizó utilizando el método AOAC 978.18.2005.18th Ed. Water activity of canned vegetales.

5.6 **Metodología de Superficie de Respuesta**.

Se utilizó como una herramienta de optimización para la producción de FOS utilizando el preparado comercial pectinasa (Sigma-Aldrich). Se consideraron 4 variables independientes, temperatura (°C), tiempo (h) y concentraciones de enzima (µL) y sustrato (°Bx). Las que se ensayaron posteriormente en el medio de reacción. Siendo los rangos de los parámetros evaluados los que se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Variables a evaluar

Variables Independientes	**Unidades**	**Codificación de los niveles**	
		Min	**Max**
Temperatura de reacción	ºC	45	65
Concentración de sustrato (algarrobo)	°Bx	20	50
Tiempo	h	0.5	18
Concentración de enzima	u	5	30

Tabla 5. Matriz diseño Box-Behnken

Orden Corrida	**TipoPt**	**Tiempo (h)**	**Temperatura (°C)**	**Enzima (µl)**	**Algarrobo (°Bx)**
1	2	9,25	45	17,5	20
2	2	18	55	5	35
3	2	9,25	65	17,5	50
4	2	9,25	65	17,5	20
5	2	18	55	17,5	50
6	2	9,25	45	17,5	50
7	2	18	45	17,5	35
8	2	18	45	17,5	35
9	2	9,25	55	5	50
10	2	18	55	17,5	50
11	2	9,25	45	5	35
12	2	9,25	55	5	50
13	2	9,25	45	30	35
14	2	9,25	45	30	35

15	0	9,25	55	17,5	35
16	2	9,25	45	17,5	20
17	2	9,25	55	30	50
18	2	9,25	55	5	20
19	2	0,5	55	30	35
20	2	9,25	65	17,5	20
21	2	0,5	45	17,5	35
22	2	9,25	65	30	35
23	2	0,5	55	17,5	20
24	2	0.5	55	5	35
25	2	9,25	45	17,5	50
26	0	9,25	55	17,5	35
27	2	0,5	55	17,5	50
28	0	9,25	55	17,5	35
29	2	0,5	65	17,5	35
30	2	0,5	55	17,5	20
31	0	9,25	55	17,5	35
32	2	0,5	65	17,5	35
33	2	9,25	55	30	50
34	2	0,5	55	5	35
35	2	18	65	17,5	35
36	2	9,25	65	5	35
37	2	0,5	55	17,5	50
38	2	18	55	17,5	20
39	0	9,25	55	17,5	35
40	2	18	55	30	35
41	0	9,25	55	17,5	35
42	2	9,25	55	30	20
43	2	18	55	30	35
44	2	9,25	65	30	35
45	2	9,25	65	17,5	50
46	2	9,25	55	30	20
47	2	0,5	45	17,5	35
48	2	9,25	45	5	35
49	2	9,25	65	5	35
50	2	18	65	17,5	35
51	2	18	55	5	35
52	2	0,5	55	30	35
53	2	9,25	55	5	20
54	2	18	55	17,5	20

Terminado el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 0,1 ml para cuantificar la cantidad de azúcares libres; para ello se utilizó el método del DNS,

kit enzimático de glucosa oxidasa y Fructan Kit, para determinar azúcares reductores, glucosa y FOS respectivamente. El incremento en la concentración de glucosa y azúcares libres permite identificar el proceso de hidrolisis.

5.7 Producción fructooligosacáridos a partir de los frutos de algarrobo.

Para producir FOS a partir de los frutos de algarrobo usando una fructosiltransferasas comercial de uso alimentario (pectinasa de *A. aculeatus*), se incubó la enzima en un concentrado acuoso de algarrobo, bajo las condiciones óptimas previamente establecidas en los ensayos anteriores. La biotransformación se llevó a cabo con agitación constante a 150 rpm en matraces de 50 ml. Terminado el tiempo de incubación se cuantificó la concentración de FOS, azúcares reductores y glucosa libre, usando el método de la AOAC 999,03; DNS y glucosa oxidasa respectivamente.

5.8 Determinación de los carbohidratos presentes en la reacción de biocatálisis.

La cuantificación se realizó por HPLC de un sistema isocrático combinado con detección por índice de refracción para el análisis de carbohidratos.

Para ello se aplicó 20 µL de muestra de extracto de algarrobo en una columna Aminex HPX 42 - (Bio Rad, Richmond), con un flujo de 0,6 mL/min, presión aproximada de 52 bars y 81,7 ºC de temperatura. El solvente utilizado fue agua mili-Q. Los resultados se analizaron con la ayuda del BioCrom, versión 3,0.

VI. RESULTADOS

6.1 Recolección de la muestra

Se realizó la recolección y selección de los frutos de algarrobo la provincia de Piura, distrito de Catacaos a 28 metros de altitud (enero 2018), utilizando herramientas convencionales que utilizan los agricultores de la zona. Además, se recolecto una planta (figura 5 y 6) que se entregó para su estudio y clasificación al Museo de Historia Natural, encontrando la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISIÓN; Magnoliophyta

CLASE; Magnoliopsida

SUBCLASE; Rosidae

ORDEN; Fabales

FAMILIA; Fabaceae

GÉNERO; Prosopis L.

ESPECIE; *Prosopispallida* (Willd.)Kunt

Nombre vulgar: "algarrobo"



Figura 5. Mapa de ubicación del Algarrobo

(Catacaos – Piura)



Figura 6. Algarrobo (Catacaos – Piura)

6.2 Selección de la enzima y determinación de la actividad enzimática.

Se evaluaron tres glucosiltransferasas comerciales: invertasa (Sigma-Aldrich), inulinasa (Sigma-Aldrich) y pectinasa de *Aspergillus aculeatuns* (Sigma-Aldrich) utilizando sacarosa al 30 % como sustrato. La pectinasa comercial presenta la mayor actividad de transfructosilación como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Actividades de glucosidasas comerciales

Glucosidasas comerciales	Glucosa (g/%)	Azúcares reductores (g/%)	Fructosa (g/%)
Pectinasa	**14,0**	**16,3**	**2,4**
Inulinasa	12,1	15,0	3,0
Invertasa	11,5	14,9	3,4

Tomando en cuenta la cantidad de glucosa libre, se calculó la actividad enzimática en UI/mL y la actividad específica (µmol/min * mg).

Tabla 7. Determinación de la actividad enzimática y actividad específica de transfructosilación de las glicosidasas.

Enzima (mg/ml)	Actividad enzimática (µmol/min)/mL	Actividad específica (UI/mg)
Pectinasa	0,0129	0,0634
Inulinasa	0,0119	0.0054
Invertasa	0,0106	0.0005

6.3 Determinación de la concentración de proteínas en la preparación enzimática seleccionada

En la determinación de proteínas por el método de Bradford, se encontró que la pectinasa comercial contenía 20,4 mg/mL de proteínas

6.4 Determinación de FOS por cromatografía en capa fina.

La presencia de FOS en el medio de reacción se observó utilizando cromatografía en capa fina (figura 7 y 8). Los productos de biosíntesis utilizando pectinasa, inulinasa e invertasa, además de un estándar de FOS fueron colocados en la placa de silica gel y corridos utilizando acetona al 95 %. Se puede observar la presencia de FOS en los diferentes productos de digestión, observándose que cuando se utiliza pectinasa hay producción de kestosa (GF2), nistosa (GF3), fructosilnistosa (GF4) y fructosil-fructosilnistosa (GF5) y sacarosa residual.

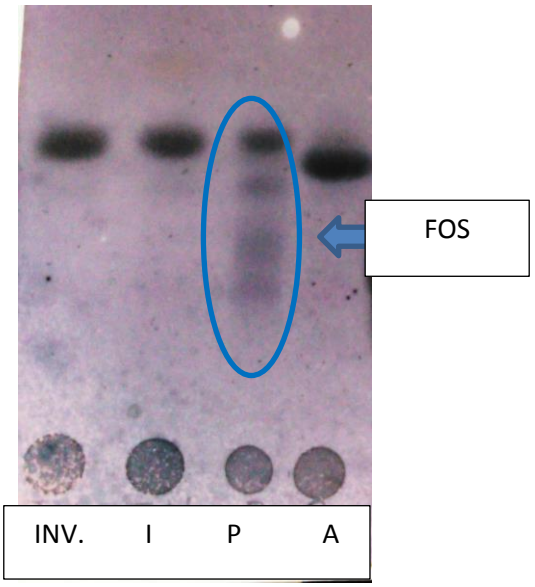


Figura. 7. Producción de FOS según tipo de enzima en extractos de algarrobo mediante cromatografía en capa fina. INV, invertasa-algarrobo; I, inulinasa-algarrobo; P, pectinasa-algarrobo; A, algarrobo.

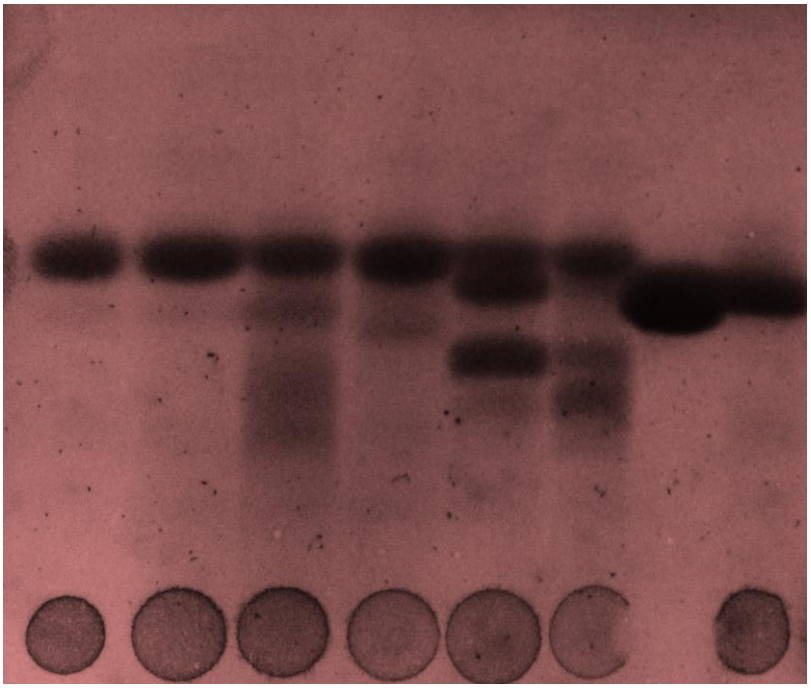


Figura 8. Perfiles de FOS en extractos de algarrobo mediante cromatografía en capa fina. INV, invertasa-algarrobo; I, inulinasa-algarrobo; P, pectinasa-algarrobo; S, sacarosa; G, glucosa

6.5 Elaboración de harina de algarroba

Análisis químico de la harina de algarrobo

Los resultados del análisis proximal de la harina se presentan en la tabla 8:

Tabla 8. Análisis proximal de la harina de algarrobo

ENSAYO	NORMA O REFERENCIA	UNIDADES	RESULTADOS
Determinación de Humedad	FAO, Food and Nutrition Paper pp205 T14/7, 1986	%	8,6
Determinación de Proteína pura	LABS-ITP-FQ-001-2009	%	5,7
Determinación de Cenizas	FAO, Food and Nutrition Paper pp228 T14/7, 1986	%	8,1
Determinación de Grasa cruda	LABS-ITP-FQ-003-2009	%	2,1
Determinación de Carbohidratos	LABS-ITP-FQ (Por diferencia)	%	75,5

6.6 Extracción y caracterización de los carbohidratos presentes en el extracto acuoso de los frutos de algarrobo

La extracción de los carbohidratos de la harina de algarrobo a concentraciones de harina del 10 %, 20 % y 30 %, alcanzaron 15, 30 y 40 °Bx respectivamente al concentrarse a un mismo volumen, lo cual demuestra una mayor recuperación de carbohidratos al 20 % de harina en un medio acuoso.

Tabla 9. Caracterización de los carbohidratos de los frutos de algarrobo

Extracto de Algarrobo (°Bx)	Glucosa libre (g %)	Fructosa (g %)	Sacarosa (g %)
20	3,89	4,21	9,53
35	6,82	7,36	16,67
50	9,74	10,53	23,82

Determinación de la actividad del agua (Aw) en el extracto acuoso de algarrobo

El resultado de la Aw nos indica que nuestro producto es estable frente a la contaminación de diferentes microorganismos, siendo que está dentro del rango permitido de 0 a 1. En el análisis fisicoquímico de Aw realizado al extracto acuso de algarroba se obtuvo 0,90 lo que indica que es estable frente a la contaminación de diferentes microorganismos

6.7 Metodología de superficie de respuesta

Diseño Box-Behnken.

Los resultados de los ensayos de transfructosilación en porcentaje de FOS, glucosa y azúcares reductores se muestran en la Tabla 10

Tabla 10. Porcentajes de oligosacáridos, glucosa y Azúcares reductores según MSR diseño Box - Behnken.

Número de ensayo	T (h)	T R (°C)	[VE] (µL)	[CS] °Bx	G %	AR %	FOS %
1	9,25	45	17,5	20	4,66	8,94	11,01
2	18,00	55	5,0	35	8,99	13,15	11,26
3	9,25	65	17,5	50	6,82	17,45	11,45
4	9,25	65	17,5	20	4,29	7,87	12,75
5	18,00	55	17,5	50	8,06	14,02	9,56
6	9,25	45	17,5	50	5,19	17,28	12,99
7	18,00	45	17,5	35	8,33	14,87	12,98
8	18,00	45	17,5	35	8,40	14,56	13,04

9	9,25	55	5,0	50	8,43	15,78	12,09
10	18,00	55	17,5	50	8,55	14,11	8,70
11	9,25	45	5,0	35	9,30	12,33	9,91
12	9,25	55	5,0	50	8,89	15,97	12,70
13	9,25	45	30,0	35	7,19	13,49	7,07
14	9,25	45	30,0	35	7,56	13,84	7,34
15	9,25	55	17,5	35	9,45	16,03	13,88
16	9,25	45	17,5	20	4,32	8,94	11,24
17	9,25	55	30,0	50	6,91	22,58	12,31
18	9,25	55	5,0	20	4,74	7,03	11,71
19	0,50	55	30,0	35	7,85	9,58	7,49
20	9,25	65	17,5	20	4,21	7,95	11,24
21	0,50	45	17,5	35	2,35	10,77	8,70
22	9,25	65	30,0	35	6,11	13,78	9,08
23	0,50	55	17,5	20	1,60	4,26	5,39
24	0,50	55	5,0	35	2,53	6,68	3,39
25	9,25	45	17,5	50	6,03	18,60	12,15
26	9,25	55	17,5	35	9,11	18,47	14,01
27	0,50	55	17,5	50	5,43	13,61	5,70
28	9,25	55	17,5	35	9,17	15,84	13,07
29	0,50	65	17,5	35	4,26	10,50	7,66
30	0,50	55	17,5	20	1,60	4,34	5,56
31	9,25	55	17,5	35	9,43	16,95	13,62
32	0,50	65	17,5	35	4,80	10,36	8,91
33	9,25	55	30,0	50	5,19	22,33	12,27
34	0,50	55	5,0	35	2,71	5,81	2,41
35	18,00	65	17,5	35	4,44	16,84	13,32
36	9,25	65	5,0	35	7,23	10,04	6,64
37	0,50	55	17,5	50	5,98	11,29	5,36
38	18,00	55	17,5	20	6,39	10,52	8,75
39	9,25	55	17,5	35	10,11	16,01	13,78
40	18,00	55	30,0	35	8,97	19,29	9,74
41	9,25	55	17,5	35	9,77	16,91	13,78
42	9,25	55	30,0	20	7,15	11,45	9,20
43	18,00	55	30,0	35	8,82	19,27	9,06
44	9,25	65	30,0	35	6,54	13,82	8,02
45	9,25	65	17,5	50	6,09	17,56	11,66
46	9,25	55	30,0	20	7,47	11,71	9,97
47	0,50	45	17,5	35	2,12	10,71	8,73
48	9,25	45	5,0	35	9,34	12,02	9,39
49	9,25	65	5,0	35	7,04	10,56	7,64
50	18.00	65	17.5	35	4,54	17,06	13,44
51	18.00	55	5.0	35	9,10	13,91	11,86
52	0.50	55	30.0	35	7,10	9,88	7,43

53	9.25	55	5.0	20	4,63	6,99	11,14
54	18.00	55	17.5	20	6,23	10,46	8,72

Dónde:

[T]: Tiempo en horas

[TR]: Temperatura de reacción

[VE]: Cantidad de enzima en microlitros

[CS]: Concentración de sustrato o extracto en °Bx

FOS %: Porcentaje de fructooligosacáridos

G %: Porcentaje de glucosa libre

AR %: Porcentaje de azúcares reductores libres

°C: grados centígrados

°Bx: grados Brix

En la matriz MSR según el diseño Box-Behnken se observa que de los 54 ensayos realizados, presentan menor concentración de glucosa el ensayo N° 23 obteniéndose 1,60 %. Mientras que la mayor concentración se encontró en el ensayo N° 39, donde se obtuvo glucosa 10,11 % y azúcares reductores 16,01 % a las condiciones de 9,25 h, 55 °C, 17,5 µL de enzima y 35 °Bx de extracto de algarrobo. La concentración de glucosa es directamente proporcional a la biosíntesis de fructooligosacáridos en el medio de reacción.

Con respecto a la producción de FOS se encontró menor producción en el ensayo N° 34 con 2.41 % y mayor producción en los ensayos N° 15, 26, 31, 39 y 41 alcanzando una media de 13,81 % de FOS en el medio de reacción.

Parámetros del diseño Box-Behnken

En el diseño Box-Behnken, se consideraron cuatro factores: tiempo (h), temperatura (°C), concentración de enzima (mg/mL) y concentración de extracto de algarrobo, estableciéndose 27 ensayos con una réplica cada una y seis puntos centrales que se ejecutaron en dos bloques.

Tabla 11. Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje FOS vs. tiempo y, temperatura

EE del termino	**Coef.**	**Coef.**	**T**	**P**
Constante	-55,9573	10,6026	-5,278	0,000
Tiempo (h)	1,3857	0,2360	5,872	0,000
Temperatura (°C)	1,8737	0,3205	5,846	0,000
Enzima (µL)	0,2142	0,1685	1,271	0,211
Algarrobo (°Bx)	0,4960	0,1514	3,277	0,002
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0,0430	0,0036	-11,838	0,000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0,0184	0,0028	-6,605	0,000
Enzima (µL)*Enzima (µL)	-0,0176	0,0018	-9,864	0,000
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	-0,0075	0,0012	-6,098	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	-0,0007	0,0037	-0,195	0,846
Tiempo (h)*Enzima (µL)	-0,0159	0,0029	-5,422	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	-0,0008	0,0024	-0,319	0,751
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	0,0082	0,0026	3,194	0,003
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	-0,0002	0,0021	-0,076	0,940
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	0,0036	0,0017	2,103	0,042
S = 0.908322 PRESS = 64.1191				
R-cuad. = 90,36% R-cuad.(pred.) = 80,78% R-cuad.(ajustado) = 86,89%				

La ecuación de segundo orden simula correctamente la síntesis de fructooligosacáridos de acuerdo al diseño Box-Behnken.

$$Y = -55.9573 + 1.3857X1 + 1.8737X2 + 0.2142X3 + 0.4960X4 - 0.0430X^{2}1 - 0.0184X^{2}2 - 0.0176X^{2}3 - 0.0075X^{2}4 - 0.0007X1X2 - 0.0159X1X3 - 0.0008X1X4 + 0.0082X2X3 - 0.0002X2X4 - 0.0036X3X4$$

Leyenda:

Y = Concentración de FOS

X1: Tiempo en horas

X2: Temperatura °C

X3: Concentración de enzima

X4: Concentración de extracto en °Bx

El valor expresado por el coeficiente de determinación R^2 indicó que el 90.36 % de variabilidad en la respuesta puede ser explicado por el diseño propuesto.

Tabla 12. Análisis de varianza del % de FOS

Análisis de varianza de FOS					
Fuente	**GL**	**SC Sec.**	**SC Ajust.**	**F**	**P**
Regresión	14	301,438	301,438	26,10	0,000
Lineal	4	115,292	48,874	14,81	0,000
Tiempo (h)	1	110,107	28,448	34,48	0,000
Temperatura (°C)	1	0,579	28,199	34,18	0,000
Enzima (µL)	1	3,347	1,333	1,62	0,211
Algarrobo (°Bx)	1	1,259	8,858	10,74	0,002
Cuadrado	4	149,707	149,707	45,36	0,000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	55,338	115,630	140,15	0,000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	6,766	35,991	43,62	0,000
Enzima (µL)*Enzima (µL)	1	56,922	80,273	97,29	0,000
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	1	30,680	30,680	37,19	0,000
interacción	6	36,439	36,439	7,36	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	1	0,031	0,031	0,04	0,846
Tiempo (h)*Enzima (µL)	1	24,252	24,252	29,39	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	1	0,084	0,084	0,10	0,750
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	1	8,417	8,417	10,20	0,003
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	1	0,005	0,005	0,01	0,940
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	1	3,650	3,650	4,42	0,042
Error residual	39	32,177	32,177		
Falta de ajuste	10	31,880	31,880	311,69	0,000
Error puro	29	0,297	0,297		
Total	53	333,615			

En cuanto a los efectos lineales el modelo contiene 3 efectos lineales significativos que es el tiempo (P= 0,000), temperatura (P= 0,000) y algarrobo (P= 0,000), es decir la producción de FOS difiere con el tiempo, temperatura y concentración de algarrobo.

En la tabla 12 se muestra como significativo al término cuadrático P = 0,000, con 4 efectos cuadráticos individuales tiempo *tiempo = 0,000, T (°C)* T (°C) = 0,000, enzima*enzima= 0,000, algarrobo*algarrobo=0,000. Del análisis de varianza (ANOVA) se corrobora que la ecuación de segundo orden *(p-value = 0)* es la que simula mejor la producción de FOS.

Además la interacción que se observa en el modelo también es significativo (P= 0,000), con 3 interacciones de dos factores tiempo*enzima (P= 0,000), temperatura *enzima (P= 0,000) y enzima*algarrobo (P= 0,042), todos estos con un valor de P menor que 0,05, lo cual constituye un efecto de interacción significativa.

En la figura 9 se muestra el histograma del porcentaje de FOS donde la media del proceso de transfructosilación fue 9,515 %, concentración inferior al valor objetivo 14 %. Sin embargo, la distribución es simétrica varios puntos alcanzan entre 10 y 14 %.

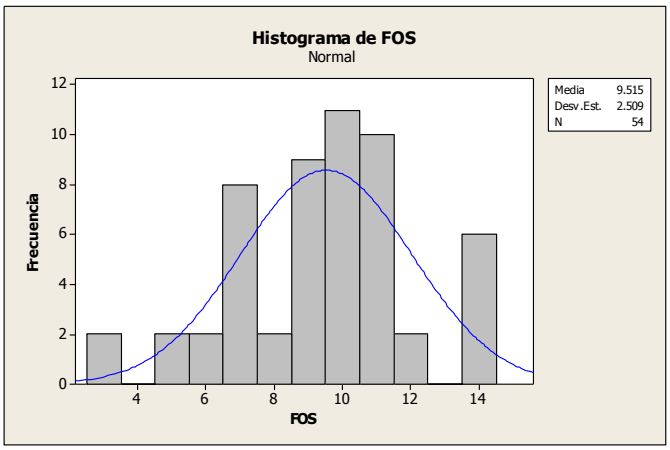


Figura 9. Histograma del porcentaje de FOS

El histograma de residuos muestra las características generales de los residuos indicando su distribución asimétrica figura 10

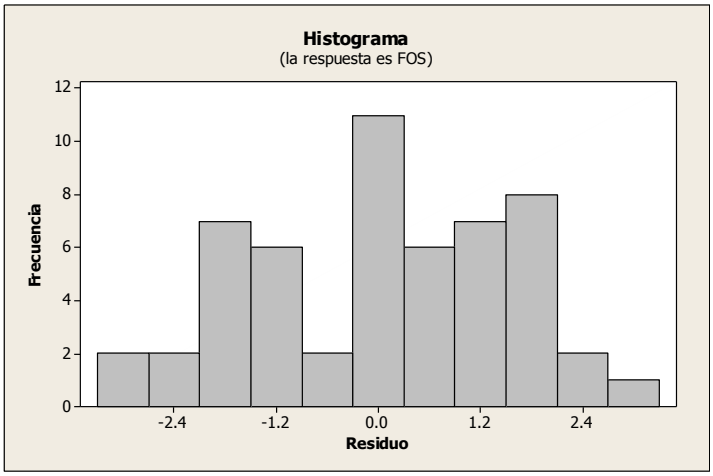


Figura 10. Histograma de residuos del porcentaje de FOS

.

Cuando los datos de probabilidad normal de residuos forman una línea recta, indican que el porcentaje de FOS final esta normalmente distribuido (figura 11).

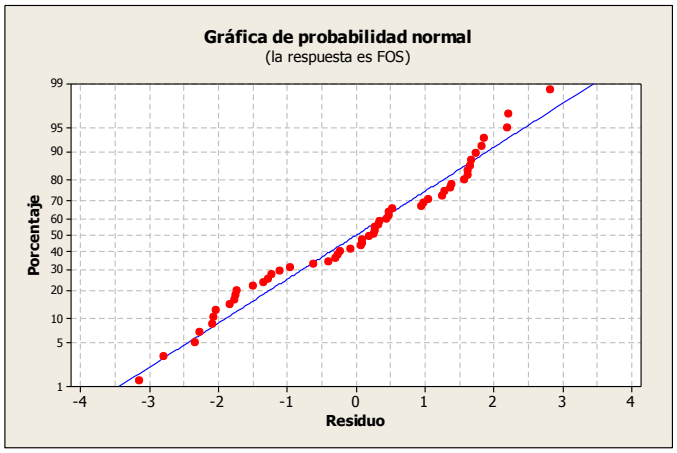


Figura 11. Distribución normal de residuos del porcentaje de FOS

En las siguientes figuras se muestra el análisis gráfico de la información para incrementar el porcentaje de FOS. En las figuras de superficies de respuesta generadas utilizando el minitab para el tiempo (h), temperatura (°C), enzima (µL) y extracto de algarrobo (°Bx), los que son puntos críticos para el proceso de transfructosilación, muestran los valores óptimos.

La figura 12 muestra que el porcentaje de FOS final (Z) más bajo se obtiene cuando la concentración de extracto de algarrobo (Y) de 20 °Bx con un volumen de enzima (X) de 30 µL de reacción y el más alto a intervalos de 30 a 40 °Bx (Y) y 15 a 20µL (X).

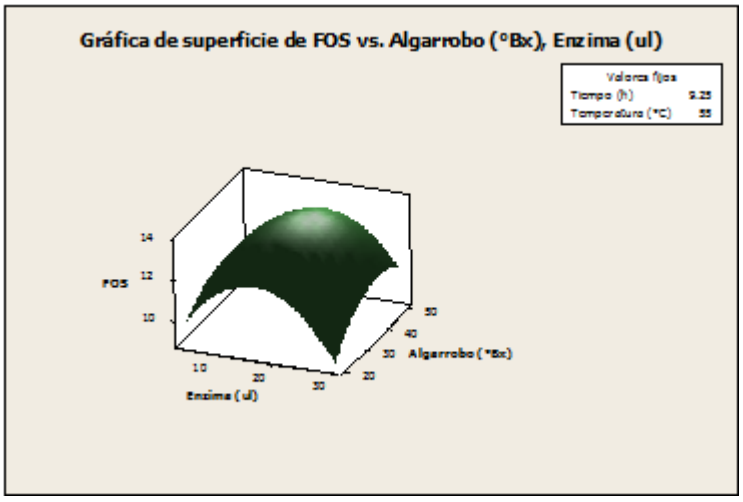


Figura 12. Superficie de respuesta del porcentaje de FOS versus Enzima y algarrobo

La figura 13 muestra como el tiempo (T), la temperatura (TP), la concentración de enzima (CE) y extracto de algarrobo (EA) afectan las reacciones de transfructosilacíon en la biosíntesis de FOS (Z). Las regiones más oscuras indican

los valores Z más altos, con mayor producción de FOS final, los niveles de contorno revelan un pico central en 12 h, 54 °C, 17,5 µL de enzima y 54 °Bx de extracto de algarrobo. En estas condiciones la producción de FOS (Z) fue ≥ 13 %.

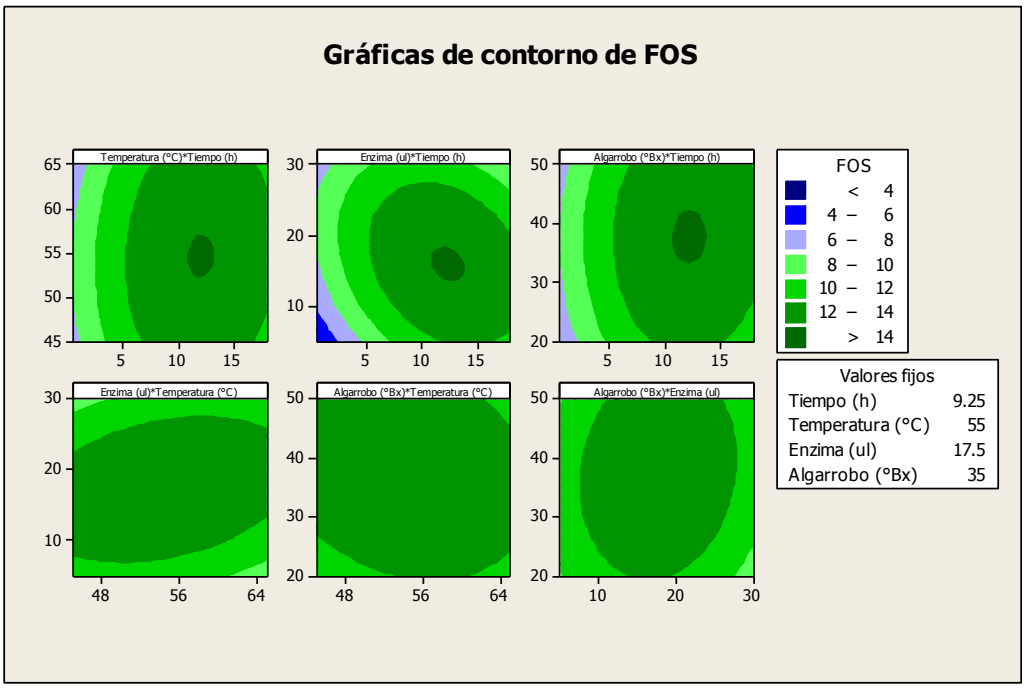


Figura 13. Contornos del porcentaje de la producción de FOS versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo.

a) temperatura y tiempo, b) enzima y tiempo, c) extracto y tiempo, d) enzima y temperatura, e) extracto y temperatura, f) extracto y enzima

También se realizó la cuantificación de glucosa en el medio de reacción considerando la tabla matriz del diseño Box-Behnken, ya que la liberación de glucosa es concomitante tanto a la reacción de hidrólisis como a la reacción de transfructosilación.

Tabla 13. Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje de glucosa vs. Tiempo y temperatura

EE del termino	**Coef.**	**Coef.**	**T**	**P**
Constante	-81,2627	10,2620	-7,919	0,000
Tiempo (h)	2,0408	0,2284	8,935	0,000
Temperatura (°C)	2,2975	0,3102	7,406	0,000
Enzima (ul)	0,3007	0,1631	1,844	0,073
Algarrobo (°Bx)	0,8144	0,1465	5,558	0,000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0,0286	0,0035	-8,136	0,000

Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0,0207	0,0027	-7,675	0,000
Enzima (µL)*Enzima (ul)	-0,0018	0,0017	-1,030	0,309
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	-0,0098	0,0012	-8,206	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	-0,0176	0,0036	-4,957	0,000
Tiempo (h)*Enzima (µL)	-0,0114	0,0028	-4,023	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	-0,0040	0,0024	-1,696	0,098
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	0,0023	0,0025	0,911	0,368
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	0,0018	0,0021	0,874	0,378
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	-0,0070	0,0017	-4,213	0,000
S = 0.879148 PRESS = 59.6796				
R-cuad. = 89,44% R - cuad.(pred.) = 79,08% R - cuad.(ajustado) = 85,64%				

La ecuación de segundo orden simula la liberación óptima de glucosa durante la síntesis de fructooligosacáridos de acuerdo al diseño Box-Behnken.

$$Y = -81{,}2627 + 2{,}0408\,X1 + 2{,}2975\,X2 + 0{,}3007X3 + 0{,}8144\,X4 - 0{,}0286\,X^2 1 - 0{,}0207X^2 2 - 0{,}0018\,X^2 3 - 0{,}0098\,X^2 4 - 0{,}0176\,X1X2 - 0{,}0114\,X1X3 + 0{,}0040X1X4 + 0{,}0023\,X2X3 + 0{,}0018\,X2X4 - 0{,}0070\,X3X4$$

Leyenda:

Y = Concentración de glucosa

X1: Tiempo en horas

X2: Temperatura °C

X3: Concentración de enzima

X4: Concentración de extracto de algarrobo en °Bx

El valor encontrado por el coeficiente de determinación R^2 indica que el 89,44 % de variabilidad en la respuesta se puede explicar por el diseño propuesto; es decir, solo el 10,56 % de la variación no pudo ser explicada por el diseño propuesto.

Tabla 14. Análisis de varianza del porcentaje de glucosa libre

Análisis de varianza de glucosa					
Fuente	**GL**	**SC Sec.**	**SC Ajust.**	**F**	**P**
Regresión	14	255,178	255,178	23,58	0,000
Lineal	4	103,390	94,241	30,48	0,000
Tiempo (h)	1	75,254	61,704	79,83	0,000
Temperatura (°C)	1	2,945	42,395	54,85	0,000
Enzima (µL)	1	0,641	2,628	3,40	0,073
Algarrobo (°Bx)	1	24,550	23,877	30,89	0,000
Cuadrado	4	103,113	103,113	33,35	0,000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	21,835	51,164	66,20	0,000
Temperatura (°C)*Temp. (°C)	1	26,709	45,532	58,91	0,000
Enzima (µL)*Enzima (µL)	1	2,528	0,820	1,06	0,390
Algarrobo (°Bx)*Alg. (°Bx)	1	52,041	52,041	67,33	0,000
interacción	6	48,674	48,674	10,50	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	1	18,995	18,995	24,58	0,000
Tiempo (h)*Enzima (µL)	1	12,508	12,508	16,18	0,000
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	1	2,222	2,222	2,87	0,098
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	1	0,642	0,642	0,83	0,368
Temp. (°C)*Algarrobo (°Bx)	1	0,590	0,590	0,76	0,387
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	1	13,716	13,716	17,75	0,000
Error residual	39	30,143	30,143		
Falta de ajuste	10	26,144	26,144	18,96	0,000
Error puro	29	3,999	3,999		
Total	53	285,321			

En cuanto a los efectos lineales el modelo contiene 3 efectos lineales significativos que es el tiempo (P= 0,000), temperatura (P= 0,000) y algarrobo (P= 0,000), es decir la producción de FOS difiere con el tiempo, temperatura y concentración de algarrobo. El modelo muestra como significativo al término cuadrático P = 0,000, con 3 efectos cuadráticos individuales tiempo *tiempo = 0,000, T (°C)* T (°C) = 0,000 y algarrobo*algarrobo=0,000. Del análisis de varianza (ANOVA) se corrobora que la ecuación de segundo orden (p-value = 0) es la que simula mejor la liberación de glucosa. Además la interacción que se observa en el modelo también es significativo (P= 0,000), con 3 interacciones de

dos factores tiempo*temperatura (P= 0,000), tiempo *enzima (P= 0,000) y enzima*algarrobo (P= 0,000), todos estos con un valor de P menor que 0,05, lo cual constituye un efecto de interacción significativa.

La figura 14 se presenta la gráfica de probabilidad normal de residuos formando línea recta lo cual indica que los residuos están normalmente distribuidos.

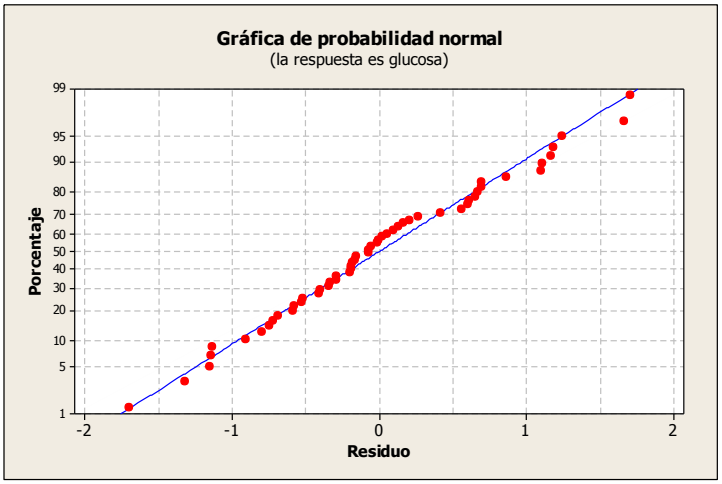


Figura 14. Distribución normal de residuos para glucosa libre %

En las siguientes figuras se muestra el análisis gráfico de la información para incrementar el porcentaje de glucosa en las reacciones de transfructosilación

Los gráficos de superficies de respuesta generadas para las variables tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo, puntos críticos en el proceso de transfructosilación, muestran los valores óptimos para incrementar el porcentaje de glucosa.

La figura 15 muestra que el porcentaje más alto de glucosa se obtiene en un intervalo de tiempo y temperatura de 10 a 15 h y 54 a 60 °C respectivamente.

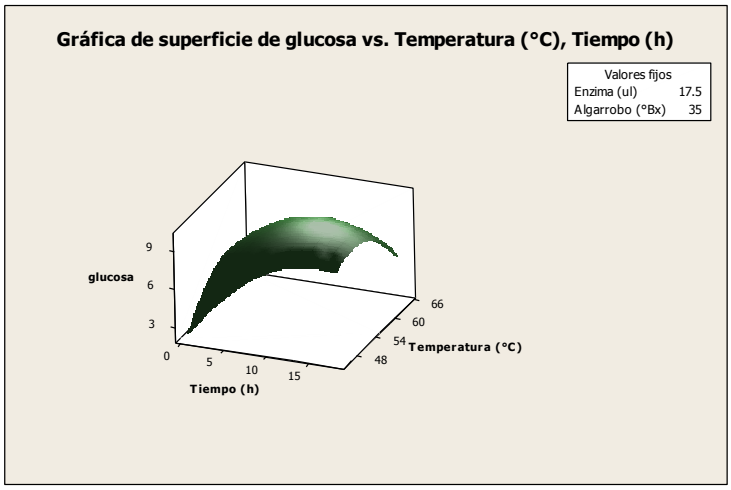


Figura 15. Superficie de respuesta del porcentaje de glucosa producida versus tiempo y temperatura

La figura 16 de contorno muestra como el tiempo (T), la temperatura (TP), la concentración de enzima (CE) y el extracto de yacón (EY) afectan las reacciones de transfructosilacíon que permiten incrementar el porcentaje de glucosa (Z). Las regiones más oscuras indican los valores Z más altos. Los niveles de contorno revelan un pico centrado en aproximadamente un T de 12 h, TP de 54 °C, CE de 16 µL y EA de 38°Bx. La concentración de Z en esta región pico es mayor a 10,0 %.

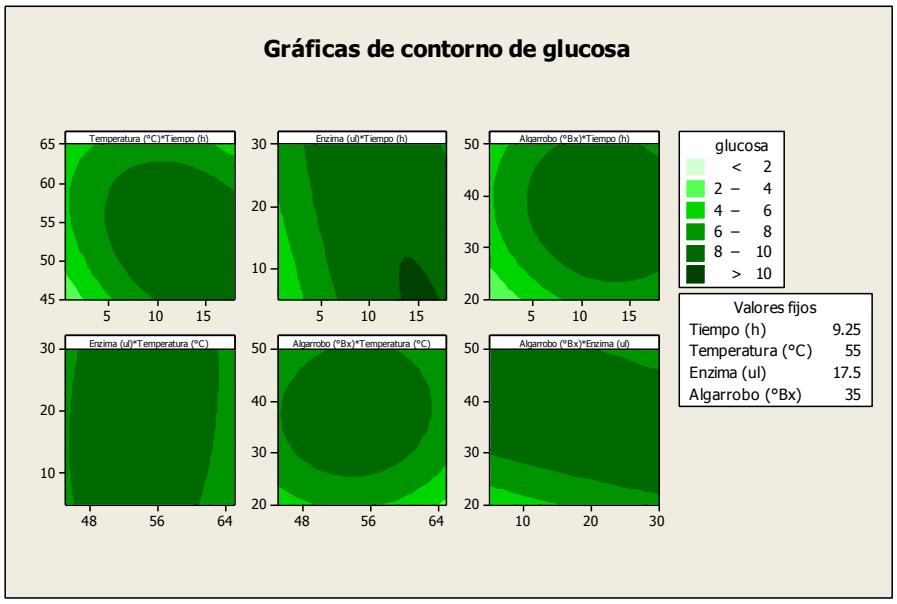


Figura 16. Gráfica de contornos de glucosa porcentaje versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo

Finalmente se evaluó la concentración de azúcares reductores producidos durante el proceso de transfructosilación.

Tabla 15. Coeficiente de regresión de superficie de respuesta del porcentaje de azúcares reductores (AR) vs. Tiempo (h), Temperatura.

Coeficientes de regresión estimados de AR			
EE del término	**Coef**	**Coef**	**P**
Constante	-542,095	193,182	0,008
Tiempo (h)	0,8916	0,4300	0,045
Temperatura (°C)	15,247	0,5840	0,013
Enzima (µL)	0,1380	0,3070	0,656
Algarrobo (°Bx)	0,9171	0,2758	0,002
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0,0401	0,0066	0,000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0,0155	0,0051	0,004
Enzima (µL)*Enzima (µL)	-0,0095	0,0032	0,006
Algarrobo (°Bx)*Algarrobo (°Bx)	-0,0094	0,0023	0,000
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	0,0073	0,0067	0,284
Tiempo (h)*Enzima (µL)	0,0052	0,0053	0,337
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	0,0087	0,0045	0,058
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	0,0040	0,0047	0,395
Temperatura (°C)*Algarrobo (°Bx)	0,0010	0,0039	0,798
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	0,0027	0,0031	0,397
S = 1,65499 PRESS = 210,195			
R-cuad. = 89,04% R-cuad.(pred.) = 78,43% R-cuad.(ajustado) = 85,10%			

La ecuación de segundo orden simula correctamente el incremento de azúcares reductores durante la síntesis de fructooligosacáridos de acuerdo al diseño Box-Behnken.

$$Y = -54{,}2095 + 0{,}8916\,X1 + 1{,}5247\,X2 + 0{,}1380X3 + 0{,}9171\,X4 - 0{,}0401X^2 1 - 0{,}0155X^2 2 - 0{,}0095\,X^2 3 - 0{,}0094\,X^2 4 + 0{,}0073\,X1X2 + 0{,}0052\,X1X3 - 0{,}0087\,X1X4 + 0{,}0040\,X2X3 + 0{,}0010X2X4 + 0{,}0027\,X3X4$$

Leyenda:

Y = Concentración de azúcares reductores

X1: Tiempo en horas

X2: Temperatura °C

X3: Concentración de enzima

X4: Concentración de extracto de algarrobo en °Bx

El coeficiente de determinación R^2 nos indica que el 89,04 % de variabilidad en la respuesta puede ser explicado por el diseño propuesto.

Tabla 16. Análisis de varianza del porcentaje de azúcares reductores (AR)

Análisis de varianza de AR					
Fuente	**GL**	**SC Sec.**	**SC Ajust.**	**F**	P
Regresión	14	867,780	867,780	22,63	0,000
Lineal	4	731,062	43,099	3,93	0,009
Tiempo (h)	1	205,837	11,778	4,30	0,045
Temperatura (°C)	1	0,277	18,672	6,82	0,013
Enzima (µL)	1	107,329	0,553	0,20	0,656
Algarrobo (°Bx)	1	417,619	30,283	11,06	0,002
Cuadrado	4	116,222	116,222	10,61	0,000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	55,538	100,678	36,76	0,000
Temperatura (°C)*Temp. (°C)	1	5,442	25,724	9,39	0,004
Enzima (µL)*Enzima (µL)	1	7,172	23,387	8,54	0,006
Algarrobo (°Bx)*Alg. (°Bx)	1	48,071	48,071	17,55	0,000
interacción	6	20,496	20,496	1,25	0,304
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	1	3,232	3,232	1,18	0,284
Tiempo (h)*Enzima (µL)	1	2,584	2,584	0,94	0,337
Tiempo (h)*Algarrobo (°Bx)	1	10,466	10,466	3,82	0,058
Temperatura (°C)*Enzima (µL)	1	2,023	2,023	0,74	0,395
Temp. (°C)*Algarrobo (°Bx)	1	0,182	0,182	0,07	0,798
Enzima (µL)*Algarrobo (°Bx)	1	2,009	2,009	0,73	0,397
Error residual	39	106,821	106,821	2,739	
Falta de ajuste	10	97,215	97,215	29,35	0,000
Error puro	29	9,606	9,606	0,331	
Total	53	974,601			

En cuanto a los efectos lineales el modelo contiene 3 efectos lineales significativos que es el tiempo (P= 0,045), temperatura (P= 0,013) y algarrobo (P= 0,002), es decir la producción de azúcares reductores difiere con el tiempo, temperatura y concentración de algarrobo. El modelo muestra como significativo al término cuadrático P = 0,000, con 4 efectos cuadráticos individuales tiempo *tiempo = 0,000, T (°C)* T (°C) = 0,004, enzima*enzima = 0,006 y algarrobo*algarrobo=0,000. Del análisis de varianza (ANOVA) se corrobora que la ecuación de segundo orden (p-value = 0) es la que simula mejor la liberación de azúcares reductores. En términos generales la interacción no es significativa (P= 0,304)

En las siguientes figuras se muestra el análisis gráfico de la información para incrementar el porcentaje de azúcares reductores (AR) en las reacciones de transfructosilación

La figura 17 muestra que el porcentaje más alto de AR se alcanza alrededor de 54 °C con 16µL enzima.

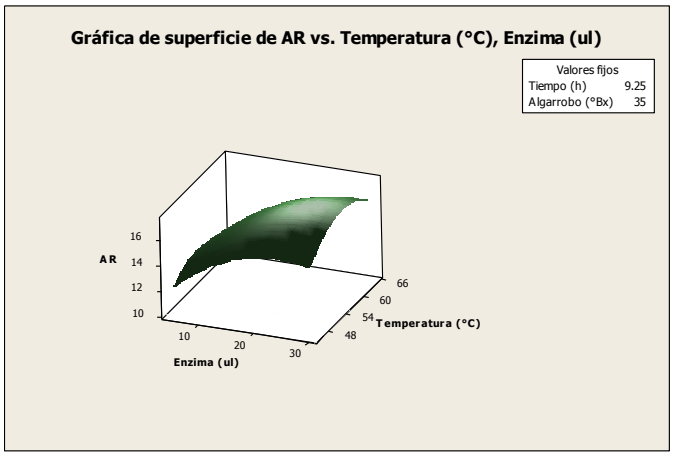


Figura 17 Superficie de respuesta del porcentaje de azúcares reductores versus enzima y temperatura.

La figura 18 muestra cómo afecta el tiempo, la temperatura, la concentración de enzima y extracto de algarrobo en las reacciones de transfructosilacíon que permiten incrementar el porcentaje de AR (Z). Las regiones más oscuras indican los valores Z más altos. Los niveles de contorno revelan un pico centrado en aproximadamente 12 h, TP 54 °C, 16µL de enzima y 54°Bx de extracto de algarrobo. La concentración de AR en esta región es mayor a 10,0 %.

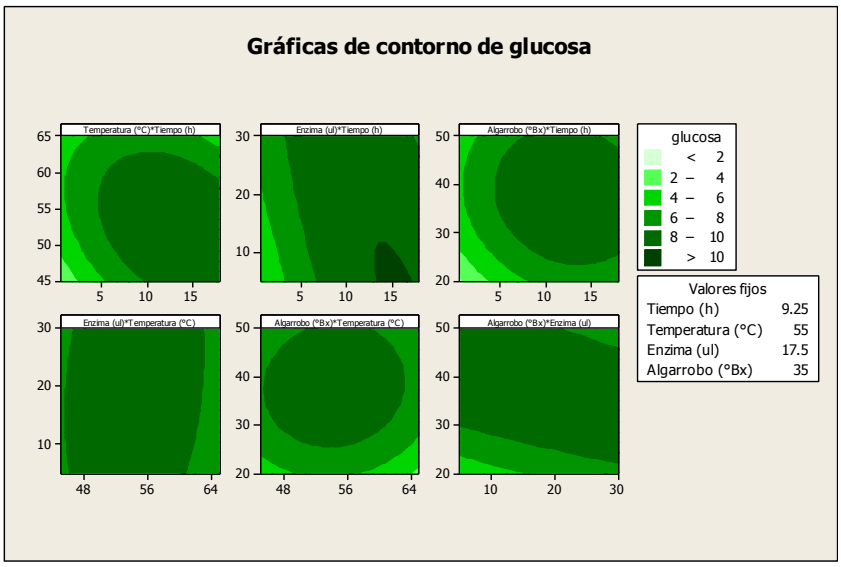


Figura 18. Contorno del porcentaje de azúcares reductores (AR) versus tiempo, temperatura, enzima y extracto de algarrobo.

6.8 Optimización de la respuesta

De acuerdo al análisis de respuesta del porcentaje de FOS se determinaron los parámetros de optimización que se muestran en la tabla 17 con el fin de maximizar las reacciones de transfructosilación para obtener el mayor porcentaje de FOS en el extracto de algarrobo.

Tabla 17. Parámetros de optimización de la respuesta para incrementar el porcentaje de FOS

Parámetros						
	Meta.	**Inferior.**	**Objetivo.**	**Superior.**	**Ponderación.**	**Importar.**
FOS	Máximo	1	14	14	1	1
Punto de inicio						
Tiempo (h)	=	0,5				
Temperatura	=	45				
Enzima (µL)	=	5				
Algarrobo (°Bx)	=	20				
Solución global						
Tiempo (h)	=	12,3434				
Temperatura	=	53,6869				
Enzima (µL)	=	15,8586				
Algarrobo (°	=	37,8788				
Respuestas pronosticadas						
FOS = 14,1396, deseabilidad = 1,00						
Deseabilidad compuesta = 1,00						

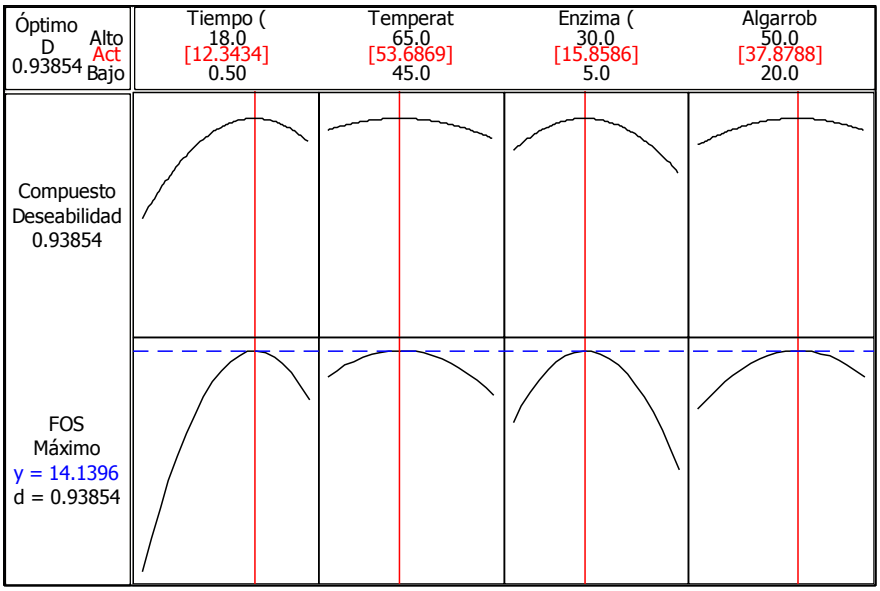


Figura 19 Condiciones óptimas para el proceso de transfructosilación

6.9 Optimización de la producción de FOS. Con los análisis y ajustes realizados se determinaron las condiciones óptimas de producción de FOS a partir de azúcares reductores son: 12 h; 54 °C; enzima 16 µL y extracto de algarrobo 38 °Bx, para un rendimiento teórico de 14 %, siendo el valor experimental 16,10 %.

6.10 Cuantificación de los carbohidratos en la reacción de biocatálisis. En los extractos de algarrobo, muestras MPEA0 y MPEAD se obtuvieron 4,5 y 17,30 g de oligosacáridos totales, siendo 16,10 g FOS por 100 g de extracto (tabla 17). Estas concentraciones se determinaron por HPLC.

Tabla 17. Determinación de carbohidratos en el extracto de algarrobo mediante HPLC.

Determinación de carbohidratos (%)					
	Oligosacáridos				
Muestras	Fructosa*	Glucosa*	Sacarosa*	FOS*	Otros
MP EAO	8,00	7,40	18,10	0,00	4,50
MP EAD	5,80	12,6	2,30	16,10	1,20

*(g/100)

Dónde:

MP EAO; Extracto de algarrobo inicial

MP EAD; Extracto de algarrobo sometido a la reacción de transfructosilación

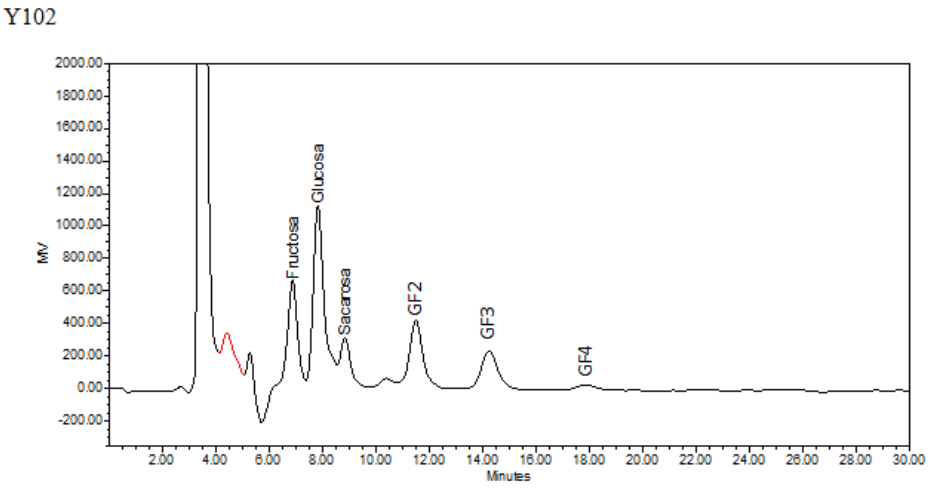


Figura 19 Perfiles cromatográficos (HPLC) del extracto biotransformado de algarrobo

6.11 Cuantificación de minerales en la reacción de biocatálisis por el método AOAC Official Method 999.10; 18th Ed. 2005, Lead Cadmium, Zinc, Copper and Iron in foods. Atomic Absorption Spectrophotometry

Tabla 19. Determinación de minerales en el extracto de algarrobo biotransformado

Minerales (mg/Kg)	Resultados
Fierro	6,0
Zinc	6,0
Calcio	462,0
Magnesio	372,0
Fósforo	899,0

VII. DISCUSIÓN

El algarrobo (*Prosopis pallida*) es una especie vegetal del norte del peruano, propios de los bosques secos de la región.[50, 51]. En el 2010 Portillo-Quintero sostiene que Perú es el país que más bosque seco ha convertido en América, solo queda alrededor del 5 % de lo que antes hubo. En tanto que en los últimos años se ha reportado que anualmente son depredadas unas 10 mil hectáreas de bosques, que son destinadas básicamente para carbón de leña. Más del 50 % del fruto se pierde en el campo, un 15 % se consume como alimento para ganado y el 35 % restante va a los mayoristas que lo venden para diversos usos. [8]

En la actualidad la harina de *prosopis pallida* es empleada para la alimentación humana pero en mayor porcentaje para la alimentación animal. En un estudio realizado por Boeri P. *et. al.*[57], evaluó el valor nutricional de la harina integral encontrando para *Prosopis alpataco* un bajo contenido de lípidos 3,23%; un alto contenido de proteínas 10 % e hidratos de carbonos 62 % con lo cual, las vainas de esta especie constituyen un potencial recurso alimentario. En otro trabajo realizado por Bermello J. y Garcia M.[58], encontraron para harina de los frutos de *Prosopis pallida* lípidos 1,98 %, proteínas 6,89 %, carbohidratos 74,31 %, humedad 12,35 % y cenizas 11,16 %. Estos resultados son similares a los encontrados en nuestro estudio para la harina de los frutos de *Prosopis pallida* donde encontramos lípidos 2 %, proteínas 5,7 %, carbohidratos 75,5 %, humedad 8,6 % y cenizas 8,1 %. Mientras que P*rosopis alpataco* presenta una concentración mayor de proteínas y menor concentración de lípidos y carbohidratos.

De los carbohidratos que presenta la harina de algarrobo entre un 40 a 50 % corresponden a fructuosa, glucosa y sacarosa[58.] Pero además de estos carbohidratos están presentes en la harina de algarrobo galactomananos provenientes del endospermo de las semillas, que presentan unidades de galactosa y manosa con enlaces en posición β-1,4 en la cual se unen varias ramas de D-galactosa mediante enlaces (1,6) cada cuatro o cinco manosas[59], estos últimos estarían en alrededor de un 20% dependiendo del suelo y variedad. Además presenta minerales: hierro, calcio, magnesio, zinc, silicio, fósforo y mucho potasio, bajo contenido de sodio que contribuye a balancear nuestra dieta tan rica en sodio[60]. En nuestro extracto de algarrobo se realizó la cuantificación de minerales encontrándose hierro 6.0 mg/Kg, calcio 462 mg/Kg, magnesio 372 mg/Kg, zinc 6.0 mg/Kg y fósforo 899 mg/Kg, por lo que consideramos que este producto será una importante fuente de minerales.

Para la elaboración del extracto de algarrobo se probaron 3 concentraciones de harina 10 %, 20 % y 30 % , alcanzando 15 °Bx, 30 °Bx y 40 °Bx respectivamente al concentrarse a un mismo volumen, por lo que se decidió utilizar al 20% para las siguientes extracciones y concentrarlas hasta 50 °Bx.

En la preparación del extracto concentrado de algarrobo, uno de los primeros retos fue controlar el pardeamiento no enzimático, por la gran cantidad de carbohidratos que presenta el extracto. A pesar que la extracción de los carbohidratos se realizó a temperatura controlada a 80 °C se presentó un color marrón oscuro debido al pardeamiento por descomposición térmica de los azúcares simples. La caramelización se produce al calentar los azúcares en ausencia de compuestos aminados, tornándose de color marrón, en esta reacción, se combinan azúcares para formar estructuras complejas de color[61].

En la caracterización del extracto concentrado de algarrobo se encontró fructuosa 10,53 %, glucosa 9,74 % y sacarosa 23,82 %, comparado con el jugo de caña de azúcar que presenta fructuosa 2.0 %, glucosa 2.0 % y sacarosa 75.0 % [62], mientras que para el extracto concentrado de yacón se reportó para el ecotipo CLLUNC118 (Hualqui) 2,6 % de glucosa libre, 40.9 % de azúcares reductores, 12,2 % de sacarosa y 10.9 de FOS [63], por lo tanto nuestro extracto de algarrobo presenta una porcentaje considerable de sacarosa que fue utilizada como sustrato para la producción de FOS.

En los últimos años los fructooligosacaridos (FOS), están siendo utilizados debido a sus propiedades biológicas y funcionales como prebiótico. Los FOS tienen bajo aporte calórico, ya que no son digeridos por las enzimas digestivas, pero tienen gran poder edulcorante, estimulan el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos contribuyendo a la prevención del cáncer de colon y la reducción de los niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos plasmáticos; estimulan la absorción de calcio y magnesio. Así mismo, redujeron el cáncer de colon en ratas experimentales, debido a que los ácidos grasos de cadena corta son fuente de energía para los colonocitos y están implicados en los mecanismos de apoptosis, división y proliferación celular. [64,65]

Actualmente, en la biosíntesis de fructooligosacáridos (FOS) a partir de sacarosa se utilizan diversas enzimas comerciales inulinasas, invertasas, celulasas, levansacarasas con actividad fructosiltransferasa que catalizan la transferencia del fructosilo desde una sacarosa a diferentes aceptores, entre ellos, otra molécula de sacarosa, dando lugar a FOS, estas enzimas pueden estar libres o inmovilizadas, también pueden utilizarse células

vivas de *Pichia pastoris* transgénica. [21,66]

En la producción de FOS a partir de sacarosa se evaluaron diferentes factores y condiciones, así Rubio *et al*. [2], utilizaron invertasa de Aspergillus niger IB56 y estudió el pH a 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,5; temperaturas 20, 25, 30 y 40 ºC, concentración de sacarosa 15,0; 30,0 y 45,0 % y tiempos de incubación a 60; 90 y 120 min. Alcanzando la máxima producción de FOS 10,5% a una concentración de sacarosa 30,0 %; a pH 5,0; 20 ºC y 60 min de reacción. En tanto Vaz *et al*. [46], utilizando inulinasa obtenida de *Kluyveromyces marxianus*y alcanzo un rendimiento de 18,2 % de FOS, mientras que Pérez-Cruz *et al*. [17], produjo 32,2 % de FOS utilizando células de *Pichia pastoris* inmovilizadas en alginato de calcio, en un biorreactor tipo tanque de 5 *L.* A la vez, Ureta *et al*.[67], sintetizaron FOS utilizando sacarosa 20, 30 y 55 % (p/v) y Viscozyme L 3,5%, de esta forma obtuvieron FOS 30% de cadena corta (GF3 y GF4) con sacarosa 30%. En tanto, Vega *et al*. [20,] utilizaron preparaciones enzimáticas comerciales, como Pectinex Ultra SP-L con 6 h de reacción, el rendimiento fue entre 58,8 a 62,6% (g sc-FOS/100 g de sacarosa).

Es por ello que en este trabajo se decidió seleccionar una enzima comercial que nos permita alcanzar un mayor rendimiento en el extracto concentrado de algarrobo, una matriz más compleja que la sacarosa estándar. Para esto se probaron tres enzimas comerciales: inulinasa, invertasa y pectinasa en sacarosa al 30 %, encontrando un rendimiento de 12.1 %, 11.5 % y 14.0 % de glucosa respectivamente, la liberación de glucosa al medio de reacción es directamente proporcional a la biosíntesis de FOS, así también utilizando estas enzimas se evaluó el perfil cromatográfico de la biosíntesis de FOS en el extracto de algarrobo observando (figura N° 7 y 8) que pectinasa (Sigma-Aldrich) permite obtener una mayor diversidad de FOS (GFn), esta última también usada por Surín et al. [23], en el Jarabe de Longan, alcanzó un rendimiento de 14,36 % de FOS.

Determinar el contenido de fructooligosacaridos (FOS), en el proceso de biosíntesis resulta costoso, debido a que el método enzimático tarda aproximadamente seis horas con un costo de US 40.00 por muestra, mientras que por HPLC su costo es de US 150. Por tal motivo, se utilizó la metodología de superficie de respuesta con diseño Box-Behnken que permite planificar y ejecutar el experimento una sola vez, mientras que Surín *et al*.[23], propone un diseño central compuesto para realizar ensayos secuenciales. Así, Vega *et al.* [18], analizaron temperatura, concentraciones de sacarosa y enzima (celulasas Rohapect CM) en el medio de reacción para la producción de FOS de cadena corta (sc-FOS). Las

respuestas del diseño fueron: rendimiento (g sc-FOS/100 g de sacarosa), 1-kestosa (g/100 g sc-FOS) y productividad volumétrica (g sc-FOS / L h). Las condiciones óptimas fueron 50 ° C, 6,6 U / ml de enzima, sacarosa 2,103 M en tampón de acetato 50 mM a pH 5,5, y 5 h. En estas condiciones, se lograron sGF2 de 68,2 %.

En el diseño Box-Behnken; se estableció las superficies de respuestas teniendo como variable de respuesta la producción de FOS y glucosa libre, los niveles para el diseño se describen en la Tabla 4. Los niveles intermedios de las variables independientes fueron: 9,25 h, 55 °C, enzima 35.9 mg y extracto de algarrobo 35 °Bx. Al calcular el coeficiente de regresión de superficie del porcentaje FOS se encontró R^2 de 90,36 %, R^2 predictivo de 80,8 % y R^2 ajustado de 86,89 %. En tanto, el porcentaje de glucosa R^2 es 89,44%, R^2 predictivo 79,08 % y R^2 ajustado 85,64%. Los coeficientes de determinación R^2 señalan que la síntesis de FOS y glucosa libre se ajustan al modelo empleado. Las interacciones tiempo-enzima y temperatura-enzima en la biosíntesis de FOS presentaron un $p < 0,05$ (Tabla 12). Los gráficos de superficie de respuesta y contorno (figuras 11 y 12) fueron establecidos entre 2 factores, mientras los demás factores se mantuvieron en un nivel intermedio.

Los gráficos para la variable producción de glucosa libre, mostro tendencias similares a las encontradas para FOS, confirmando lo propuesto por La Rota et al.[45], quien postula que la liberación de glucosa al medio es directamente proporcional a la biosíntesis de FOS. Estos datos son importantes porque permitirán monitorear el proceso de biosíntesis de FOS, de forma indirecta usando el método de glucosa oxidasa un método fácil, rápido y económico.

Las condiciones óptimas para la biosíntesis de FOS (Tabla 5) fueron determinadas por el análisis de máxima respuesta mediante Minitab 16, siendo las condiciones óptimas 12 h; 54 °C, enzima 32.54 mg y extracto de algarrobo 37,87 °Bx, para un rendimiento teórico de 14 % y experimental de 16.10 % de FOS (según el método HPLC), siendo éste mayor a los reportados por Surín *et al.*[23], quien obtuvo 14.36 % de FOS (2,03 % de nistosa (GF3) y 12,33 % de kestosa (GF2)) a partir del jarabe de Logan. En tanto, Muñoz *et al*.[24], utilizando jugo de caña y células permeabilizadas de *Candida apícola* obtuvo FOS 4,5%.

En el cromatograma (figura 19) se muestra los tiempos de retención de FOS biosintetizado, se observa la presencia de sc-FOS como kestosa (GF2), nistosa (GF3) y fructosilnistosa (GF4), con un mayor pico en GF2 sugiriendo la mayor concentración de

este fructósido similar a lo obtenido por Vega *et al*.[18] , con sacarosa y Surin *et al*.[23] con el jarabe de Logan.

Las condiciones óptimas de biosíntesis obtenidas en el presente estudio permitirán la biosíntesis de FOS en el extracto de algarrobo y la implementación de este bioproceso le dará valor agregado al producto para uso como ingrediente alimentario, no sólo por el contenido de FOS, sino también por el alto contenido de minerales (calcio y magnesio) los cuales no se alteraron con este bioproceso. Por otro lado, los datos obtenidos en esta investigación servirán el escalamiento a nivel industrial.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se seleccionó la pectinasa de *A. aculeatuns* por presentar la mayor actividad de transfructosilación de 0,0129 (µmol/min)/mL. Los productos kestosa GF2 y nistosa GF3 se observaron por cromatografía en capa fina y HPLC
2. En la elaboración del extracto de algarrobo se ensayaron las concentraciones de harina de algarrobo al 10 %, 20 % y 30 %, alcanzando una mayor recuperación de carbohidratos al 20 %. Después, el extracto de algarrobo se concentró a 50 °Bx, el cual contenía sacarosa 23,82 %, glucosa 9,74 % y fructosa 10,53 %
3. La metodología de superficie de respuesta permitió establecer las condiciones óptimas de producción de FOS, a concentraciones de extracto de algarrobo de 38 °Bx y enzima 15.8 µL, 12.3 h y 54 °C.
4. La producción de FOS a partir del extracto acuoso de los frutos de algarrobo por síntesis enzimática con los parámetros óptimos establecidos previamente con MSR permitió un rendimiento teórico de 14.00 % y experimental de 16.10 %.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olvera C, Castillo E, López-Munguía A. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. Biotecnología. 2007; 14(3):327-346. Disponible en http://goo.gl/YVWDBT
2. Rubio C, Latina A, Antonio N. Producción de fructooligosacaridos por Invertasa de Aspergillus Niger Ib56: un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. Boletín Micológico, 2012. p. 18-23.
3. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Diaz C, Puicón J. Productos Industrializables de la Algarrobina Peruana (Prosopis pallida): Algarrobina y Harina de Algarrobo. Multequina 2000; 9(2):119-132
4. Sabater M. Efectos de las poliaminas y los fructooligosacáridos de la dieta sobre la maduración intestinal en cerdos destetados precozmente. [Tesis doctoral en Biología]. España: Universidad de Murcia; 2008
5. Arango Bedoya O, Fajardo JC, Cuarán GP. Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de yacón (smallanthus sonchifolius (poepp. & endl.) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. Biotecnol. sector agropecuario agroind. [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 2 de enero de 2022];6(2):14-0. Disponible en: https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/687
6. Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. Annu Rev Food Sci Technol. 2010; 1(1):305-339.
7. Chacon A. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacaridos. Agronomia Mesoamericana. 2006;17(2):265-286
8. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre MI, Weigend M. Hoja botánica: Algarrobo Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth. 1era ed. Proyecto Perúbiodiverso. Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C.; 2012
9. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Diaz C, Puicón J. Productos Industrializables de la Algarrobina Peruana (Prosopis pallida): Algarrobina y Harina de Algarrobo. Multequina. 2000; 9(2): 119-132
10. Tamayo L, Arteaga D, Jaramillo J. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (Hymenaea courbaril Linneaus) de interés para la industria de alimentos. Lasallista de Investigación. 2008; 5(2), 100-111
11. Bernardi C, Drago S, Sabbag N, Sánchez H, Freyre M. Formulación y Evaluación

Sensorial de Prosopis alba (Algarrobo) Pulp Galletas con Aumento de Hierro y Calcio Dialyzabilities. Alimentos vegetales Hum Nutr. 2006; 61(1):37-42

12. Escobar B , Estévez AM , Fuentes C , Venegas D. Uso de la harina de algarrobo (Prosopis chilensis (Mol) Stuntz) como fuente de proteínas y fibra dietética en galletas y papas fritas. Arch Latinoam Nutr. 2009; 59 (2) :191-198
13. Petit MD, Pinilla JM. Producción y purificación de un jarabe de azúcar a partir de vainas de algarrobo. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1995; 28(1):145-152
14. Quispe C, Petroll K, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann. Efecto antioxidante y caracterización del jarabe de las vainas del Prosopis Sudamericano. Food Research Internacional. 2014; 56:174-181
15. Bigne F. Aplicación de harina de fruto de algarrobo en el desarrollo de productos panificados saludables. [Tesis doctoral]. La Plata. Universidad Nacional de La Plata; 2016. Institución otorgante: http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52428
16. Monsan P, Paul F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol Rev. 1995; 16:187-192
17. Pérez-Cruz E, Martínez-García, D, Rodriguez-Rico I, Sobrino-Legón A, Hernández L, Escalado de la reacción de biosíntesis de fructooligosacáridos, a partir de sacarosa, en biorreactores tipo tanque agitado. Tecnología Química. 2011; 31(2):19-25.
18. Vega R, Zúniga-Hansen M. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. Bioresource technology. 2011; 102(22): 10180-10186
19. Montilla A, Olano A, MartínezVillaluenga C, Corzo N. Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by Pectinex Ultra SP-L. J Agric Food Chem. 2011; 59: 10705-10711
20. Vega-Paulino R, Zúñiga-Hansen M. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosacharides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2012; 76: 44-51.
21. Santos-Moriano P. Síntesis enzimática de fructooligosacáridos estimuladores de la microbiota colónica. An Real Acad Farm. 2015;81(1):48-62. http://anales.ranf.com/2015/vol1/1534.htm
22. Hernández L, Menéndez C, Pérez-Cruz E, Martínez D, Musacchio A, Ramírez R,

Sobrino A, Trujillo L, Alfonso D, Pimentel E. Catalizadores enzimáticos novedosos para la producción de fructooligosacáridos a partir del azúcar de caña. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. 2021; 11(2):854. Disponible: http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/854/1088

23. Surin S, Seesurivachan P, Thakeow P, Phimoisiripol Y. Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from Logan syrup. Journal of Applied Sciences. 2012; 12: 1118 – 1123
24. Muñoz E. Escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de Candida apícola. [Tesis de Maestría]. Jalisco. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco; 2016
25. Özge T. Sözgen G, Baysal T, Kaplan B. Producción de 6- kestosa prebiótica usando Zymomonas mobilis levansucrase en melaza de algarroba y su efecto sobre los niveles de 5-HMF durante el almacenamiento. Agric Food Chem; 2019; 297: 124897
26. Cairati E. Historia cultural del algarrobo, desde la cuenca del Mediterráneo hasta la Costa Norte de Perú. Altre Modernita. 2013; (10):186-204.
27. Assmann J. La memoria culturale. Struttura, ricordo e identità politice nelle grandi civiltà antiche. 1era ed. Torino: Einaudi; 1997
28. Fuentes-Berrio L, Acevedo-Correa D, Gelvez- Ordoñez V. Alimentos funcionales: impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2015; 13(2):140-149. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n2/v13n2a16.pdf
29. Olveira G., González-Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. Nutr. Hosp. 2007; 22(2): 26-34. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500005&lng=es.
30. Castañeda C. Prebióticos y su repercusión para la salud. 5th. ed. Mendieta; 2014. p. 35-44.
31. Meléndez N, Aguilar N, Nevárez G, Rodríguez R. Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Internet]. 2011 Jun [citado 2022 Ener 4] ; 31(1): 6-12. Disponible en:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100003&lng=es.

32. Rodríguez O, Rodríguez J, Pérez E, Santos B, Cortada A, Trujillo L, Padrón I, Núñez M. Influencia de un sirope con prebióticos en el crecimiento de cultivos lácticos. Cienc Tecnol Alim. 2012; 22(2):48-53.
33. Corzo N, Alonso J, Azpiroz F, Calvo M, Cirici M, Leis R, Lombó F, Mateos-Aparicio I, Plou F, Ruas-Madiedo P, Rúperez P, Redondo-Cuenca A, Sanz M, Clemente A. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. Nutr Hosp. 2015; 31(1):99-118. Disponible en: http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8715.pdf
34. Kaur A, Gupta N. Aplication of inulin and oligofructosa in health and nutrition. Journal of Biosciences. 2002; 23:703-714
35. Meléndez N, Aguilar C, Nevárez G. Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. Rev. Sociedad Venezolana de Microbiología. 2011; 231:6-12.
36. Madrigal L, Sangronis E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. ALAN [Internet]. 2007 Dic [citado 2022 Ener 4] ; 57(4): 387-396. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400012&lng=es.
37. Valenzuela A, Maiz A. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. Rev Chil Nutr. 2006; 33 (2): 342-351
38. Escudero E, González P. La fibra dietética. Nutr. Hosp. [Internet]. 2006; 21(2):61-72. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500007&lng=es.
39. Vernazza, C, Gibson G, Rastall R. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria. Carbohydrate Polymers. 2005; 60: 539-545.
40. Moro G, Arslanoglu S, Stahl B. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. Arch Dis Child. 2006; 91: 814-819.
41. Gimeno Creus E. Alimentos prebióticos y probióticos. OFFARM. 2004;23(5): 90-98

42. Flores-Maltos DA, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Teixeira JA, Aguilar CN. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. Crit Rev Biotechnol. 2016; 36(2):259-67.
43. Bekers, M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova, L, Danilevics A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of Zymomonas mobilis extracellular levansucrase. Process Biochem. 2002; 38:701-706.
44. Gómez J, Zuñiga M, Silva E, Ospina S. Producción de fructooligosacáridos (FOS) por tecnología de enzimas. Parte I: Evaluación de aislados nativos de hongos para la producción de FOS. Rev. Col. Cienc. Quim.Farm. 2005; 34 (1): 77-91.
45. La Rotta C, Ospina S, Lopéz-Munguía A. Producción y caracterización de extractos enzimáticos crudos con actividad fructosiltransferasa. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1998; 27:53-56.
46. Vaz F, Marcio A, Treichel H, Costa F, Mauger F. Avaliação da produção de fruto-oligossacarídeos a partir de sacarose em meio aquoso e orgânico usando inulinase imobilizada de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2012; 32(2):245-249.
47. Montilla A, Olano A, Martínez-Villaluenga C, Corzo N. Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by Pectinex Ultra SP-L. J Agric Food Chem. 2011; 59: 10705-10711
48. Cardenas R, Santacruz S. Estudio de factibilidad para la industrialización del yacón (Smallanthus sonchifoluis) como fuente de fructooligosacáridos (FOS) para la aplicación en yogur tipo II en Cayambe. Avances. 2012; 4 (1):4-7.
49. Portillo-Quintero C, Sánchez-Azofeifa, G. Extent and Conservation of Tropical Dry Forests in the Americas. Biological Conservation. 2010; 143(1): 144-155. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.09.020
50. Harris PJ, Pasiecznik NM, Smith SJ, Billington JM, Ramırez L. La diferenciación de Prosopis juliflora (Sw.) DC. y P. pallida (H. & B. ex. Willd.) HBK utilizando caracteres foliares y ploidía. ForestEcology and Management; 2003: 180(1-3): 153-164
51. Burghardt A, Brizuela M, Mom M, Albán L, Palacios L. Análisis numérico de las especies de Prosopis L. (Fabaceae) de las costas de Perú y Ecuador. Rev. Perú.

Biol. 2010; 17(3): 317 - 323

52. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Díaz C. y Puicón J. Productos industrializables de la Algarroba Peruana (Prosopis Pallida): Algarrobina y harina de algarroba. Unidad de Proyectos Ambientales, Universidad de Piura. 2009. 129 – 132p
53. Montgomery DC. Desing and analysis of experiments. En 6th ed. En John Wiley & Sons. New York. 2004
54. Box GEP, Draper NR. Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons. New York.1987
55. Gamboa M, Víquez F, Cubero E. Utilización del método de superficie de respuesta para formular una base de banano (Musa AAA) para batidos. Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment. 2010; 1(1):081-094. https://drive.google.com/file/d/1JCLaraGQMnjzvG2LSvwqSURCFZX1IpD4/view
56. Miller, Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". Anal. Chem. 1959; 31 (3): 426–428.
57. Boeri P, Piñuel L, Sharry S, Barrio D. Caracterización nutricional de la harina integral de algarroba (*Prosopis alpataco*) de la norpatagonia Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía de la Plata. 2017; 116 (1): 129-140
58. Bermello S, García D. Métodos de extracción para los compuestos esenciales del algarrobo (*Prosopis Pallida*) y su posible aplicación a nivel industrial. [Tesis para optar el título de Ingeniero Químico]. Portoviejo: Universidad Técnica de Manabí; 2015.
59. Oliva, M., Alfaro, C., & Palape, I. Evaluación del potencial tecnológico de galactomananos del endospermo de semillas de Prosopis sp. para el uso en la industria de alimentos. Agriscientia. 2010; 27(2), 107-113. Recuperado en 28 de marzo de 2019, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-298X2010000200006&lng=es&tlng=es
60. Alzate L, Arteaga D, Jaramillo Y. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) de interés para la industria de alimentos. Rev. Lasallista Investig. 2008 ; 5(2): 100-111.
61. Arias S., López D. Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. Lámpsakos. 2019; 22:123-136.

62. Santana-Hernández E, Marcet-García E, Martínez-Padrón E, Carrillo-Ulloa R, Marcet-Sánchez M. El jugo de caña de azúcar como aditivo en la reutilización del bagazo de malta. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 2017;51(3):28-34. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223158039005
63. Manrique, I, Párraga A, Hermann M. Jarabe de yacón: Principios y Procesamiento. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. 2005
64. Martínez P., Mayorga L., Ponce T. Efecto de los fructooligosacáridos en la población bacteriana fecal de un neonato, crecida en cultivo por lote. En Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2008; 39 (1):32-37.
65. Arimandi B, Johson C, Campbell S, Hooshmand S, Chai S, Akhter M. Combining fructooligosaccharide and dried plum has the greatest effect .on restoring bone mineral density among select functional foods and bioactive compounds. Journal of Medicinal Food. 2010; 13(2): 312-319.
66. González G, Castellanos O. Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas Revista Ingeniería e Investigación 2003; 52: 5-17
67. Ureta MM, Romano N, Kakisu E, Gómez-Zavaglia A. Synthesis of fructo-oligosaccharides using grape must and sucrose as raw materials. Food Res Int. 2019; 123:166-171
68. Ferrer J. Empleo de enzimas en la síntesis de prebióticos. [Trabajo de fin de grado] Madrid: Universidad Complutense. 2018

ANEXOS

Recolección. En el presente estudio se emplearon 10 kilogramos de frutos de algarrobo recolectados en Catacaos Piura.



Figura 1A. Recolección de algarroba

Acopio y selección de vainas.

Las algarrobas fueron seleccionadas eliminando aquellas que están dañadas y contaminadas



Figura 2A. Selección de algarroba

Lavado y Secado

Las algarrobas previamente seleccionadas fueron lavadas utilizando cepillos para eliminar cualquier tipo de residuo adherido para finalmente ser llevado a secado en estufa a 42 °C por 7 días para disminuir la humedad y facilitar la molienda.



Figura 3A. Secado de algarroba

Molienda.

Durante la molienda y tamizaje se logró disminuir el tamaño de partícula y separar la fibra de la harina, con un rendimiento de 60 % para harina de algarrobo.



Figura 4A. Molienda de algarroba

Envasado. El envasado se llevó acabo en bolsas de polietileno de 500 gramos.



Figura 5A. Harina de algarroba

Gráficos de superficie de respuesta para la producción de FOS

La figura 6A se muestra que las concentraciones altas de enzima no favorecieron el proceso de transfructosilación. Sin embargo, las concentraciones en el intervalo

de 5 a 30 µL de enzima permitieron alcanzar el pico máximo en la biosíntesis de FOS en el extracto algarrobo.

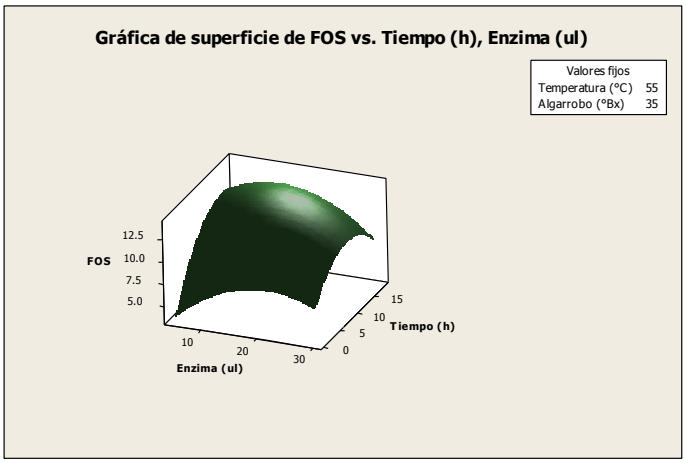


Figura 6A. Superficie de respuesta del porcentaje de FOS final versus, tiempo (h) y enzima (µL)

La reacción de transfructosilación durante los intervalos de 16 a 18 h originaron extractos de algarrobo con bajas concentraciones de FOS. Sin embargo, las reacciones de transfructosilación durante los intervalos de 10 a 14 h combinado con extracto de algarrobo en el intervalo de 30 a 40 °C, permitieron obtener los picos más altos en la biosíntesis de FOS (figura 7A).

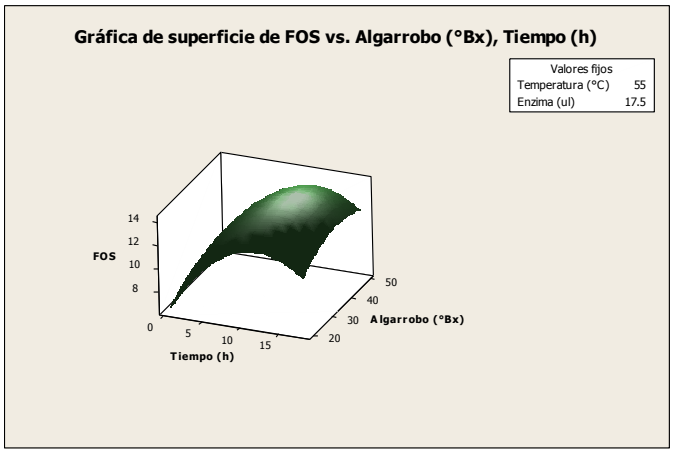


Figura 7A. Superficie de respuesta del porcentaje de FOS versus tiempo y extracto de algarrobo

La figura 8A se muestra que las temperaturas (X) mínimas y máximas usadas en la producción de FOS no favorecen la biosíntesis (Z), que alcanza un pico máximo alrededor de los 54 °C con concentraciones de enzima (Y) en el intervalo de 10 a 20 µL.

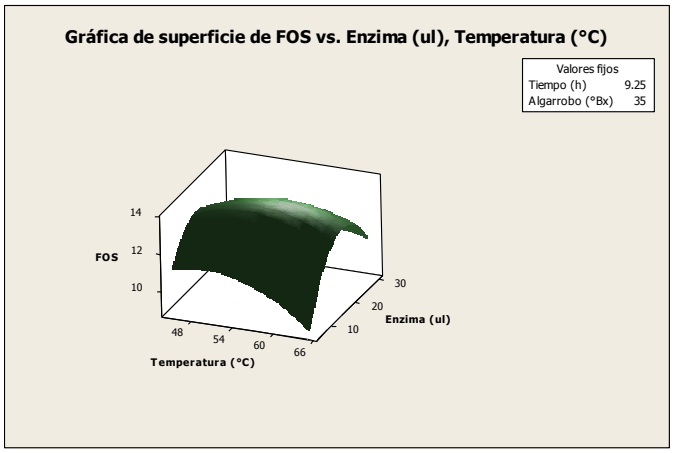


Figura 8A. Superficie del respuesta de porcentaje de FOS versus enzima y temperatura

El proceso de transfructosilación es directamente proporcional a la liberación de glucosa. La figura 9A muestra que los picos más altos del porcentaje de glucosa (Z) se alcanzan en los intervalos de tiempo (X) de 8 a 15 h combinado con una concentración de enzima (Y) en un intervalo de 10 a 20 μL.

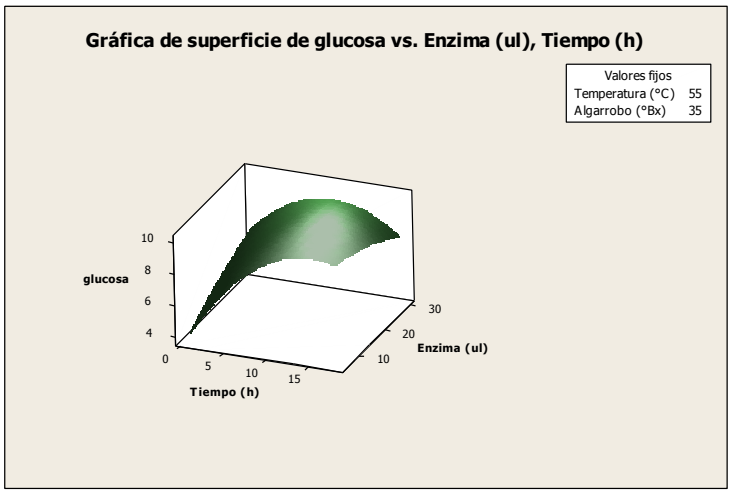


Figura 9A. Gráfica de superficie de respuesta del porcentaje de glucosa versus tiempo y enzima

El incremento del porcentaje de glucosa (Z) en intervalos de tiempo (X) de 0 a 5 h es mínimo. Sin embargo, a intervalos de X de 10 a 15 h combinado con extracto de algarrobo (Y) en los intervalos de 50 a 60 °Bx alcanza su pico máximo (figura 10A)

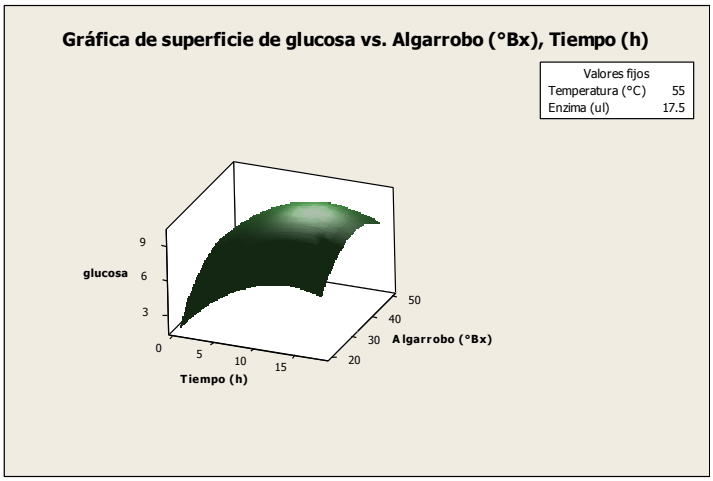


Figura 10A. Superficie de respuesta del porcentaje de glucosa producida (Z) versus tiempo (X) y extracto de algarrobo (Y).

La figura 11A muestra que el porcentaje más alto de AR se alcanza a un intervalo de 50 y 60 °C combinado con extracto de algarrobo entre 30 y 40 °Bx.

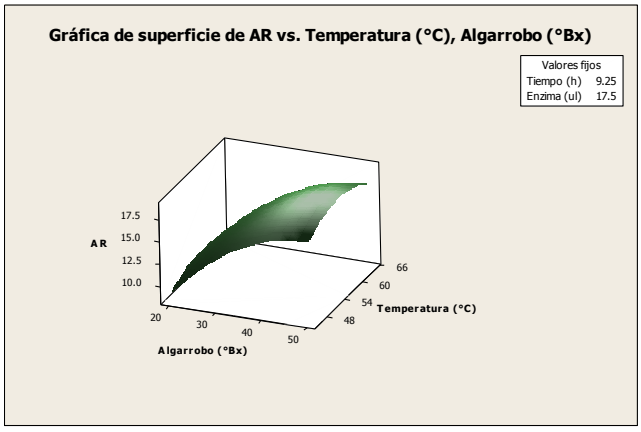


Figura 11A. Gráfico de superficie de respuesta del porcentaje de azúcares Reductores versus extracto de algarrobo y temperatura.

La figura 12A muestra que el porcentaje de AR es bajo a 30 µL de enzima y 20 °Bx de extracto de algarrobo.

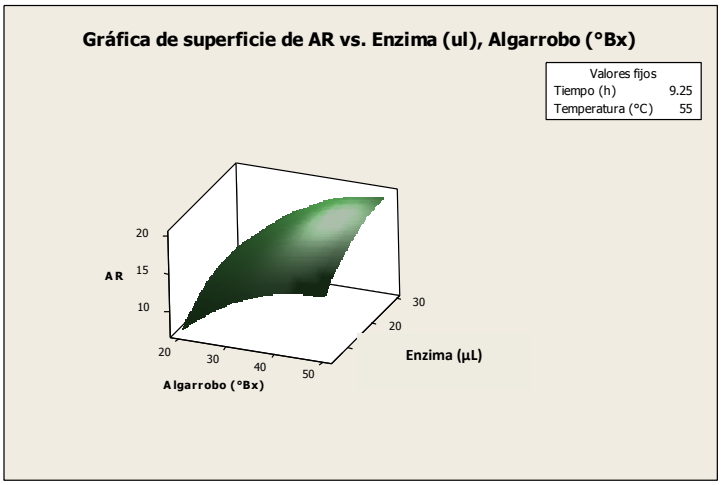
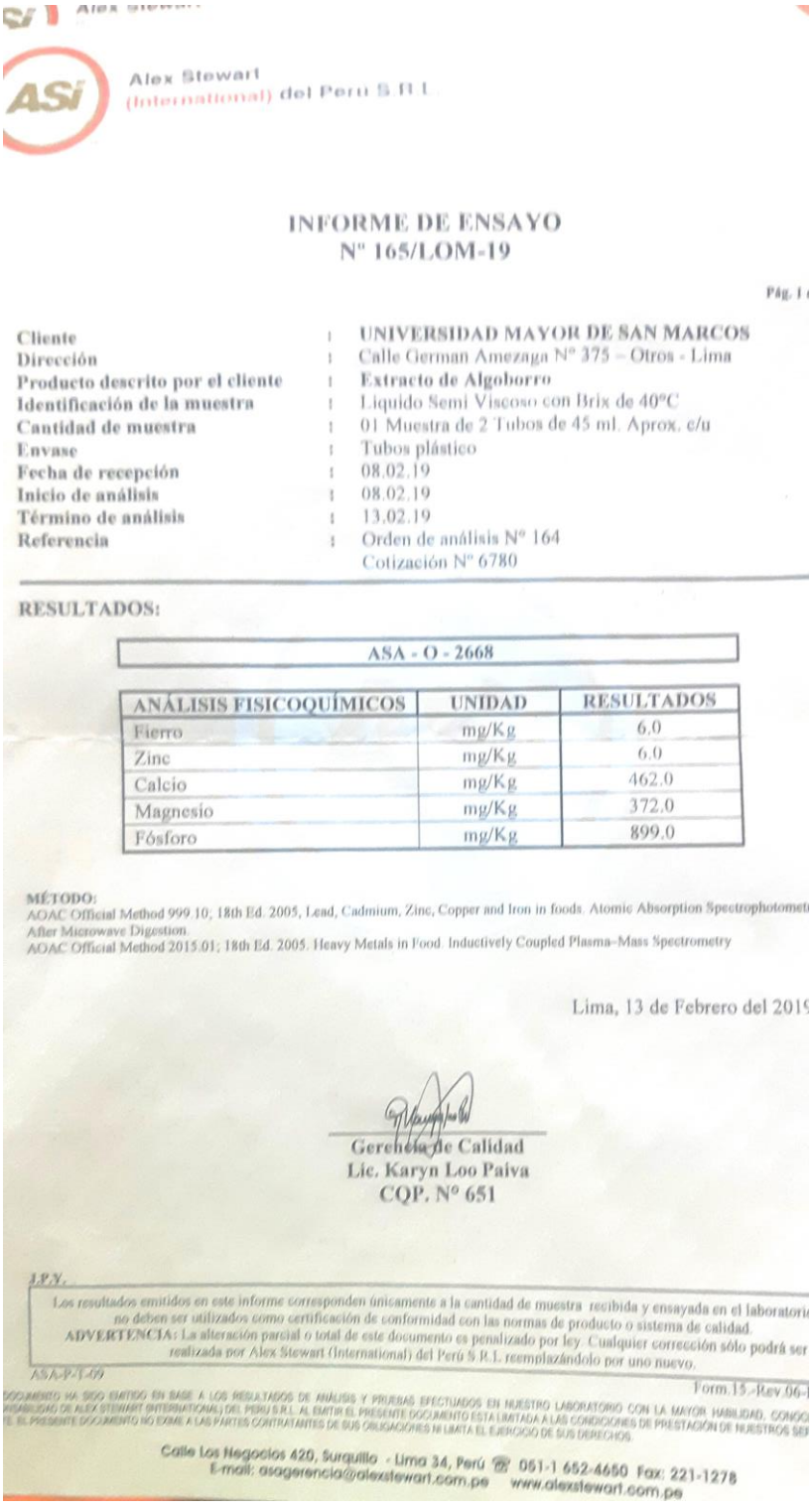


Figura 12A. Gráfica de superficie de respuesta del porcentaje de azúcares reductores (AR) vs extracto de algarrobo y enzima



Alex Stewart
(International) del Perú S.R.L.

INFORME DE ENSAYO
N° 165/LOM-19

Pág. 1 de

Cliente	:	**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN MARCOS**
Dirección	:	Calle German Amezaga N° 375 – Otros - Lima
Producto descrito por el cliente	:	**Extracto de Algoborro**
Identificación de la muestra	:	Liquido Semi Viscoso con Brix de 40°C
Cantidad de muestra	:	01 Muestra de 2 Tubos de 45 ml. Aprox. c/u
Envase	:	Tubos plástico
Fecha de recepción	:	08.02.19
Inicio de análisis	:	08.02.19
Término de análisis	:	13.02.19
Referencia	:	Orden de análisis N° 164 Cotización N° 6780

RESULTADOS:

ASA - O - 2668

ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS	UNIDAD	RESULTADOS
Fierro	mg/Kg	6.0
Zinc	mg/Kg	6.0
Calcio	mg/Kg	462.0
Magnesio	mg/Kg	372.0
Fósforo	mg/Kg	899.0

MÉTODO:
AOAC Official Method 999.10; 18th Ed. 2005, Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in foods. Atomic Absorption Spectrophotometi
After Microwave Digestion.
AOAC Official Method 2015.01; 18th Ed. 2005. Heavy Metals in Food. Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry

Lima, 13 de Febrero del 201

Gerencia de Calidad
Lic. Karyn Loo Paiva
CQP. N° 651

I.P.Y.

Los resultados emitidos en este informe corresponden únicamente a la cantidad de muestra recibida y ensayada en el laboratorio
no deben ser utilizados como certificación de conformidad con las normas de producto o sistema de calidad.
ADVERTENCIA: La alteración parcial o total de este documento es penalizado por ley. Cualquier corrección sólo podrá ser
realizada por Alex Stewart (International) del Perú S.R.L. reemplazándolo por uno nuevo.

ASA-P-T-09 Form.15.-Rev.06-

DOCUMENTO HA SIDO EMITIDO EN BASE A LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS Y PRUEBAS EFECTUADOS EN NUESTRO LABORATORIO CON LA MAYOR HABILIDAD. CONOC
RESPONSABILIDAD DE ALEX STEWART (INTERNATIONAL) DEL PERU S.R.L. AL EMITIR EL PRESENTE DOCUMENTO ESTA LIMITADA A LAS CONDICIONES DE PRESTACIÓN DE NUESTROS SER
E. EL PRESENTE DOCUMENTO NO EXIME A LAS PARTES CONTRATANTES DE SUS OBLIGACIONES NI LIMITA EL EJERCICIO DE SUS DERECHOS.

Calle Los Negocios 420, Surquillo - Lima 34, Perú ☎ 051-1 652-4650 Fax: 221-1278
E-mail: asagerencia@alexstewart.com.pe www.alexstewart.com.pe

Figura 13A. Minerales presentes en el extracto biotransformado de algarrobo