

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

"Influencia de amilasas extremófilas procedentes de bacterias
antárticas en las propiedades reológicas de la masa de pan"

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Tesis de Grado

Previo la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentado por:

Karla Paulina Morejón Jácome

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, en especial al Ph.D. Juan Manuel Cevallos y al Ing. Jeffrey Vargas por su excepcional orientación y dedicación en este proyecto.

Al Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales, específicamente al Ing.

Carlos Parra y al Ing.
Julio Cáceres por su
gran apoyo e inagotable
paciencia.

A Corporación Superior,
en particular al Ing.
Andrés Guerrón por su
gran gestión e
invaluable ayuda.

DEDICATORIA

A Dios por brindarme
la oportunidad de
aprender cosas nuevas.

A mi madre y mi padre
que hicieron posible mi
educación y guiaron mi
vida en cada momento.

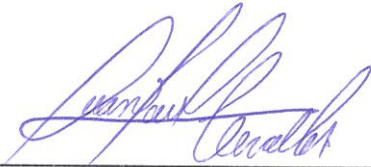
A mis hermanas que las
amo mucho.

A mis compañeros, que
hicieron de esta
experiencia una de las
más especiales.

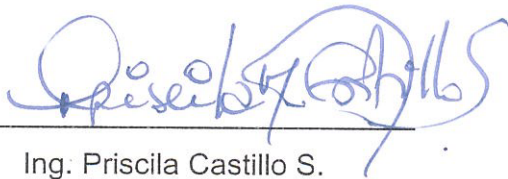
TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ph.D. Juan Manuel Cevallos C.
DIRECTOR DEL TFG



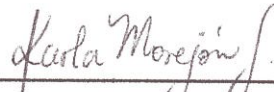
Ing. Priscila Castillo S.

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Trabajo Final de Graduación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Karla Paulina Morejón Jácome

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue demostrar que algunos microorganismos antárticos pueden producir amilasas y que estas lograrían reducir la viscosidad de la masa de pan a bajas temperaturas, de tal manera que se las pueda exponer como una favorable alternativa para mejorar la textura y volumen del pan como producto final.

Para llevar a cabo esta investigación se requirieron dos componentes experimentales: microbiológico y reológico. El primer componente fue desarrollado en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), donde se seleccionó el aislado bacteriano con mayor eficiencia amilolítica, denominado CIBE-27. Se realizó un diseño experimental en el que se mantuvo al microorganismo durante 8 días para concertar la temperatura y pH óptimos de la producción de la enzima, mediante la formación de un halo en medio sólido con almidón como sustrato y se designaron 5 temperaturas y pH diferentes. Se obtuvo como resultado que la temperatura de 20°C y el pH 6,5 fueron los parámetros óptimos. Por consiguiente, el microorganismo fue inoculado en medio mineral con almidón y se lo mantuvo a 120 rpm durante 8 días a la temperatura y pH óptimos ya hallados. El medio fue centrifugado a 8000rpm por 15min a 4°C y el sobrenadante fue liofilizado. Mediante el método de Biuret se estimó que por

cada gramo de liofilizado se contaba con 0,1202 mg de proteína. Al no contar con la enzima pura, dicho valor permitió calcular las concentraciones de proteína requeridas para la posterior experimentación en la masa de pan.

El segundo componente fue ejecutado en el Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales (LEMAT). Se empleó el reómetro Kinexus Pro y se cuantificó el módulo de elasticidad (G') como característica reológica de la masa de pan, aplicando individualmente tres diferentes concentraciones de proteína. Se encontró que la concentración 0,5% redujo de mejor manera la viscosidad de la masa de pan, aumentando la elasticidad.

Finalmente, se determinó que la amilasa antártica pudo reducir eficientemente la viscosidad de la masa de pan y que además tiene la posibilidad de actuar en un amplio rango de temperatura.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS	vii
SIMBOLOGÍA	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
1.1. Microorganismos.	3
1.2. Enzimas.....	12
1.3. Reología	32
CAPÍTULO 2.....	36
2. GENERALIDADES.....	36

2.1	Planteamiento del Problema.....	36
2.2	Justificación	38
2.3	Hipótesis.....	39
2.4	Objetivos.....	40
CAPÍTULO 3.....		41
3.	METODOLOGÍA.....	41
3.1	Diseño experimental microbiológico	43
3.2	Diseño experimental reológico	54
CAPÍTULO 4.....		61
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	61
4.1	Análisis estadísticos	61
4.2	Interpretación de resultados	82
CAPÍTULO 5.....		87
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FEE	Factor de Eficiencia Enzimática
INAE	Instituto Antártico Ecuatoriano
LEMAT	Laboratorio de de Ensayos Metrológicos y de Materiales
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

SIMBOLOGÍA

α	Alfa
β	Beta
γ	Deformación
Δ	Delta
\$	Dólar
σ	Esfuerzo
e	Exponencial
°	Grados
+	Más
>	Mayor que
-	Menos
<	Menor que
¬	Negación
$\rightleftharpoons$	Reversible
%	Tanto por ciento
μ	Tasa de crecimiento específico
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro

μ_{opt}	Tasa de crecimiento específico a la temperatura óptima
μ_T	Tasa máxima de crecimiento específico a la temperatura T
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$\Delta G'$	Diferencial del módulo de elasticidad
cm	Centímetros
Dc	Diámetro de la colonia
Dh	Diámetro del halo
E	Módulo de elasticidad (deformación por compresión)
[E]	Enzima
[ES]	Complejo enzima - sustrato
G'	Módulo de elasticidad (deformación por cizallamiento)
g	Gramo
g/l	Gramo por litro
h	Hora
H _o	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alternativa
Hz	Hertz
Kg	Kilogramos
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LAG	Fase de latencia
Ln	Logaritmo natural
LOG	Fase logarítmica
m	Metro
M	Molar

mg	Miligramo
mg/ml	Miligramo por mililitro
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
[P]	Producto
Pa	Pascal
q_o	Constante de estado fisiológico
rpm	Revoluciones por minuto
[S]	Sustrato
T	Temperatura
T_{min}	Temperatura mínima
$T_{m\acute{a}x}$	Temperatura máxima
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de la reacción enzimática
vs	Versus
$Y_{m\acute{a}x}$	Logaritmo natural del nivel máximo de población bacteriana
Y_o	Logaritmo natural de la concentración inicial de bacterias
Y_t	Logaritmo natural de los recuentos bacterianos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Curva de crecimiento bacteriano: Escala logarítmica y aritmética	4
Figura 1.2	Fases del crecimiento bacteriano	5
Figura 1.3	Complejo enzima - sustrato	15
Figura 1.4	Energía libre en una reacción	16
Figura 1.5	Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción enzimática	18
Figura 1.6	Determinación cualitativa de la degradación de almidón	20
Figura 1.7	Gelatinización del almidón	21
Figura 1.8	Retrogradación del almidón	23
Figura 1.9	Acción de la α -amilasa en la fracción de amilopectina del almidón	24
Figura 1.10	Acción de la β -amilasa en la fracción de amilopectina del almidón	25
Figura 3.1	Bioprospección de microorganismos	43
Figura 3.2	Aislados bacterianos CIBE-27, CIBE-51 y CIBE-73	44
Figura 3.3	Inoculación del microorganismo CIBE-27	45
Figura 3.4	0,5 McFarland del microorganismo CIBE-27	46
Figura 3.5	Placa inoculada con microorganismo CIBE-27	46

Figura 3.6 Actividad amilolítica positiva	47
Figura 3.7 Medio mineral inoculado con CIBE-27 (día 8)	51
Figura 3.8 Sobrenadante obtenido por centrifugación	51
Figura 3.9 Extracto liofilizado (enzima cruda)	51
Figura 3.10 Medición de absorbancia en el espectrofotómetro	54
Figura 3.11 Preparación de la masa de pan	56
Figura 3.12 Ensayo reológico de la masa de pan	57
Figura 4.1 Formación de halos a 7°C	61
Figura 4.2 Formación de halos a 11°C	62
Figura 4.3 Formación de halos a 16°C	62
Figura 4.4 Formación de halos a 20°C	62
Figura 4.5 Formación de halos a 23°C	63
Figura 4.6 CIBE-27 a 4°C, 25°C y 37°C	63
Figura 4.7 Degradación del almidón	63
Figura 4.8 FEE de acuerdo a la temperatura	64
Figura 4.9 Modelo de Rosso para temperatura	66
Figura 4.10 Fase LAG con respecto a la temperatura	67
Figura 4.11 Niveles máximos de FEE	67
Figura 4.12 CIBE-27 a pH 4,6 y 5	68
Figura 4.13 CIBE-27 a pH 6, 7 y 8	68
Figura 4.14 FEE de acuerdo al pH	69
Figura 4.15 Curva de calibración de BSA	70
Figura 4.16 Elasticidad de la masa de pan evaluada en tres concentraciones de proteína del extracto liofilizado	72

Figura 4.17 Regresiones polinómicas: Concentración de proteína del extracto liofilizado	74
Figura 4.18 Masa de pan evaluada a 40°C	75
Figura 4.19 Masa de pan evaluada a 7°C	76
Figura 4.20 Elasticidad de la masa de pan evaluada a 40°C	76
Figura 4.21 Elasticidad de la masa de pan evaluada a 7°C	77
Figura 4.22 Regresiones polinómicas: Masa de pan a 40°C	79
Figura 4.23 Regresiones polinómicas: Masa de pan a 7°C	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Microorganismos productores de amilasa	8
Tabla 2	Datos para la curva de calibración de BSA	52
Tabla 3	Características de la harina de trigo	55
Tabla 4	Tasas específicas de crecimiento por temperatura	65
Tabla 5	Resultados del modelo de Rosso	66
Tabla 6	Valores $\Delta G'$ de concentración de proteína del extracto liofilizado	73
Tabla 7	Resultado de ANOVA: $\Delta G'$ para concentración de proteína del extracto liofilizado	73
Tabla 8	Valores $\Delta G'$ de masa de pan con enzima antártica y comercial a 40°C	78
Tabla 9	Resultado de ANOVA: $\Delta G'$ de masa de pan con enzima antártica y comercial a 40°C	78
Tabla 10	Valores $\Delta G'$ de masa de pan con enzima antártica y comercial a 7°C	80
Tabla 11	Resultado de ANOVA: $\Delta G'$ de masa de pan con enzima antártica y comercial a 7°C	80

INTRODUCCIÓN

En la industria panificadora, la calidad del producto final depende en gran medida de las enzimas amilasas, las cuales logran reducir la viscosidad en la masa de pan a 40°C; sin embargo, en las demás etapas del proceso se maneja comúnmente temperaturas por debajo de 35°C, proponiendo que sería una favorable alternativa emplear enzimas extremófilas, sin necesidad de calentar la masa a 40°C para mejorar la textura y volumen del pan como producto final. El estudio pretende demostrar que algunos microorganismos antárticos pueden producir amilasas y que estas lograrían reducir la viscosidad de la masa de pan a bajas temperaturas. El desarrollo del siguiente trabajo abarca principalmente lo siguiente:

En el capítulo 1 se describirá el fundamento teórico referente a: los microorganismos, entre ellos se destacan a los extremófilos, a las enzimas amilasas y sus aplicaciones en la industria y a la reología, resaltando el comportamiento viscoelástico que presenta la masa de pan.

En el capítulo 2 se presentará el planteamiento del problema con su respectiva justificación, la hipótesis y los objetivos de la investigación.

Con dichos antecedentes, en el capítulo 3 se detallará la metodología para realizar la producción de amilasas a partir de la selección de microorganismos antárticos; así como la metodología para determinar la influencia de estas enzimas en el módulo de elasticidad como características reológicas de la masa de pan a bajas temperaturas, mediante diseños experimentales.

Una vez efectuados los experimentos, en el capítulo 4 se definirá los resultados y se ejecutará los correspondientes análisis estadísticos.

Finalmente, en el capítulo 5 se dará las pertinentes conclusiones y recomendaciones de las pruebas y análisis realizados.

CAPÍTULO 1

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Microorganismos

Crecimiento y desarrollo de los cultivos bacteriológicos

Se aplica el término crecimiento bacteriano para describir o representar: *“El aumento de la población total y no el aumento de la masa de un organismo aislado; esto se debe a la dificultad del estudio individual de cada célula debido a su pequeño tamaño”* (13).

Cada célula dentro del proceso de división se duplica y a su vez cada nueva célula se divide en dos, por lo que al graficar el número de células contra el tiempo se obtiene una línea curva creciente con tendencia exponencial; sin embargo, es preferible utilizar el logaritmo del número de células, ya que la línea se vuelve recta y permite una

mejor descripción del ciclo de desarrollo de los cultivos bacteriológicos (13).

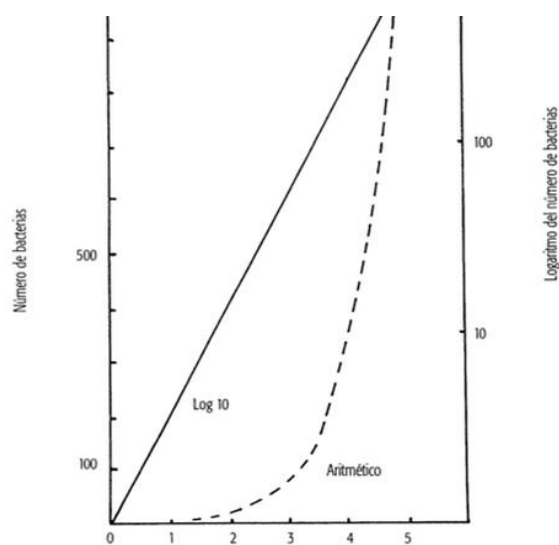
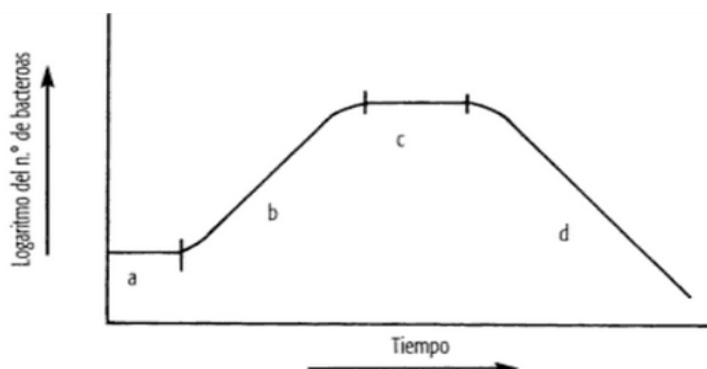


Figura 1.1 Curva de crecimiento bacteriano: escala logarítmica y aritmética

Fuente: García V. 2004.

Pues bien, cuando se inocula un número determinado de microorganismos en un medio de cultivo fresco y se define regularmente la población bacteriana durante un período de incubación, se puede obtener una curva típica de desarrollo bacteriano presentando en una gráfica los resultados de los logaritmos del número de células contra el tiempo y en ella se puede apreciar 4 fases: la inicial en la que no parece haber desarrollo,

seguida de un crecimiento rápido, después de un equilibrio y por último un descenso de la población (31).



a: latencia, b: logarítmica; c: estacionaria; d: muerte

Figura 1.2 Fases del crecimiento bacteriano

Fuente: García V. 2004.

Tal como se presenta en la gráfica, la primera fase conocida como LAG o de Latencia, es en donde se requiere de tiempo para establecer la adaptación de cada célula en el medio en el que se va a desarrollar. En esta etapa, las enzimas son insuficientes como para que las bacterias puedan desempeñarse de manera óptima; por lo tanto, ellas pueden mantener su actividad metabólica pero llegan a presentar un retardo en su división celular. Luego viene la fase logarítmica o exponencial (LOG) en la que las células se reproducen a ritmo constante; no obstante, las células que aquí se desarrollan

son consideradas las más uniformes y son las que comúnmente se utilizan para realizar investigaciones sobre metabolismo ya que se mantienen en un ambiente adecuado, regular y preciso en comparación a las otras etapas. Posteriormente, la tendencia creciente se detiene y continúa como una línea recta; es decir que se da inicio con la fase estacionaria. En este espacio, es posible que el fin de la división celular o el equilibrio entre el índice de reproducción y de mortalidad bacteriana sean el resultado de la producción de sustancias tóxicas durante el crecimiento. Finalmente, las bacterias se inclinan a morir rápidamente probablemente por el agotamiento de sustancias nutritivas esenciales y la concentración de productos inhibidores como los ácidos (31).

Condiciones necesarias para el desarrollo bacteriano

Como todos los seres vivos, las bacterias requieren además del agua, nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo; claro está que dependiendo de la bacteria las fuentes son diversas. De igual manera requieren de condiciones físicas y químicas para crecer óptimamente como la presencia o ausencia de oxígeno, el pH y la temperatura (31). Más adelante serán descritas las especificaciones para que el aislado bacteriano que se pretende investigar pueda

desarrollarse y producir las enzimas requeridas (Factores que influyen en la producción de enzimas).

Microorganismos productores de amilasas

Generalmente, las enzimas fúngicas son obtenidas a partir del género *Aspergillus*, ya que producen grandes cantidades de amilasas con un significativo valor industrial, entre ellos destacan: *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. También se ha considerado al género *Penicillium*; sin embargo, las amilasas bacterianas pueden ser producidas en un rango más extenso de temperatura y son consideradas termoestables, obteniéndose a partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (17).

TABLA 1
MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE AMILASA

Microorganismo	pH óptimo/ estabilidad	Temperatura óptima/ estabilidad
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7,0	33°C
<i>Haloarcula hispanica</i>	6,5	50°C
<i>Bacillus subtilis</i>	7,0	37°C
<i>Bacillus licheniformis</i> GCBU-8	7,5	40°C
<i>Chromohalobacter sp.</i> TVSP 101	7,0 - 9,0	65°C
<i>Bacillus sp.</i> KR-8104	4,0 - 6,0	70 - 75°C
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0 - 9,0	25 - 35°C
<i>Aspergillus niger</i>	5,5	70°C
<i>Aspergillus kawachii</i>	3,0	30°C
<i>Penicillium fellutanum</i>	6,5	30°C
<i>Cryptococcus flavus</i>	5,5	50°C
<i>Saccharomyces kluyveri</i> YKM5	5,0	30°C
<i>Pycnopus sanguineus</i>	7,0	37°C

Fuente: Monteiro de Souza P, Oliveira P. 2010 (27).

Es importante destacar que además de los microorganismos ya mencionados, se han publicado investigaciones en las que se demuestra que existen ciertos hongos y bacterias capaces de producir amilasas en condiciones extremas (21) (20).

Los microorganismos extremófilos son aquellos que consiguen desarrollarse y adaptarse ante condiciones extremas de salinidad, pH y temperatura; además pueden producir biocatalizadores en este tipo de circunstancias, los cuales tienen novedosas aplicaciones dentro

de los procesos industriales; sin embargo, solo una pequeña porción de estos microorganismos ha sido explotada (17).

Dentro de este grupo de extremófilos constan los halófilos, es decir, quienes sobreviven en altas concentraciones de sal (concentraciones de KCl = 4M y concentraciones de NaCl > 5M) (41), tales como las bacterias *Chromohalobacter sp.*, *Halobacillus sp.*, *Haloarcula hispanica*, *Halomonas meridiana* y *Bacillus dipsosauri*, que producen α -amilasas evitando inhibiciones y permaneciendo estables a temperatura ambiente por largos tiempos (17).

Se conoce que las amilasas son generalmente estables en un amplio intervalo de pH 4 a 11; sin embargo, resaltan aquellas producidas por microorganismos alcalófilos y acidófilos, ya que actúan muy bien en pH alto o bajo respectivamente (41). Para el primer caso, se ha reportado un estudio en que la amilasa denominada Amyl I, proveniente de la bacteria alcalófila *Bacillus sp.* Cepa GM8901 y presentó un pH óptimo de funcionamiento entre 11 y 12 produciendo predominantemente maltotetraosa a partir del almidón para su uso en alimentos de nutrientes para los lactantes o personas mayores (20).

En el segundo caso se tiene al *Aspergillus niger*, el cual puede producir amilasas con una característica tolerante al ácido ($\text{pH} < 3$) evitando la contaminación bacteriana (17) al igual que las amilasas provenientes del *Alicyclobacillus acidocaldarius* (16).

Con respecto a la temperatura, tenemos a los termófilos, que crecen óptimamente a partir de los 50°C hasta los 70°C o más y reducen el riesgo de contaminación debido a sus altas temperaturas (39). Entre ellos existen hongos termófilos como *Talaromyces*, *Thermomonospora fusca* y *Thermomyces lanuginosus* que pueden producir amilasas en un nivel óptimo entre 50 - 55°C ; así mismo la bacteria *Rhodothermus marinus* puede dar rendimientos máximos de una α -amilasa termoestable a 61°C . Otro ejemplo, es del *Thermococcus profundus* y *Thermatoga maritima*, los cuales producen α -amilasas a 80°C (38). También se cuenta con los hipertermófilos, los cuales se desarrollan entre 75°C y 106°C (39); además sus enzimas pueden activarse y mantenerse estables hasta 130°C , tal es el caso del *Pyrococcus woesei* (21). Por último se tiene a aquellos que poseen una temperatura óptima de crecimiento $< 20^{\circ}\text{C}$ llamados psicrófilos, considerando que -12°C es su límite de temperatura para la reproducción microbiana, pero pueden llevar

actividades metabólicas a -20°C en condiciones definidas (39); y a aquellos que poseen una temperatura óptima de crecimiento $>20^{\circ}\text{C}$ denominados psicrófilos facultativos o psicrotrofos. Se ha reportado que *Alteromonas haloplanktis* (bacteria antártica) manifiesta una producción máxima de α -amilasa a 4°C (2); y que además existen amilasas con temperatura óptima más baja (25°C) producidas por el *Fusarium oxysporum* (16).

Adaptación de los microorganismos a bajas temperaturas

Los microorganismos psicrófilos pueden predominar en temperaturas cercanas al punto de congelación, colonizando hábitats como las regiones polares, glaciares y aguas profundas. Dentro de las estrategias para sobrellevar las bajas temperaturas constan la síntesis de moléculas anticongelantes y crioprotectores para que el hielo no sea formado y el incremento proporcional de ácidos grasos saturados en lugar de los insaturados, modificando las actividades de las enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos y lípidos con el fin de mantener la fluidez de la membrana (bicapa lipídica), la cual contribuye con la mayoría de las funciones biológicas (18).

1.2 Enzimas

Definición

Badui indica que, “*Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad*”; además es importante tener en consideración que en su ausencia las células se tardarían mucho tiempo en llevar a cabo la mayoría de las transformaciones químicas que necesitan para estar activas (3).

Estructura

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que van adquiriendo una forma tridimensional específica. La cadena lineal de aminoácidos constituyen la estructura primaria, luego se pliegan y doblan formando la estructura secundaria y terciaria (23). La disposición de enlaces disulfuro (covalentes) permite que se establezcan uniones entre una o dos cadenas polipeptídicas otorgando la estabilidad de la estructura tridimensional (4).

Propiedades

Las enzimas presentan propiedades catalíticas importantes, entre las cuales destacan: proporcionar un alto grado de especificidad de sustratos en comparación a los catalizadores químicos, esto es debido a las orientaciones espaciales complementarias entre sustrato y enzima (24), mantener condiciones moderadas de reacción, es decir que son funcionales a temperaturas inferiores a los 100°C, presión atmosférica y pH casi neutro, otorgar mayores velocidades de reacción con respecto a las reacciones no catalizadas por ellas, incrementándose de 10^8 a 10^{20} veces su velocidad (23). Cabe recalcar, que las enzimas no se consumen ni se modifican durante una reacción, por lo que pueden utilizarse una y otra vez (9).

Cinética enzimática

Fennema señala que *“La cinética enzimática comprende el estudio de los parámetros que influyen la velocidad de las reacciones químicas catalizadas por enzimas”* (12).

Por lo tanto, para comprender la cinética enzimática se debe partir por entender primero las dos etapas del funcionamiento de una

enzima: la formación del complejo específico y la interacción catalítica (14).

El complejo enzima-sustrato sólo puede formarse si la enzima tiene un sitio exactamente complementario a la forma del sustrato, en donde suelen participar fuerzas químicas no covalentes como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, de tal manera que permiten alinear los grupos reactivos en enlaces específicos del sustrato. Esto puede interpretarse teniendo en cuenta que la enzima y el sustrato presentan una interacción semejante a la llave con su cerradura; sin embargo, se debe destacar que las moléculas estructuralmente no son rígidas, por lo que la interacción de la enzima con el sustrato induce un cambio conformacional con el centro de fijación más flexible y adecuado, denominándose encaje inducido (14).

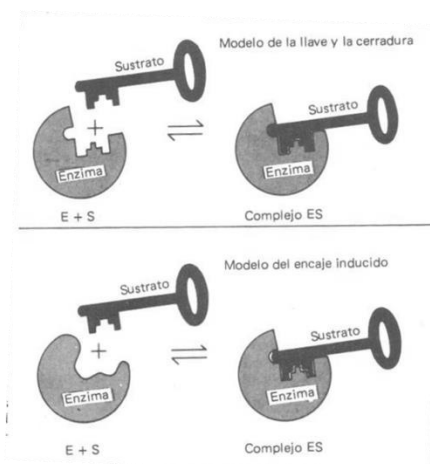
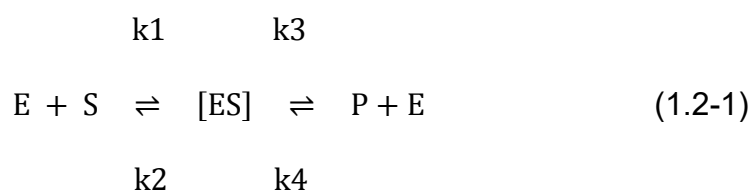


Figura 1.3 Complejo enzima - sustrato

Fuente: De Robertis E. 2004.

Para llevar a cabo la interacción catalítica, se combinan temporalmente el sustrato [S] junto con la enzima [E], la cual posee uno o más sitios activos en donde se genera la reacción y libera posteriormente uno o más productos [P]. En cada una de las etapas de la reacción global, se presentan constantes de velocidad (k_1 , k_2 , k_3 y k_4), y la enzima al concluir con su función, retorna a su estado original (9). Cabe destacar que dicha reacción es reversible y puede ser expresada con la siguiente estructura:



Este modelo representa la cinética enzimática (12).

Como se mencionó anteriormente, las enzimas catalizan reacciones biológicas e intervienen en la velocidad a la cual se consigue el estado de transición, ya que emplean una ruta que demanda de una menor energía libre de activación para llevar a cabo las transformaciones químicas. De manera explícita se representa la diferencia de energía libre entre la acción de un catalizador y sin él en el siguiente gráfico (3).

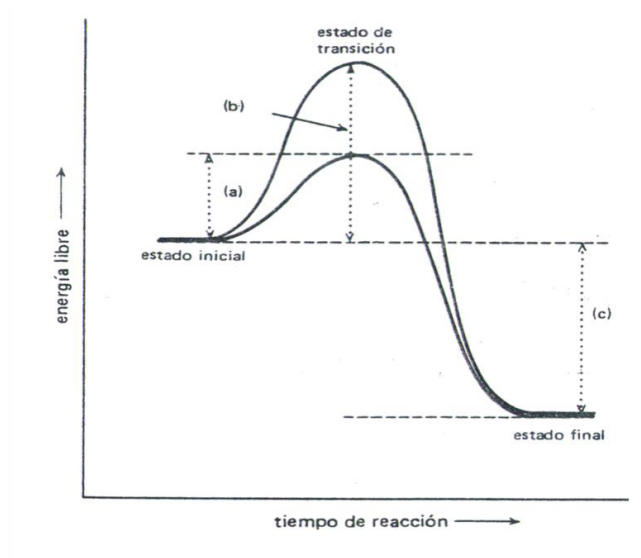


Figura 1.4 Energía libre en una reacción

Fuente: Badui S. 2006.

Además, para determinar la actividad de una enzima se emplea la Unidad Internacional de Actividad Enzimática, definida como *“La cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto una micromol de sustrato por minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura”* (3).

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato [S]. Cuando se tiene concentraciones bajas de sustrato se establece una relación proporcional con respecto a la velocidad (de primer orden); sin embargo cuando se incrementa hasta saturarse, se vuelve independiente de la velocidad (de orden fraccionario y luego de orden cero); por lo tanto, la expresión de Michaelis-Menten sirve de gran utilidad para conocer la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y el índice de afinidad que tiene una enzima por un sustrato determinado (K_m o constante de Michaelis-Menten), tal como se la presenta a continuación (3).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.2-2)$$

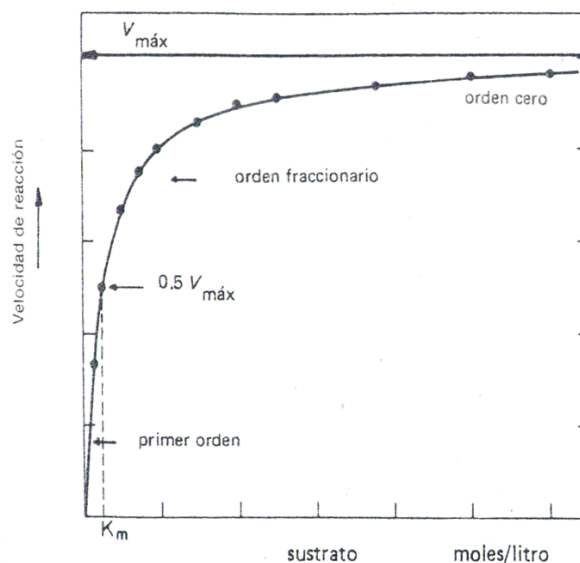


Figura 1.5 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción enzimática

Fuente: Badui S. 2006.

Previo a la descripción de las enzimas amilasas, es necesario conocer al almidón y sus propiedades.

Almidón

Se define como un hidrato de carbono complejo, compuesto por: amilosa, que es una cadena de forma helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y la amilopectina, que conforma una cadena ramificada mediante α (1-6) enlaces glucosídicos cada 15 ó

25 unidades lineales de glucosa acopladas por enlaces glucosídicos α -1,4. Particularmente, el almidón del trigo presenta aproximadamente un 24% de amilosa y un 76% de amilopectina, con temperaturas de gelatinización entre 58 y 64°C. Estos dos polisacáridos influyen de manera significativa en las propiedades reológicas y sensoriales de los alimentos (3).

Es importante notar que para determinar cualitativamente la degradación del almidón se usa el lugol, el cual está constituido por yodo y este puede reaccionar con la amilosa. Aparentemente se genera la inclusión del I_2 en la larga hélice, presentando una coloración azul intensa; sin embargo, cuando se trata de cadenas muy cortas de amilosa, se produce un color rojo; además, la amilopectina desarrolla dicha coloración con sólo una pequeña cantidad de I_2 ; por lo tanto, se puede mencionar que cuando se tiene una mayor degradación del almidón, al aplicarse el lugol se va a observar un cambio en la coloración y tenderá a ser rojiza (3) (12).



Figura 1.6 Determinación cualitativa de la degradación de almidón

Elaborado por: Karla Morejón

Gelatinización del almidón

Los gránulos de almidón no son solubles en agua fría; sin embargo al aumentar la temperatura, se retiene más agua y los gránulos se hinchan. Al llegar a una cierta temperatura, denominada temperatura de gelatinización, el gránulo alcanza su volumen máximo y al estar incapacitado para retener el líquido, se rompe parcialmente, por lo que la amilosa y la amilopectina fuertemente hidratadas se esparcen en la solución (12). Baudi define que *“La gelatinización transforma los gránulos de almidón insolubles en una solución de moléculas constituyentes en forma individual”* (3).

A medida que se aumenta el volumen de los gránulos, también se aumenta la viscosidad de la dispersión acuosa. Cuando los gránulos se rompen, la viscosidad se reduce hasta alcanzar un valor estable, generando un gel, tal como se presenta a continuación (3).

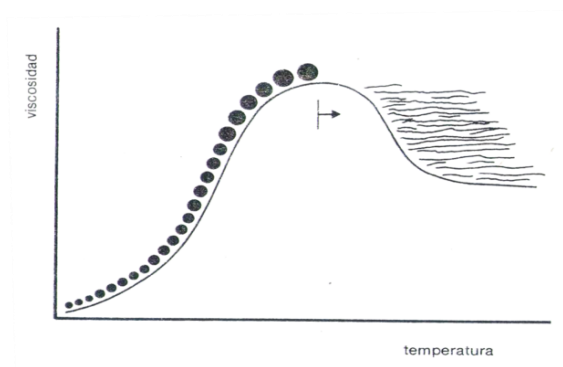


Figura 1.7 Gelatinización del almidón

Fuente: Badui S. 2006.

Fennema señala que *“Cualquier factor que implique que una molécula lineal en solución adopte una forma más extendida provocará un incremento de la viscosidad; por el contrario disminuirá la viscosidad”* (12).

Retrogradación del almidón

La retrogradación del almidón se define como la insolubilización y la precipitación espontánea. La primera se genera debido a que las largas moléculas comienzan a cristalizar, acompañadas de una eliminación de agua; mientras que para la segunda, si se calienta y enfría rápidamente una solución concentrada de amilosa se forma un gel rígido y reversible, pero si las soluciones son diluidas, se precipitan cuando se dejan reposar y enfriar lentamente, de tal manera que se forman estructuras muy rígidas que requiere de una alta energía para romperse y el almidón pueda gelatinizar. Por consiguiente, se puede mencionar que la retrogradación del almidón depende del contenido de amilosa, ya que sus cadenas lineales se orientan de forma paralela y accionan entre sí por puentes de hidrógeno; mientras que en la amilopectina es más difícil que se suscite este fenómeno porque sus ramificaciones impiden la formación de estos enlaces entre moléculas adyacentes, tal como se indica en el siguiente gráfico (3) (12).

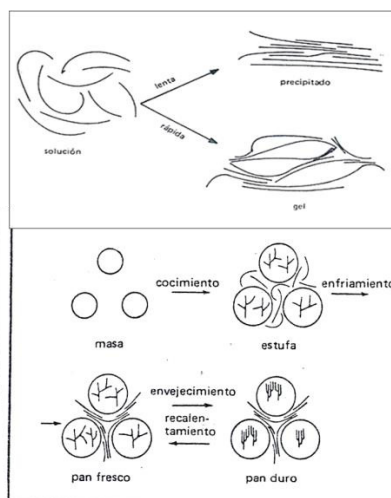


Figura 1.8 Retrogradación del almidón

Fuente: Badui S. 2006.

El envejecimiento del pan se encuentra relacionado con la retrogradación y se debe básicamente a la pérdida de la amilosa durante el cocimiento del pan, dejando a la agrupación de amilopectina en el gránulo hinchado, por lo que al extenderse la amilosa fuera retrograda en el momento de su enfriamiento. En el pan fresco, la amilopectina tiene todas sus ramas extendidas por completo, mientras que en el pan duro se encuentran retrogradadas unidas entre sí y sin el agua original. Dependiendo del estado de retrogradación, el envejecimiento del pan puede hacerse reversible con calor húmedo (3).

Amilasas

Las amilasas son enzimas capaces de hidrolizar el almidón y se han dividido en 3 subclases: α - β - γ -amilasa. Cabe destacar que su clasificación se basa en el tipo de unión.

α -amilasa (EC 3.2.1.1): Su contribución es la más importante al iniciar el proceso de hidrólisis del almidón, ya que rompe las uniones internas α -1,4-glicosídicos para obtener maltosa, maltotriosa y oligosacáridos de longitudes variadas, es decir compuestos de 6 a 8 unidades de glucosa (27).

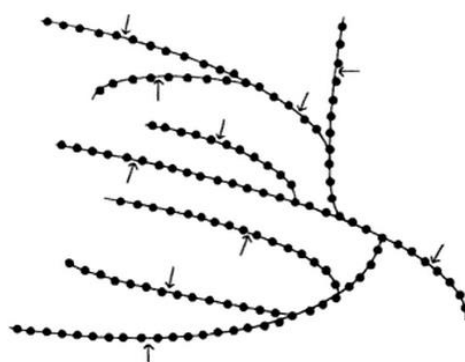


Figura 1.9 Acción de la α -amilasa en la fracción de amilopectina del almidón

Fuente: Hebeda R. 1996.

β -amilasa (EC 3.2.1.2): Trabajan desde el extremo no reductor, cataliza el segundo enlace glucosídico α -1,4 obteniendo maltosa, lo que genera en la fruta madura un sabor dulce. La amilasa de cereales de grano es clave en la producción de malta (17).



Figura 1.10 Acción de la β -amilasa en la fracción de amilopectina del almidón

Fuente: Hebeda R. 1996.

γ -amilasa (EC 3.2.1.3): Separa α (1-6) enlaces glucosídicos, así como los últimos α (1-4) enlaces glucosídicos en el extremo no reductor de la amilosa y la amilopectina, produciendo glucosa. Es más activa a pH 3. Se la emplea en la industria farmacéutica (17).

Producción de enzimas

Para producir las enzimas extremófilas, es necesario aumentar la biomasa del microorganismo (41) y se requiere de varias etapas. Se parte con el desarrollo de un cultivo en medio nutriente solidificado estéril de donde se toma una parte y se lo transfiere a un matraz que contiene medio líquido estéril con el fin de disponer de una cantidad suficiente de masa microbiana (adaptable al medio ambiente y nutrientes) como inóculo para la fermentación de la cepa de producción. Además, se requiere del manejo de temperatura, pH, grado de aireación y agitación para una óptima producción (27).

La siguiente etapa es la obtención de las enzimas. Para el caso de las amilasas, se necesita de la centrifugación para obtener la solución sobrenadante en la que está contenida la enzima, separándose de la biomasa (34). Cabe destacar que en algunas publicaciones se declara haber realizado experimentaciones referentes a la determinación cuantitativa de actividad enzimática directamente con el sobrenadante (37), ya que la última etapa que es la purificación es altamente costosa. Sin embargo, los procesos como precipitación selectiva, adsorción de impurezas a una resina en una columna o cristalización permiten la obtención de la enzima pura

(34). A escala de laboratorio existen diferentes estrategias para llevar a cabo la purificación de α -amilasa, entre las alternativas destacan varias combinaciones de intercambio iónico y filtración en gel. Además, se ha propuesto protocolos de extracción empleando solventes orgánicos como etanol, acetona y la precipitación con sulfato de amonio (27).

Factores que influyen en la producción de enzimas

Fuente de sustrato: Generalmente la inducción de α -amilasa se realiza en presencia de almidón o maltosa (producto hidrolítico), tal es el caso del *Aspergillus oryzae* que aumentó 20 veces su actividad enzimática usando estos inductores. Por otra parte, se ha utilizado sustratos no convencionales como lactosa y aguas residuales de procesamiento de almidón. También, el salvado de trigo se lo ha aplicado en el proceso de fermentación con *Clavatia gigantea* para obtener una producción económica de α -amilasas (16).

Fuente de nitrógeno: Se ha preferido fuentes de nitrógeno orgánico para la producción de α -amilasas, entre ellos constan: extracto de levadura, peptona, caseína, sulfato de amonio, harina de soja y

extracto de carne. También se ha utilizado estas fuentes en conjunto, como bactopectona y sulfato de amonio en el caso de *Bacillus subtilis* (16).

Rol del fosfato: El fosfato afecta el crecimiento de los microorganismos y por ende de la producción de α -amilasa, ya que regula síntesis de metabolitos primarios y secundarios. Con un bajo nivel de fosfato, se obtuvo en el caso de *B. amyloliquefaciens* una baja densidad celular sin producción de enzima (16).

Agitación: La intensidad de la agitación influye en la mezcla y transferencia del oxígeno en muchas fermentaciones. Normalmente, se ha empleado hasta 300rpm para la producción de amilasas de diversos microorganismos (16).

Temperatura y pH: La temperatura y pH óptimo para la producción de amilasas están relacionados con el crecimiento del microorganismo (16). Además, las interacciones entre estos dos factores influyen directamente en las etapas de fermentación, por lo que pueden ser

manipulados para obtener un mayor rendimiento de la cantidad de enzimas (38).

Como se mencionó en la primera parte, se ha realizado estudios con hongos mesófilos dentro del rango de temperatura entre 25°C y 37°C (13). No obstante, las amilasas de origen bacteriano son producidas en un rango más extenso, siendo las más utilizadas del género *Bacillus* entre 37°C y 60°C (38).

El pH repercute en el crecimiento de los microorganismos debido a la sensibilidad que tienen estos a las concentraciones de iones de hidrógeno presentes en el medio. Usualmente, para generar un crecimiento óptimo, así como la síntesis y secreción de amilasas, se requiere de pH ligeramente ácido para el caso de los hongos, mientras que para las bacterias se necesita de pH neutro. Se puede citar como ejemplo al *Saccharomyces kluyveri*, el cual presentó rendimientos significativos de la enzima a pH 5,0 y el *Bacillus subtili* con una producción máxima a pH 7,0 (38).

Aplicaciones en la Industria

Las amilasas abarcan alrededor del 25% del mercado mundial de la enzima (17), ubicándose en el segundo puesto de las más utilizadas en todo el mundo debido a sus varias aplicaciones biotecnológicas en la industria papelera, textil, química y alimentaria (29). Aunque sus fuentes son varias (plantas y animales), obtenerlas a partir de microorganismos refleja una mayor capacidad de producción satisfaciendo las demandas industriales (16).

Dentro de la industria papelera, las amilasas son empleadas en la modificación de almidones de la pulpa y del papel recubierto, ya que generan una baja viscosidad a partir del almidón de alto peso molecular y mejora la calidad del papel acabado. También, en la elaboración de textiles son aplicadas para remover gomas protectoras con almidones que se usan en la urdimbre (conjunto de hilos ubicados en paralelo y acomodados longitudinalmente) para resistir el proceso de tejido y evitar que los hilos se rompan. El proceso es conocido como desencolado (17).

La utilización de estas enzimas como ingredientes en la formulación de detergentes y lavavajillas ha resultado ventajosa dentro de la industria química para eliminar residuos de almidón y por lo general se encuentran vinculadas con las proteasas dentro de su formulación para generar una estabilidad contra los oxidantes (16).

En la industria alimentaria son aprovechadas ampliamente en la preparación de jarabes de maíz de alta fructosa y debido a su capacidad edulcorante es aplicado en la industria de refrescos (17).

En el caso de la industria panificadora, la actividad enzimática está ligada con la actuación de las levaduras para producir anhídrido carbónico, pero estas dependen de las amilasas, ya que estas enzimas les proporcionan azúcares fermentables como sustratos y son consideradas como un suplemento (18) ya que las pertenecientes a la materia prima, es decir las del cereal, no son suficientes por lo que deben ser adicionadas para obtener un pan de calidad. Con ello se logra aumentar la velocidad de fermentación. Cabe destacar, que este principio se aplica también en la elaboración de cerveza (27).

1.3 Reología

Definición

En 1929, Bingham definió a la Reología como “*El estudio de la deformación y el flujo de la materia*”. Los principios de esta ciencia abarca cualquier clase de material, desde los líquidos viscosos (Ley de Newton) hasta los sólidos elásticos (Ley de Hooke), los cuales se encuentran vinculados por una relación cuantitativa entre esfuerzo y deformación (5).

Su aplicación es evidente en agua, plásticos, sangre, pinturas, suelos, cerámicos, piedras y por ende también en alimentos y bebidas. En la industria alimentaria la fabricación, manipulación y desarrollo de productos así como las pruebas de calidad se encuentran relacionadas con la Reología, ya que existe un gran vínculo entre las propiedades texturales y el comportamiento reológico de un alimento; por tal motivo, se puede decir que la Reología de alimentos, es “*el estudio de la deformación y flujo de materias primas, productos intermedios y productos terminados en la industria de alimentos*” (36).

Esfuerzo, deformación y módulo de elasticidad

Para comprender los términos mencionados, se puede partir de un ensayo de física: A una varilla le es aplicada una tensión a la cual se le denomina esfuerzo (σ) que finalmente ocasionara un cambio en la longitud de dicha varilla (Y). Para este ejemplo, se tiene como base que la fuerza ejercida por unidad de área es proporcional a la deformación por unidad de longitud (44). La relación lineal que se genera entre el esfuerzo y la deformación se presenta en la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\sigma}{Y} \quad (1.3-1)$$

Y es definida como Módulo de Elasticidad (E); además es importante destacar que el módulo de elasticidad se denota con el símbolo E cuando la deformación aplicada es de extensión o compresión; mientras que el símbolo G' se lo emplea para determinar el desplazamiento o cizallamiento (33).

Propiedades reológicas de los alimentos

Considerando lo anteriormente mencionado, si se tuviese un sólido ideal y se le aplicara un esfuerzo, se deformaría rápidamente (Ley de Hooke); sin embargo, en la realidad todos los materiales son viscoelásticos, solo que estos van a presentar una tendencia hacia una estructura más sólida (elástica) o más líquida (viscosa) (5). Para los alimentos, esta propiedad reológica se ve significativamente influenciada por la composición como incluir polímeros disueltos, sólidos en suspensión, proteínas, pectinas y por la estructura como por ejemplo si trata de un gel o de una emulsión (33).

Características reológicas de la masa de pan

La masa de pan combina las propiedades de un fluido viscoso y un sólido puramente elástico. Una masa recién mezclada tiende a ser viscosa y fluye bajo la fuerza de gravedad, pero la misma cuando es estirada rápidamente, debido a su elasticidad se recupera resistiendo a la deformación (32).

El componente responsable del carácter viscoelástico en la masa de pan es la harina de trigo y se encuentra constituida por 80% almidón,

14% proteínas, 5,4% lípidos y 2% pentosas (32); además, de acuerdo a las investigaciones que se han realizado en la masa de trigo se ha indicado que el tiempo de mezcla, el nivel de enzimas y la cantidad de agua añadida intervienen en la pegajosidad de la masa (36); de igual manera se considera que las proteínas del gluten tienen gran influencia en las propiedades viscoelásticas de la masa, en donde las gliadinas y gluteninas manifiestan un comportamiento viscoso y elástico respectivamente, esto con el fin de atrapar el gas durante la fermentación (36). Por otro lado, el almidón puede causar diferencias y se vuelven evidentes en la panificación (43). En el caso de las enzimas, específicamente la α -amilasa, reduce rápidamente la viscosidad sobre las soluciones de almidón, ya que le basta con romper las uniones glucosídicas internas para provocar dicho efecto (12). Con ello se obtienen mejoras en la textura y volumen del pan, así como su sabor y pardeamiento característico (16). Es importante mantener un equilibrio adecuado de enzimas en la harina, ya que durante el proceso la miga puede tornarse pegajosa y débil si se incorpora la α -amilasa en exceso; y en el otro extremo ocasionaría una fermentación insuficiente (3).

CAPÍTULO 2

2. GENERALIDADES

2.1 Planteamiento del Problema.

El desarrollo de la Biotecnología depende en gran medida de la búsqueda, detección y explotación de nuevas enzimas a partir de ambientes naturales que presenten características innovadoras, con el propósito de mejorar sus aplicaciones en la industria química, textil, papelera y alimentaria (13).

En la actualidad, se ha reportado estudios acerca del potencial biotecnológico de microorganismos psicrófilos procedentes de glaciares, del Ártico y de la Antártida (11). Nuestro país al formar parte del Tratado Antártico cuenta con una gran fuente de riqueza biológica y tiene el acceso para realizar investigaciones en estas áreas (1).

Desde el año 2010, el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) a través de un convenio con el Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE) ha realizado el aislamiento, identificación y preservación de microorganismos antárticos; sin embargo, el reconocimiento de los potenciales biotecnológicos en el área alimentaria aún no ha sido concluido (26).

En la industria panificadora, la calidad del producto final depende en gran medida de las enzimas amilasas, las cuales proporcionan azúcares fermentables para que las levaduras puedan producir anhídrido carbónico (3). También, logran reducir la viscosidad sobre las soluciones de almidón, favoreciendo con la textura y volumen del pan (12). Sin embargo, es importante conocer que frecuentemente se utiliza temperaturas por debajo de 35°C en la mezcla de la masa, pero las amilasas comerciales empleadas en esta etapa provienen de hongos y bacterias que actúan eficientemente a temperaturas que superan los 40°C (22). En este proceso mecánico (generador de calor) se le incorpora agua helada a la mezcla para controlar la actuación de la levadura que aún no es deseada y que podría ocasionar la disminución de la calidad en el producto final.

Actualmente, la industria se encuentra en la búsqueda de enzimas extremófilas (35).

2.2 Justificación

La biotecnología debe apreciarse como una herramienta de desarrollo sostenible, la cual permite redefinir procesos en la industria. Las enzimas al ser específicas, naturales y reciclables permiten catalizar selectivamente determinados componentes individuales sin afectar a otros, obteniendo productos de alta calidad con el compromiso de promover condiciones de trabajo seguras durante el procesamiento, ya que logran sustituir los tratamientos químicos (13).

Debido a su gran utilidad, el mercado global de enzimas industriales se encontraba valorado en \$3,3 billones hasta el año 2010 y para el 2015 se estima un alcance de \$4,4 billones, de los cuales \$1,3 billones conciernen al segmento de alimentos y bebidas (31).

Dentro de las enzimas más utilizadas en todo el mundo, se encuentran las amilasas y estas son aprovechadas para degradar el almidón. Particularmente en la panificación, son añadidas en la masa para obtener pequeñas dextrinas, las cuales serán fermentadas por la levadura, consiguiendo beneficios como el incremento de la velocidad de fermentación, la reducción de la viscosidad de la masa, el mejoramiento de la textura y la extensión del volumen en el producto final (17).

Como parte del proyecto "*Microorganismos Antárticos: Aislamiento, identificación, preservación y evaluación de su potencial biotecnológico*", se pretende investigar la influencia de amilasas extremófilas en las propiedades reológicas de la masa de pan.

2.3 Hipótesis

Algunos microorganismos antárticos producen amilasas que pueden reducir la viscosidad de la masa de pan a bajas temperaturas.

2.4 Objetivos

Objetivo General

Determinar las condiciones óptimas de producción de amilasas por parte de bacterias antárticas y la influencia de las amilasas antárticas en las propiedades reológicas de la masa de pan a bajas temperaturas.

Objetivos Específicos

Determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH para la producción de amilasas por parte de los microorganismos de la Antártida seleccionados.

Determinar el efecto de la concentración de la amilasa antártica en las propiedades reológicas de la masa de pan.

Determinar el efecto en las características reológicas de la masa de pan procesada con amilasa antártica a temperatura de refrigeración.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este trabajo se realizaron 2 diseños experimentales: uno microbiológico, realizado en el Laboratorio de Fitopatología del CIBE y otro reológico, llevado a cabo en el Laboratorio de Ensayos Metrológicos y de Materiales (LEMAT).

Antes de proceder con la descripción de la metodología, es importante conocer que entre 2010 y 2012 el CIBE en conjunto con el Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE) realizaron expediciones al continente blanco donde se tomaron varias muestras de suelo, especies vegetales, anidación de aves y deshielos en puntos cercanos a la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, específicamente en las Islas Torres y Greenwich como parte del proyecto “*Microorganismos antárticos: aislamiento, identificación, preservación y evaluación de su potencial biotecnológico*” (26).

Dichas muestras fueron sembradas bajo varios métodos (siembra directa y diluciones) en medios de cultivo específicos e incubados a baja temperatura, con el fin de efectuar el aislamiento. Posteriormente, se llevaron a cabo las extracciones de ADN, las amplificaciones de ciertas regiones por PCR para que un laboratorio externo proceda con la secuenciación de nucleótidos. Mediante el uso de BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (siglas en inglés NCBI), el CIBE pudo identificar con un nivel mínimo de 98%: 26 aislados de levaduras, destacando *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.* y *Rhodotomura glacialis* y 127 aislados de bacterias, como *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Achromobacter sp.*, *Pantoea sp.*, entre otros (26).

Para ejecutar la Bioprospección de enzimas extremófilas, los aislados microbiológicos fueron sometidos a medios de cultivo con sustratos específicos como: almidón, pectina, urea, lactosa y caseína con el objetivo de evaluar a baja temperatura la eficiencia de las enzimas: amilasa, pectinasa, ureasa, lactasa y proteasa respectivamente, las cuales mejorarían los procesos industriales. A partir de este estudio, los microorganismos fueron clasificados de acuerdo a su actividad enzimática para luego evaluar su potencial biotecnológico (30).



Figura 3.1 Bioprospección de microorganismos

Fuente: Vargas J. 2012.

3.1 Diseño experimental microbiológico

El propósito de este diseño experimental fue determinar la temperatura y pH óptimos que el microorganismo CIBE-27 necesita para producir la mayor cantidad de enzima amilasa y luego ser extraída. La metodología se basó en el estudio publicado por Mishra y Behera en 2008 (25).

Microorganismo

Tomando como referencia la Bioprospección de microorganismos y sus enzimas extremófilas realizada en 2012 por el CIBE, se seleccionó el aislado que presentaba la mayor eficiencia en producción de amilasas y fue la bacteria identificada como CIBE-27.

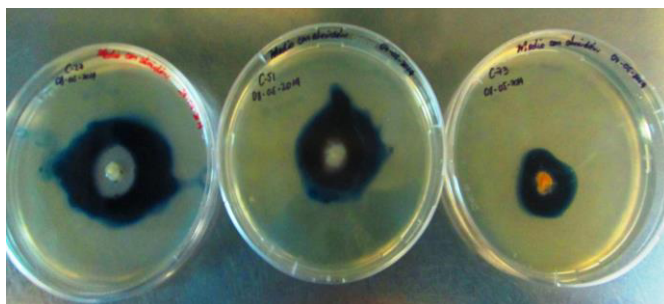


Figura 3.2 Aislados bacterianos CIBE-27, CIBE-51 y CIBE-73

Elaborado por: Karla Morejón

Medios

Para la experimentación se requirió de 2 tipos de medio mineral con almidón: líquido y sólido. Cada uno estuvo compuesto por: 1 g/l KH_2PO_4 , 2,5 g/l Na_2HPO_4 , 1 g/l NaCl , 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g/l MgSO_4 , 0,05 g/l CaCl_2 , 2 g/l triptona y 10 g/l almidón soluble. Cabe recalcar que al medio sólido le fue añadido 8 g/l agar y se lo dispensó en cajas Petri (90mm) (25).

Determinación de la temperatura y pH óptimo para la producción de amilasas

Se tomó como estándar 0,5 McFarland del microorganismo CIBE-27 que equivale a una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia (UFC) por ml en el equipo Densimat (marca

Biomérieux, Italia) (15), para luego inocular 10µl en 4 puntos ubicados individualmente a 2cm del centro, en cada cuadrante del medio sólido ajustado a pH 6,5. Con el fin de evaluar la temperatura, se colocaron las placas inoculadas a 4°C, 7°C, 16°C, 20°C, 23°C, 25°C y 37°C por duplicado durante 8 días. Luego se procedió con la medición del diámetro de la colonia y del halo que se iba formado debido al consumo de almidón (25).



Figura 3.3 Inoculación del microorganismo CIBE-27

Elaborado por: Karla Morejón



Figura 3.4 0,5 McFarland del microorganismo CIBE-27

Elaborado por: Karla Morejón

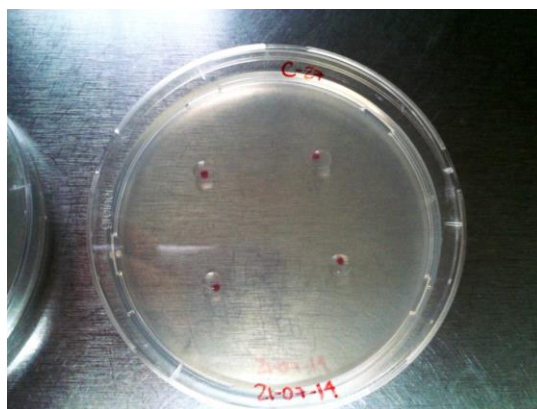


Figura 3.5 Placa inoculada con microorganismo CIBE-27

Elaborado por: Karla Morejón

Para este diseño experimental, la cuantificación estuvo dada por un Factor de Eficiencia Enzimática (FEE), el cual fue obtenido diariamente dividiendo la longitud del diámetro del halo (D_h) para la longitud del diámetro de la colonia (D_c) que se iba formando durante los 8 días. Cabe recalcar, que se empleó un calibrador Vernier para

la obtención de dichas mediciones. Al final, se adicionó lugol para revelar una zona clara alrededor de la colonia, con lo cual se confirmaba el consumo de sustrato. Posteriormente, se procedió a inocular el microorganismo pero en placas con diferente pH (4,6; 5, 6, 7 y 8) bajo la misma metodología, incubados a temperatura óptima (previamente definida) durante 8 días (25).

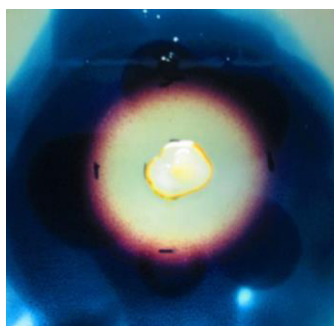


Figura 3.6 Actividad amilolítica positiva

Elaborado por: Karla Morejón

En este diseño experimental, los datos obtenidos del FEE para Temperatura tuvieron que ajustarse mediante la adaptación del Modelo de Baranyi y Roberts para temperatura constante, denotado bajo las siguientes ecuaciones:

$$y_t = y_0 + \mu(A_t) - \ln\left[1 + \frac{e^{\mu(A_t)} - 1}{e^{y_{\text{máx}} - y_0}}\right] \quad (3.1-1)$$

$$At = t + \frac{1}{\mu} \ln\left(\frac{e^{-\mu t} + q_0}{1 + q_0}\right) \quad (3.1-2)$$

Donde;

Y_t : Ln de los recuentos bacterianos

Y_0 : Ln de la concentración inicial de bacterias

μ : Tasa de crecimiento específico máxima

q_0 : Constante de estado fisiológico, refleja el estado inicial del inóculo

$Y_{m\acute{a}x}$: Ln del nivel máximo de población bacteriana

Además, tuvo que estimarse la duración de la fase LAG mediante la siguiente fórmula (7):

$$LAG = \frac{1}{\mu} \ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right) \quad (3.1-3)$$

Y una vez conseguidos los valores de μ para cada una de las temperaturas, se empleó el modelo de Rosso (7):

$$\mu T = \frac{\mu_{opt} (T - T_{min})^2 (T - T_{m\acute{a}x})}{(T_{opt} - T_{min})(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{m\acute{a}x})(T_{opt} + T_{min} - 2T)} \quad (3.1-4)$$

Donde;

μ_T : Tasa máxima de crecimiento específico a la temperatura T

μ_{opt} : Tasa de crecimiento específico a la temperatura óptima

T_{min} : Temperatura mínima

$T_{máx}$: Temperatura máxima

Para comparar los efectos de la temperatura sobre $Y_{máx}$ durante los 8 días, fue necesario emplear la ecuación que se presenta a continuación (7):

$$Y_{máx} = (a(T - T_{mín})\{1 - \text{Exp}[b(T - T_{máx})]\})^2 \quad (3.1-5)$$

Donde a y b son constantes.

Este procedimiento se realizó con el fin de hallar la temperatura óptima para la producción de enzima cruda. Dichos modelos también pueden ser utilizados para evaluar el pH y encontrar su valor óptimo.

Producción de enzima cruda

Se inoculó 1 ml del aislado CIBE-27, tomando como referencia 0,5 McFarland en 50 ml de caldo nutriente estéril (8 g/L) contenido en una fiola (100 ml) durante 48 horas a 100 rpm y temperatura óptima en una incubadora (Innova 44R, Alemania) (25). Luego, se añadieron 5 ml de dicho caldo nutriente inoculado en fiolas de 1 L conteniendo 500 ml de medio mineral con almidón (líquido) ajustado al pH óptimo (10). Se mantuvo en incubación a temperatura óptima durante 8 días y 120 rpm. Después, el medio fue dispensado en tubos Falcon (50 ml) y colocados en la centrifuga (marca Fisher Scientific, Alemania) manteniendo el equilibrio a 8000 rpm por 15 min a 4°C (45). El sobrenadante obtenido fue llevado previamente a congelar a -80°C (marca Fisher Scientific, Alemania) para luego ponerlo en el liofilizador (marca Labconco, Brasil). El extracto liofilizado o enzima cruda fue conservada a -17°C (marca Indurama, Ecuador) para luego aplicarla en las pruebas reológicas en la masa de pan.



Figura 3.7 Medio mineral inoculado con CIBE-27 (día 8)

Elaborado por: Karla Morejón



Figura 3.8 Sobrenadante obtenido por centrifugación

Elaborado por: Karla Morejón



Figura 3.9 Extracto liofilizado (enzima cruda)

Elaborado por: Karla Morejón

Estimación cuantitativa de la concentración de proteína presente en el extracto liofilizado

Con el objetivo de conocer la concentración de proteína contenida en el extracto liofilizado se utilizó el método de Biuret; siendo necesario realizar una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (28). El procedimiento consistió en diluir diferentes volúmenes de la solución patrón de albúmina (10 mg/ml) en agua destilada completando 1 ml como solución final (40), tal como se indica en la siguiente tabla:

TABLA 2

DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE BSA

No. Tubo	Concentración de proteína (mg/ml)	Estándar SBA (μl)	Agua (μl)
0	0	0	1000
1	0,25	25	975
2	0,5	50	950
3	0,75	75	925
4	1	100	900
5	1,25	125	875
6	1,5	150	850
7	1,75	175	825
8	2	200	800
9	2,25	225	775
10	2,5	250	750
11	2,75	275	725
12	3	300	700
13	3,25	325	675
14	3,5	350	650
15	3,75	375	625
16	4	400	600

Elaborado por: Karla Morejón

Luego, a cada tubo le fue añadido 1 ml del reactivo de Biuret, se lo tapó e invirtió para mezclar. Se mantuvo a 37°C durante 15 min en una incubadora (marca Fisher Scientific, Alemania). Es importante mencionar, que el color púrpura en la reacción indicaba claramente la presencia de proteína en la muestra (42). A continuación, en el espectrofotómetro (marca Biotek, Estados Unidos) se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm utilizando pocillos. Cabe destacar que esta prueba se la realizó por triplicado, empezando por la solución blanco (sólo con agua destilada) y luego con cada una de las diluciones. Con los valores promedios hallados, se elaboró una gráfica de Absorbancia (nm) vs Concentración de proteína (mg/ml) con su respectiva ecuación (40).

Finalmente bajo el mismo procedimiento, se midió la absorbancia del extracto liofilizado obtenido experimentalmente (30 mg/ml) y se despejó la concentración de proteína presente en la muestra a partir de la ecuación de la curva de calibración (40). El valor despejado fue dividido para la concentración que se colocó del liofilizado en la prueba, con el fin de hallar específicamente la cantidad de proteína por cada miligramo de extracto liofilizado.

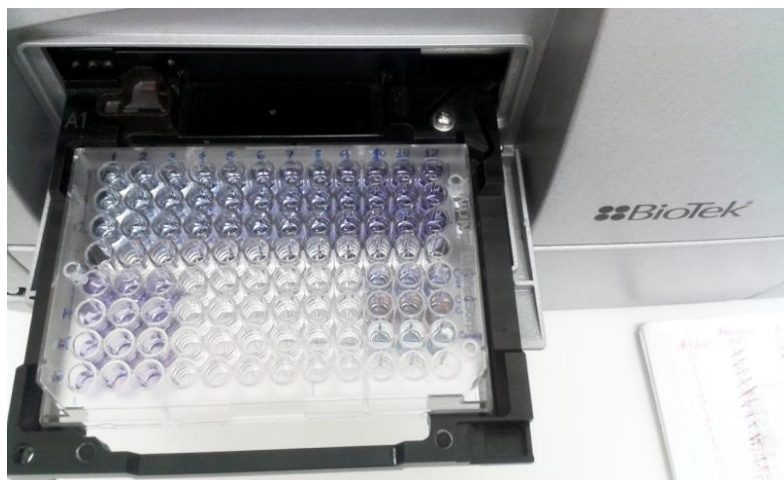


Figura 3.10 Medición de absorbancia en el espectrofotómetro

Elaborado por: Karla Morejón

La concentración de proteína conseguida en esta prueba sería aplicada para el diseño experimental reológico.

3.2 Diseño experimental reológico

Para el diseño experimental reológico, se tuvo como propósito determinar el efecto de la amilasa procedente del microorganismo CIBE-27 en las características reológicas de la masa de pan elaborada a temperatura de refrigeración. En esta parte se tomó como referencia el estudio publicado por Lindahl y Eliasson en 1992 (22).

Harina de trigo

La harina de trigo tipo panificación empleada para la experimentación fue proporcionada por la Planta Molinera perteneciente a la Corporación Superior (Manta, Ecuador).

De acuerdo con el Certificado de Análisis (Apéndice A), la harina presentaba las siguientes características (19):

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS DE LA HARINA DE TRIGO

Muestra Harina: Superior Tipo Panificación	
Mezcla de Trigo:	90% CWRS+10%SRW
Análisis Físico Químico	Resultados
Humedad (%)	14,3
Falling Number Normal	385,0
Aditivos	Resultados
Ac. Ascórbico y Enzimas	Negativo
Micronutrientes	Negativo

Fuente: Aseguramiento de Calidad – Grupo Superior. 2014.

Es importante conocer que en la harina, naturalmente se encuentra presente la α -amilasa y su nivel de actividad se evalúa midiendo el

Número de Caída o Falling Number. Mientras más alto es su valor, menor actividad enzimática posee la harina (6).

Preparación de la masa de pan

Para elaborar la masa de pan fue necesario mezclar en un vaso de precipitación (400 ml) 10 g de harina y 5,5 ml de agua destilada por medio de una batidora con espas para amasar (marca Oster, México) durante 3 minutos a una temperatura de 20°C. Para el preparado enzimático fue indispensable realizar una pre-mezcla de la enzima con la harina sin la adición de agua. Además, el porcentaje de enzima a añadirse se lo calculó en base a los 10 g de harina (22).



Figura 3.11 Preparación de la masa de pan

Elaborado por: Karla Morejón

Es importante señalar que para cada prueba se contó con una muestra blanco (sin adición de enzimas) y con una muestra de referencia preparada con 0,13% de enzima comercial.

Parámetros requeridos para el ensayo reológico

Para esta experimentación, se necesitó de ensayos oscilatorios y fueron realizados en el reómetro KINEXUS PRO (marca Malvern, Inglaterra) bajo el sistema de cono (ángulo 4°) y plato (diámetro= 40 mm) con una brecha o gap de 150 μm , frecuencia variable desde 0,02 hasta 5 Hz, valor de deformación o strain value de 1,8 para obtener los valores del módulo de elasticidad (G'). Las mediciones se realizaron por duplicado con una nueva masa preparada (22).

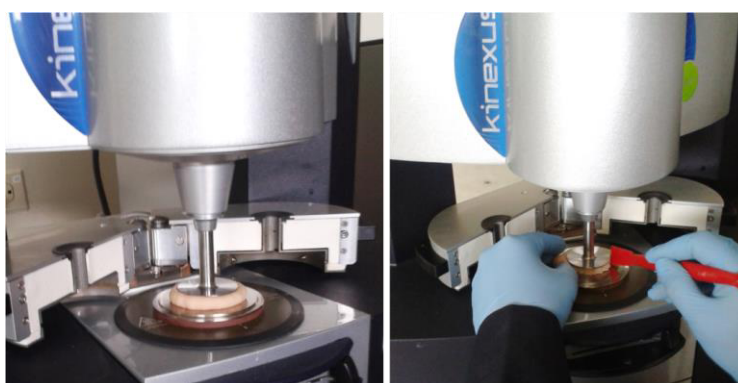


Figura 3.12 Ensayo reológico de la masa de pan

Elaborado por: Karla Morejón

Análisis reológico

Por cada prueba, se midió los valores del módulo de elasticidad (G') durante 30 min y se comparó con sus correspondientes valores iniciales, como se indica a continuación:

$$G'(t) - G'(t = 0) \quad (3.1-6)$$

Por lo tanto, se estableció gráficas del Diferencial del módulo de elasticidad $\Delta G'$ (Pa) vs Tiempo (min). Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadísticos basados en pruebas ANOVA y regresiones lineales y no lineales con 95% de confianza.

Evaluación de la concentración de proteína del extracto liofilizado en la masa de pan

Al no contar con la enzima pura experimentalmente, no se pudo proceder con la determinación de la concentración de amilasa antártica con la que se debía trabajar; por lo tanto en este diseño experimental, se optó por evaluar el Diferencial del módulo de elasticidad ($\Delta G'$) de la masa de pan elaborada con 3 diferentes concentraciones de proteína: 0,3%, 0,4% y 0,5% (8), asumiendo que

dentro de toda la cantidad de proteína una porción que es desconocida corresponde en efecto a la enzima.

Como parámetro, se trabajó con la temperatura óptima definida por el diseño experimental microbiológico, ya que se ha observado en publicaciones que las enzimas extremófilas pueden trabajar bien en un amplio rango, dependiendo de la característica del microorganismo (temperatura, pH o salinidad) (20).

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante una prueba ANOVA para determinar si existía diferencia significativa en las características reológicas de la masa de pan elaborada con las 3 diferentes concentraciones de proteína. La mejor concentración de proteína fue aquella que presentó un menor valor significativo de $\Delta G'$ (8).

Efecto de la amilasa antártica en la masa de pan

Se procedió a preparar la masa de pan con el extracto liofilizado, conociendo la mejor concentración de proteína y se la sometió a dos

temperaturas: la normal de proceso a 40°C y la de refrigeración a 7°C (22) con su respectivo patrón o referencia (8).

Mediante pruebas ANOVA se evidenció si existía una diferencia significativa en las características reológicas de la masa de pan elaborada con la enzima cruda y la masa de pan elaborada con la amilasa comercial a 40°C y luego a 7°C.

Además, con la ayuda de gráficos $\Delta G'$ (Pa) vs Tiempo (min) se pudo interpretar el efecto que produjo la amilasa antártica en la reducción de la viscosidad en la masa de pan comparándola con la referencia.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Análisis estadísticos

Determinación de temperatura y pH óptimo para la producción de amilasas por parte del microorganismo CIBE-27

Con respecto a la temperatura, se evaluó el mayor consumo de almidón por parte del microorganismo CIBE-27 revelándose la formación de un halo alrededor de la colonia.

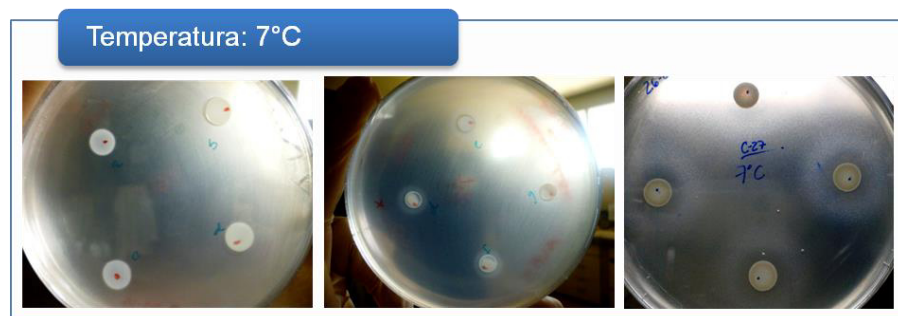


Figura 4.1 Formación de halos a 7°C

Elaborado por: Karla Morejón

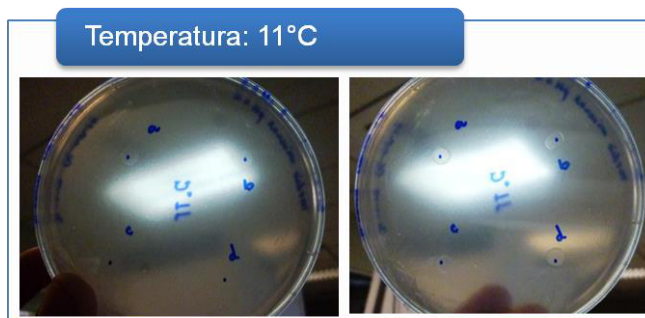


Figura 4.2 Formación de halos a 11°C

Elaborado por: Karla Morejón

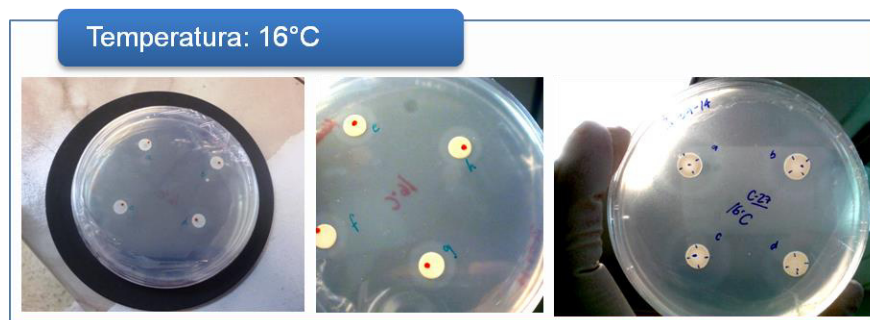


Figura 4.3 Formación de halos a 16°C

Elaborado por: Karla Morejón

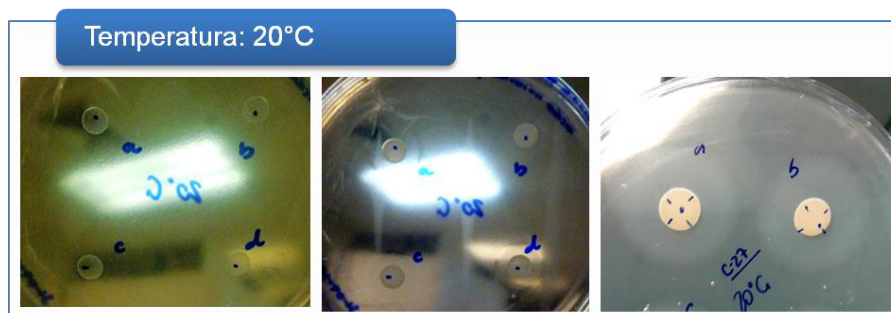


Figura 4.4 Formación de halos a 20°C

Elaborado por: Karla Morejón

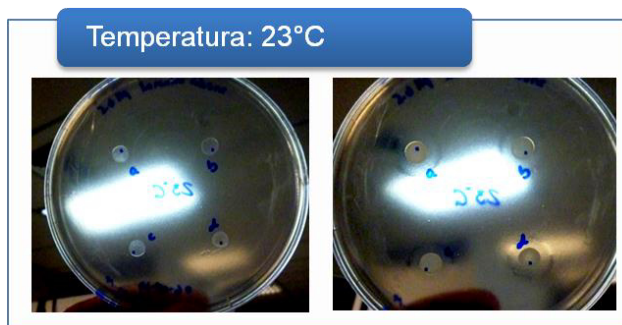


Figura 4.5 Formación de halos a 23°C

Elaborado por: Karla Morejón

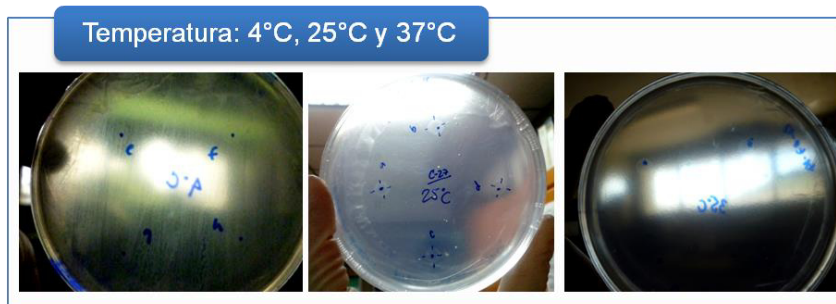


Figura 4.6 CIBE-27 a 4°C, 25°C y 37°C

Elaborado por: Karla Morejón

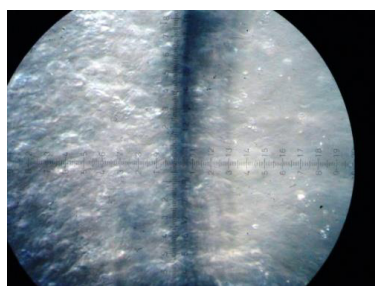


Figura 4.7 Degradación del almidón

Fuente: Vargas J. 2014.

Los valores promedio del Factor de Eficiencia Enzimática (FEE) a 4°C, 7°C, 11°C, 16°C, 20°C, 23°C, 25°C y 37°C durante los 8 días, se encuentran en el Apéndice B y se puede explicar mediante la siguiente gráfica:

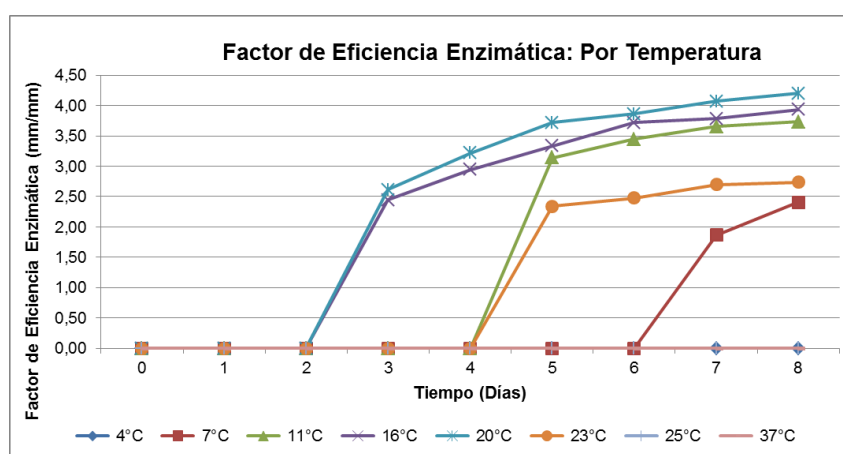


Figura 4.8 FEE de acuerdo a la temperatura

Elaborado por: Karla Morejón

Se pudo observar que el microorganismo CIBE-27 a 16°C y 20°C presentó un Factor de Eficiencia Enzimática en ascenso a partir del tercer día y superior al de las demás temperaturas; mientras que a 11°C y 23°C se manifestó la formación del halo desde el quinto día y sus valores de FEE no superaron el 3,73. A 7°C, se inició con una clara formación del halo alrededor de la colonia a partir del séptimo

día y no hubo halo alguno ni ninguna zona clara al añadirse lugol en la placa a 4°C, 25°C y 37°C.

Al tener que considerar la fase LAG del microorganismo, se tuvo que utilizar el modelo propuesto por Baranyi y Roberts con el fin de obtener las tasas específicas de crecimiento (μ) por cada temperatura (Apéndice C). Empleando el programa XLSTAT (Addinsoft Inc.) se alcanzaron los siguientes datos:

TABLA 4
TASAS ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO POR TEMPERATURA

Valores obtenidos del Modelo Baranyi y Roberts		
Temperaturas (°C)	μ	LAG (días)
4	0	
7	1,097	5,037
11	1,692	3,266
16	2,982	1,853
20	2,999	1,842
23	1,651	3,347
25	0	

Elaborado por: Karla Morejón

Los valores de μ fueron ajustados con el modelo de Rosso:

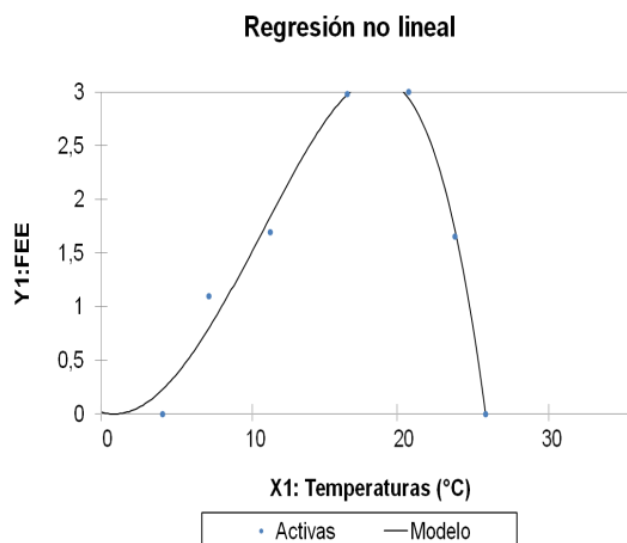


Figura 4.9 Modelo de Rosso para temperatura

Elaborado por: Karla Morejón

TABLA 5

RESULTADOS DEL MODELO DE ROSSO

Resultados del Modelo de Rosso	
Parámetros	Valores
μ máx	3,12
T mín (°C)	0,86
T máx (°C)	24,98
T óptima (°C)	20,00

Elaborado por: Karla Morejón

Se evidenció con un 98% de confianza que la temperatura óptima era de 20°C con un FEE=3,12; además el modelo final presentó una

temperatura mínima de $0,86^{\circ}\text{C}$ y una temperatura máxima de $24,98^{\circ}\text{C}$.

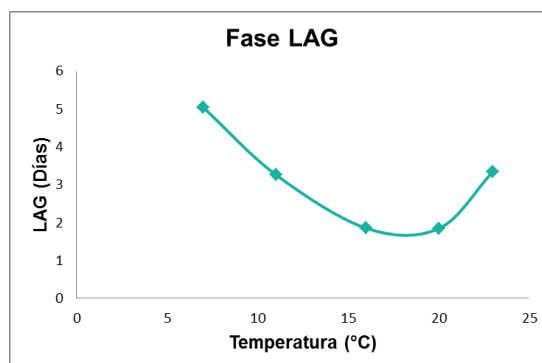


Figura 4.10 Fase LAG con respecto a la temperatura

Elaborado por: Karla Morejón

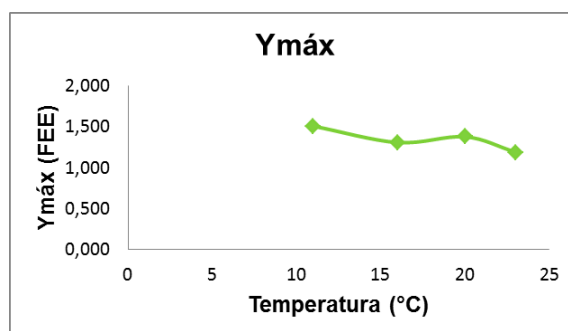


Figura 4.11 Niveles máximos de FEE

Elaborado por: Karla Morejón

Por otra parte, la fase LAG más corta se manifestó entre 16°C y 20°C ; mientras que la más larga se dio a 7°C . Además, a 11°C se

presentó el valor más alto de FEE; pero cabe recalcar que el inicio de la producción de enzima se manifestó después del tercer día.

También se evaluó el consumo de sustrato por parte del microorganismo CIBE-27 en diferente pH.

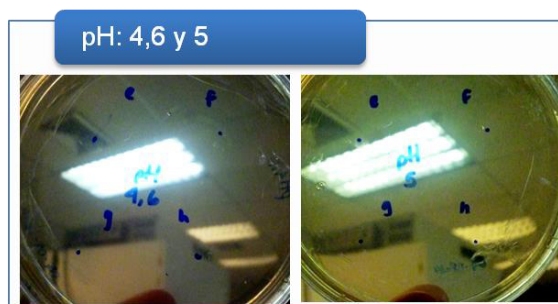


Figura 4.12 CIBE-27 a pH 4,6 y 5

Elaborado por: Karla Morejón



Figura 4.13 CIBE-27 a pH 6, 7 y 8

Elaborado por: Karla Morejón

Los valores promedio del Factor de Eficiencia Enzimática (FEE) a pH 4,6; 5, 6, 6,5; 7 y 8 durante los 8 días, se encuentran en el Apéndice D y se puede explicar mediante la siguiente gráfica:

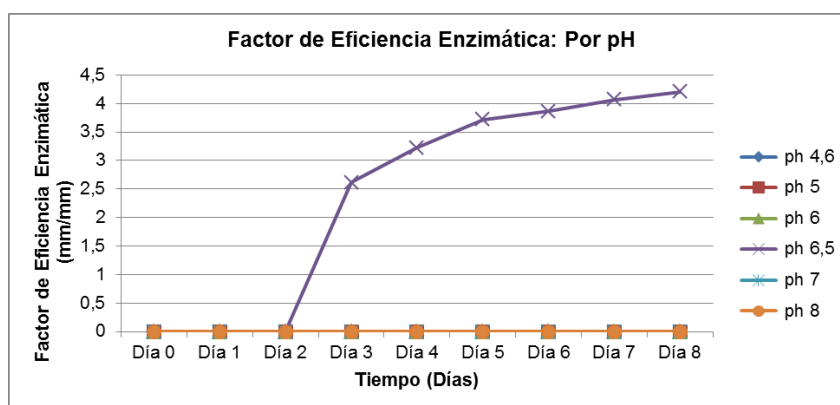


Figura 4.14 FEE de acuerdo al pH

Elaborado por: Karla Morejón

Al evaluarse el pH se presentó que a pH 6 y 7 las colonias del microorganismo CIBE-27 aumentaron su dimensión, pero no se evidenció la formación de los halos y tampoco se formó una zona clara alrededor de la colonia al añadirse el lugol. Al evaluar las placas con pH 8, 5 y 4,6 no se evidenció el crecimiento de las colonias y con mayor razón no hubo halo alguno a su alrededor. Podemos mencionar entonces que solo se vio el consumo de almidón a pH 6,5 con el que se trabajó en las pruebas de temperatura.

Producción de enzima cruda

Se obtuvo un aproximado de 2 g de extracto liofilizado por cada 500 ml del medio mineral inoculado con el microorganismo CIBE-27.

Determinación de la concentración de proteína en el extracto liofilizado

Mediante el método de Biuret y su respectiva lectura de absorbancia en el espectrofotómetro, la curva de calibración para la concentración de proteínas quedó establecida de la siguiente manera:

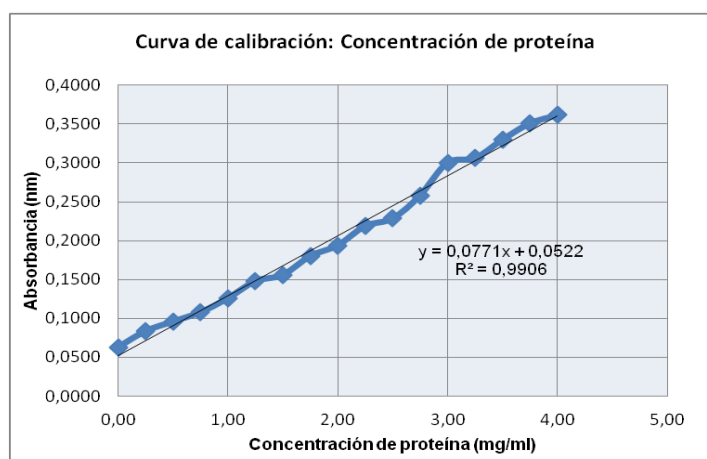


Figura 4.15 Curva de calibración de BSA

Elaborado por: Karla Morejón

Los valores promedio de absorbancia y concentración de proteína fueron colocados en el Apéndice E.

También, se tomaron por triplicado las lecturas de absorbancia a 540 nm del extracto liofilizado (30 mg/ml), obteniéndose un valor de 0,33 que al despejarse de la ecuación de la curva de calibración dio como resultado 3,607 mg/ml. Este valor al dividirse por la concentración colocada del extracto liofilizado, es decir 30 mg/ml, se estimó que por cada miligramo de liofilizado se tiene 0,1202 mg de proteína.

Evaluación de la concentración de proteína para las pruebas reológicas en la masa de pan

Se evaluó el Diferencial del módulo de elasticidad ($\Delta G'$) de la masa de pan expuesta a 3 diferentes concentraciones de proteína: 0,3%, 0,4% y 0,5% (Apéndice F) con su respectiva referencia. Esta prueba fue realizada a 20°C y se obtuvo el siguiente gráfico:

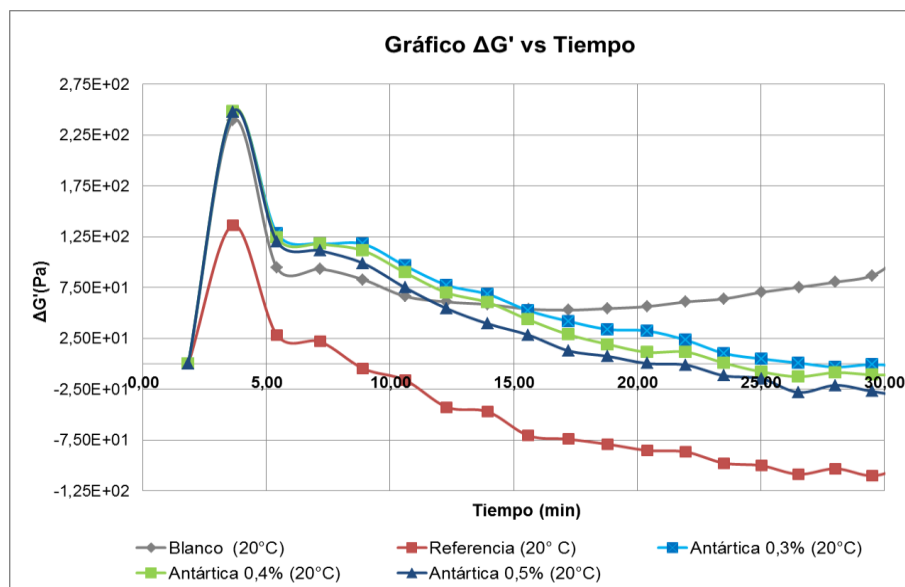


Figura 4.16 Elasticidad de la masa de pan evaluada en tres concentraciones de proteína del extracto liofilizado

Elaborado por: Karla Morejón

Mediante una prueba ANOVA de un factor se determinó si existía una diferencia significativa entre dichas concentraciones bajo la siguiente hipótesis:

H₀: Los valores mínimos de $\Delta G'$ en la masa de pan son iguales al elaborarse con 0,3%, 0,4% y 0,5% de concentración de proteína del extracto liofilizado.

Vs

H₁: $\neg H_0$

TABLA 6
VALORES $\Delta G'$ DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DEL
EXTRACTO LIOFILIZADO

Valores mínimos: Concentración de Proteína			
	Antártica 0,5%	Antártica 0,4%	Antártica 0,3%
$\Delta G' 1$	-4,00E+01	-1,63E+01	-3,00E+00
$\Delta G' 2$	-2,60E+01	-1,73E+01	0,00E+00

Elaborado por: Karla Morejón

TABLA 7
RESULTADO DE ANOVA: $\Delta G'$ PARA CONCENTRACIÓN DE
PROTEÍNA DEL EXTRACTO LIOFILIZADO

Resultado ANOVA: Concentración de Proteína			
Grupos	Promedio	Varianza	Probabilidad
Antártica 0,5%	-33,000	98,000	0,029
Antártica 0,4%	-16,750	0,500	
Antártica 0,3%	-1,500	4,500	

Elaborado por: Karla Morejón

Con esta prueba se alcanzó un valor $P=0,029$ el cual es menor que 0,05 por lo que se rechaza H_0 y se concluye que existe una diferencia significativa entre los valores mínimos del $\Delta G'$ correspondientes a las tres concentraciones de proteína del extracto liofilizado en la masa de pan, con un 95% de confianza (Apéndice G). Por lo tanto, se optó

por tomar como mejor concentración de proteína la de 0,5%, ya que presentó $\Delta G'$ más bajo.

Además, se ejecutaron las respectivas regresiones a partir del tercer dato que es donde empieza la masa de pan a presentar la tendencia elástica. Para este caso, las regresiones resultaron ser polinómicas de segundo orden, tal como se presentan a continuación:

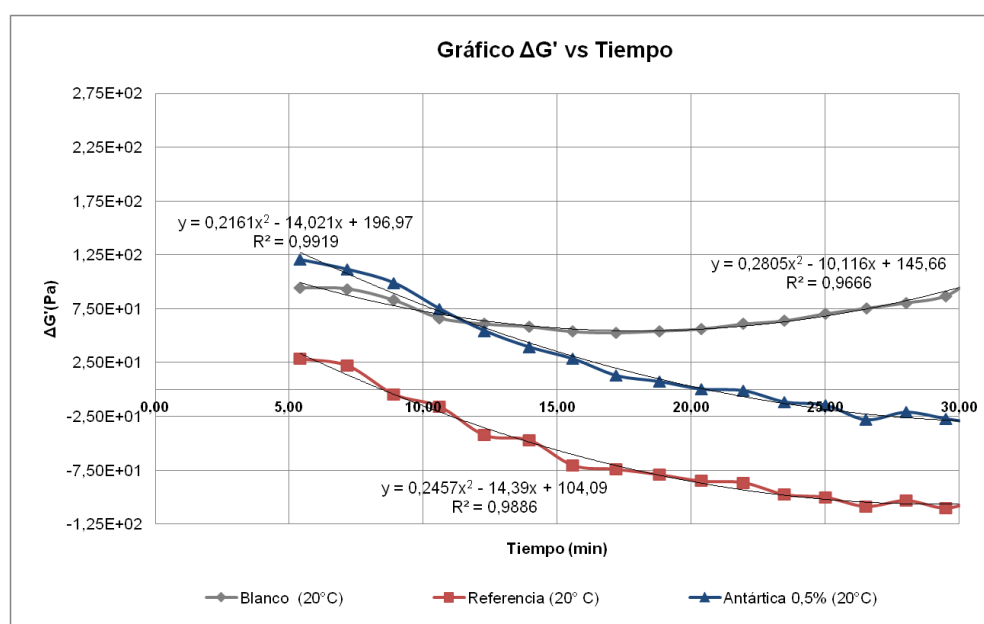


Figura 4.17 Regresiones polinómicas: Concentración de proteína del extracto liofilizado

Elaborado por: Karla Morejón

Efecto de la amilasa antártica en la masa de pan

Se evaluó el efecto generado por la amilasa antártica (bajo la estimación de la concentración de proteína contenida en el extracto liofilizado) en la elasticidad de la masa de pan ante la temperatura normal de proceso y la temperatura de refrigeración, 40°C y 7°C respectivamente.

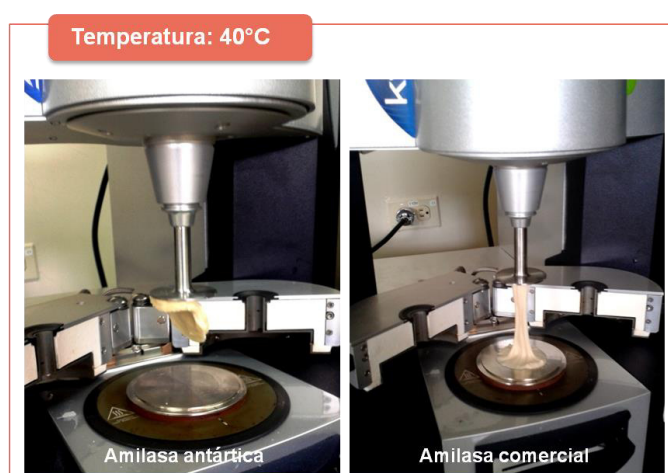


Figura 4.18 Masa de pan evaluada a 40°C

Elaborado por: Karla Morejón

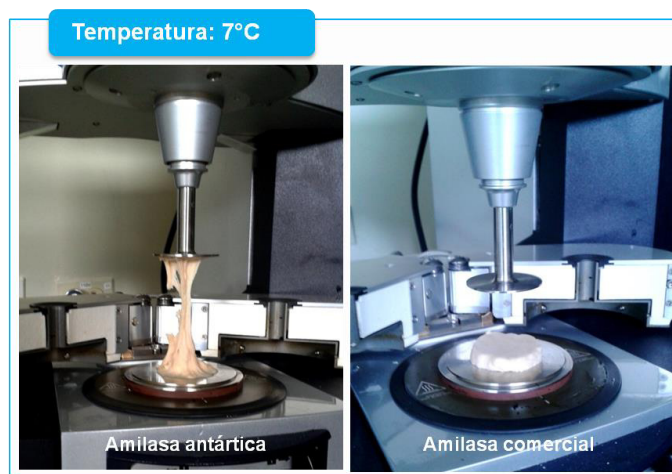


Figura 4.19 Masa de pan evaluada a 7°C

Elaborado por: Karla Morejón

Los datos de estas pruebas se encuentran en los Apéndices H e I. A continuación se presentan los gráficos correspondientes:

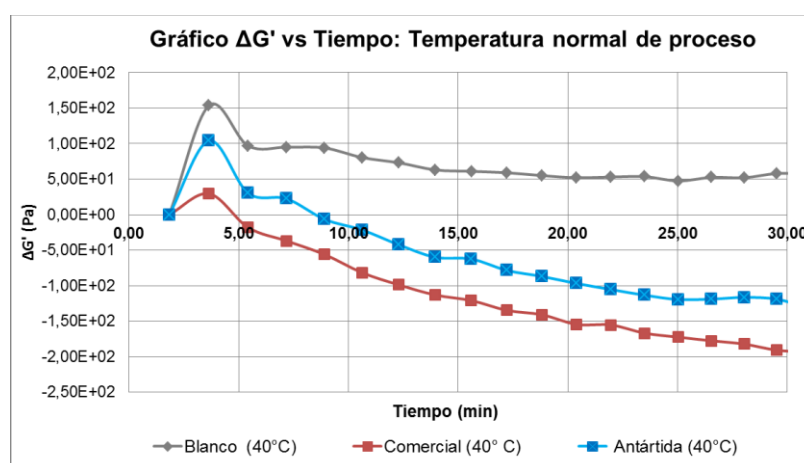


Figura 4.20 Elasticidad de la masa de pan evaluada a 40°C

Elaborado por: Karla Morejón

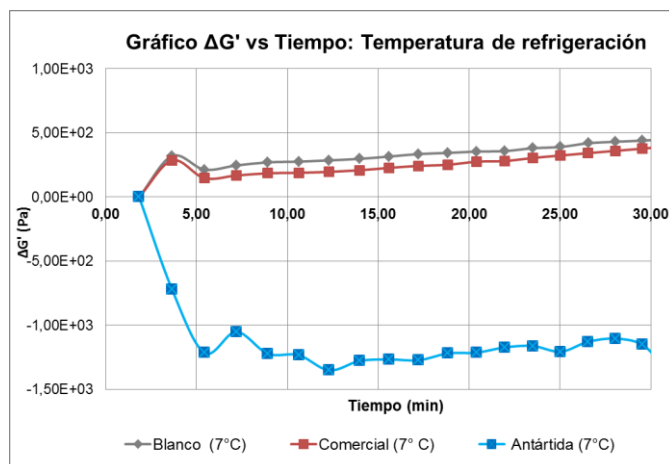


Figura 4.21 Elasticidad de la masa de pan evaluada a 7°C

Elaborado por: Karla Morejón

Con los datos obtenidos, se determinó si existía una diferencia significativa a 40°C entre la masa de pan elaborada con la enzima antártica y la referencia, es decir la masa de pan elaborada con 0,13% de amilasa comercial, mediante una prueba ANOVA (Apéndice J) y la hipótesis fue la siguiente:

H₀: Los valores de $\Delta G'$ de la masa de pan elaborada con enzima antártica y de la masa de pan con amilasa comercial a 40°C son iguales.

Vs

H₁: $\neg H_0$

TABLA 8

**VALORES $\Delta G'$ DE MASA DE PAN CON ENZIMA ANTÁRTICA Y
COMERCIAL A 40°C**

Valores mínimos: Masa de Pan a 40°C		
	Comercial	Antártica
$\Delta G' 1$	-1,99E+02	-1,47E+02
$\Delta G' 2$	-1,91E+02	-1,24E+02

Elaborado por: Karla Morejón

TABLA 9

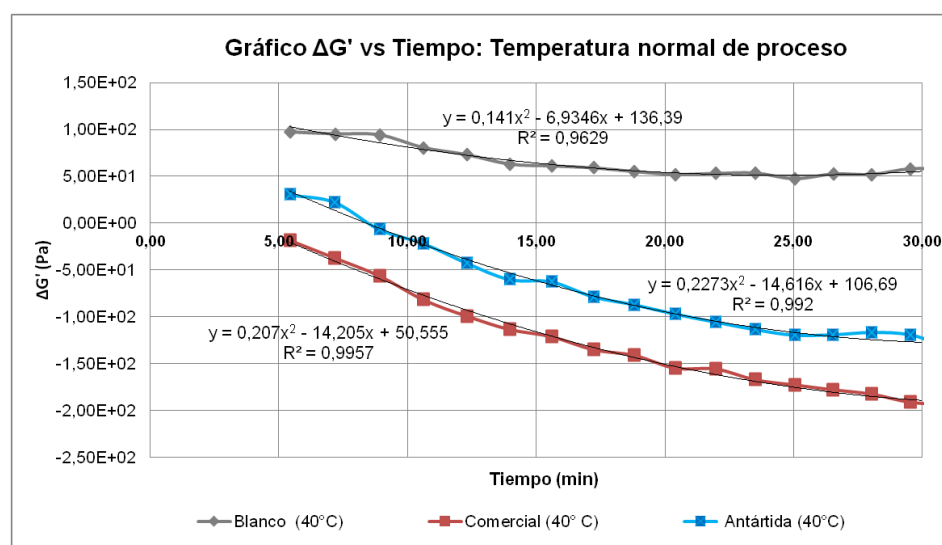
**RESULTADO DE ANOVA: $\Delta G'$ DE MASA DE PAN CON ENZIMA
ANTÁRTICA Y COMERCIAL A 40°C**

Resultado ANOVA: Masa de pan a 40°C			
Grupos	Promedio	Varianza	Probabilidad
$\Delta G'$ Comercial	418,5	2244,5	0,0004
$\Delta G'$ Antártica	-1268,5	40,5	

Elaborado por: Karla Morejón

Mediante esta prueba, se obtuvo un valor $P=0,0004$ rechazando H_0 , y evidenciando con un 95% de confianza una diferencia significativa a 40°C entre los valores mínimos del $\Delta G'$ de la masa de pan elaborada con enzima antártica y la comercial.

Al igual que en la primera parte del análisis reológico, se ejecutó las respectivas regresiones polinómicas que también resultaron ser de segundo orden, como se indica en el siguiente gráfico:



Por último, para determinar si existía una diferencia significativa a 7°C entre la masa de pan elaborada con la enzima antártica y la enzima comercial, se efectuó nuevamente una prueba ANOVA (Apéndice K) con la siguiente hipótesis:

H_0 : Los valores de $\Delta G'$ de la masa de pan elaborada con enzima antártica y de la masa de pan con amilasa comercial a 7°C son iguales.

Vs

$H_1: \neg H_0$

TABLA 10
VALORES $\Delta G'$ DE MASA DE PAN CON ENZIMA ANTÁRTICA Y
COMERCIAL A 7°C

Valores mínimos: Masa de Pan a 7°C		
	Comercial	Antártica
$\Delta G' 1$	4,52E+02	-1,26E+03
$\Delta G' 2$	3,85E+02	-1,27E+03

Elaborado por: Karla Morejón

TABLA 11
RESULTADO DE ANOVA: $\Delta G'$ DE MASA DE PAN CON ENZIMA
ANTÁRTICA Y COMERCIAL A 7°C

Resultado ANOVA: Masa de pan a 7°C			
Grupos	Promedio	Varianza	Probabilidad
$\Delta G'$ Comercial	-194,9	32	0,0395
$\Delta G'$ Antártica	-135,5	264,5	

Elaborado por: Karla Morejón

Con esta prueba se consiguió un valor $P=0,0395$, con el cual se rechaza H_0 y se puede mencionar que sí existe una diferencia significativa a 7°C entre los valores mínimos del $\Delta G'$ de la masa de pan elaborada con enzima antártica y la masa de pan elaborada con enzima comercial con un 95% de confianza.

Al igual que los análisis anteriores, se ejecutaron las respectivas regresiones polinómicas que también resultaron ser de segundo orden, a excepción de la gráfica correspondiente a la amilasa antártica, ya que posiblemente al no estar pura no presentó tendencia alguna como se indica a continuación:

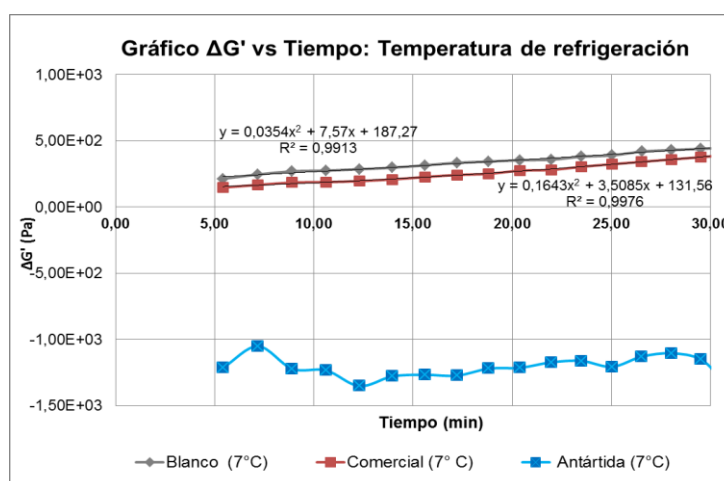


Figura 4.23 Regresiones polinómicas: Masa de pan a 7°C

Elaborado por: Karla Morejón

Tomando como referencia la interpretación realizada en el estudio de Lindahl y Eliasson se pudo concluir que, a 7°C la masa de pan elaborada con la amilasa antártica (sin encontrarse pura), presentó un menor $\Delta G'$ en comparación a la amilasa antártica y que además pudo actuar en un amplio rango de temperatura.

4.2 Interpretación de resultados

En el presente trabajo se determinó las condiciones óptimas de temperatura y pH para la producción de amilasas por parte de la bacteria antártica denominada CIBE-27 y la influencia de dichas enzimas en las propiedades reológicas de la masa de pan.

Es necesario empezar señalando que los microorganismos psicrófilos pueden crecer entre una temperatura de 0°C a 25°C, como lo menciona Stan-Lotter (39) y aunque no se ha realizado un estudio específico acerca del crecimiento del microorganismo CIBE-27, es importante destacar que podría ser clasificado dentro de esta categoría, de acuerdo con los datos de crecimiento de sus colonias a diferentes temperaturas, con los cuales se realizó el cálculo del Factor de Eficiencia Enzimática. Además, curiosamente la

temperatura de 25°C a la que fue sometido el microorganismo CIBE-27, coincide como la temperatura final de crecimiento de la *Alteromonas haloplanctis*, productora de amilasa y proveniente del agua de mar de la Antártida (2).

Continuando con la investigación, se estipuló como parámetro de producción óptima de amilasa antártica por parte del microorganismo ya mencionado, una temperatura de 20°C, gracias al modelo de Rosso, el cual consideraba a temperatura constante la fase de latencia; es decir el período en que cada célula de la colonia requería para adaptarse al medio, así como también contemplaba la fase logarítmica en donde las células se reproducen a ritmo constante. Además el modelo de Rosso permitió ajustar las tasas máximas de crecimiento específico obtenidas empleando el modelo anterior por cada temperatura, tal como se lo manejó en el estudio realizado por Cevallos (7). Por lo tanto, las temperaturas límites alcanzadas para la producción de amilasas antárticas fueron 0, 86°C y 24,98°C.

Por otra parte, para evaluar el pH no fue posible utilizar la misma metodología, ya que a pH 6 y 7 aunque se evidenció crecimiento de

la colonia no se observó la formación del halo a su alrededor y mucho menos a pH 8, pH 5 y pH 4,6 se presentó crecimiento alguno; por lo tanto el pH 6,5 utilizado en las pruebas de temperatura quedó definido como óptimo. Esto concuerda con estudios anteriores los cuales indican que los rangos de actividad de pH son mucho menores cuando se comparan con otros parámetros como la temperatura (10).

Conociendo los parámetros óptimos de temperatura y pH se efectuó la producción de amilasas. A partir del medio mineral inoculado se alcanzó un rendimiento aproximado del 0,4% al adquirir como producto final el extracto liofilizado; además se estableció que cada miligramo de este contenía alrededor del 12% de proteína.

Al no contar con la enzima pura experimentalmente y asumiendo que dentro de toda la cantidad de proteína una porción corresponde en efecto a la enzima, se procedió a evaluar el comportamiento reológico, en este caso la elasticidad de la masa de pan aplicando diferentes concentraciones de proteína del extracto liofilizado mediante ensayos oscilatorios y con la temperatura óptima ya

definida anteriormente. El módulo de elasticidad G' fue seguido durante 32,42 minutos y fue comparado con el valor inicial; es decir al tiempo cero. Esto condujo a una diferencia positiva o negativa denominada $\Delta G'$. Por consiguiente a diferentes concentraciones de proteína se encontró que, en todos los casos se presentó un aumento máximo de $\Delta G'$ a los 3,64 minutos después de la mezcla, en el cual se generó la gelatinización del almidón. Después de este periodo, empezó a evidenciarse la acción de las enzimas antárticas y las curvas en consecuencia tendieron a descender. Pues bien, la disminución del $\Delta G'$ al continuar o nivelarse dependió del sustrato disponible y de la cantidad de amilasa. Al existir diferencia significativa entre las tres concentraciones y contando con esta interpretación, se pudo citar que la masa de pan elaborada con una concentración 0,5% de proteína fue la mejor, ya que los valores volvieron a cero aproximadamente a los 20 minutos y en comparación a las demás concentraciones, presentó el valor más bajo de $\Delta G'$ al final de la experimentación (22).

Al evaluar el efecto de las amilasas antárticas sobre las características reológicas de la masa de pan a temperatura de proceso, se determinó que pudieron desarrollar luego de 30 minutos

una masa más elástica a razón de un factor igual a 3,33; mientras que las amilasas de tipo comercial lo realizaron a 4,36. A temperatura de refrigeración, las amilasas antárticas redujeron la viscosidad de la masa de pan a razón de un factor igual a 3,66; mientras que las de tipo comercial lo hicieron alrededor del 0,12; por lo tanto, se puede mencionar que las amilasas antárticas sin encontrárselas en un estado puro, dentro de este estudio manifestaron la posibilidad de actuar en un amplio rango de temperatura (22).

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las condiciones óptimas de temperatura y pH para la producción de amilasas por parte del microorganismo CIBE-27 fueron 20°C y pH 6,5.
2. La concentración de proteína 0,5% del extracto liofilizado pudo reducir la viscosidad de la masa de pan a 20°C en aproximadamente 20 min.
3. El efecto que demostraron las amilasas antárticas en las características reológicas de la masa de pan superó las expectativas, ya que sin encontrárselas en estado puro pudieron reducir eficientemente la viscosidad de la masa luego de 30 minutos a temperatura de refrigeración con una diferencia de fracción aproximada de 3,5 con respecto a su par comercial y además

manifestaron la posibilidad de actuar en un amplio rango de temperatura.

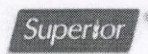
4. Se recomienda purificar la amilasa antártica y por consiguiente determinar la Velocidad Máxima de la reacción enzimática bajo condiciones de saturación de sustrato, pH y temperatura, de tal manera que pueda definirse la cantidad de producto formado por minuto; así como también, establecer la Constante de Michaelis-Menten, la cual permite relacionar la afinidad de la enzima por un sustrato en particular.

5. Para trabajos posteriores se sugiere evaluar la influencia de las amilasas antárticas en la vida útil del pan como producto final. Además, dentro de la industria alimentaria podría investigarse su potencial en la preparación de jarabes de maíz y en la elaboración de cerveza. También, sería recomendable evaluar su acción en el proceso de desencolado que maneja la industria textil y en la modificación de almidones que manipula la industria papelera.

APÉNDICES

APÉNDICE A

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LA HARINA DE TRIGO



CERTIFICADO ANÁLISIS DE HARINA

R-830-01-21

ATENCIÓN:

Srta. Karla Morejón

FECHA

26/11/2014

MUESTRA HARINA SUPERIOR TIPO PANIFICACION

FECHA DE PRODUCCION:

25/11/2014

MEZCLA DE TRIGO:

90% CWRS+10%SRW

ANALISIS FISICO QUIMICO	RESULTADOS
Absorción a 14% H (%)	68,00
Humedad (%)	14,30
Gluten Húmedo (%)	33,47
Falling Number Normal	385

ADITIVOS	
Ac. Ascórbico y enzimas	Negativo
Micronutrientes	Negativo

OBSERVACIONES:

Muestra 1 Kg

(f.)Aseguramiento de Calidad

APÉNDICE B

VALORES PROMEDIO DE FEE POR TEMPERATURA

Valores promedio de los Factores de Eficiencia Enzimática (FEE) por Temperatura								
	Temperaturas (°C)							
Tiempo (Días)	4	7	11	16	20	23	25	37
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	2,444	2,616	0	0	0
4	0	0	0	2,948	3,221	0	0	0
5	0	0	3,142	3,338	3,722	2,342	0	0
6	0	0	3,448	3,718	3,863	2,474	0	0
7	0	1,867	3,655	3,783	4,068	2,698	0	0
8	0	2,405	3,731	3,935	4,202	2,738	0	0

APÉNDICE C

VALORES PARA EL CÁLCULO DEL MODELO DE BARANYI Y ROBERTS

Parámetros para ejecutar el Modelo de Baranyi y Roberts								
	Temperaturas (°C)							
Parámetros	4	7	11	16	20	23	25	37
Yo	-2,303	-2,303	-2,303	-2,303	-2,303	-2,303	-2,303	-2,303
μ	0,0001	0,2537	0,5988	0,5903	0,6307	0,4389	0,0001	0,0001
qo	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Ymáx	-2,303	0,878	1,317	1,370	1,436	1,007	-2,303	-2,303

APÉNDICE D

VALORES PROMEDIO DE FEE POR PH

Valores promedio de los Factores de Eficiencia Enzimática (FEE) por pH						
	PH					
Tiempo (Días)	4,6	5	6	6,5	7	8
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	2,616	0	0
4	0	0	0	3,221	0	0
5	0	0	0	3,722	0	0
6	0	0	0	3,863	0	0
7	0	0	0	4,068	0	0
8	0	0	0	4,202	0	0

APÉNDICE E

DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNA

Valores de absorbancia a 540nm				
Concentración (mg/ml)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
0,00	0,064	0,063	0,062	0,0630
0,25	0,082	0,084	0,085	0,0837
0,50	0,093	0,095	0,1	0,0960
0,75	0,109	0,107	0,108	0,1080
1,00	0,126	0,124	0,128	0,1260
1,25	0,157	0,146	0,141	0,1480
1,50	0,156	0,154	0,158	0,1560
1,75	0,186	0,17	0,185	0,1803
2,00	0,192	0,194	0,196	0,1940
2,25	0,219	0,217	0,221	0,2190
2,50	0,228	0,228	0,23	0,2287
2,75	0,262	0,255	0,258	0,2583
3,00	0,293	0,307	0,301	0,3003
3,25	0,305	0,308	0,306	0,3063
3,50	0,33	0,32	0,34	0,3300
3,75	0,361	0,332	0,36	0,3510
4,00	0,37	0,34	0,375	0,3617
Microorganismo CIBE-27 (extracto liofilizado)				
30	0,3	0,336	0,325	0,33

APÉNDICE F

TABLA 1F

MUESTRA BLANCO Y REFERENCIA A 20°C

	Muestra Blanco a 20°C		Muestra Referencia a 20°C	
Tiempo (min)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)
1,83	2,51E+03	0,00E+00	1,55E+03	0,00E+00
3,64	2,75E+03	2,40E+02	1,69E+03	1,37E+02
5,42	2,60E+03	9,45E+01	1,58E+03	2,85E+01
7,18	2,60E+03	9,35E+01	1,57E+03	2,20E+01
8,91	2,59E+03	8,30E+01	1,55E+03	-4,50E+00
10,62	2,58E+03	6,65E+01	1,53E+03	-1,60E+01
12,30	2,57E+03	6,10E+01	1,51E+03	-4,25E+01
13,96	2,57E+03	5,85E+01	1,50E+03	-4,70E+01
15,60	2,56E+03	5,40E+01	1,48E+03	-7,05E+01
17,22	2,56E+03	5,30E+01	1,48E+03	-7,40E+01
18,82	2,56E+03	5,45E+01	1,47E+03	-7,90E+01
20,40	2,57E+03	5,65E+01	1,47E+03	-8,50E+01
21,97	2,57E+03	6,10E+01	1,46E+03	-8,65E+01
23,50	2,57E+03	6,40E+01	1,45E+03	-9,75E+01
25,03	2,58E+03	7,05E+01	1,45E+03	-1,00E+02
26,55	2,58E+03	7,55E+01	1,44E+03	-1,09E+02
28,03	2,59E+03	8,05E+01	1,45E+03	-1,03E+02
29,52	2,60E+03	8,70E+01	1,44E+03	-1,10E+02
30,97	2,62E+03	1,08E+02	1,45E+03	-1,02E+02
32,42	2,62E+03	1,10E+02	1,44E+03	-1,08E+02

TABLA 2F

MUESTRA ANTÁRTICA 0,3%, 0,4% y 0,5% A 20°C

	Muestra Antártica 0,3% a 20°C		Muestra Antártica 0,4% a 20°C		Muestra Antártica 0,5% a 20°C	
Tiempo (min)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)
1,83	2,12E+03	0,00E+00	2,20E+03	0,00E+00	2,37E+03	0,00E+00
3,64	2,36E+03	2,48E+02	2,45E+03	2,49E+02	2,62E+03	2,48E+02
5,42	2,24E+03	1,29E+02	2,32E+03	1,25E+02	2,49E+03	1,21E+02
7,18	2,23E+03	1,19E+02	2,32E+03	1,18E+02	2,48E+03	1,12E+02
8,91	2,23E+03	1,18E+02	2,31E+03	1,12E+02	2,47E+03	9,90E+01
10,62	2,21E+03	9,65E+01	2,29E+03	8,98E+01	2,45E+03	7,50E+01
12,30	2,19E+03	7,75E+01	2,27E+03	7,00E+01	2,43E+03	5,45E+01
13,96	2,18E+03	6,85E+01	2,26E+03	6,05E+01	2,41E+03	3,95E+01
15,60	2,17E+03	5,25E+01	2,24E+03	4,35E+01	2,40E+03	2,85E+01
17,22	2,16E+03	4,20E+01	2,23E+03	2,90E+01	2,39E+03	1,30E+01
18,82	2,15E+03	3,40E+01	2,22E+03	1,93E+01	2,38E+03	7,50E+00
20,40	2,15E+03	3,25E+01	2,21E+03	1,15E+01	2,37E+03	5,00E-01
21,97	2,14E+03	2,35E+01	2,21E+03	1,18E+01	2,37E+03	-1,00E+00
23,50	2,13E+03	1,05E+01	2,20E+03	1,00E+00	2,36E+03	-1,15E+01
25,03	2,12E+03	5,00E+00	2,19E+03	-7,75E+00	2,36E+03	-1,45E+01
26,55	2,12E+03	1,00E+00	2,18E+03	-1,25E+01	2,35E+03	-2,80E+01
28,03	2,11E+03	-3,00E+00	2,19E+03	-8,50E+00	2,35E+03	-2,10E+01
29,52	2,11E+03	-5,00E-01	2,19E+03	-1,08E+01	2,35E+03	-2,70E+01
30,97	2,11E+03	-2,50E+00	2,19E+03	-1,13E+01	2,34E+03	-3,20E+01
32,42	2,11E+03	-1,50E+00	2,18E+03	-1,68E+01	2,34E+03	-3,30E+01

APÉNDICE G

ANOVA: EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE PROTEINA DEL EXTRACTO LIOFILIZADO EN LA MASA DE PAN A 20°C

Análisis de varianza: Masa de pan a 20°C

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Antártica 0,5%	2	-66	-33	98
Antártica 0,4%	2	-33,5	-16,75	0,5
Antártica 0,3%	2	-3	-1,5	4,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	992,583	2,000	496,292	14,455	0,02882622	9,552
Dentro de los grupos	103,000	3,000	34,333			
Total	1095,583	5,000				

APÉNDICE H

MUESTRA BLANCO, COMERCIAL Y ANTÁRTICA A 40°C

	Muestra Blanco a 40°C		Muestra Comercial a 40°C		Muestra Antártica a 40°C	
Tiempo (min)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)
1,83	1,26E+03	0,00E+00	6,28E+02	0,00E+00	1,26E+03	0,00E+00
3,64	1,41E+03	1,54E+02	6,58E+02	2,95E+01	1,36E+03	1,04E+02
5,42	1,35E+03	9,70E+01	6,10E+02	-1,80E+01	1,29E+03	3,05E+01
7,18	1,35E+03	9,50E+01	5,91E+02	-3,70E+01	1,28E+03	2,25E+01
8,91	1,35E+03	9,40E+01	5,72E+02	-5,61E+01	1,25E+03	-6,50E+00
10,62	1,34E+03	8,05E+01	5,47E+02	-8,16E+01	1,24E+03	-2,15E+01
12,30	1,33E+03	7,30E+01	5,29E+02	-9,90E+01	1,21E+03	-4,25E+01
13,96	1,32E+03	6,30E+01	5,15E+02	-1,13E+02	1,20E+03	-6,00E+01
15,60	1,32E+03	6,10E+01	5,07E+02	-1,21E+02	1,19E+03	-6,25E+01
17,22	1,31E+03	5,90E+01	4,93E+02	-1,35E+02	1,18E+03	-7,85E+01
18,82	1,31E+03	5,50E+01	4,87E+02	-1,41E+02	1,17E+03	-8,70E+01
20,40	1,31E+03	5,20E+01	4,74E+02	-1,55E+02	1,16E+03	-9,70E+01
21,97	1,31E+03	5,30E+01	4,73E+02	-1,55E+02	1,15E+03	-1,06E+02
23,50	1,31E+03	5,35E+01	4,61E+02	-1,67E+02	1,14E+03	-1,14E+02
25,03	1,30E+03	4,75E+01	4,56E+02	-1,73E+02	1,14E+03	-1,20E+02
26,55	1,31E+03	5,25E+01	4,50E+02	-1,78E+02	1,14E+03	-1,19E+02
28,03	1,31E+03	5,20E+01	4,46E+02	-1,82E+02	1,14E+03	-1,17E+02
29,52	1,31E+03	5,80E+01	4,37E+02	-1,91E+02	1,14E+03	-1,19E+02
30,97	1,31E+03	5,75E+01	4,35E+02	-1,93E+02	1,13E+03	-1,31E+02
32,42	1,31E+03	5,80E+01	4,33E+02	-1,95E+02	1,12E+03	-1,36E+02

APÉNDICE I

MUESTRA BLANCO, COMERCIAL Y ANTÁRTICA A 7°C

	Muestra Blanco a 7°C		Muestra Comercial a 7°C		Muestra Antártica a 7°C	
Tiempo (min)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)	G' Promedio (Pa)	$\Delta G'$ (Pa)
1,83	2,60E+03	0,00E+00	2,61E+03	0,00E+00	8,97E+03	0,00E+00
3,64	2,92E+03	3,20E+02	2,89E+03	2,86E+02	8,25E+03	-7,19E+02
5,42	2,81E+03	2,14E+02	2,76E+03	1,48E+02	7,76E+03	-1,21E+03
7,18	2,84E+03	2,47E+02	2,78E+03	1,68E+02	7,92E+03	-1,05E+03
8,91	2,87E+03	2,71E+02	2,79E+03	1,86E+02	7,75E+03	-1,22E+03
10,62	2,87E+03	2,76E+02	2,80E+03	1,89E+02	7,74E+03	-1,23E+03
12,30	2,88E+03	2,86E+02	2,81E+03	1,96E+02	7,62E+03	-1,35E+03
13,96	2,90E+03	2,98E+02	2,82E+03	2,09E+02	7,69E+03	-1,28E+03
15,60	2,91E+03	3,16E+02	2,84E+03	2,28E+02	7,70E+03	-1,27E+03
17,22	2,93E+03	3,36E+02	2,85E+03	2,43E+02	7,70E+03	-1,27E+03
18,82	2,94E+03	3,44E+02	2,86E+03	2,52E+02	7,75E+03	-1,22E+03
20,40	2,95E+03	3,55E+02	2,88E+03	2,76E+02	7,76E+03	-1,21E+03
21,97	2,96E+03	3,59E+02	2,89E+03	2,81E+02	7,80E+03	-1,17E+03
23,50	2,98E+03	3,81E+02	2,91E+03	3,05E+02	7,81E+03	-1,16E+03
25,03	2,99E+03	3,91E+02	2,93E+03	3,24E+02	7,76E+03	-1,21E+03
26,55	3,02E+03	4,20E+02	2,95E+03	3,43E+02	7,84E+03	-1,13E+03
28,03	3,03E+03	4,31E+02	2,97E+03	3,61E+02	7,87E+03	-1,10E+03
29,52	3,04E+03	4,40E+02	2,99E+03	3,77E+02	7,82E+03	-1,15E+03
30,97	3,05E+03	4,53E+02	3,01E+03	3,97E+02	7,64E+03	-1,33E+03
32,42	3,07E+03	4,77E+02	3,03E+03	4,19E+02	7,70E+03	-1,27E+03

APÉNDICE J

ANOVA: EFECTO DE LA ENZIMA ANTÁRTICA Y ENZIMA COMERCIAL EN LA MASA DE PAN A 40°C

Análisis de varianza: Masa de pan a 40°C						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Comercial	2	-389,8	-194,9	32		
Antártica	2	-271	-135,5	264,5		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3528,36	1	3528,36	23,8001	0,0395	18,5128
Dentro de los grupos	296,5	2	148,25			
Total	3824,86	3				

APÉNDICE K

ANOVA: EFECTO DE LA ENZIMA ANTÁRTICA Y ENZIMA COMERCIAL EN LA MASA DE PAN A 7°C

Análisis de varianza: Masa de pan a 7°C						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Comercial	2	837	418,5	2244,5		
Antártica	2	-2537	-1268,5	40,5		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2845969	1	2845969	2491,0013	0,0004	18,5128
Dentro de los grupos	2285	2	1142,5			
Total	2848254	3				

BIBLIOGRAFÍA

1. ACUERDO MINISTERIAL 563-A, Adhesión del Ecuador al Tratado Antártico, Registro Oficial 823, Ecuador, 1987.
2. AGHAJARI N., FELLER G., GERDAY C. y HASER R., Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level, Current Biology Research Article, Francia, 1998.
3. BADUI S., Química de los Alimentos, Cuarta edición, Pearson Education, México, 2006, págs. 94-102, 281-288, 303-317.
4. BENDER M. y BRUBACHER L., Catálisis y acción enzimática, Editorial Reverté, Barcelona - España, 1977, pág. 16.
5. BOURNE M., Food texture and viscosity: Concept and measurement, Academic Press, San Diego - Estados Unidos, 2002, págs. 22-24, 59-68.
6. CAUVAIN S. y YOUNG L., Baked products: Science, Technology and Practice, Editorial Blackwell, Inglaterra, 2006, págs. 75-76.

7. CEVALLOS J., AKINS E., FRIEDRICH L., DANYLUK M. y SIMONNE A., Growth of *Clostridium perfringens* during cooling of refried beans, Journal of Food Protection - International Association for Food Protection, Estados Unidos, 2012.
8. CHEREJI R., DOGARU D., BORDEI D. y MATEESCU C., Influence of α -amylase on rheological properties of dough, Agroalimentary Processes and Technologies, Rumania, 2005, págs. 101-108.
9. DE ROBERTIS E., HIB J., y PONZIO R., Biología celular y molecular de De Robertis, Décimoquinta edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires - Argentina, 2005, págs. 37-40.
10. DEB P., TALUKDAR S., MOHSINA K., SARKER P. y SAYEM S., Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001, Springerplus, Bangladés, 2013.
11. FELLER G., Psychrophilic enzymes: From folding to function and biotechnology, Hindawi Publishing Corporation Scientifica, Bélgica, 2013.
12. FENNEMA O., Química de los Alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza - España, 1993, págs. 128-135, 417-496.

13. GARCÍA V., Introducción a la Microbiología, Segunda edición, Editorial EUNED, Costa Rica, 2004, pág. 54.
14. GARRIDO A. y TEIJÓN J., Fundamentos de Bioquímica estructural, Editorial Tébar, Madrid - España, 2006, pág. 198.
15. GOLDMAN E. y GREEN L., Practical handbook of Microbiology, Segunda edición, Editorial CRC Press, Estados Unidos, 2009, pág. 17.
16. GUPTA R., GIGRAS P., MOHAPATRA H., GOSWAMI V. y CHAUHAN B., Microbial α -amylases: A biotechnological perspective, Elsevier Process Biochemistry, India, 2003.
17. GURUNG N., RAY S., BOSE S. y RAI V., A broader view: Microbial enzymes and their relevance in Industries, Medicine and beyond, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, India, 2013.
18. HOYOUX A., BLAISE V., COLLINS T., D'AMICO S., GRATIA E., HUSTON A., MARX J., SONAN G., ZENG Y., FELLER G. y GERDAY C., Extreme catalysts from low-temperature environments, Journal of Bioscience and Bioengineering, Bélgica, 2004, págs. 317-330.
19. INEN, Norma Técnica Ecuatoriana: Harina de Trigo. NTE INEN 616, Primera Edición - Tercera Revisión, Ecuador, 2006.

20. KIM T., GU B., JEONG J., BYUN S. y SHIN Y., Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901, Applied and Environmental Microbiology, Corea, 1995.
21. LÉVÊQUE E., JANEČEK S., HAYE B. y BELARBI A., Thermophilic archaeal amylolytic enzymes, Elsevier Enzyme and Microbial Technology, Francia, 2000.
22. LINDAHL L., y ELIASSON A., Influence of added enzymes on the rheological properties of a wheat flour dough, American Association of Cereal Chemists Inc., Estados Unidos, 1992.
23. MADIGAN M., MARTINKO J., y PARKER J., Brock Biología de los microorganismos, Décima edición, Pearson Prentice Hall, España, 2002, págs. 111-113.
24. MCGILVERY R., Conceptos bioquímicos, Editorial Reverté, Barcelona - España, 1977, pág. 103.
25. MISHRA S. y BEHERA N., Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes, African Journal of Biotechnology, India, 2008.

26. MONSERRATE L., ZAMBRANO K., TACURI L., CAÑARTE O., CEVALLOS J. y PERALTA E., Identificación y bioprospección de levaduras antárticas, VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica: Avances en ciencia antártica latinoamericana, Chile, 2013, pág. 336-337.
27. MONTEIRO P. y DE OLIVEIRA P., Application of microbial α -amylase in industry – a Review, Brazilian Journal of Microbiology, Brasil, 2010.
28. NIGAM A., y AYYAGARI A., Lab manual in biochemistry, immunology and biotechnology, McGraw Hill, India, 2007, págs. 49-50.
29. PASIN T., BENASSI V., MOREIRA E., JORGE J. y POLIZELI M. Prospecting filamentous fungi for amylase production: Standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions, British Biotechnology Journal, Brasil, 2014, págs. 482-498.
30. PATHAN A., BHADRA B., BEGUM Z. y SHIVAJI S., Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids, Current Microbiology, Springer Science, India, 2010.
31. PELCZAR M., Microbiología, Segunda edición, McGraw Hill, México, 2000, págs. 88-108.

32. PETROFSKY K. y HOSENEY R., Rheological properties of dough made with starch and gluten from several cereal sources, American Association of Cereal Chemists Inc., Estados Unidos, 1995.
33. RAO M., Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications, Editorial Springer, New York - Estados Unidos, 2007, págs. 14-18.
34. RASTALL R., Novel enzyme technology for food applications, Editorial Woodhead, Cambridge - England, 2007, págs. 54-56.
35. SAMIR Â., MIGUEL M., MARTINS-MEYER T., VERÍSSIMO É., WARUAR B., LOBO P. y DELLAMORA G., Enzymes in bakery: Current and future trends, INTECH, Brasil, 2013, págs. 288-307.
36. SANDOVAL E., QUINTERO A. y APONTE A., Reología y textura de masas: Aplicaciones en trigo y maíz, Revista Ingeniería e Investigación No.57 Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2005, págs. 72-78.
37. SINGH S., SINGH S., BALI V., SHARMA L. y MANGLA J., Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, India, 2014.

38. SIVARAMAKRISHNAN S., GANGADHARAN D., MADHAVAN K., SOCCOL C. y PANDEY A. α -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments, Food Technol. Biotechnol. 44, India, 2006.
39. STAN-LOTTER H. y FENDRIHAN S., Adaption of microbial life to environmental extremes: Novel research results and application, Springer, Austria, 2012, págs. 7-8.
40. UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, Métodos para la cuantificación de proteínas.
41. VAN DEN BURG B., Extremophiles as a source for novel enzymes, Elsevier Current opinion in Microbiology, Holanda, 2003, págs. 213-218.
42. VEENA G., Biotechnology-1 including Biochemistry, Mathematics computer science, Editorial New age international, India, 2008, pág. 112.
43. WEIPERT D., The benefits of basic rheometry in studying dough rheology, American Association of Cereal Chemists Inc., Estados Unidos , 1990.

44. YOUNG R. y FREEDMAN R., Física universitaria, Décimosegunda edición, Pearson Educación, México, 2009, págs. 363-369.
45. YU Y., LI H., ZENG Y. y CHEN B., Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active hydrolytic enzymes from culturable bacteria associated with sediment from Nella Fjord, Eastern Antarctica, Journal Marine Drugs, China, 2011.