

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



Producción de extracto enzimático de *Rhizomucor Pusillus* y su aplicación en el desarrollo de un integrador tiempo temperatura.

Por:

**GRACIELA PÉREZ DÍAZ**

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2016.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Producción de extracto enzimático de *Rhizomucor Pusillus* y su aplicación en el desarrollo de un integrador tiempo temperatura.

Por:

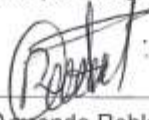
**GRACIELA PÉREZ DÍAZ**

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Evaluado y aprobado por el siguiente comité evaluador.



Dr. Armando Robledo Olivo

**Asesor principal**



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

**Coasesor**



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

**Coasesor**



Dr. José Duñez Alans

**Coordinador de la División de Ciencia Animal**



Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2016.

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por permitirme lograr una meta más en la vida, por haberme cuidado durante este tiempo lejos de mi familia ,por darme tu apoyo a través de mis seres queridos, por darme la fuerza en cada paso que he dado y daré.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, que me abrió las puertas para sumergirme al mundo de la sabiduría, por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

Al **Doctor Armando Robledo Olivo** por todo el apoyo que me ha brindado, gracias por todo el conocimiento, tiempo, dedicación, consejos y sobre todo paciencia para guiarme hacia la culminación de esta etapa de mi vida.

Al **Doctor Mario Alberto Cruz** Hernández por todo el apoyo que ha brindado para llevar a cabo este trabajo, por los conocimientos transmitidos y el gran interés, además por sus comentarios y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

A la **Doctora Gabriela Martínez Vázquez**, por tomarse el tiempo de revisar el trabajo realizado y por el apoyo con material de laboratorio que me permitió realizar los experimentos.

A mis compañeros de trabajo del área de Bioprocesos que me apoyaron con material, tiempo y conocimientos para sacar adelante este trabajo.

## DEDICATORIAS

### A MI HERMOSA FAMILIA:

A **mis papas Manuel y Guadalupe**, Gracias por haberme permitido la vida, por su inmenso amor, cariño, confianza y consejos, por ser parte de mi vida y compartir conmigo tantos momentos felices. Gracias por enseñarme el valor del trabajo y la honestidad porque día a día se esforzaron con gran ilusión y esfuerzo para darme una vida mejor y lograr hacer de mí una persona de bien.

A **mis hermanos**, Jorge, Víctor, Ángel, José Y Samuel por el apoyo moral, por quererme y por cuidarme tanto. Gracias por compartir momentos dulces conmigo, por sus regaños y consejos que me han servido mucho.

A **mis abuelitas**: A **Duduvina** por enseñarme durante toda mi infancia el valor del amor, del trabajo y de la honestidad, es un placer estar a tu lado y escucharte hablar de JESÚS. A **Pascuala** por enseñarme todos los días que para obtener algo hay que trabajar y confiar en Dios.

A **Adolfo** por todo el apoyo que ha brindado en los momentos más difíciles y por compartir conmigo una etapa más de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
OBJETIVOS .....	13
Objetivo general .....	13
Objetivos específicos .....	13
JUSTIFICACIÓN .....	13
HIPÓTESIS .....	14
REVISIÓN DE LITERATURA .....	15
MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	15
Celulosa .....	16
Hemicelulosa .....	16
Lignina .....	18
Formación y estructura. ....	18
Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido.....	21
Biorreactores .....	21
Olate de maíz .....	23
CONCEPTO DE XILANASA Y CARACTERÍSTICAS .....	23
EL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN .....	24
Valores termo cinéticos: Valor D, Z y P .....	25
LOS INTEGRADORES TIEMPO- TEMPERATURA .....	25
Requisitos que debe satisfacer un integrador tiempo temperatura (ITT). ....	27
Clasificación de los integradores tiempo temperatura (ITTs).....	28
Aplicaciones de los Integradores tiempo temperatura (ITT) .....	28
METODOLOGÍA.....	30
ETAPA I. CARACTERIZAR EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DEL OLOTE DE MAÍZ PARA SER UTILIZADO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. 30	
Preparación de la muestra.....	30
Determinación de lignina .....	30
Determinación de celulosa.....	31
Determinación de hemicelulosa.....	32

Determinación de cenizas totales .....	32
Determinación de punto crítico de humedad e índice de absorción de agua..	32
<b>ETAPA II. PRODUCCIÓN DE UN CONSORCIO ENZIMÁTICO EMPLEANDO RH. PUSILLUS EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO OLOTE DE MAÍZ COMO SOPORTE-SUSTRATO .....</b>	<b>33</b>
Propagación de la cepa .....	33
Preparación del inóculo .....	33
Fermentación en medio sólido.....	33
Obtención del extracto enzimático.....	34
Determinación de actividad proteasa (método de kunitz modificado 1946) ....	34
Determinación de actividad xilanasa .....	35
Determinación de actividad exocelulasa.....	35
Evaluación de azúcares totales y azúcares reductores .....	36
<b>ETAPA III. DESARROLLAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA (ITT) A BASE DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO, EMPLEANDO DIVERSOS TAMAÑOS DEL INTEGRADOR. ....</b>	<b>36</b>
Preparación del ITT .....	36
Evaluación del diseño del ITT.....	37
Características del integrador tiempo temperatura .....	38
<b>ETAPA IV. EVALUAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA EN UN PROCESO DE PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL. ....</b>	<b>38</b>
Preparación del jugo.....	38
Determinación de pH .....	38
Grados Brix.....	38
Aplicación de los integradores tiempo temperatura .....	38
Cálculo del tiempo de reducción decimal o valor D .....	40
Cálculo del valor z .....	41
Valor pasteurizador de un tratamiento térmico .....	42
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>ETAPA I. CARACTERIZAR EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DEL OLOTE DE MAÍZ PARA SER UTILIZADO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. ....</b>	<b>43</b>
Componentes obtenidos del análisis bromatológico.....	43
Índice de absorción de agua y punto crítico de humedad.....	45

ETAPA II. PRODUCIR UN CONSORCIO ENZIMÁTICO EMPLEANDO <i>RH. PUSILLUS</i> EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO OLOTE DE MAÍZ COMO SOPORTE-SUSTRATO. ....	47
Productos obtenidos del proceso de fermentación en medio sólido. ....	47
Azúcares presentes en el extracto enzimático.....	49
ETAPA III. DESARROLLAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA A BASE DEL EXTRACTO ETAPA ENZIMÁTICO, EMPLEANDO DIVERSOS TAMAÑOS DEL INTEGRADOR.....	49
Capacidad y tamaño del integrador tiempo temperatura. ....	49
Trasferencia de calor del material con agua y el jugo de frambuesa.....	50
ETAPA IV. EVALUAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURAS EN UN PROCESO DE PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL. ....	52
Características del jugo de frambuesa.....	52
Parámetros cinéticos obtenidos: valor D, z y P.....	53
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del tamaño ideal para la realización de los ITT y su determinación enzimática en el proceso térmico convencional.....	37
Tabla 2. Volúmenes usados para determinar la cantidad ideal para la cuantificación del extracto enzimático .....	37
Tabla 3.características del polipropileno. ....	38
Tabla 4.Comparacion de componentes lignocelulósico con diferentes autores. ...	44
Tabla 5. Actividades enzimáticas obtenidas del experimento. ....	47
Tabla 6.Azucares presentes en el extracto de olote de maíz antes y después del proceso de fermentación.....	49
Tabla 7.características del ITT evaluado .....	50
Tabla 8. Características fisicoquímicas del jugo de frambuesa.....	52
Tabla 9. Valores cinéticos. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Representacion esquemática de la organización estructural de los diferentes polímeros de la pared celular (Bidlack et. Al 1992. ....	15
Figura 2. Estructura primaria de la celulosa (P.prinsen,2010). ....	16
Figura 3. Monómeros precursores de la hemicelulosa (colodette y col, 1980). ....	17



Figura 4. Modelos estructural de la lignina de maderas blandas (Alder, 1977). .....	19
Figura 5. Representación grafica del integrador tiempo temperatura.....	37
Tabla 3. características del polipropileno.....	38
Figura 6. Ubicación de ITT dentro del envase.....	39
Figura 7. Ejemplo de cinética de termo destrucción.....	40
Figura 8. Grafico del valor Z y formulas.....	41
Figura 9. Integrador tiempo temperatura.....	50

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafica 1. Componentes lignocelulósicos del olote de maíz obtenidos en esta investigación.....	43
Grafica 2. Punto crítico de humedad e índice de absorción de agua del olote de maíz a las 0 hr y 72 hr.....	46
Grafica 3. Resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas. ....	48

## RESUMEN

La inocuidad de los alimentos garantiza la sanidad y seguridad de los alimentos que consumimos y disminuyen el número de enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Uno de los métodos más usados para inactivar o eliminar los microorganismos es el procesamiento térmico. Para evaluar que el tiempo y la temperatura de pasteurización sean adecuados actualmente se utilizan integradores tiempo temperatura (ITT) que indican la historia de la temperatura. En el presente trabajo se realizó un integrador tiempo temperatura biológico, el cual estuvo compuesto por un consorcio enzimático. Se realizó un análisis bromatológico del olote de maíz, en el cual se determinó lignina, hemicelulosa ((NORMA ANSI/ASTM, 1977a) y celulosa y se usó como soporte para la obtención de enzimas, como la celulasa y xilanasa en fermentación en medio sólido (FMS). Se diseñó el integrador tiempo temperatura y se evaluó diferentes tamaños y capacidades de extracto enzimático, posteriormente se evaluó la inactivación de la enzima en un baño maría a 85 °C por 10 min., simulando la inactivación de microorganismos en alimentos ácidos. La cantidad de endocelulasa, exocelulasa y xilanasa fue de 1208.08 U/ml, 180.53 U/ml 214 U/ml, respectivamente. El tamaño del integrador utilizado fue de 20 mm. Se obtuvo los siguientes valores cinéticos, un valor P de 7.52, valor D de 94.2, valor z de 10 min., y valor F de 1.1148. Con el valor P se demuestra que el proceso térmico aplicado al alimento fue adecuado y la disminución de la carga microbiana también. La enzima xilanasa simuló adecuadamente la inactivación microbiana por lo que es factible usarlo como un integrador tiempo temperatura.

**Palabras claves:** Integrador tiempo temperatura, xilanasa, valor D, Valor z, valor P, compuesto lignocelulósico, inactivación microbiana.

## INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos ha pasado a ser una cuestión de alta prioridad para muchos gobiernos. La amplia divulgación de algunos casos ha hecho evidente que el brote de enfermedades significativas transmitidas por los alimentos, la cual, puede tener consecuencias sanitarias, políticas y económicas. Junto al creciente interés y la divulgación realizada por los medios de difusión, la toma de conciencia y la preocupación del público respecto de la inocuidad de los alimentos han alcanzado un nivel más alto (Loaharanu, 2001).

Por otro lado, la pérdida de alimentos deteriorados y desperdicio a nivel mundial alcanza cifras preocupantes. Gustavsson (2011) afirman que esta cifra asciende a cerca de un tercio de la producción de alimentos, que equivale a 1300 millones de toneladas .estas perdida están asociadas a diversos factores y abarcan toda la cadena productiva. Sin embargo hay dos factores que se destacan: primero las limitaciones técnicas, principalmente en los países de desarrollo como México y segundo el manejo de las fechas de vencimiento, principalmente en comunidades con alto poder adquisitivo (G.V. Francisco, 2012).

El Procesamiento térmico de Alimentos persiste como uno de los métodos más utilizados para la conservación de alimentos. El producto se trata a una temperatura dada durante un período determinado de tiempo para minimizar los riesgos de salud pública debido a la presencia de microorganismos patógenos y de extender la vida útil del producto. A medida que el número de procesos, productos y tipos de envases aumenta, las empresas de alimentos se enfrentan al reto de las limitaciones de seguridad satisfactorias. Las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura se podrían utilizar para lograr la seguridad. Sin embargo, las historias de tiempo temperatura relacionados afectarían a la calidad del producto de diferentes maneras. Esto ha llevado a una práctica común de sobre el procesamiento de productos alimenticios para garantizar la seguridad, pero a expensas de un mayor deterioro de la calidad del producto (Arias Méndez A. y col, 2014).

Uno de los tratamientos térmico a aplicar es la pasteurización, la cual, es un proceso que combina tiempo y temperatura para asegurar la destrucción de todas las bacterias patógenas que pueden estar presentes en el producto crudo con el objetivo de mejorar su capacidad de conservación. Los alimentos envasados generalmente se pasteurizan entre los 62°C y los 68°C durante 30 minutos.

Para ello hay que conocer la dinámica del calentamiento del punto más frío de éstos durante su tratamiento térmico. Si dicho tratamiento es excesivo, el alimento pierde valor nutritivo y puede adquirir características indeseables en su aroma, textura y color. En caso contrario, se pueden desarrollar microorganismos patógenos poniendo en riesgo la salud del consumidor. Para tal fin la simulación numérica resulta ser una valiosa herramienta, la cual permite determinar la distribución y evolución de las temperaturas en el producto, minimizando los procedimientos experimentales, reduciendo los costos y tiempos de desarrollo. Esto se puede lograr a partir del análisis de las distribuciones de tiempo de residencia y la temperatura, junto con la cinética de cambio térmico, o de la utilización de un integrador de tiempo-temperatura adecuada (TTI) como indicador de la seguridad y la calidad (F. Helena y col,2012) .

El TTI debe ser un componente térmicamente sensible (intrínseca o extrínseca a la comida) que permite la cuantificación del impacto proceso térmico en el atributo de seguridad o calidad. Los cambios que ocurren durante el proceso deben ser irreversibles y de dinámica similar del atributo estudiado. La letalidad calculada a partir de los datos de tiempo-temperatura debe estar de acuerdo con la letalidad obtenida del TTI (Hendrickx et al., 1995 y Van Loey et al., 1996).

Sin embargo las demandas de los consumidores van más allá de los requisitos básicos de seguridad y estabilidad en almacenamiento. Por lo tanto, se pone más énfasis en la alta calidad y productos de valor añadido. Esto requiere de validación de procesos y optimización de técnicas adecuadas (Awuah, Ramaswamy, y Economides, 2007).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Producir un extracto enzimático y aplicarlo como un integrador tiempo temperatura capaz de monitorear temperaturas y tiempos de pasteurización de alimentos por el método convencional.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar el material lignocelulósico del olote de maíz para ser utilizado en fermentación en medio sólido.
- Producir un extracto enzimático empleando *Rh. Pusillus* en fermentación en medio sólido, utilizando olote de maíz como soporte-sustrato.
- Desarrollar el integrador tiempo temperatura a base del extracto enzimático, empleando diversos tamaños del integrador.
- Evaluar el integrador tiempo temperaturas en un proceso de pasteurización convencional.

## **JUSTIFICACIÓN**

A nivel nacional la siembra y cosecha de maíz ha sido una de las actividades primarias más importantes, de las cuales lo único que utilizan son los granos del maíz, desechando el olote sin darle un valor agregado a todos los desechos que se generan a partir de este cultivo.

- El rastrojo es utilizado para la alimentación de ganado y algunas veces el olote también, sin embargo, se encuentra mucho desperdicio a nivel nacional.
- Para ello una alternativa para su uso y evitar el desperdicio de este, es usarlos como soporte-sustrato para la producción de enzimas, las cuales tiene muchas aplicaciones dentro de la industria alimentaria.

- La inocuidad de los alimentos ha pasado a ser una cuestión de alta prioridad para muchos gobiernos. La amplia divulgación de algunos casos ha hecho evidente que el brote de enfermedades significativas transmitidas por los alimentos la cual, puede tener consecuencias sanitarias, políticas y económicas (Loaharanu, 2001).
- Para ellos se necesitan de tecnología nuevas que permitan la cuantificación del impacto del proceso térmico en el alimento, que permita mantener la calidad e inocuidad del mismo. Es por eso que los integradores tiempo temperaturas permiten evaluar el proceso térmico, además son baratos, accesibles y no contamina el alimento.

## **HIPÓTESIS**

El extracto enzimático derivado de la fermentación del olote maíz por la cepa *Rhizomucor Pusillus* podrá ser empleado para desarrollar un integrador tiempo temperatura de pasteurización convencional.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

En general las paredes celulares de plantas consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, etc.). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosas y pectinas. Gran parte de los compuestos fenólicos están presentes en la estructura de lignina. La pared celular primaria envuelve la célula que durante la fase de expansión celular crece hasta un tamaño 100 veces más larga que su tamaño justo después de dividirse.

Después ciertas células empiezan a desarrollar una pared secundaria. Los compuestos fenólicos pueden alcanzar hasta 30 % en peso seco de las paredes celulares secundarias (Scheller, 2010).

Relativamente poco se conoce sobre la organización y coordinación de celulosa, hemicelulosa y lignina durante y después la biosíntesis que determinan la morfología y funcionalidad de la pared celular.

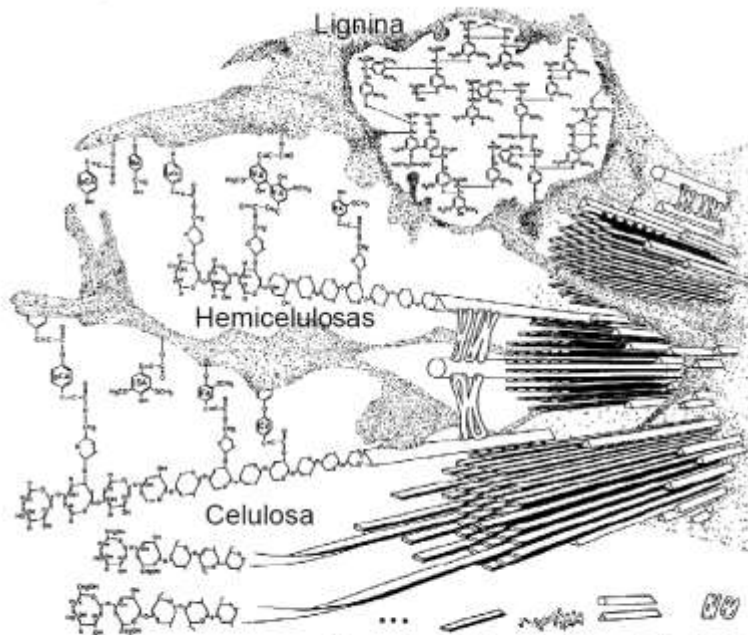


Figura 1. Representación esquemática de la organización estructural de los diferentes polímeros de la pared celular (Bidlack y col. 1992).

## Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra. Consiste en cadenas lineales de celobiosa (D-glucopiranosil- $\beta$ -1,4-D-glucopiranososa) de aproximadamente 10.000 unidades glicosídicas en celulosa nativa de fibras madereras donde representan más de 50 % del peso. En la célula vegetal gran parte de la celulosa está presente como microfibrillas empaquetadas muy densamente. Poco se conoce sobre la regulación de este plegamiento. Contiene zonas amorfas y cristalinas. Las cadenas en la zona amorfa son susceptibles a bioconversión (celulasas).

La cadena de celulosa es alargada y las unidades de glucosa están dispuesta en un solo plano debido a la presencia del anillo glucosídico y a su conformación. (Fengel y Wegener, 1984, Vasques y col, 2013).

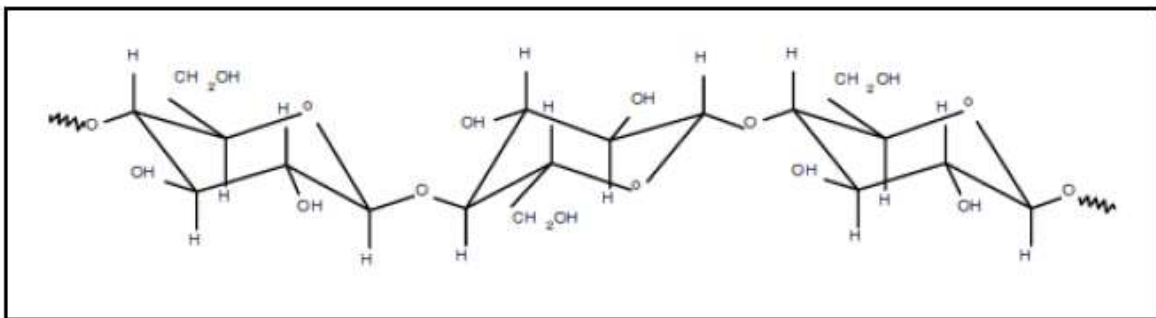


Figura 2. Estructura primaria de la celulosa (P. Prinsen, 2010).

El anillo de piranosa está en conformación  ${}^4C_1$ , es decir, que los grupos  $\text{-CH}_2\text{OH}$  y  $\text{-OH}$ , así como los enlaces glicosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo y los átomos de hidrógeno en posición axial.

Las microfibrillas de celulosa establecen interacciones cruzadas con los xiloglucanos para contribuir con su integridad estructural y rigidez (Vasquez, 2013. McCann y Roberts, 1991).

## Hemicelulosa

La hemicelulosa es la segunda fracción de la planta más abundante después de la celulosa. Consiste en una mezcla de hexanos, pentosas y otros monómeros que



son usados para la producción de diferentes antibióticos, alcohol, comida animal y combustibles. El xilano es el más abundante de la hemicelulosas, el cual tiene una estructura lineal de  $\beta$ -1,4 de xilapiranosas.

La hemicelulosa es un polímero constituido por unidades de anhidrozucars unidas por enlaces glucosídicos, y formadas por más de un tipo de azúcar; además presentan ramificaciones y sustituciones. Los azúcars que forman las hemicelulosas se pueden dividir en diferentes grupos como las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucurónico, metilglucurónico y galacturónico) y deoxihexosas (ramnosa y fucosa). La cadena principal puede consistir en una sola unidad (homopolímero) como por ejemplo los xilanos o en dos o más unidades (heteropolímero) como por ejemplo los glucomananos. Su papel es contribuir a la unión entre la celulosa y lignina. (Vásquez y col, 2013)

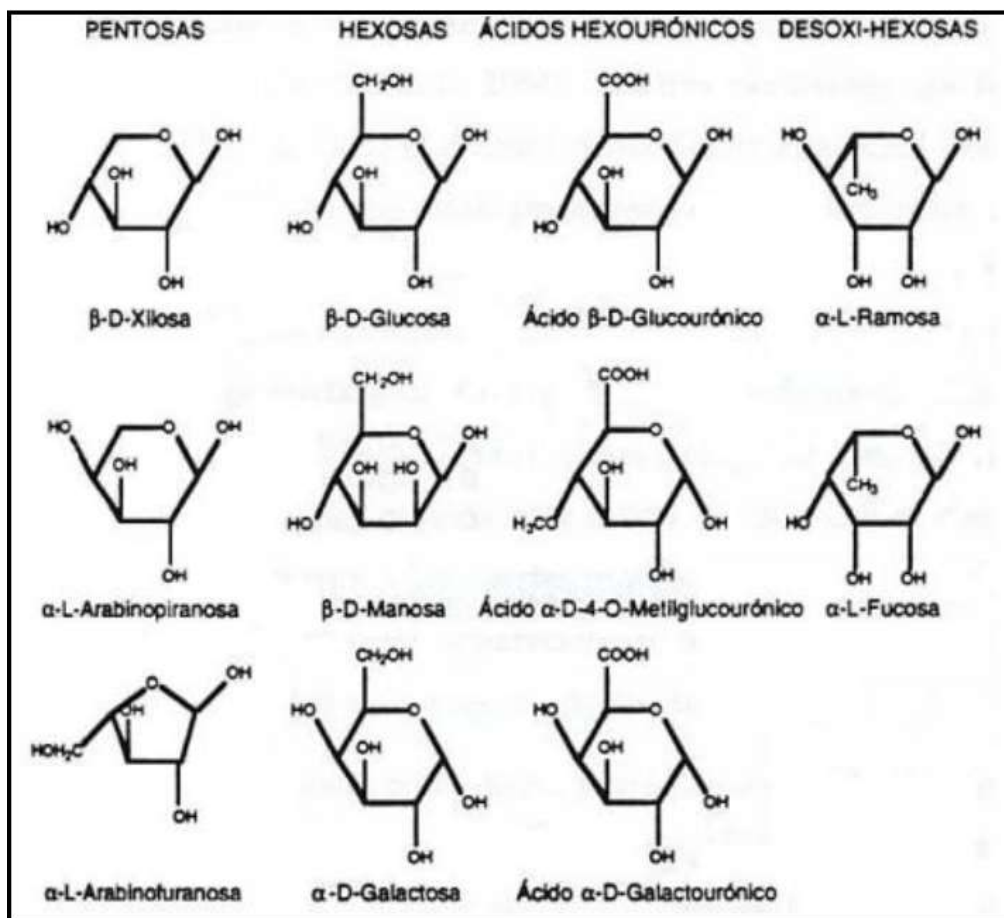


Figura 3. Monómeros precursores de la hemicelulosa (colodette y col, 1980).

## **Lignina**

La lignina es un polímero aromático, altamente ramificado, y en conjunto con la celulosa y la hemicelulosa representan los tres componentes mayoritarios presentes en la pared celular de las plantas. La principal función de la lignina dentro de la matriz lignocelulósica es unir las microfibrillas y fibras de los polisacáridos, impartiendo fuerza y rigidez a la planta. Así mismo tiene otras funciones biológicas, incluyendo la protección de las plantas contra el ataque de microorganismos y asiste en el transporte de agua a través de la pared celular (Hernández 2013, Fox 2006).

Actualmente el contenido y la estructura de lignina y su entrecruzamiento con polisacáridos son factores limitantes en el aprovechamiento lignocelulósico. En procesos con biomasa se requieren pretratamientos optimizados para aumentar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas a los polisacáridos, por ejemplo para aumentar el rendimiento de sacarificación con el fin de producir biocombustibles o para conversión en otros productos (por ejemplo por fermentación). Por ello se debe conocer los cambios estructurales de la lignina durante el proceso.

La lignina representa aproximadamente entre 20 y 35 % de la materia seca en fibras madereras y entre 10-25 % en fibras no-madereras. Presenta una estructura polimérica macromolecular. Sus unidades repetitivas son fenoles sustituidos con respectivamente 0, 1 y 2 grupos de metoxilo en la subunidad fenólica de respectivamente unidades H, G y S.

### **Formación y estructura.**

La estructura química de la lignina no se conoce por completo principalmente por las alteraciones que sufre durante las condiciones que se utiliza para su aislamiento, así como al tipo de planta (Lora y Glasser, 2002). Es un polímero construido por la combinación de tres tipos de monómeros básicos: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-coumarílico (C9 o C6C3) y difieren principalmente en la sustitución de las posiciones de los carbonos 3 y 5 del anillo aromático.

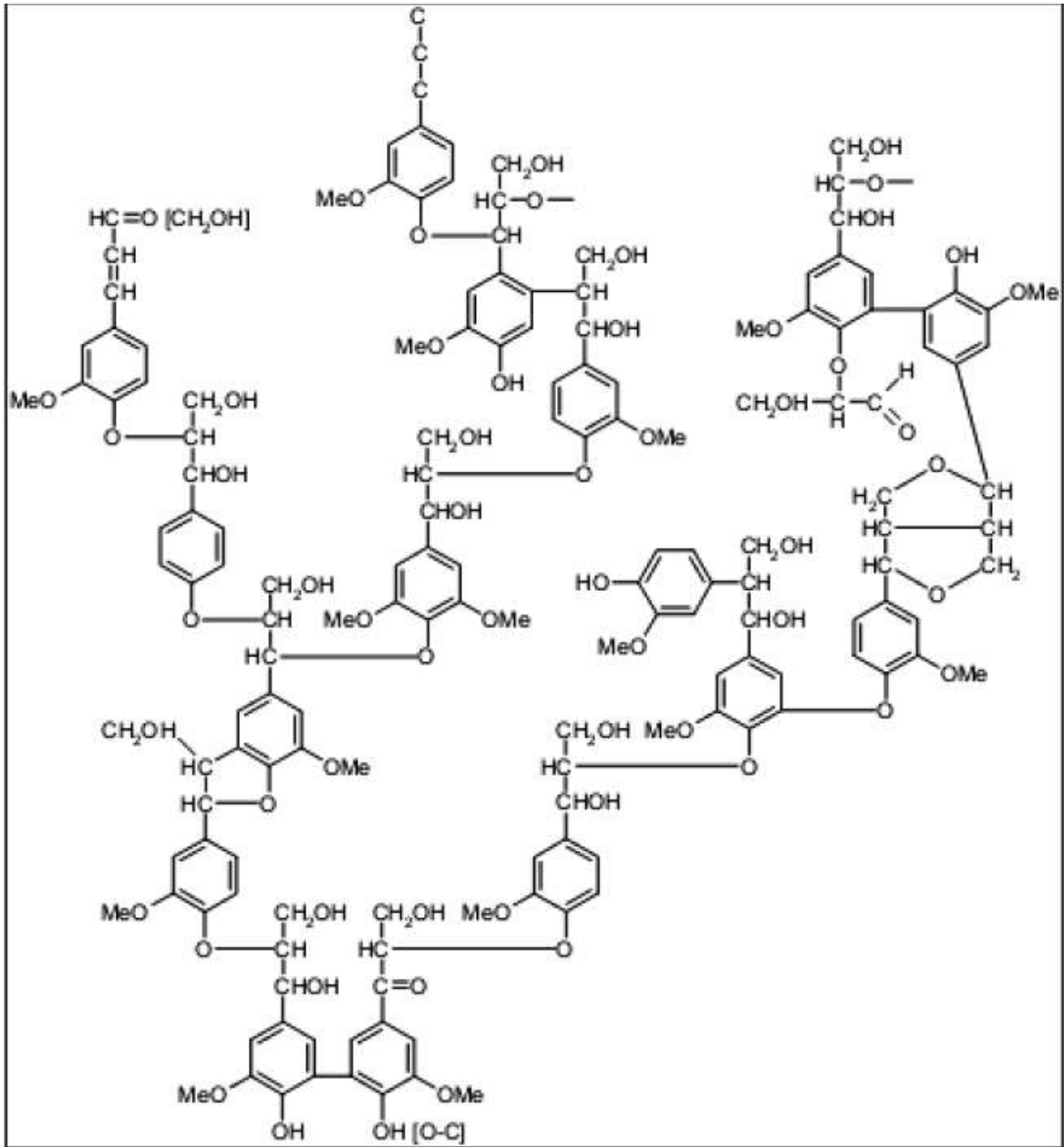


Figura 4. Modelos estructural de la lignina de maderas blandas (Alder, 1977).

## FERMENTACIÓN EN MEDIO SOLIDO

El cultivo solido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales solidos porosos y humedecidos con niveles de actividad de agua de 0.4 a 0.9, el material solido puede ser natural o inerte, siendo el primero, el más usado como sustratos para el crecimiento de los microorganismos (Nigam y Robinson, 2004; Krishna, 2005; Vásquez, 2013).

Mientras que las bacterias y levaduras requieren de una alta actividad de agua ( $a_w > 0.98$ ), los hongos filamentosos pueden crecer con valores de  $a_w$  de 0.85, (Pandey 1992; Vázquez, 2013). El bajo nivel de actividad de agua favorece la germinación y el crecimiento miceliar de los hongos.

Los hongos filamentosos son los microorganismos más adaptados al cultivo en medio solido (*aspergillus*, *claviceps*, *penicillium*, *rhizopus*, *trichoderma*).

La fermentación en estado sólido (FMS), es una tecnología con orígenes ancestrales y consiste en una fermentación con sólidos en ausencia (o cerca a la ausencia) de agua con libre flujo. En este proceso, el sustrato debe de poseer la humedad suficiente, para que el microorganismo crezca y se desarrolle metabólicamente. Este tipo de características, le confiere a la FMS distintas ventajas sobre la fermentación líquida o sumergida, como lo son la simplicidad del medio, maquinaria poco compleja, mayores rendimientos de producto, demanda de energía reducida (Gupta y Kar, 2008), bajo empleo de agua y baja posibilidad de contaminación.

La técnica de FMS fue utilizada por numerosos investigadores para enriquecer en proteína sustratos agrícolas para producir enzimas y otros metabolitos primarios y secundarios. Por lo general los cultivos de microorganismos en medio solido se realizan utilizando sustratos agrícolas (salvado de trigo, bagazo de caña, harina de yuca) a estos sustratos se les agrega una solución de sales y una suspensión de esporas de hongos como inoculante.

A pesar de sus notables ventajas, su escalamiento a nivel industrial se ha venido generando lentamente, debido a las principales dificultades del proceso como lo son la transferencia de calor y de masa y especialmente, la transferencia de oxígeno. Aunque se han empleado diferentes procedimientos (agitación o rotación) para resolver el problema de transferencia, las rupturas generadas por estos métodos afectan la porosidad del medio y el micelio fúngico.

### **Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido.**

Esta tecnología ofrece algunas ventajas frente al cultivo líquido para la formación del producto, destacándose el uso de sustratos más baratos como fuentes de carbono, rendimiento del producto más alta, represión por carbono baja, volúmenes de operación pequeños, baja demanda de agua y energía, productividad volumétrica alta, fácil aireación y simulación del medio de crecimiento natural de los microorganismos (Viniegra Gonzalez y col., 2003)

Algunas desventajas del cultivo sólido, por ejemplo, puede ser necesario el pre tratamiento mecánico y químico del sustrato (molido, hidrolisis con solventes), la determinación de biomasa y la reproducibilidad de los experimentos es difícil por la heterogeneidad de los sustratos empleados, los gradientes de temperatura, oxígenos y pH no pueden ser controlados a gran escala (Holker y col., 2004, Vásquez 2013).

### **Biorreactores**

Los biorreactores, denominados así por las reacciones biológicas que se llevan a cabo en ellos, se pueden clasificar en dos grupos principales: sistemas dinámicos y estáticos. Donde la primera categoría comprende el tambor rotatorio, camas fluidizadas sólido-gas, tambor balanceado, mezclador de paletas horizontal, etc., mientras que la segunda incluye columna empacada, columna charola, entre otros. Ya sea que se empleen para fermentación en estado sólido o líquido, su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado.

## **RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SOPORTE-SUSTRATO.**

Es importante señalar que el término residuo hace alusión a aquellas materias originadas en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico; ello puede deberse tanto a la falta de tecnología adecuada para su transformación y aprovechamiento, así como a la existencia de un limitado mercado para los productos recuperados

Las actividades agropecuarias y agroindustriales dan origen a una serie muy amplia de esquilmos y subproductos que se pueden emplear de diversas maneras para formular alimentos para los animales. Los principales esquilmos derivan en su mayor parte de cereales. El cultivo del maíz es el que contribuye con mayor cantidad de material. Además, existe un volumen importante de pajas de sorgo, trigo, frijol, arroz, cebada, soya, cáscara de algodón y subproductos de la industria azucarera como melaza, puntas de caña y bagazos (SAGARPA, 2010), estos residuos vegetales están constituidos principalmente por biomasa lignocelulósica, siendo los polímeros de celulosa y hemicelulosa los presentes en mayor cantidad.

La cantidad anual de esquilmos oscila alrededor de 45 millones de toneladas de materia seca para los diez principales cultivos (maíz, sorgo, trigo, frijol, arroz, cebada, soya, algodón, cártamo y ajonjolí); el rastrojo y olote de maíz (25, 500,000 toneladas), las pajas de sorgo (6, 600,000 toneladas) y de trigo (4, 500,000 toneladas) representan poco más del 81% de los residuos de cultivos. (SAGARPA, 2007).

El xilano representa la hemicelulosa más abundante de la pared vegetal, siendo un heteropolisacárido con cadenas homopoliméricas centrales  $\beta$ -1,4-ligadas a residuos de D-xilopiranososa, que dependiendo de su origen, también puede presentar residuos de arabinosa, ácido glucurónico y ácido arabino-glucurónico (Saha, 2003; Assamoi y col., 2008). Diversos procesos industriales han sido desarrollados para emplear estos residuos en la generación de productos con valor agregado, como el etanol, proteína celular y enzimas. Estos bioprocesos han sido efectivos en el uso de biosustratos alternativos, ya que pueden reducir los problemas de contaminación causados por éstos desperdicios.

## **Olote de maíz**

Entre las fuentes de recursos no maderables con un alto contenido de xilanos, por lo que ha sido considerado de interés como fuente alternativa de diferentes compuestos químicos de interés comercial o industrial, entre otras fuentes de biomasa se encuentra el olote de maíz. El olote es un residuo o subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (CIMMYT, 1995).

En México, debido a su amplia producción en el país con cifras que rebasan las 35 toneladas anuales el cultivo del maíz es el que más contribuye a este tipo de contaminación, por medio del olote, un subproducto derivado del desgranado mecánico del mismo (SAGARPA, 2010). El olote, ampliamente rico en hemicelulosas con un 34% del cual el 94% corresponde a xilano, se emplea mezclado con otros compuestos en la alimentación ganadera como forraje, pero carece de otra aplicación debido a su escases de nutrimentos (Saha 2003; Gupta y Kar, 2008). A causa de esta concentración de xilano, el olote de maíz se ha venido empleando como sustrato en fermentaciones en medio líquido y sólido, para la producción dirigida de enzimas degradadoras de ésta hemicelulosa (Robledo y col., 2012; Gupta y Kar, 2008).

## **CONCEPTO DE XILANASA Y CARACTERÍSTICAS**

Las xilanasas son enzimas que rompen los enlaces que unen los azúcares en la columna del polímero. Además de las enzimas degradadoras del xilano, se requieren esterases para hidrolizar los enlaces éster entre la columna de xilosas y el ácido acético (acetilxilano esterasa), o ácidos fenólicos.

Existen tres enzimas con acción hidrolítica directa sobre la columna de xilano: endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, exo-1,4- $\beta$ -xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas. De estas, las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas son de particular importancia ya que son las responsables de la hidrólisis del xilano en XOS de menor tamaño que permite la parcial o total solubilización del

sustrato, necesaria para la completa degradación. Esta hidrólisis parcial es también para la hidrólisis de los residuos ramificantes (Saha, 2003; Montoya, 2012).

Los microorganismos según su especie, son capaces de producir una o más formas isoenzimáticas de xilanasas. Se ha demostrado la existencia de glicohidrolasas con actividad sobre más de un tipo de polisacárido. La actividad de estas enzimas es generalmente menos eficiente que la de enzimas con actividad para un solo sustrato (Wong y col., 1988; Montoya., 2012).

## **EL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN**

El procesamiento térmico es uno de los métodos físicos más utilizados para la conservación de alimentos. Una temperatura alta inactiva a los microorganismos y enzimas no deseadas, también deteriora la calidad y los atributos sensoriales. Los consumidores demandan productos mínimamente procesados, con esto, obligan a las compañías de alimentos para optimizar y rediseñar las tecnologías existentes. En este contexto, la evaluación del impacto del proceso en términos de seguridad y calidad de los alimentos es de gran importancia para la evaluación y diseño de procesos. La pasteurización se utiliza hoy en día ampliamente en la producción de diferentes tipos de alimentos, como los productos de frutas, vegetales encurtidos, mermeladas y platos preparados refrigerados. Los alimentos pueden ser pasteurizados en recipientes sellados (análogos a los alimentos enlatados), o en procesos continuos (análogas a las operaciones de llenado aséptico) que incluye intercambiadores de calor, recipientes y hornos (Gary Tucker.2009).

Para ello el efecto del tratamiento térmico puede ser evaluada de dos maneras: desde el análisis de la historia de tiempo-temperatura y la distribución del tiempo de residencia, junto con la cinética de cambio térmico; y de la utilización de un integrador de tiempo-temperatura (TTI) como indicador de la seguridad y la calidad (Lewis & Heppell, 2000).



### **Valores termo cinéticos: Valor D, Z y P**

La destrucción microbiana normalmente sigue una cinética de primer orden. Datos de conteo microbianos pueden, entonces, ser utilizados para determinar los dos parámetros clave que caracterizan la letalidad microbiana: D (el tiempo de calentamiento requerido para reducir la población microbiana en un 90%) y z (el cambio de temperatura que resulta en un cambio de 10 veces en D). Del mismo modo D y z valores se pueden determinar para caracterizar la pérdida de nutrientes.

Así para evaluar los perfiles de inactivación es necesario estudiar, la transferencia de calor que se produce entre la película de agua caliente, generalmente llamado de película descendente, y la superficie del paquete, y desde el paquete al producto alimenticio. La transferencia de calor dentro del producto alimenticio es impulsada por el calor de la conducción y la convección, que induce un gradiente de temperatura dentro del producto alimenticio.

Sin embargo, las desviaciones de temperatura eventuales en una o más de las zonas de calentamiento considerados durante el proceso de pasteurización, pueden acabar con los productos que no cumplan con los requisitos de seguridad o con menor calidad del producto final de lo esperado. En tales escenarios, es de vital importancia para poder garantizar el correcto funcionamiento del proceso o al menos para ser capaz de cuantificar la relevancia de tales perturbaciones en las especificaciones del producto final. (A. Arias-Méndez y col., 2014).

### **LOS INTEGRADORES TIEMPO- TEMPERATURA**

Los TTI se definen como dispositivos sencillos y económicos que indican con una, el cambio fácil de medir el tiempo dependiente de la temperatura, la historia de la temperatura y el estado de la calidad de los alimentos que se unen al cambio irreversible (Taoukis y col., 1991).

Un sistema TTI, puede ser un cambio físico, químico o biológico que se interrumpe durante el calentamiento de una manera reproducible (Mehauden y col., 2008). Dentro de los TTI biológicos, se emplean de gran manera los de tipo enzimático, ya que tienen la capacidad de medir simultáneamente tiempo y temperatura, además

de que son capaces de mimetizar las piezas de un alimento durante su proceso, sin intervenir en el mismo (Guiavarc'h y col., 2004; Mehauden y col., 2008; Gogou y col., 2010).

Una de las enzimas empleadas para este tipo de TTI es la xilanasa, debido a su termo estabilidad (Gogou y col., 2010) y su capacidad de degradar el xilano presente en la pared celular de los vegetales, lo que le confiere la característica de utilizar residuos agroindustriales para su síntesis por diversos microorganismos.

Para ello el TTI a diseñar será en base a la enzima xilanasa, estas enzimas son producidas por hongos, levaduras, algas marinas y algunas bacterias, generalmente son de tipo extracelular, estas son enzimas modulares disfuncionales que presentan un dominio catalítico y un dominio de unión carbohidrato (cbm) ambos dominios son independientes del plegamiento, estructura y función.

Algunos TTI también fueron desarrollados para la evaluación del tratamiento térmico continuo de alimentos líquidos que contienen partículas. Por ejemplo, Tucker, Lambourne, Adams, y Lach (2002) selló un TTI enzimático en pequeñas partículas de silicio que se incorporaron al azar en lotes de grosella negra, piña o de fresa que luego se procesa en un intercambiador de calor de doble tubo. Con el fin de evaluar un proceso continuo de alimentos líquidos sin partículas usando un TTI extrínseco, el componente elegido tiene que ser introducido en el producto alimenticio o en otros medios líquidos (modelo alimentario). Miles y Swartzel (1995a) , por ejemplo, utilizaron Azul # 2 en tampón carbonato-bicarbonato para evaluar la letalidad en un proceso térmico continuo que consistía en dos intercambiadores de calor de doble tubo (calefacción y refrigeración) y un tubo de retención (temperatura de tratamiento entre 75 y 140 ° C. Ellborg y Trägårdh (1994) desarrollaron un método para determinar la distribución de la letalidad en el flujo no isotérmico mediante hidrólisis ácida de dextrano para el procesamiento continuo en el intercambiador de calor de doble tubo. (F.Helena y col, vol. 47, 2012)

### **Requisitos que debe satisfacer un integrador tiempo temperatura (ITT).**

1. El TTI se debe incorporar en el alimento sin transferencia de calor perturbador dentro de la comida.
2. El TTI debe experimentar el mismo perfil de tiempo temperatura que el parámetro bajo investigación.
3. El TTI debe cuantificar el impacto del proceso de un atributo de destino que resulta en una cinética específica, la sensibilidad a la temperatura de la tasa constante del TTI y el objetivo atributo debe ser igual. (A. Van Loey y col, 1999).
4. Debe contener un elemento sensor calibrado y resistente al tratamiento térmico, experimentando la misma evolución de temperatura que experimenta el alimento real.
5. El tamaño del integrador y su geometría deben ser similares al alimento real, con el elemento sensor homogéneamente distribuido en su interior.
6. El soporte debe retener adecuadamente al elemento sensor de forma que no se produzcan pérdidas del mismo durante el proceso de esterilización.
7. Se debe poder incorporar en el producto alimenticio sin producir distorsiones en la transferencia de calor, ni modificar el perfil tiempo-temperatura del alimento.
8. Debe ser barato de producir, fácil y rápido en su preparación, fácil de analizar y de recuperar.
9. Debe tener estabilidad y capacidad para ser almacenado durante largos períodos de tiempo.
10. Debe tener suficiente resistencia física para soportar el proceso de calentamiento sin desintegrarse.
11. La letalidad alcanzada en el integrador debe ser igual a la respuesta de letalidad del factor termolábil usado como indicador (microorganismo, enzima, etc.).
12. El valor z del ITT tiene que ser igual o similar al del factor considerado como indicador.

## **Clasificación de los integradores tiempo temperatura (ITTs)**

Los indicadores pueden clasificarse de acuerdo al tipo de información transmitida, funcionamiento y principios de operación. Generalmente se han usado 3 categorías para la clasificación de los integradores tiempo temperatura.

### **1. Indicadores de temperatura critica(C.T.I.)**

Estos indicadores muestran por medio de un color, que la temperatura de referencia a la cual fue programado, es sobrepasada en algún punto de la cadena de distribución. El C.T.I. no indica la historia térmica a la cual se ha expuesto el producto, solo monitorea que el producto ha sobrepasado una temperatura predeterminada por un tiempo suficiente como para producir un cambio crítico en la calidad del alimento.

### **2. Integrador tiempo temperatura( sobre temperatura critica) (C.T.T.I.)**

Este indicador entrega una respuesta (p.e. cambio de color) que refleja el efecto tiempo-temperatura acumulado sobre una temperatura critica. Son muy útiles para reacciones de deterioro que ocurren a velocidades apreciables solamente por sobre una temperatura critica. (p.e. crecimiento de *Clostridium botulinum*).

### **3. Integradores tiempo temperatura (T.T.I.)**

Los TTI dan una respuesta continua a los cambios de temperatura. Estos integran (en una sola medida) la historia térmica real desde el momento de la activación. También pueden ser usados para indicar la temperatura efectiva (temperatura media) durante la distribución, la que teóricamente puede ser usada para inferir instantáneamente sobre la calidad del alimento.

## **Aplicaciones de los Integradores tiempo temperatura (ITT)**

Los T.T.I. pueden ser usados para el monitoreo de temperaturas en la distribución y almacenamiento de alimentos y de los más diversos productos.

Una clasificación tentativa de las distintas aplicaciones en productos alimenticios seria.

- Monitoreo en la distribución y almacenamiento,
- Optimización de la administración de inventarios
- Predicción de vida útil
- Predicción de calidad sanitaria

Varios estudios se ha concentrado en la aplicación de indicadores para alimentos congelados y refrigerados (p.e. Wells y Singh, 1985; LeBlanc, 1988). Tinker y col., (1985) evaluó filetes de pescado refrigerados. Los resultados demostraron que los indicadores pueden usarse satisfactoriamente para evaluar la calidad del producto durante la distribución.

Las dificultades que presenta el modelamiento de la calidad especialmente cuando el crecimiento de microorganismos es el factor de control. Los parámetros que deben considerarse se pueden resumir en:

- ✓ Conocimiento de la población inicial de microorganismos.
- ✓ Modelo cinético- matemático de crecimiento microbiano.
- ✓ Limite microbiano que corresponda al fin de la vida útil.
- ✓ Probabilidad de crecimiento de patógenos y producción de toxinas.

## **METODOLOGÍA**

### **ETAPA I. CARACTERIZAR EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DEL OLOTE DE MAÍZ PARA SER UTILIZADO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.**

#### **Preparación de la muestra**

Antes de determinar los componentes lignocelulósicos, el oloote de maíz se secó en estufa de aireación a 60 °C por 24 h. A la muestra seca, se le determinó la humedad del oloote de maíz por medio de una termobalanza (Precisa XM50) mediante la colocación de 1 g de muestra a 100 °C durante 3 minutos.

La muestra fue desengrasada en un equipo Soxhlet con un reflujo de 6 h. Posteriormente, se secó en estufa con aireación forzada para después ser utilizada en las determinaciones siguientes. El procedimiento se realizó antes y después de la fermentación del oloote de maíz.

#### **Determinación de lignina**

La lignina aislada recibe distintos nombres según el método usado para aislarlo, aquellos que disuelven los hidratos de carbono dejan como residuo lignina muy condensada y poco reactiva es la lignina Klason.

El método de hidrólisis acida cuantitativa, practica una hidrólisis en dos etapas: la primera con ácido sulfúrico al 72% que hidroliza los polisacáridos en oligosacáridos y una segunda al 4% que rompe los oligomeros en monosacáridos.

La determinación se realizó en base a la norma ANSI/ASTM (American Standard Institute, 1977<sup>a</sup>). Se tomó 1 g de muestra y se disolvió con 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 %, se mantuvo en agitación por 2 h. Pasado el tiempo se le añadió agua caliente hasta obtener una concentración del 4%. Se realizó un proceso de reflujo durante 4 h a ebullición constante. Se filtró usando papel watmman # 1 previamente puesto a peso constante. El residuo obtenido se lavó con agua destilada caliente y se secó en estufa a 105 °C por 24h. Se pesó la placa con la lignina seca y del residuo obtenido se tomó 100mg y se calcinó en mufla a 430 °C por 4 h, obteniéndose así el contenido de materia orgánica.

El contenido de lignina se obtiene sustituyendo los valores en la siguiente formula (Eq 1).

$$\% \text{lignina} = \frac{(p3-p2)(\% \text{molig})(100)}{(p1)(100-\%H)} \quad (1)$$

Donde:

P1 = peso de la muestra en g.

P2 = peso de papel filtro secado a 105 °C

P3 = Peso de muestra seca

%molig = materia orgánica

%H = porcentaje de agua.

La determinación se realizó por duplicado, antes y después de la fermentación.

### **Determinación de celulosa**

La celulosa se determinó por el método de Kurschner & Hoffer (Technical Association for the Pulp and Paper Industries, 1978).

Se le adicionó a 1 g de olote maíz una mezcla de etanol y ácido nítrico en relación 4:1, y se llevó a reflujo en baño maría durante 30 min. Se filtró y se repitió el procedimiento dos veces. Al filtrado se le añadió 25 ml de KOH al 1% y paso a reflujo durante 30 min. El residuo obtenido se secó a una temperatura de 105 °C por 24 h, se enfrió en un desecador y se pesó. El porcentaje de celulosa se obtuvo usando la siguiente formula (Eq 2):

$$\% \text{ celulosa} = \frac{por}{po} * 100 \quad (2)$$

Donde;

Por = peso del residuo en gr

Po = peso anhidro de la muestra en g.

### **Determinación de hemicelulosa**

La hemicelulosa se determinó mediante la diferencia existente entre la lignina y la celulosa.

### **Determinación de cenizas totales**

Las cenizas suelen determinarse por ignición y son el residuo orgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Para determinar la cantidad de materia orgánica presente en el olote de maíz se utilizó la norma de la AOAC (2005).

Se tomó 2 g de olote de maíz y se puso en un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante, fue llevado a una mufla a 430 °C por 4 h, pasado el tiempo se sacó, se enfrió y se pesó.

El porcentaje de cenizas se obtuvo mediante la siguiente fórmula (Eq 3):

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(\text{peso del crisol con cenizas} - \text{peso del crisol solo}) * 100}{\text{g de muestra}} \quad (3)$$

### **Determinación de punto crítico de humedad e índice de absorción de agua**

La determinación del punto crítico de humedad e índice de absorción de agua se llevó a cabo por triplicado y se realizó a los 0 y 72 h

Se pesó 1.25 g de olote de maíz y se le añadió 15 ml de agua destilada, se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. La cantidad centrifugada se pasó a una termobalanza a una temperatura de 120 °C y se monitoreó durante 60 min tomando lectura de humedad cada 5 minutos.

Con los datos obtenidos se calculó el punto crítico de humedad y el índice de absorción de agua.



## **ETAPA II. PRODUCCIÓN DE UN CONSORCIO ENZIMÁTICO EMPLEANDO *RH. PUSILLUS* EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO OLOTE DE MAÍZ COMO SOPORTE-SUSTRATO**

### **Propagación de la cepa**

El microorganismo *Rhizomucor pusillus* se obtuvo del departamento de Ciencia y tecnología de alimentos. Se preparó agar papa dextrosa (PDA,) siguiendo las indicaciones del envase. Se esterilizó en una autoclave automática, se vertió en cajas Petri, se sembró el hongo por estriado y se incubó a 50 °C por 96 h en una incubadora RIOSSA (modelo E-71).

### **Preparación del inculo**

Las esporas producidas en la fase de propagación se cosecharon con 10 ml de solución Tween 80 al 0.1 % previamente esterilizado a 120 °C (15 psi) durante 15 minutos. Una vez cosechadas y recolectadas, se tomaron 100 µL de la suspensión de esporas y se diluyó en 20 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se utilizaron 20 µL de la dilución, se colocó en la cámara de Neubauer y se cubrió con un portaobjetos. Se observó en un microscopio con el objetivo 40X. Las esporas presentes se contaron en los cuadros elegidos (formando una "Z"). Se contaron un total de 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas.

Se determinó el número de esporas por mL utilizando la siguiente fórmula (Eq 4):

$$\text{Esporas/mL} = \text{promedio} \times 250,000 \times \text{factor de dilución} \quad (4)$$

### **Fermentación en medio sólido**

Se pesaron 3 gramos de olate de maíz y se esterilizaron en una autoclave automática (marca Yamatto, modelo SK100C),

El olote se puso en cajas Petri, se inoculo de manera aséptica  $1 \cdot 10^7$  esporas/ por gramo de soporte seco (gss) y 8 ml de medio Czapek-dox. Se sellaron y se incubaron a 50 °C por 72 h (RIOSSA modelo E-71).

### **Obtención del extracto enzimático**

Se preparó una solución de tween 0.1%-NaCL 0.9%, y se vertió 50 ml por cada 3 g. de olote de maíz, se agito por 30 min. Se filtró primeramente en papel Whatman #1, seguido de una segunda filtración en un millipore. Una vez obtenido el extracto se guardó en tubos eppendorf previamente esterilizados. La mitad de estos se llevaron a congelación y la otra parte fue utilizada para medir las actividades enzimáticas correspondientes.

### **Determinación de actividad proteasa (método de kunitz modificado 1946)**

En un tubo de ensaye se adicionó 500 ul de caseína al 1% en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y 1 ml de extracto enzimático. Se incubó a 30°C durante 10 min, la reacción se detuvo con 1 ml de TCA al 0.4 M para la muestra. En el Testigo el extracto enzimático se adicionó hasta el final del procedimiento y en el blanco se sustituyó con buffer fosfato 50 mM pH 7.0.

Detenida la reacción se centrifugó a 19,100 G durante 10 minutos. Se tomó solo el sobrenadante y se incubo a 30°C durante 30 minutos. Se leyó a 660 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). La evaluación se realizó por triplicado y se realizó una curva patrón con L-Tirosina al 1% en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 (Anexo).

Para la determinación de las actividades enzimáticas siguientes se usó el método de determinación de azucres reductores (*Miller, 1959*) como método indirecto para la cuantificación enzimática.

### **Determinación de actividad xilanasa**

Para la medición de actividad xilanasa se utilizó el método de *Bailey y col.* (2006), empleando xilano de abedul como sustrato para la reacción.

Se prepararon tres tubos. La muestra de reacción (extracto enzimático + sustrato), el blanco de enzima (enzima + buffer de acetatos) y el blanco de sustrato (sustrato + buffer de acetatos). Se pusieron a reaccionar en un baño maría a 50 °C por 10 min. Deteniendo la reacción con un baño de hielo.

Se determinó la cantidad de azúcares liberados, por el método de *Miller* (1959). La determinación se hizo por triplicado y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). Se comparó con una curva patrón de xilosa al 1%.

### **Determinación de actividad endocelulasa**

Se preparó carboximetil celulosa a 100 ppm (sustrato), buffer de acetatos (0.1 M, pH 4.8) y citratos (50 mM. A pH 4.8).

En un tubo de ensaye (13 x 100) se preparó el blanco de enzima (200 µL de buffer + 50 µL de extracto enzimático), blanco de sustrato (200 µL de sustrato más 50 µL de buffer y muestra de reacción) y muestra reacción (200 µL de sustrato más 50 µL de extracto enzimático). Los tubos fueron llevados a un baño maría a 50 °C por 10 min, para después detener la reacción en un baño maría a ebullición.

La determinación se realizó por triplicado para mayor confiabilidad de los datos y se leyó absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). Se comparó con una curva patrón de glucosa al 1%.

### **Determinación de actividad exocelulasa**

Para la determinación de actividad exocelulasa se utilizó como reactivos: buffer de ácido cítrico/citrato de Na 0.1 M a pH 4.8 y reactivos para la determinación de azúcares reductores. Como sustrato se utilizó papel filtro Whatman #1 de 1cm\*6cm

En un tubo de ensaye se hizo reaccionar el blanco de enzima (1 ml de buffer + 50 ul de extracto enzimático), blanco de sustrato (1 ml de buffer+ 1 tira de papel filtro) y la mezcla de reacción (50 ul de extracto enzimático+ 1ml de buffer+ 1 tira de papel filtro). Los tubos fueron llevados a un baño maría a 50 °C por una hora y se detuvo la reacción en un baño de hielo por 5 min. Después se midió los azúcares reductores presentes en cada tubo. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado y fue leído a 540 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV) y se comparó con una curva patrón de glucosa al 1%.

### **Evaluación de azúcares totales y azúcares reductores**

Los azúcares totales y reductores se evaluaron por el método de Dubois et al. (1956) con fenol-sulfúrico y por el método de Miller et al., (1959) con ácido dinitrosalilico (DNS) respectivamente del extracto enzimático filtrado. La cantidad de azúcares se determinó en diferentes tiempos (0 y 72 h) por triplicado. Las muestras tratadas se leyeron a 480 nm para azúcares totales y 540 para azúcares reductores (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). Se preparó una curva patrón de azúcares totales y una curva patrón de azúcares reductores (Anexo).

### **ETAPA III. DESARROLLAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA (ITT) A BASE DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO, EMPLEANDO DIVERSOS TAMAÑOS DEL INTEGRADOR.**

#### **Preparación del ITT**

Los ITT fueron preparados con tubos de polipropileno obtenidos en una tienda comercial. Las medidas de los ITT fueron: diámetro de 0.6 mm, grosor de 1 mm y una longitud variante de 5 mm, 10 mm y 20 mm, hasta seleccionar la mejor. Se introdujo un volumen de extracto enzimático y se sellaron ambas partes con silicón de alta temperatura (Dow Corning 736, silicón de alta temperatura). Los ITT fueron refrigerados hasta la etapa de inactivación de la enzima.

## Evaluación del diseño del ITT

La evaluación de los integradores tiempo temperatura se llevó a cabo de la siguiente manera: Se realizaron diferentes tamaños del ITT y se determinó la capacidad de extracto que podía contener cada medida (Tabla 1). Además se analizó los diferentes volúmenes a la cual la actividad xilanasa podía ser cuantificada (Tabla 2).

Tabla 1. Evaluación del tamaño ideal para la realización de los ITT y su determinación enzimática en el proceso térmico convencional.

Tamaño del integrador (mm)	Capacidad en Volumen (ml)
5	0.160
10	0.235
20	0.251

Tabla 2. Volúmenes usados para determinar la cantidad ideal para la cuantificación del extracto enzimático

Cantidad (ul)	18.75	37.5	75	150	350
---------------	-------	------	----	-----	-----

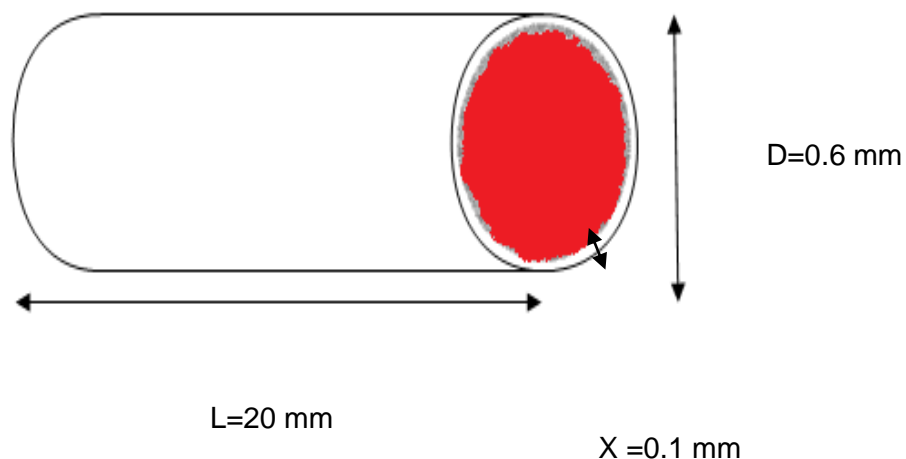


Figura 5. Representación gráfica del integrador tiempo temperatura.

## Características del integrador tiempo temperatura

Tabla 3. características del polipropileno.

<b>Calor específico</b>	1700-1900 J/k kg
<b>conductividad térmica</b>	0.22 W/km
<b>Difusividad térmica</b>	5.8 m/s <sup>2</sup>

## ETAPA IV. EVALUAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA EN UN PROCESO DE PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL.

### Preparación del jugo

Las frambuesas utilizadas se obtuvieron de un supermercado local. Se licuo en una licuadora convencional. Se filtró para separar las semillas y se determinó el pH y los grados Brix.

### Determinación de pH

El pH de jugo de frambuesa se midió en un potenciómetro digital (HANNA INSTRUMENTS, pH 213). La determinación se llevó cabo por triplicado.

### Grados Brix

Los grados Brix fueron ajustados según la norma (NMX-F-103-2982 alimentos, frutas y derivados, determinación de grados Brix), para ser considerado jugo de frambuesa. Se realizó un balance de materia y se prosiguió a medir los grados Brix con un refractómetro de 0-56 grados Brix.

### Aplicación de los integradores tiempo temperatura

Los integradores tiempo temperatura se utilizaron para medir cuanto se inactivación de la enzima xilanasa simulando de esta forma la inactivación de los microorganismos presentes en el jugo de frambuesa

El jugo se vació en envases de vidrio de 250 ml, el cual se esterilizo antes de su uso, se introdujeron los ITT dentro del envase y enseguida se llevó a un baño maría,

usando la temperatura de evaluación (85 °C/ 10 min.).Se realizó por triplicado para mayor confiabilidad de los datos.

Una vez pasado el tiempo de evaluación, los envases fueron pasados a un baño de hielo durante un tiempo de 30 minutos, para llevar a cabo el choque térmico para inactivar los microorganismos.

Una vez pasado el tiempo en el baño de hielo los tubos fueron sacados del envase, se prosiguió a recuperar el extracto enzimático y se puso en tubos de ensaye de vidrio para posteriormente determinar la actividad enzimática residual de cada muestra usando el método de azúcares reductores (Miller, 1959).Una vez obtenido los datos se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el valor D, z y P, usando como temperatura de referencia los 85 °C. Estos parámetros se definen de la siguiente manera:

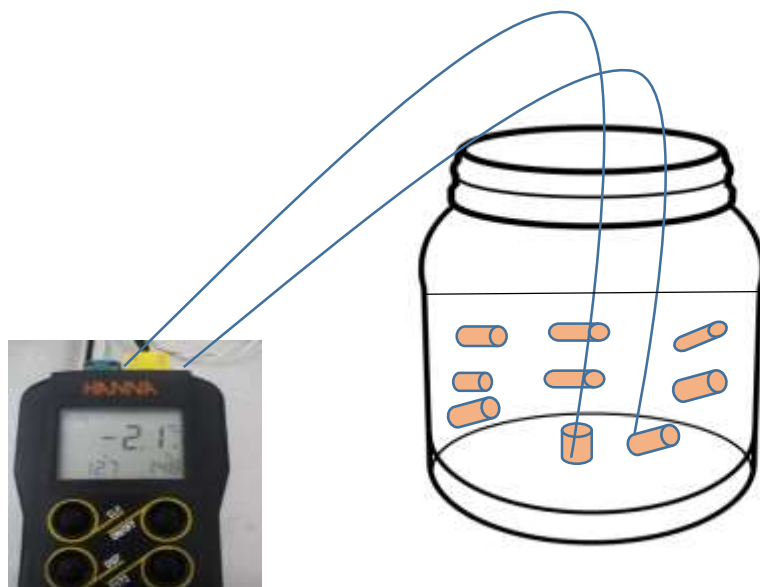


Figura 6. Ubicación del ITT dentro del envase.

## Calculo del tiempo de reducción decimal o valor D

El valor D de reducción decimal se define como el tiempo necesario para inactivar, a una temperatura constante, un 90% de la actividad enzimática original.

$$\text{Log} \frac{A}{A_0} = -\frac{t}{D} \quad \text{Eq.5}$$

Por lo tanto, la relación entre K y D es:

$$\frac{1}{D} = \frac{k}{2.303} \quad \text{Eq.6}$$

Obteniéndose de esta forma:

$$D = \frac{2.303}{k} \quad \text{Eq.7}$$

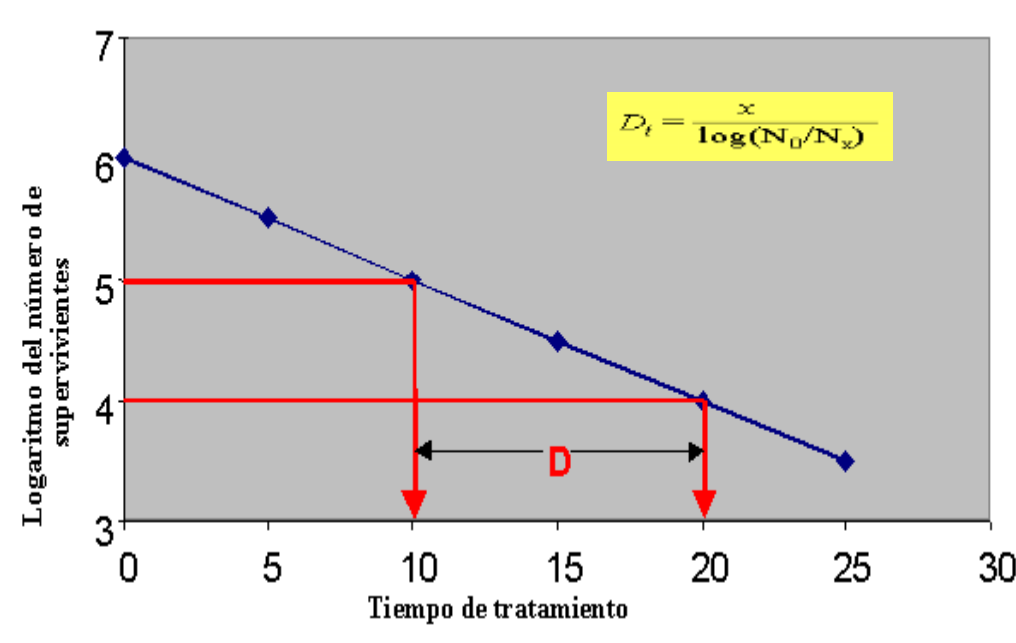


Figura 7. Ejemplo de cinética de termo destrucción.



$$Dt = \frac{x}{\log(N_0/N_x)}$$

**Donde:**

$N_0$ = Número de células al inicio del tratamiento,

$N_x$ = Número de células supervivientes después de un tratamiento,

$x$ = minutos a una determinada temperatura  $t$ .

### Cálculo del valor $z$

Es el cambio de temperatura que se requiere para modificar el valor  $D$  por un factor de 10.

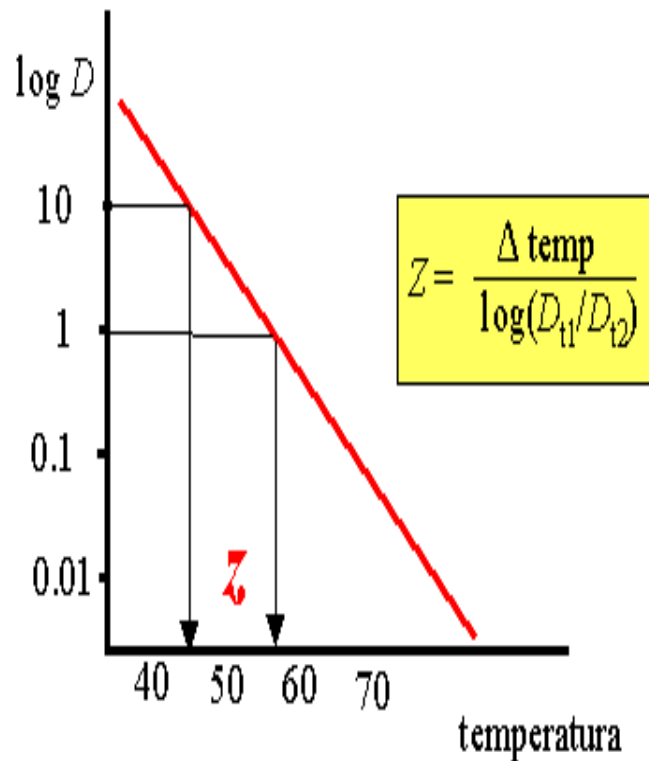


Figura 8. Grafico del valor  $Z$  y formulas.

$$z = \frac{\Delta temp}{\log(Dt_1/Dt_2)} \quad \text{Eq. 6}$$

**DONDE:**

$\Delta\text{temp.}$  = Incremento de la temperatura.

Dt1, Dt2= Valores respectivos de D.

Los valores D y z varían para cada microorganismo y para cada condición. Las esporas, por ejemplo, tienen valores D mucho más altos que las células vegetativas de los mismos microorganismos.

**Valor pasteurizador de un tratamiento térmico**

La cuantificación de la letalidad de un tratamiento térmico de pasteurización se realiza comparándolo con otro de letalidad conocida (Shapton, 1966; Shapton y col., 1971). La relación entre la letalidad de dos tratamientos de pasteurización se podrá conocer obteniendo el cociente de sus parámetros D:

$$LT = \frac{D^*}{D} = 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad \text{Eq. 6}$$

Esta sería la relación entre la letalidad de dos tratamientos de 1 minuto, uno de ellos realizado a la temperatura de referencia ( $T^*$ ) y el otro a una temperatura cualquiera ( $T$ ), para un microorganismo que tenga como parámetro de termorresistencia z. Si el tratamiento se prolonga por t minutos:

$$P = LT * t = t * 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad \text{Eq.7}$$

Con esta expresión se halla el valor del parámetro P (valor pasteurizador), que será la unidad de comparación con la que se medirán los distintos tratamientos aplicados después de haber elegido una temperatura de referencia ( $T^*$ ) y un microorganismo de referencia que fije el valor de z. Una vez determinados esos  $T^*$  y z de referencia, al valor pasteurizador en esas condiciones se le denomina P0. En los procesos de pasteurización se suele elegir como temperatura de referencia 70°C y z=10

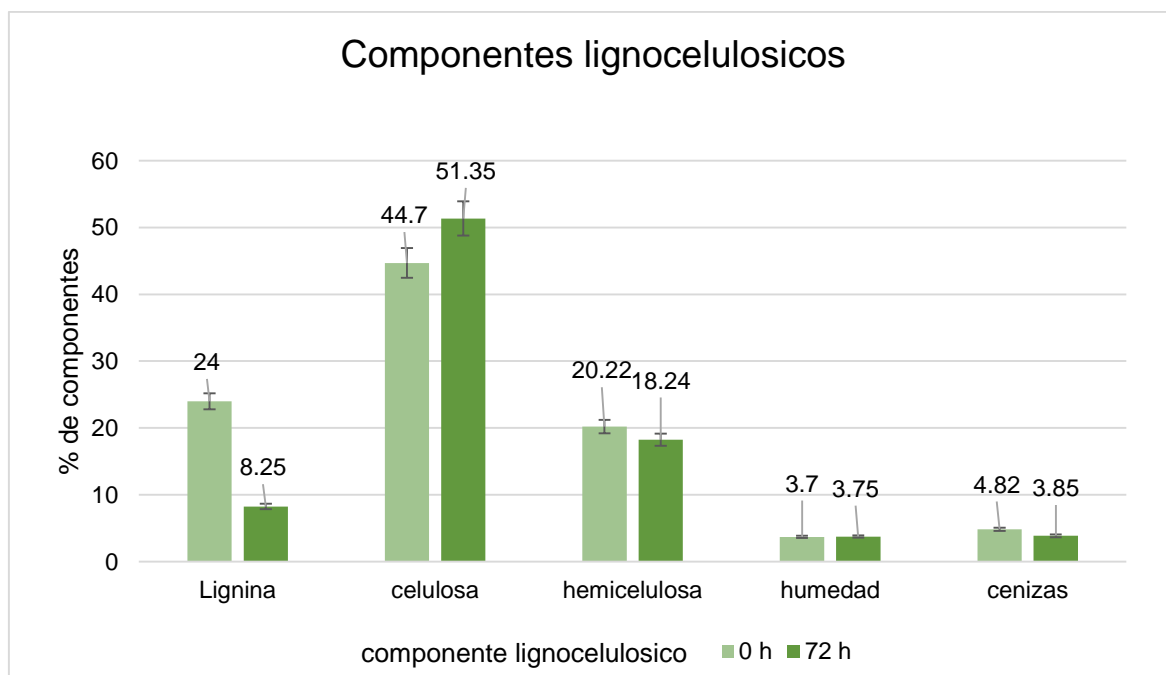
## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### ETAPA I. CARACTERIZAR EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DEL OLOTE DE MAÍZ PARA SER UTILIZADO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.

#### Componentes obtenidos del análisis bromatológico.

En el grafico 4 se observa los resultados obtenidos del análisis bromatológico que se realizó, antes y después del proceso de fermentación, el cual fue de 72 hr. Antes de determinar los componentes lignocelulósicos del olate de maíz, se llevó a cabo un reflujo con hexano, un solvente que permitió retirar el contenido de grasa en la muestra para evitar interferencias en los resultados de lignina y celulosa.

Las características de la lignina después de llevar a cabo el procedimiento correspondiente, fue de un polvo con partículas muy finas y de color oscuro, este color fue debido al uso de  $H_2SO_4$  durante los reflujos realizados. En lo que respecta a la celulosa, el olate tuvo una consistencia muy suave y de un color amarillo, debido a las características del reactivo usado. En ambos el proceso de reflujo permitió retirar todos los componentes del olate que pudieran afectar los resultados que se muestran en el grafico 4.



Grafica 1. Componentes lignocelulósicos del olate de maíz obtenidos en esta investigación.

En el grafico 4 se observa que durante el tiempo inicial la lignina y la hemicelulosa tienen valores mayores con respecto al tiempo final (72 h) con valores de 24% y 20.22%, respectivamente, contrario a la celulosa, ya que presento un 44.7 %.

La suma de los componentes es un total de 97. 44 %, sin embargo no se determinó proteína y grasa, la cual correspondería al por ciento faltante.

También se puede observar que la lignina, fracción insoluble del olote disminuye al pasar las 72 hr., esto debido a las diferentes actividades enzimáticas que se llevan a cabo durante el proceso de fermentación, el cual permitió eliminar parcialmente algunos componentes de la fracción insoluble.

La hidrolisis enzimática que se llevó a cabo permitió que componentes de la fracción insoluble disminuyeran, y de esta manera tener más accesibilidad a la fracción soluble como lo es la celulosa (Villanueva, 2007), la cual tuvo un aumento de 6.65%.

Se puede observar que la celulosa no aumenta de manera considerable, debido al tiempo de fermentación. Si fuera más tiempo de fermentación posiblemente la celulosa aumente conforme el paso de tiempo y podría presentarse más presencia de la fracción soluble.

En cuanto a la cantidad de cenizas Córdoba y col. (2014) indica haber obtenido un 2.0 %, mientras que en los experimento realizados se muestra un 4. 82% (t0) después de la fermentación un 3.85%.

Tabla 4.Comparacion de componentes lignocelulósico con diferentes autores.

<b>COMPONENTES (%)</b>	<b>Olote de maíz*</b>	<b>Córdoba y col,2013</b>	<b>Garrote y col, 2007a)</b>	<b>Rivas y col, 2004)</b>
<b>HEMICELULOSA</b>	20.22±0.01	33.6	31.1	39.0
<b>CELULOSA</b>	44.70± 0.03	45	34.3	34.3
<b>LIGNINA</b>	24±0.04	15.8	18.8	14.4
<b>KLASON</b>				

\*resultados obtenidos en esta investigación durante el T 0.

Comparando los resultados con otros autores, se muestra las diferencias de los resultados. (Villanueva, 2007) menciona que es necesario un pre tratamiento antes de realizar la fermentación, ya que esto permite una mejor accesibilidad a los componentes lignocelulósico y por lo tanto que la degradación de estos sea más fácil.

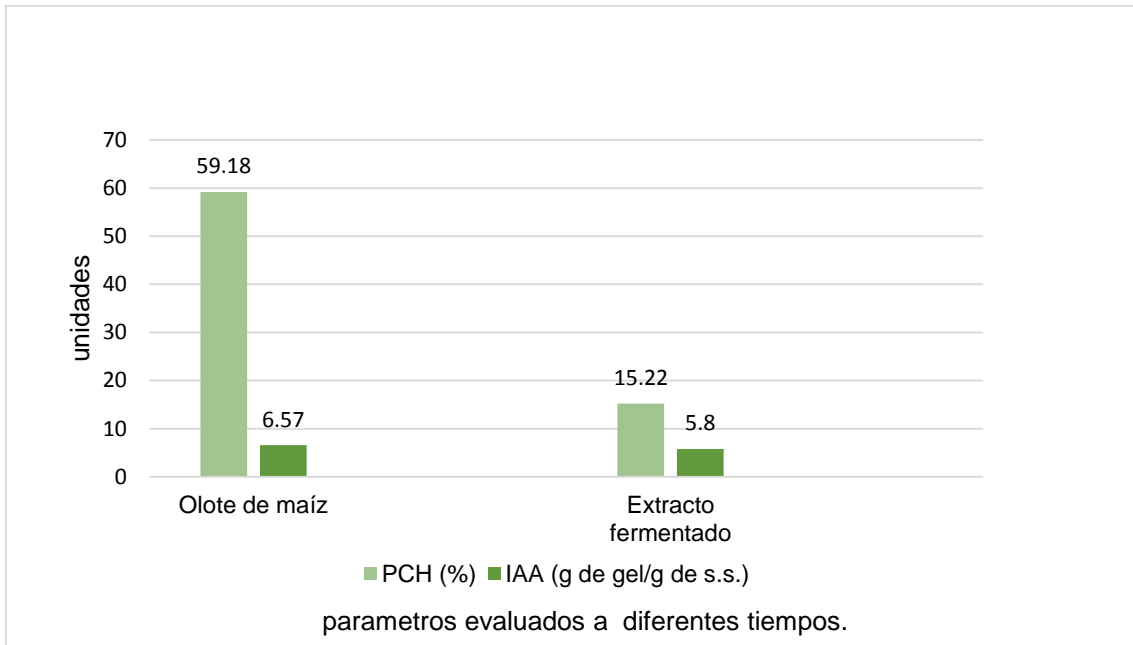
El uso de enzimas xilanolíticas durante el proceso de hidrolisis también tienen efectos positivos en cuanto a la accesibilidad de las fibras de celulosa, ya que estas rompen la estructura polimérica de la hemicelulosa (Mesa, 2010).

### **Índice de absorción de agua y punto crítico de humedad.**

En el gráfico 2 se muestra los resultados de la evaluación realizada al olote de maíz, en cuanto al punto crítico de humedad e índice de absorción de agua. Las características del olote de maíz antes de someterlo a la evaluación correspondiente, fue que presentaban un tamaño de 1 mm (malla # 30), una textura porosa y granulada, además estaba muy deshidratado, ya que fue sometido a procesos de limpieza y secado.

El índice de absorción de agua (IAA) es la cantidad de agua que puede ser absorbida por el soporte (Robledo y col. 2013). Basándose en este concepto el olote tiende a absorber poca agua, ya que únicamente hubo una disminución de 0.77 %. Esto indica que el olote de maíz absorbe poca cantidad de agua que podría afectar la fermentación.

El punto crítico de humedad (PCH), representa la cantidad de agua ligada al soporte que no puede ser empleada por el microorganismo y se encuentra fuertemente relacionado con la actividad de agua ( $a_w$ ), (Robledo A. 2006) el cual se define como la relación entre la presión de vapor de agua en el sustrato del cultivo y la presión de vapor en el agua pura.



Grafica 2. Punto crítico de humedad e índice de absorción de agua del olate de maíz a las 0 hr y 72 hr.

La actividad de agua requerida por los hongos filamentosos es mayor a 0.80, por lo tanto, los hongos filamentosos son capaces de crecer en substratos con una actividad de agua mucho menor (mucho más secos).

En el grafico 2 se observa que el punto crítico de humedad del olate de maíz antes del proceso de fermentación es de 59.18 % y el extracto solido fermentado presenta un 15.22%, esto indica que hubo una reducción de un 43,96 % del agua ligada del olate de maíz, este valor en relación con el índice de absorción de agua, estaría indicando que el sustrato no contiene mucha humedad, por lo tanto el microorganismo utiliza toda el agua disponible, además del agua ligada para poder realizar sus procesos bioquímicos. La literatura menciona que cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con una actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada.

**ETAPA II. PRODUCIR UN CONSORCIO ENZIMÁTICO EMPLEANDO *RH. PUSILLUS* EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, UTILIZANDO OLOTE DE MAÍZ COMO SOPORTE-SUSTRATO.**

**Productos obtenidos del proceso de fermentación en medio sólido.**

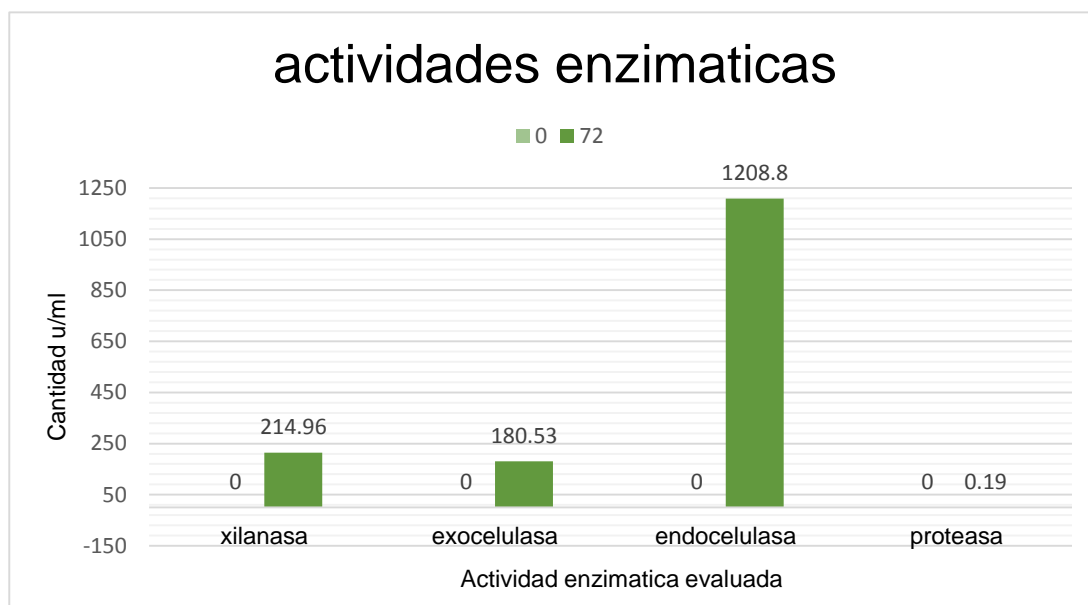
El tiempo de fermentación fue de 72 horas, debido a que diversos estudios muestran que es el tiempo en el que la producción enzimática es mayor en comparación con otros tiempos de fermentación usando como sustrato el olate de maíz.

En las primeras 24 h. de incubación, el sustrato no presentó ninguna diferencia en comparación con el tiempo 0.

A las 36 horas se presentó crecimiento de micelio sin esporular de color blanco, a los 48 h. se vio un crecimiento con un gran número de esporas, presentando un color grisáceo y a los 72 h. se presentó un crecimiento mayor, cubriendo toda la caja Petri con micelio y esporas y presento gris oscuro.

Tabla 5. Actividades enzimáticas obtenidas del experimento.

<b>Actividad enzimática(u/ml)</b>	<b>xilanasa</b>	<b>Exo-elulasa</b>	<b>Endo-celulasa</b>	<b>proteasa</b>
0 h	0.0	0.0	0.0	0.0
72 h	214.96 ±0.00	180.53±120. 35	1208.88±160.74	0.19±0.18



Grafica 3. Resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas.

La actividad xilanasa obtenida fue de 214.96 u/ml

Por diferentes factores puede aumentar o disminuir la actividad xilanolítica, tales como el pH, un estudio realizado por Vázquez (2013), usando *aspergillus sp.* Indica que el pH óptimo del extracto enzimático debe ser de 7, mientras que el usado en el experimento usando *rhizomucor pusillus* fue de 4.9, el cual es un pH bajo.

Además también puede estar influenciada por la temperatura, ya que el mismo autor indica que a temperaturas de 50°C a 60°C se puede determinar la máxima actividad enzimática de xilanasa.

Se presentó cierta actividad proteasa lo cual no fue considerable, debido a que esta enzima tiene una alta producción a un pH de 7.0 (8), y el extracto analizado estuvo a un pH de 4.9.

Se presentó una mayor producción de la enzima celulosa, seguida de la xilanasa, lo cual indica que el hongo utilizado tiene el potencial para producir estas enzimas durante un tiempo específico (72 h).



## Azúcares presentes en el extracto enzimático.

Tabla 6. Azúcares presentes en el extracto de olote de maíz antes y después del proceso de fermentación.

Tiempo	Azúcares totales(mg/ml)	Azúcares reductores(mg/ml)
0 h	1580.48 ±16.56	0.42 ± 0.01
72 h	229.29±5.05	0.26±0.00

Los azúcares totales se reducen considerablemente, debido a la alta producción de enzimas que por medio de la hidrólisis de los azúcares, le permiten al microorganismo la obtención de energía, esto debido a las características fisicoquímicas, tales como el tamaño y superficie de las fibrillas y la estructura amorfa del material celulósico (Acosta y Col, 2013). Estas características también permiten que la absorción de agua en el sustrato sea alta (Tabla de IDAA), y disminuya al someterse al proceso de fermentación.

### ETAPA III. DESARROLLAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURA A BASE DEL EXTRACTO ETAPA ENZIMÁTICO, EMPLEANDO DIVERSOS TAMAÑOS DEL INTEGRADOR.

#### Capacidad y tamaño del integrador tiempo temperatura.

En esta etapa se utilizó un tamaño de integrador de 20 mm de largo y 6 mm de diámetro con una capacidad de 0.251 ml, ya que este tamaño fue más manejable para poder realizar correctamente los experimentos.

El de 5 y 10 mm fueron muy difíciles de manejar debido, al tamaño muy pequeño, además el pegamento se despegaba con facilidad.

La resistencia del pegamento con relación a la temperatura, se evaluó sometiéndolo a diferentes valores de temperatura. Para la temperatura de 65°C durante 30 min., no se vio efectos en el pegamento, para las temperatura de 85 °C durante un 15 min, a un cuarto del total de integradores se les despegó el pegamento ya que no resistieron la temperatura y para los integradores evaluados a 95°C durante 15 min.

Se les despegó todo el pegamento, ya que fue una temperatura muy alta y tuvo efectos significativos en el ablandamiento del mismo.

El polipropileno es un termoplástico comercial, semicristalino, blanco semiopaco elaborado en una amplia variedad de calidades y modificaciones. El homopolímero polipropileno tiene una dureza y una resistencia térmica superiores a las del polietileno de alta densidad pero una resistencia al impacto inferior y se vuelve quebradizo por debajo de  $-0^{\circ}\text{C}$  (GOODFELLOW, 2016)

Tabla 7. características del ITT evaluado

Tamaño del integrador (mm)	Capacidad en Volumen (ml)
20	0.251

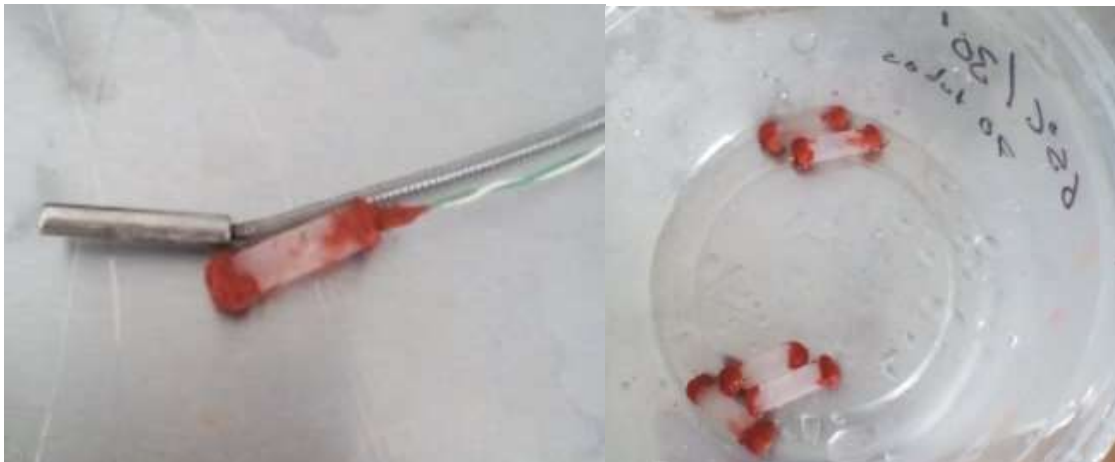


Figura 9. Integrador tiempo temperatura.

### Trasferencia de calor del material con agua y el jugo de frambuesa

Se evaluó la transferencia de calor del polipropileno usando agua y jugo de frambuesa usando la siguiente ecuación. (Eq. 8) para poder comparar la velocidad de transferencia de calor de la parte externa a la parte interna del integrador tiempo temperatura evaluado con agua y con jugo de frambuesa.

La transferencia de calor se define como la energía en tránsito debido a una diferencia de temperaturas. (Frank P, 2000).

$$\frac{Q}{L} = \frac{2\pi r_2(T_1 - T_2)}{\frac{r_2}{k} \ln \frac{r_2}{r_1}} \quad \text{Eq. 8}$$

Con agua

$$\frac{Q}{L} = \frac{2\pi(85.6^\circ\text{C} - 85.1^\circ\text{C})}{\frac{1}{0.22\text{W/mk}} \ln\left(\frac{0.00035\text{ m}}{0.0003\text{ m}}\right)}$$

$$\frac{Q}{L} = \frac{3.1415}{0.7006}$$

$$\frac{Q}{L} = 4.4841 \text{ W/m}$$

Con jugo de frambuesa

$$\frac{Q}{L} = \frac{2\pi(87.7^\circ\text{C} - 85.6^\circ\text{C})}{\frac{1}{0.22\text{W/mk}} \ln\left(\frac{0.00035\text{ m}}{0.0003\text{ m}}\right)}$$

$$\frac{Q}{L} = \frac{13.194}{0.7006}$$

$$\frac{Q}{L} = 18.832 \text{ W/m}$$

La velocidad de transferencia de calor usando agua fue de 4.48 W/m, el cual fue menor en comparación con el jugo de frambuesa que fue de 18.83 W/m. esto podría ser por la viscosidad del líquido, ya que es mucho más fluido que el jugo de frambuesa, además el jugo de frambuesa contenía pulpa, el cual influyo en velocidad de la transferencia de calor.

Para la mayoría de los líquidos, la conductividad térmica disminuye con el aumento de la temperatura, pero el agua es una excepción notable. La conductividad térmica de los líquidos es insensible a la presión, excepto cerca del punto crítico. Como regla general la conductividad térmica de los líquidos disminuye con el aumento en el peso molecular. (Frank y col. 2012)

En relación a la conductividad térmica reportados por la literatura, el jugo de frambuesa a una temperatura de 15.57°C tiene una conductividad de 0.571 W/m°C, en el caso del agua la conductividad térmica a 15 °C es 0.674 W/m°C.

#### **ETAPA IV. EVALUAR EL INTEGRADOR TIEMPO TEMPERATURAS EN UN PROCESO DE PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL.**

##### **Características del jugo de frambuesa**

Para obtener el jugo, se procedió a licuar la frambuesa, se pasó por un colador para retirar todas las semillas que contenía. El jugo presento un color rosa, de consistencia muy espesa. Para realizar la evaluación de pH se introdujo el electrodo a los envases. Para la determinación de los grados brix se tomó una pequeña muestra y se puso en el sensor. Después del proceso térmico se esperó 30 min, para que la muestra se enfriara y evaluar los parámetros nuevamente.

Las características de pH y grados brix del jugo de frambuesa no se vieron afectadas por el incremento de la temperatura ya que se obtiene los mismos datos antes y después del proceso térmico al que fue sometido.

Tabla 8. Características fisicoquímicas del jugo de frambuesa.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>ANTES DEL PROCESO TÉRMICO</b>	<b>DESPUÉS DEL PROCESO TÉRMICO</b>
<b>Grados brix</b>	6.9±0.082	6.9 ±0.082
<b>pH</b>	2.98±0.013	2.98 ± 0.013

El Codex (STAN 247) indica que los grados brix para zumo de frambuesa es de 8.0, el cual comparado con el evaluado en el experimento ligeramente mayor, esto podría ser por las diferentes variedades de frambuesa.

En el caso del pH, se observa que el jugo de frambuesa es altamente ácido, el cual coincide con la literatura que indica que es de 2.6 a 2.9. (Berries del sur, SAC).

### Parámetros cinéticos obtenidos: valor D, z y P

En esta etapa se realizó la inactivación de la enzima xilanasa, simulando la inactivación de los microorganismos presentes en el jugo de frambuesa. El cual permitió conocer el tiempo y la temperatura necesarios para llevar a cabo el proceso de pasteurización.

El concepto tradicional para los proceso de pasteurización es el concepto 6D, lo que significa que una reducción del ciclo logarítmico de 6 log en número microbianos se considera suficiente (Robledo y col, 2014, Van Boekel, 2002).

Para la evaluación del Integrador tiempo temperatura se utilizó una temperatura de referencia de 85°C con un tiempo de 10 minutos.

Tabla 9. Valores termocinéticos.

VALORES	Valor D	Valor z	Valor P	Valor F
	94.2 °C	10 m	7.52±0.3056501	1.148

El valor P se obtuvo usando la actividad inicial de la xilanasa presente en consorcio enzimático y la actividad final presente después del proceso térmico aplicado.

El valor P obtenido no presentó diferencia significativa, por lo que indica que el proceso térmico aplicado a los tres envases fue adecuado.

Cálculo del valor de letalidad

$$L_T = 10^{\frac{T-T^*}{z}} = 10^{\frac{85.6-85}{10}} = 1.1148$$

Calculo del tiempo real

$$t = \frac{P}{L_T} = \frac{7.52}{1.148} = 6.550$$

Usando la Eq. 7 se obtuvo el tiempo necesario de pasteurización con un valor de 6.5 min., con el cual se logra una reducción logarítmica de 6D, ya que en la evaluación realizada se utilizó un tiempo de 10 min, esto indica que el proceso térmico se sobrepasó en tiempo.

En un estudio, se evaluó los rangos de medición de un ITT de amilasa proveniente de *Bacillus licheniformis*, para alimentos ácidos, en cual se usó un tiempo y una temperatura de referencia de 5 min a 85 °C, obteniendo los siguientes valores cinéticos, un valor D de 8-10 °C, un valor z de 9.0-9.5.(Tucker y col,2008).

El valor D obtenido en este trabajo fue de 94. 2, el cual indica que la enzima xilanasa proveniente de *Rhizomucor pusillus* es estable a temperaturas altas. Robledo y col (2015) realizaron un estudio sobre el termo estabilidad de la enzima xilanasa, y en el cual indica que es estable a 75 °C, presentando una máxima actividad enzimática a 70 °C.

En relación con el valor z, se obtuvo un valor de 10 °C, Tucker y col (2008) indican que un microorganismo formador de esporas exhibirá valores z de 9 a 11°C, por lo tanto el valor z obtenido es adecuado.

## CONCLUSIONES

Con este trabajo concluimos.

Que el olote de maíz tiene altos niveles de componentes lignocelulósicos, en especial de celulosa y niveles aceptables de lignina y celulosa. Esto permite usar el olote de maíz en el proceso de fermentación en medio sólido, ya que el microorganismo utilizado *Rhizomucor pusillus*, demuestra tener la capacidad de degradar los componentes del olote de maíz.

El microorganismo *Rhizomucor pusillus* demuestra ser buen organismo productor de enzimas, en específico celulasas y xilanas, ya que presentaron niveles altos actividad enzimática.

La inactivación de la enzima xilanas simuló adecuadamente la inactivación de microorganismos presentes en el jugo de frambuesa, por lo que puede ser usado como integrador tiempo temperatura en procesos de pasteurización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**AOAC 923.03** Cap. 32, pág 2. Official Methods of Analysis 18<sup>th</sup> Edition, (2005).

**A. Arias Mendez, C. Vilas, A. A. Alonso, E. Balsa-Canto.** (2014). Time-temperature integrators as predictive temperature sensors. *Food Control* ,44 (2014) 258-266.

**A. Robledo, C. N. Aguilar, R. E. Belmares, A. C. Flores, J. C. Contreras, J.C. Montañez, S. I. Mussatto.** (2015). Production of thermotolerant xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage, *Journal of food*, ISSN 1947-6337, ISSN-e 1947-6345, Vol. 14, N<sup>o</sup>. 2, 2016, págs. 302-308.

**A. Van Loey, M. Hendrikx, S. de Cordt, T. Haentjens, P. Tobback.** (1996). Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators, *Trends in Food Science & Technology*, vol 7, pp 16-26.

**A.F. Elena, A.S. Yamashita, J. A. Wilhelms Gut.** (2012). Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. *Food Science and Technology*, vol 47, pag 111.

**Ajay Pal, Khanum, Farhat.** (2010). Purification of xylanase from *aspergillus niger* DFR-5 individual and interactive effect of temperature and Ph on stability. *Process biochemistry*,

**Ashutosh Kar** (2008); *Pharmaceutical Microbiology*; Copyright © 2008 New Age International (P) Ltd., Publishers; capítulo 7; ISBN (13): 978-81-224-2867-4

**Assamoi A. A., F. Delvigne, JM. Aldric, J. Destain** (2008). Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2008) 12 (2), 111-118.

**G. B. Awuah, H.S. Ramasamy y A. Economides** (2007). Economides. Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering Process*, 46 (2007), pp. 584–602

**Bello Gil, Daniel, Díaz Maqueira, Yuset, Carrera Bocourt, Emilia** (2006), Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de



azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílicoCIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.

**Cordoba J. Alexander, E. Salcedo, R. Rodriguez, J. F. Zamora, R. Manriquez, Hector Contreras, J. Robledo, E. Delgado.** (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotermica bajos condiciones subcriticas. Revista latinoamericana Quim.

**Costa Marcia, M. Torres, A. Reyes,** (2010). Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. Revista Colombiana Biotecnológica. Vol. XII. Num. 2.

**Frank Kreith, Raj M Manglik, Mark S. Bohn.** (2012) Principios de transferencia de calor. Cengage Learning Editores. Pag. 16.

**Garces Vega Francisco, Bernadette Klotz (2012),** diseño de un prototipo de integrador tiempo temperatura para el monitoreo de la calidad de la leche refrigerada, Facultad de Ingenieria de la Universidad de Sabana, pp. 20-22.

**Garcia Patricia, Y. Garza.** (2007), sacarificación y fermentación simultanea de olote pre tratado. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Vol. 5. Num 9. ISSN 2007-9990.

**Gary Tucker.** (2008). Development and application of time temperature integrators to thermal food processing. Department of food manufacturing technologies campden & Chorleywood Food Research Association Chipping Campden, Glos. University of Birmingham.

**Gary Tucker, E. Hamby, H. Brown.** (2009), development and application of a new time– temperature integrator for the measurement of P-values in mild pasteurisation processes, Food and Bioproducts Processing, 87, 23-33.

**Gogou E., Katapodis P., Christakopoulos P., Taoukis P. S.,** (2010). Effect of water activity on the thermal stability of *Thermomyces lanuginosus* xylanases for process time–temperature integration. J. Food Eng., 100: 649-655.

**GS Tucker y col** (2002), aplicación de un integrador de tiempo temperatura bioquímica para estimar los valores de pasteurización de alimentos en los procesos continuos, Innovative Food Science & Emergin Technologies, vol 3, 2002, pp 165-174.

**Hernández Hugo, R. Pedroza, J. A. Quezada, M. Hernández.** (2013). Utilización de lignina de olote de maíz como componente en películas a base de almidón. Universidad Iberoamericana.

**Hugo and Russell, S. P. Denver, N. Hodges, S. P. Gorman, B. Gilmore.** (2004) Pharmaceutical Microbiology; EDITED BY Stephen P Denyer et al. 7th edition 2004; capítulo 20

**Lazo E, A. S. Hernandez, M. T. Mejía, M. E. Hidalgo (2003).** Purificación y caracterización de una xilanasa de 57 kDa de cellulomonas flavigena con afinidad celulosa. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

**Lora J.H., Glasser, W.G.** (2002).Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable material. Journals of polymer an the Enviroment. 10:39-47.

**L. Mesa, C. Cara, E. Gonzalez, S. Mussatto.** (2010), An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. IV Simposio Internacional de Química y II Seminario Latinoamericano de Análisis de Ciclo de Vida, At Santa Clara, Cuba.

**Montoya Margarita, A. Margarita.** (2012). Caracterización de una endo-xilanasa producida por *Bacillus fLexus* NJY2. Universidad Autónoma de Nuevo León. (Tesis de maestría). Pp: 24-25

**Nigam P, Robinson,** (2004) Solid state fermentation: an overview in: arora D(ed) Handbook of Fungal Biotechnology, Mycology 20. CRC Press. London.

NORMA Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2016.

**Pandey A.**, (1991). Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 37(2):169-172.

**Pepijn Prinsen.** (2010) Composición química de diversos materiales, de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas, Instituto De Recursos Naturales Y Agrobiología De Sevilla (IRNAS), Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC).

**Ponce T., y Pérez O.**, (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. Avance y perspectiva. 2002, 21, 273-277.

**Alejandro R. Lespinard, Ruth R. Bambicha, Miriam E. Agnelli, Rodolfo H. Mascheroni.** (2009), modelado de la transferencia de calor y variación de índices de calidad en mermeladas durante el proceso de pasteurización, Centro de Investigación y Desarrollo en Crio tecnología de Alimentos, *Mecánica Computacional*, pag. 3068.

**Robledo Armando, C. Noe Aguilar, J. C. Montañez.** (2012). Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Acta Química Mexicana*.

**SAGARPA.** (2010) Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado.

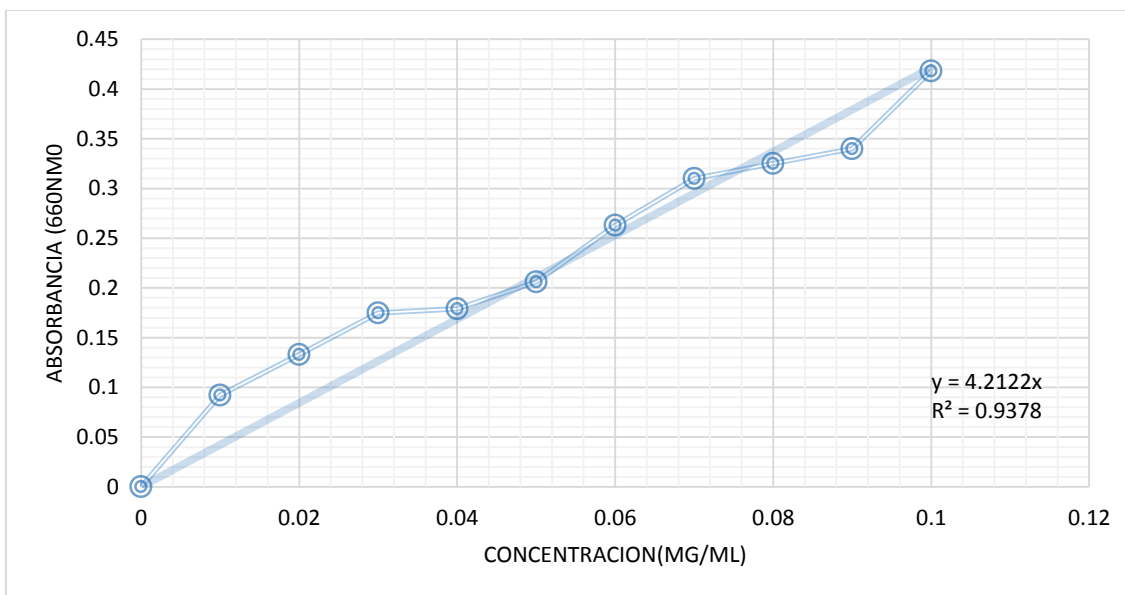
**Segovia Rodrigo, M. Costa, F. Figueroa.** (2005). Determinación de la termo estabilidad de una enzima fitasa derivada de *peniophora lyci*. Facultad de ciencia Agrarias. P.18.

**Shapton, D.A.** (1966) "Evaluating pasteurization processes". *Process. Biochem.*, 1, 121-124

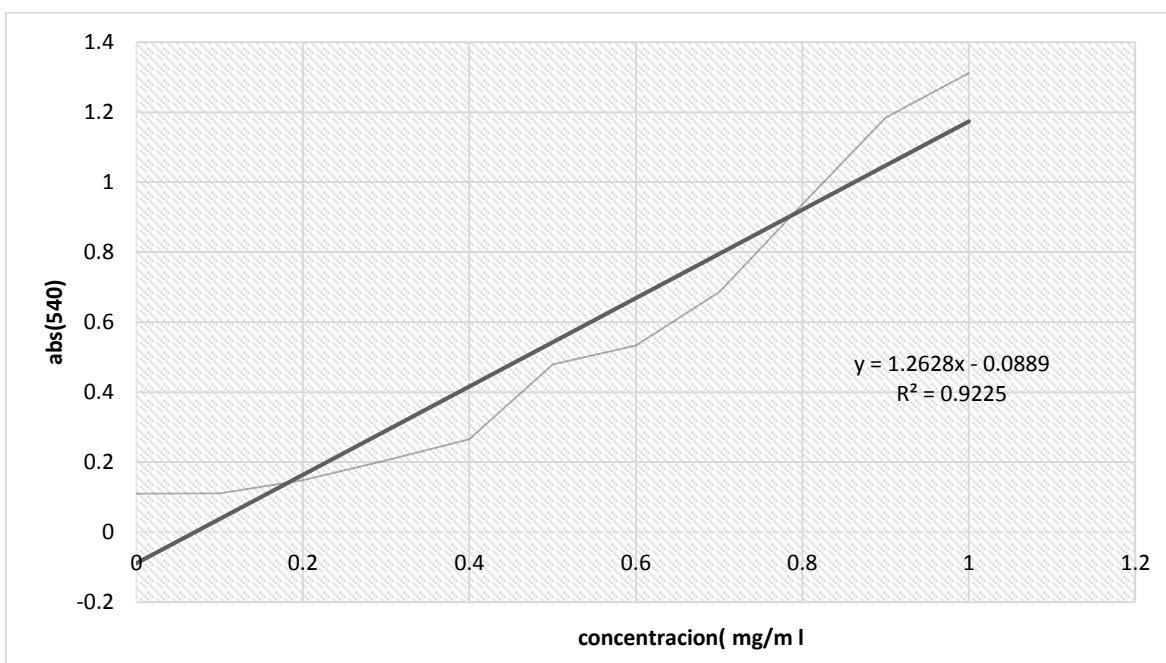
**Vásquez Milena, L. Pedraza, E. Favela, R. Moreno.** (2013). Producción de xilanasas por *aspergillus sp* en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Universidad Iberoamericana.

## ANEXOS

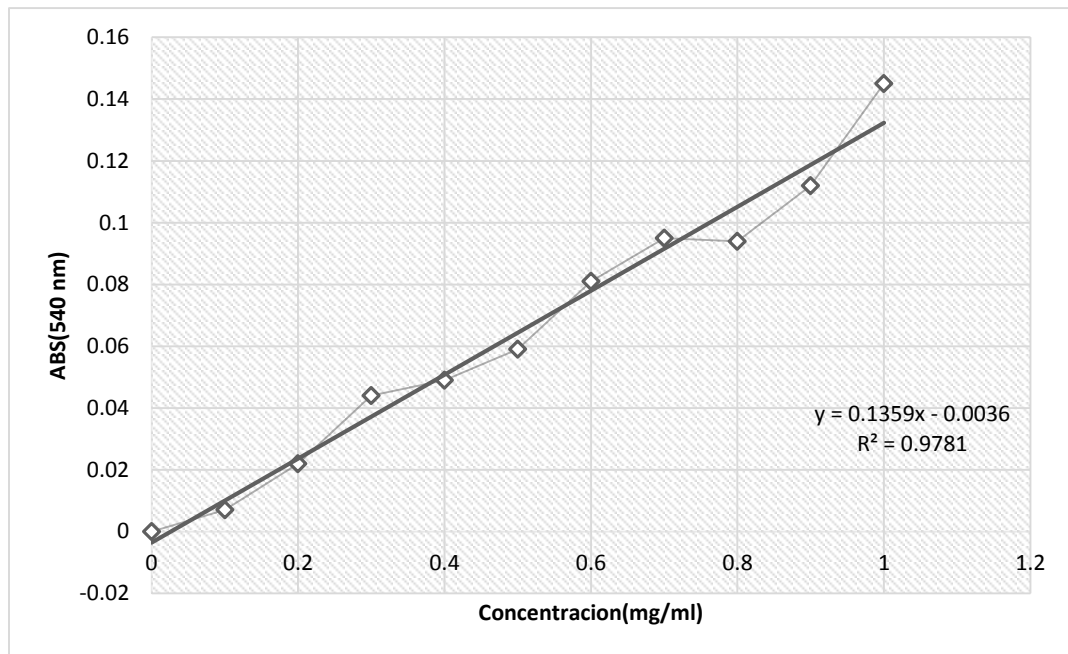
### Curva patrón de proteasa (tirosina 0.01 %)



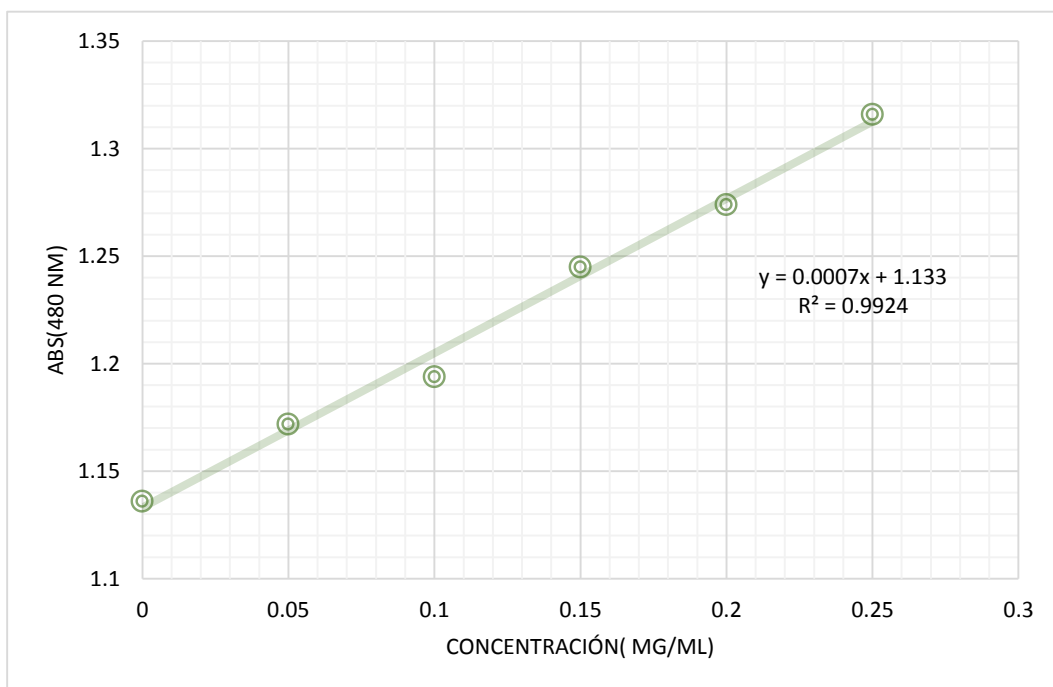
### Curva patrón de producto( endo-celulasa)( glucosa 0.1%)



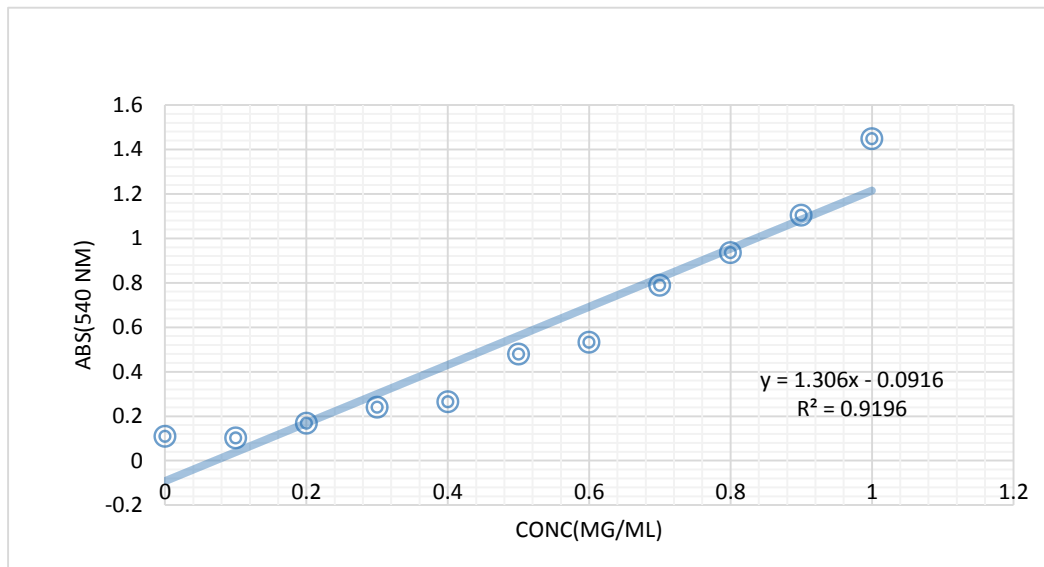
### Curva patrón de exo-celulasa (glucosa 0.1%)



### Curva patrón de azúcares totales (glucosa 1%)



### Curva patrón de azúcares reductores (glucosa 1%)



### Curva patrón de xinalasa (xilosa 1%)

