

[Fructooligosacáridos^{FOS}]



[Fructooligosacáridos] FOS



Fundación para la Innovación Agraria - FIA

Documento elaborado bajo el marco del Proyecto FIA: BIOT - 01 - A - 026
**"Biosíntesis de Fructooligosacáridos (FOS) a partir de fuentes enzimáticas
vegetales y bacterianas para producción animal"**

Entidad Responsable

Apablaza y Santalices Ltda.

Equipo Técnico

Mónica Santalices A., Bioquímica
Nibaldo Apablaza R., Químico
Raul Cañas C., Ingeniero Agrónomo PhD
José Luis Godoy M., Ingeniero Agrónomo
Alvaro García M., Ingeniero Agrónomo, MSc
Karin Arévalo M., Técnico en Microbiología de Alimentos



[Fructooligosacáridos^{FOS}]

Índice

Introducción _ 5

Aspectos agronómicos del cultivo de Topinambur para producción de FOS _ 7

Alimentos Funcionales _ 7

¿Qué es el Topinambur? _ 8

Variedades _ 9

Mercado _ 9

Suelo y Clima _ 9

Fisiología de la Planta _ 10

Manejo del Cultivo _ 11

Enfermedades _ 13

Cosecha _ 13

Rendimientos _ 13

Manejos de Post Cosecha _ 14

Costos de Producción _ 15

Cultivo *In Vitro* de Topinambur y Yacón. Obtención de Callos _ 17

Materiales y Métodos _ 18

Resultados y Conclusiones _ 18

Anexo 1 _ 19

Obtención de Fructooligosacáridos y Fructosa a partir de Inulina: *Bioreactor Enzimático* _ 23

Inulinasas y su aplicación industrial _ 25

Materiales y Métodos _ 26

Discusión y Comentarios _ 28

Proyecciones del Proyecto _ 29

Bibliografía _ 31



[Fructooligosacáridos] FOS

Introducción

El topinambur como fuente de fructooligosacáridos es una excelente alternativa para la producción de ingredientes funcionales (fibra soluble, prebiótico) los cuales pueden ser empleados en la alimentación de humanos y animales con resultados comprobados sobre la salud y la prevención de afecciones gastrointestinales entre otras. No obstante a nivel nacional el desarrollo y utilización de este tipo de productos es aún incipiente, a nivel mundial el mercado se presenta muy desarrollado.

Con el objeto de desarrollar tecnología a nivel nacional para la elaboración de estos productos y específicamente de FOS, la Fundación para la Innovación Agraria, FIA, ha respaldado el proyecto **"Biosíntesis de fructooligosacáridos (FOS) a partir de fuentes enzimáticas vegetales y bacterianas para producción animal"**, código BIOT-01-A-026. Este proyecto ha sido desarrollado por el Laboratorio Apablaza y Santalices Ltda., en asociación con las empresas Biofrut S.A. y Bioprocesos S.A., con la colaboración de la consultora Biotecnología Agropecuaria S.A.

La publicación resume el trabajo realizado en el proyecto y tiene por objetivo difundir los resultados obtenidos en los rubros agropecuario, agroindustriales y de laboratorios, interesados en adoptar las tecnologías desarrolladas. El presente compendio abarca las experiencias de uso de FOS en alimentación animal, manejos agronómicos del cultivo del topinambur y los resultados obtenidos en el proyecto respecto a la biosíntesis de FOS.

Con mucho agrado dejamos en manos de productores, agroindustrias, laboratorios y profesionales este compendio que pretende ser una significativa contribución y una señal de apoyo para aquellos con espíritu innovador.

Agradecimientos sinceros a la Fundación para la Innovación Agraria y a las empresas asociadas participantes del proyecto por su valioso interés y respaldo, quienes creyeron en la iniciativa, lo que sin duda ha permitido concretar con éxito las metas planteadas al inicio de este proyecto de investigación.



[Aspectos agronómicos del cultivo de Topinambur para producción de FOS]

Alimentos Funcionales

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano y de los animales en los sistemas productivos. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales. Aunque la relación entre la dieta y la salud fue reconocida por la medicina china hacia el año 1000 A.C. y con la frase "deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación", propuesta por Hipócrates hace casi 2500 años, actualmente existe una renovada atención en este campo.

El término alimento funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo, más allá de su contenido nutricional. Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, funcionamiento del sistema cardiovascular, antioxidantes, el metabolismo de xenobióticos, el sistema gastrointestinal entre otros.

Para uniformar la terminología empleada se define:

Alimento funcional (Functional Food): Cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", o sea característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y los sistemas físico químicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo.

La inulina y los fructooligosacáridos son considerados ingredientes de alimentos funcionales.

¿Qué es el Topinambur?

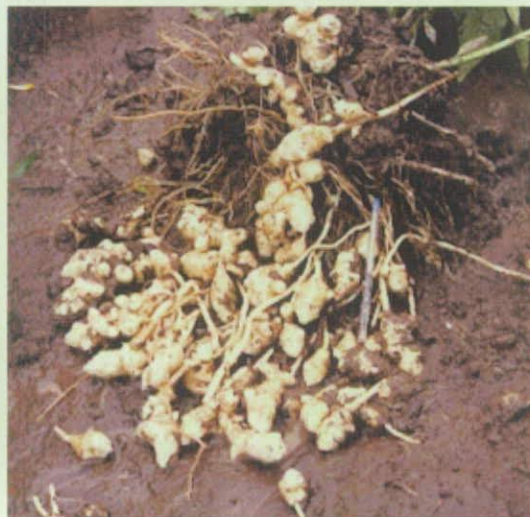
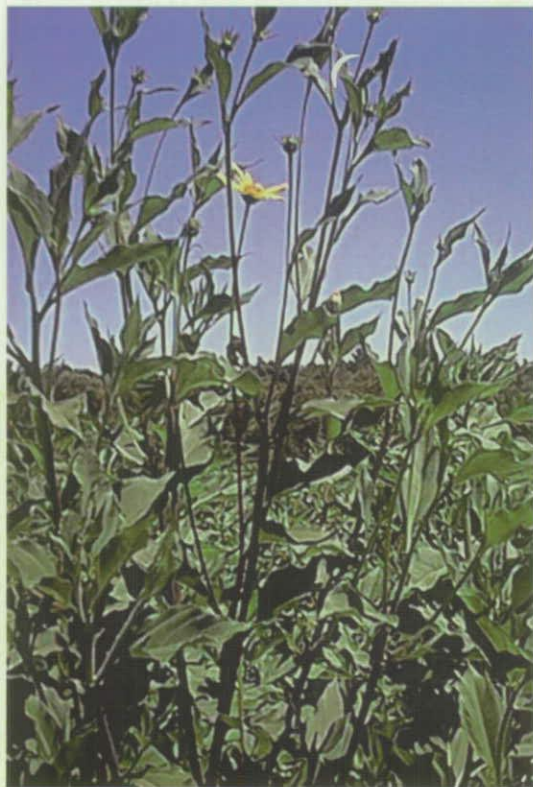
El TOPINAMBUR o *Helianthus Tuberosus* L. es una planta perenne de la cual se aprovechan tallos, hojas, bulbos y flores, se presenta en la naturaleza como un rizoma con gran cantidad de tuberizaciones y cierto parecido a la papa, pero se desarrolla a mayor profundidad.

Pertenece a la familia de las compuestas / asteráceas, y esta emparentado con el girasol: se trata de una planta de hasta 4 metros de alto con flores de color amarillo oro, muy melíferas.

El Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) es originario de Norteamérica y ha sido cultivado por sus habitantes durante siglos. A pesar de ello también se le ha cultivado en Europa. Se lo introdujo a Francia en el siglo XVII, extendiéndose rápidamente a Inglaterra, Alemania y Europa Central (Geisler, 1980).

"El Topine es una forma alemana cultivada con un doble propósito agrícola, los tallos y las hojas son cortados para el ensilado a los comienzos del otoño, mientras que los tubérculos son recogidos mas tarde y se manipulan para la extracción de la inulina o son utilizados directamente como alimento para el ganado. Se obtienen rendimientos de unas 47 toneladas métricas de alimento verde por hectárea (corresponde a un 18 a 20 % de materia seca), juntamente con 20 toneladas métricas de tubérculos (alrededor de un 16 % en materia seca)" (Gis y Vera, 1965). En Chile, el Topinambur se introdujo principalmente como alimento para cerdos, sin dársele mayor importancia para otros usos. Se encuentra distribuido en muy pequeña escala desde Coquimbo a Llanquihue (Cañas y otros, 1980).

Los tubérculos son ricos en inulina, que es un polisacárido constituido por cadenas de fructosa y cuando se someten a procesos de extracción y dependiendo del estado fenológico de la planta se puede obtener FOS (fructooligosacáridos).



Cultivos y tubérculos de Topinambur durante el estado de floración

La clasificación botánica del Topinambur es la siguiente:

División	<i>Embryophita siphonogama</i>
Sub división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotiledónea</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Compositae</i>
Sub familia	<i>Tubuliflorae</i>
Tribu	<i>Heliantae</i>
Nombre científico	<i>Helianthus tuberosus</i>
Nombres comunes	<i>Topinambur; Alcachofa de Jerusalem; Petaca; Topinambo; Aguaturma; Patata de Caña; Castaña de Tierra; Marenquera; Patata de Palo; Turma de Agua (Gill y Vear, 1965).</i>

Variedades

Algunos antecedentes de la variabilidad de tubérculos presente en el sur de Chile (Gallyas, 1969 y Opazo, 1939) indican que se distinguen principalmente tres variedades:

- 1) La más común es de forma de huso jorobado, difícil de lavar, de gran rendimiento. Color amarillo por fuera, blanco por dentro. Se denomina variedad "amarilla".
- 2) En forma de huevo, bastante liso y regular. Color amarillo tanto por fuera como por dentro. Menos rendidora que la anterior, pero de mejor sabor, llamada variedad "patate".
- 3) Con forma de pera o patata, pardo rojizo por fuera, blanco o amarillo por dentro. Tiene en general más contenido de azúcar. Es denominado tipo "común".

Recolectando material en la zona sur de Chile, Décima Región, (Venegas, 1994) se encontraron las variedades amarilla y común. La más frecuentemente encontrada fue del tipo jorobado, amarillo por fuera y blanca por dentro y en menor escala la del tipo pardo rojizo. Es posible encontrarlas en ferias y algunos huertos familiares, y en mucha menor proporción en supermerca-

dos; los que los compran en huertos cercanos a la zona. La producción es, por lo tanto, principalmente familiar, para autoconsumo o venta en ferias, pero no en forma de explotación comercial a gran escala, sino una superficie pequeña plantada.

En Chile si bien existen bancos genéticos con la finalidad de preservar este material no se hace un trabajo de selección y mejoramiento de variedades debido principalmente a que no existe un mercado desarrollado para los tubérculos y los productos que de este se pueden obtener; tubérculos, fructosa, inulina, FOS.

Mercado

El mercado para los tubérculos a nivel nacional es demasiado reducido, concentrándose principalmente en una baja demanda que realizan los supermercados. El topinambur ha sido usado para alimentación animal, mediante la utilización de su follaje y tubérculos, alimentación humana utilizando en la cocina los tubérculos para realizar exquisitas preparaciones y como materia prima para la producción de edulcorantes y productos funcionales (FOS, Inulina).

Durante los últimos años a nivel mundial se ha desarrollado un crecimiento explosivo de la demanda de productos funcionales, dentro de los cuales se consideran los fructooligosacáridos (FOS). Una de las principales fuentes naturales de éstos productos es el chicory seguido por el topinambur.

No se cuenta con antecedentes nacionales de cultivo de topinambur, ni de las producciones, debido a que solo se ha trabajado a nivel de ensayos y la superficie sembrada a nivel nacional no debe superar las 20 o 30 hectáreas distribuidas en superficies de 1 a 2 hectáreas.

Suelo y Clima

El topinambur puede ser cultivado en suelos que no permiten rendimientos comerciales de otros cultivos como papa (*Solanum tuberosum*) o remolacha (*Beta vulgaris*). Las exigencias de suelos son mínimas soportando suelos delgados, medios y pesados. Puede crecer en forma adecuada en terrenos pedregosos y are-

nas, suelos muy pesados presentan una limitante de tipo mecánico al desarrollo del tubérculo (Geisler, 1980). Según Gallyas (1969) crece con vigor en suelos pantanosos aunque allí no produce tubérculo pero sí abundante follaje, con alto contenido de nutrientes. Naturalmente sus más altos rendimientos se obtienen en los mejores suelos.

El Topinambur se adapta a una gran variedad de climas, como se demuestra por su amplia distribución tanto en América como en Europa. Los mejores rendimientos se obtienen en aquellos climas que presentan diferencias marcadas, tanto en temperatura como largo de día, entre invierno y verano. Gallyas (1969) y Geisler (1980) señalan que es una planta muy resistente tanto al frío como al calor. Los tubérculos resisten heladas de hasta -30°C sin dañarse, lo que permite que sea cosechando de acuerdo a las necesidades. Regiones en que el fin de verano y principio de otoño son cálidos y soleados son muy favorables, ya que permiten un fuerte desarrollo y una gran asimilación de nutrientes en los tubérculos. La parte aérea resiste temperaturas de 5°C como máximo.

Por tratarse de un cultivo que no sufre daños por heladas, es posible sembrarlo desde otoño hasta temprano en la primavera. Para el replante pueden utilizarse tubérculos germinados, trasplantando plantas hasta de 50 cm de altura. Se recomienda, durante la cosecha, dejar una cierta cantidad de tubérculos en el suelo, permitiendo ello una repoblación adecuada en la temporada siguiente (Cañas y otros, 1980).

En cuanto a sus requerimientos de luz se comporta como una planta con fotoperíodo de día corto, por esta razón no florece mucho si las condiciones de luz no son adecuadas y la formación de semillas es escasa (Geisler, 1980).

Debido a su eficaz sistema radicular se adapta bien a cualquier condición de humedad del suelo (Geisler, 1980).

Fisiología de la Planta

El topinambur es una planta de día corto, por lo tanto su floración y formación de semillas depende de esta característica, siendo escasa en zonas que no cumplen esta condición. Es una especie de polinización, hexaploide con $2n=102$ cromosomas, el número base de su genoma es 17 al igual que todas las especies del género *Helianthus* (Kappert y Rudolf, 1958).

El topinambur es una especie perenne, capaz de reproducirse por semillas o por crecimiento clonal desde rizomas y tubérculos. Es frecuente encontrar poblaciones naturales de esta especie en habitats altamente inestables, tales como bordes de ríos, zonas de desechos urbanos y en campos cultivados. Se ha postulado que la variabilidad entre poblaciones de Topinambur de diferentes áreas, el almacenamiento de reservas dentro de la planta durante su ciclo de vida y el potencial de regeneración de los rizomas y tubérculos a diferentes profundidades de suelo, han contribuido a su capacidad para sobrevivir en una gran variedad de lugares (Swanton, 1987).

El Topinambur es capaz de acumular reservas para el crecimiento de hojas, rizomas y tubérculos, aún en condiciones de gran defoliación. Los patrones de acumulación anual de reservas se caracterizan por un compromiso importante de reservas almacenadas en los rizomas y tubérculos en invierno, para el crecimiento de estructuras, hojas y nuevos rizomas y tubérculos para un nuevo desarrollo (Swanton, 1987).

Por otro lado, la mantención de la variabilidad genética entre las poblaciones de Topinambur y la habilidad para movilizar reservas para el crecimiento vegetativo y clonal, reproducción y regeneración, explican la capacidad del Topinambur para sobrevivir en diferentes medios (Swanton, 1987).

La regeneración de fragmentos de rizomas enterrados y tubérculos, es un fenómeno muy importante en el aumento de las poblaciones de Topinambur. También las semillas pueden contribuir a la diseminación de la especie, pero el rápido aumento del número de plantas una vez establecido el cultivo, se realiza fundamentalmente por rizomas y tubérculos (Swanton y Cavers, 1988).

Los tubérculos son de formas irregulares; alargados, ovales hasta redondos. Se encuentran en rizomas cortos alrededor del cuello de las raíces o en rizomas más largos (Kappert y Rudolf, 1958). La cáscara muestra una coloración de rojiza a amarillenta (Geisler, 1980). Las variedades cultivadas producen un gran número de tubérculos acumulados cerca del tallo principal, mientras que las variedades silvestres producen tubérculos pequeños en los extremos de los rizomas largos (Wyse y Wilfahrt, 1982).

Manejo del Cultivo

Época de Plantación

La época de plantación es en primavera (septiembre), pero puede plantarse desde el otoño donde se obtiene un más alto rendimiento de forraje verde (Geisler, 1980).

Preparación de suelo

Es conveniente hacer una buena preparación mediante una aradura profunda y rastraje sucesivos para obtener un buen mullimiento del suelo (Gallyas, 1969).

Siembra

El tamaño más recomendable del tubérculo semilla es similar a un huevo de gallina. La distancia de plantación más adecuada es de 70 a 90 cm. entre las hileras y 25 a 30 cm. sobre la hilera. La profundidad de plantación fluctúa entre 5 a 10 cm. Una mayor distancia de plantación entre líneas facilita el empleo de elementos mecánicos de tracción animal o motorizados. La plantación misma es similar a la de la papa, puede ser a mano, en surcos detrás del arado o a máquina. La práctica de plantar tubérculos partidos no es aconsejable pues son muy susceptibles a pudrición; tubérculos marchitos se pueden utilizar dejándolos dos o tres días en agua (Gallyas, 1969). La cantidad de tubérculo semilla varía entre 1.500 a 1.800 Kg/há (Geisler, 1980).

La mayoría de los rizomas y tubérculos que quedan en los primeros 10 a 15 cm de suelo normalmente producen nuevos brotes o macollas. Se ha visto que solo el 25% de los tubérculos enterrados a 25 cm producen brotes dentro de los 58 días de haberse plantado. Mientras mayor es la profundidad de siembra, mayor es el tiempo requerido para la emergencia de los brotes (Swanton y Cavers, 1988). En general, también se ha visto que el porcentaje de tubérculos que se regeneran es mayor que los rizomas, especialmente a mayores profundidades de siembra. Por otro lado, tanto los tubérculos como los rizomas que no emiten brotes un año después de sembrados, se descomponen totalmente (Swanton y Cavers, 1988).

Fertilización

Es un cultivo que reacciona muy bien a la fertilización y especialmente a los abonos orgánicos. Se recomiendan los mismos fertilizantes que para las papas, aún

cuando pueden ser usados en menor cantidad por la mayor asimilación del topinambur. Es recomendable repetir la fertilización cada dos o tres años para asegurar buenos rendimientos en los años que siguen a la plantación inicial (Gallyas, 1969). La fertilización nitrogenada se aplica toda en el surco o parcializada. El fósforo y potasio se aplican todos al momento de la plantación (García, 1985).

La fertilización empleada en las pruebas realizadas y la cual ha dado excelentes resultados ha sido la mezcla para papas compuesta por los siguientes elementos:

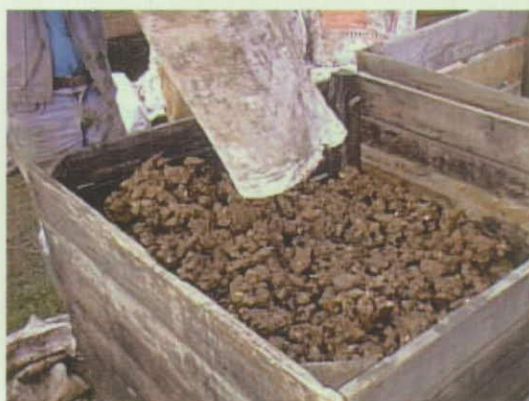
N	5,78%
P2O5	27,57%
K2O	22,17%
MgO	1,92%
S	2,89%
CaO	1,10%
B	0,096%
DOSIS:	600 KG POR HECTÁREA

Luego de 30 días post siembra, cuando las plantas han alcanzado una altura de 30-40 cms, se aplica la segunda dosis de nitrógeno que corresponde a 160 kilos de N por hectárea.

Otros manejos

El crecimiento inicial del topinambur es lento, lo que hace necesario cuidar que no se produzca enmalezamiento en la primera etapa, ya sea con control mecánico o manual o mediante el uso de herbicidas. Posteriormente el desarrollo es rápido y la maleza es agotada por la falta de luz (Gallyas, 1969).

La aporca sólo es recomendable en caso de obtención de tubérculos y en zonas expuestas a fuertes vientos. Cuando el cultivo se utiliza para obtención de forraje no es conveniente realizar aporca por cuanto dificulta la labor de siega (Gallyas, 1969). Su objetivo principal es favorecer la emisión y próximo desarrollo de tubérculos, su objetivo secundario es el control de malezas y protección de los tubérculos de heladas y rayos directos del sol. Se realiza cuando la planta tiene entre 20 y 30 cm. de altura. Aporcar en años posteriores a la plantación ayuda a formar las hileras que se pierden pues el rebrote de la planta es desordenado (García, 1985).



Siembra y cosecha de tubérculos de Topinambur.



*Daño provocado por *Sclerotinia sclerotiorum**



Producto final (FOS). Presentación en Polvo.

Enfermedades

Con respecto a la susceptibilidad de los cultivares de topinambur a enfermedades, se menciona en general que es un cultivo bastante resistente. Sin embargo en trabajos relativamente recientes se indican algunas enfermedades de mediana importancia que causan problemas en los cultivos anuales de girasol, que también han sido mencionados en cultivos de Topinambur en Canadá: *Erysiphe cichoracearum* DC ex Méral (moho pulverulento); *Puccinia helianthi*; *Sclerotinia sclerotiorum* (pérdida de follaje y daño en tubérculos) (Connors, 1967).

En un trabajo realizado en Canadá (Laberge y Sackston, 1987) se indica que el moho pulverulento aparece a fines de julio y luego se desarrolla profusamente hacia el fin de la estación. No se mencionan efectos en la producción de Topinambur, por lo que se indica que debería investigarse el problema. En el mismo trabajo se argumenta que la *Esclerotinia* por su parte, se propaga de una planta a otra, afectando aproximadamente entre el 0,6 y el 1,5% de ellas. Esta enfermedad tiene una gran gama de huéspedes, por lo tanto es un problema potencial serio tanto a nivel de campo como durante el almacenamiento, a menos que se hagan adecuadas rotaciones y controles sanitarios.

Otra enfermedad que se menciona (Laberge y Sackston, 1987) del Topinambur es la clorosis apical producida por una bacteria *P. syringae* pv. *tagetis*. Esta enfermedad puede ser un factor limitante en los cultivos de Topinambur, a menos que se tomen medidas para la obtención de semillas de tubérculos libres de la enfermedad y se empleen rotaciones de cultivos adecuadas.

Cosecha

Si se cultiva el topinambur para la obtención de tubérculos, se cosecha después de la muerte de la parte aérea de la planta. El mejor rendimiento se obtiene segando el follaje antes que las hojas inicien su marchitamiento, lo que ocurre a principios de otoño (Gallyas, 1969). Facilita mucho la operación de cosecha segar y quemar el follaje con anterioridad y en forma manual (para evitar compactar las melgas). Después de la cosecha se pasa una rastra sobre el suelo y queda listo para la próxima brotación (García, 1985). Los tubérculos pueden ser mantenidos en la tierra e irse extrayen-

do a medida que se necesitan, de esta forma el período de cosecha puede extenderse hasta la primavera. Esto es lo más recomendable ya que los tubérculos una vez sacados de la tierra se pudren fácilmente y no pueden ser almacenados por más de un mes (Geisler, 1980). Cuando el cultivo se destina sólo a forraje pueden obtenerse tres cortes: en diciembre, febrero y mayo. El mayor valor alimenticio se alcanza cuando la planta tiene una altura de 80 cm. (Gallyas, 1969). Es posible el uso combinado de corte en verde y cosecha de tubérculos, pero éstos disminuyen su producción en un 50% (Geisler, 1980).

Rendimientos y Usos

Con respecto a rendimientos del Topinambur, se informan una amplia gama de valores. En Alemania, utilizándolo como doble propósito (follaje y tubérculos) se han obtenido rendimientos de 47 ton de forraje verde por Há. (18 a 20% MS) y 20 ton de tubérculos (16 a 20% MS) (Gill y Vear, 1965). En otro trabajo realizado en Canadá (Laberge y Sackston, 1987) con cuatro cultivares: Columbia, Challenger y Oregon White, fertilizados con 100/50/50 Kg/Há. de N/P/K y con aplicación de herbicida Trifluralin a razón de 0,8 Kg/Há. antes de la siembra, se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Cultivar	Forraje (Ton/Há)		Tubérculos (Ton/Há)	
	M. Verde	M. Seca	M. Verde	M. Seca
Columbia	7,77	3,71	33,23	7,91
Challenger	18,30	4,57	34,23	7,80
Oregon White	29,45	6,51	21,84	4,90

Se puede observar claramente de la tabla anterior que existe una relación inversa entre el crecimiento del follaje y el de los tubérculos, esto se debe a que si se elimina la parte aérea y mientras mas temprano en la temporada ocurra, la traslocación de reservas a los tubérculos disminuye. Este punto también es importante para tomar la decisión de qué producir, si forraje o tubérculos.

En Chile (Cañas y otros, 1980) se han efectuado siembras de topinambur en diferentes localidades y tipos de suelos, encontrándose los siguientes resultados en rendimiento de tubérculos (materia verde):

Localidad	Tipo de Suelo	Rendto. (Ton/Há)
SANTIAGO	3rr (limoso), prof. 1 m	90
LINARES	4rr (arcilla), prof. 30 cm	70
CHILLAN	4rr (arcilla), prof. 40 cm	75
PANGUIPULLI	Secano (trumao), prof. 1 m	60

Otros resultados de rendimientos de tubérculos frescos de topinambur, informados por Cañas y otros (1980), en diferentes localidades de Inglaterra y cultivado en suelos aluviales, indican las siguientes cifras:

Localidad	Rendimiento (Ton/Há)
WOBURN año 1954	21,3
WOBURN año 1955	36,3
OXFORD año 1955	28,8
OXFORD año 1956	22,8

Con respecto a la producción de forraje, en Chile en la localidad de Linares, se han obtenido rendimientos promedios de 17 toneladas de materia verde por hectárea, con una altura de corte de 80 cm (Aguilar y otros, 1987).

En referencia al uso que se le puede dar a los tubérculos de topinambur, estos pueden ser consumidos por cerdos, bovinos, ovinos, caballares y conejos. Las aves no pueden utilizar el tubérculo (Gallyas, 1969). El forraje puede ser usado en forma de pastoreo directo, heno o ensilaje, aunque de esta forma presenta serias limitaciones (Seiler, 1988). Comparando la utilización del tubérculo de topinambur con la papa, que también se utiliza en alimentación animal, éste presenta la ventaja de no poseer compuestos tóxicos como la solanina, por lo que no es necesaria su cocción antes de suministrarlo.

Deshidratando y moliendo el tubérculo se obtiene un producto muy palatable y de alto valor nutritivo debido a la alta concentración de carbohidratos. Es factible de incluir en cualquier tipo de ración, como componente energético, pero debe acompañarse de un suplemento proteico (Becker, 1982). El uso del tubérculo en rumiantes tiene la desventaja de producir acidosis ruminal si no se suministra en una ración adecuada que contenga un mínimo de fibra cruda (García, 1985). Según Aguilar y otros, 1987 el tubérculo de este cultivo puede ser utilizado en la alimentación de cerdos con mayores ven-

tajas comparativas que otras especies en el pastoreo directo por su capacidad de hozar en terreno. En cerdos además no existen limitantes de tipo enzimático, como el caso de las aves, para un adecuado aprovechamiento de la inulina presente en el topinambur, cuya digestibilidad sería del 98%.

Entre otros usos, el topinambur también puede utilizarse como un cultivo de mejoramiento y protección en suelos erosionables dado su abundante crecimiento radicular, sirve además como cortina cortaviento. Según Duan y otros (1991) es posible la obtención de sorbitol y etanol del tubérculo de topinambur por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* a 33° C. El etanol se produce a partir de la glucosa y fructosa que contiene el jugo del tubérculo; mientras que el sorbitol se produce sólo a partir de la fructosa. Se han realizado estudios económicos en Canadá, para determinar las posibilidades económicas de utilizar el etanol producido por los tubérculos y principalmente la parte aérea del topinambur como aditivo en los combustibles para evitar el uso de plomo como aditivo. El cultivo serviría para aprovechar áreas con suelos degradados (Baker y otros, 1990).

También es posible la obtención de FOS, Inulina y fructosa del tubérculo por hidrólisis enzimática de la inulina. Un cultivo que produce 60.000 kg. de tubérculo por hectárea puede producir cerca de 7.000 kg. de fructosa (García, 1985).

Manejos de Post Cosecha

Los tubérculos unas vez extraídos de la tierra tienen una gran susceptibilidad a la pudrición, siendo el mejor lugar para conservarlos el suelo. Se han realizado pruebas de almacenaje, determinándose las condiciones artificiales óptimas las cuales se detallan a continuación:

- 1.- Almacenaje en cámara entre 1-2°C, con ventiladores de aire forzado.
- 2.- Utilizar bins de maderas con tablas separadas para permitir ventilación.
- 3.- En lo posible introducir entre los tubérculos tubos de PVC perforados para mejorar la aireación.

- 4.- El máximo tiempo de almacenaje es de 60 días, siempre y cuando los tubérculos hayan ingresados en óptimas condiciones. Este tiempo se puede reducir si es que se presentan daños en los tubérculos, ya están próximos a la brotación, contienen focos de pudrición, presentan un grado visible de deshidratación o han sido mantenidos en condiciones no apropiadas previo al almacenaje.

Costos de Producción

FICHA TECNICO-ECONOMICA PARA UNA HECTAREA DE TOPINAMBUR

(Precios de Septiembre de 2002, sin IVA)
Zona 1 - R.M. - VI Región

ITEM	Unidad	Cantidad/ha	Valor unitario (\$)	Costo total (\$)
1. Maquinaria				
Preparación de suelo				
<i>Aradura</i>	ha	1	19.000	19.000
<i>Rastrajes</i>	ha	2	15.000	30.000
<i>Aporca - Surcado</i>	ha	4	15.000	60.000
2. Mano de obra				
Siembra	JH/ha	5	7.000	35.000
Aplicación fertilizantes	JH/ha	4	7.000	28.000
Cosecha	Kilos	45000	12	540.000
3. Insumos físicos				
Semilla	kg	1800	100	180.000
Fertilizantes				
<i>Siembra: Mezcla Papas (Aluvial)</i>	kg	600	150	90.000
<i>Aporca: Muriato de potasio</i>	kg	133	141	18.753
<i>Urea</i>	kg	175	128	22.400
<i>Post-tercer riego: Urea</i>	kg	175	128	22.400
4. Riego por surcos				
	ha	12	10.000	120.000
5. Flete				
	Nº	0,0	140.000	0
Costo total por ha (\$)				1.165.553

OBSERVACIONES: La dosis de semilla en kg, se calculó en base a una población de plantas de 42.000/ha y un peso promedio de 25 g/tubérculo.



[Cultivo *In Vitro* de Topinambur y Yacón. Obtención de Callos]

La región andina se caracteriza por poseer variados tipos de plantas tuberosas, las cuales en su mayoría han sido utilizadas como fuentes de energía por los pueblos que habitan dichas regiones. Entre estas especies encontramos al Topinambur (*Helianthus tuberosus*) y Yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

El Topinambur o más conocido por su nombre común en inglés Jerusalem artichoke, pertenece a la familia de las compuestas y está emparentado con el girasol. Su parte aérea llega a medir hasta 4 metros y desarrolla flores de color amarillo oro, posee una raíz tuberosa, de la cual se pueden cosechar tubérculos similares a la papa común. Estos tubérculos están siendo muy apreciados por la industria de alimentos a nivel mundial, debido principalmente al alto contenido de polisacáridos, especialmente inulina (15 a 20 % en base fresca).

El Yacón, pertenece a la familia de las compuestas, es una herbácea que alcanza los 2 metros de alto que desarrolla flores amarillas-anaranjadas y posee una raíz tuberosa grande y alargada. Dichos tubérculos se comercializan en fresco, como frutas y al igual que el Topinambur poseen un alto contenido de inulina (10-20 % en base fresca) (Ficha técnica CIP, 2004).

La inulina es una clase de carbohidrato de cadena larga conocido como fructanos. La inulina se considera un ingrediente de alimentos funcionales ya que afecta procesos fisiológicos y bioquímicos que resultan en una mejor salud y reducción de riesgo de varias enfermedades, tanto en animales como humanos.

Las características señaladas implican un promisorio futuro comercial para los cultivos de Yacón y Topinambur tanto para la industria de alimentos humanos y animales, como para la industria farmacéutica.

Esto ha desarrollado varias líneas de investigación sobre estos cultivos, incluyendo el cultivo *in vitro* y micropropagación, inicialmente para mantención de las especies en bancos de germoplasma y posteriormente para comercialización.

En la presente investigación se revisaron y llevaron a la práctica los protocolos para micropropagación y posteriormente se desarrolló un protocolo para la obtención de callos de estas especies, con el objetivo principal de obtener células tanto de Yacón como Topinambur para su posterior utilización en procesos enzimáticos semi-industriales.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

- **Topinambur:** Se realizó una selección visual de plantas de Topinambur, previamente establecidas en el campo eligiendo las plantas con mejor aspecto desde el punto de vista agronómico, es decir, tamaño, desarrollo foliar, color. Se forzó el desarrollo de yemas laterales, material que luego de dos semanas se utilizó como material para establecimiento del cultivo in vitro.
- **Yacón:** Por la no existencia del cultivo en territorio nacional se importaron plantas de Yacón in vitro desde el Centro Internacional de la Papa en Perú.

Micropropagación

- **Topinambur:** El material vegetal proveniente de cultivo tradicional fue descontaminado por lavado con hipoclorito de sodio al 2 %, se utilizó como medio de iniciación y micropropagación MS básico (ver anexo 1), manteniéndose a 18 °C, fotoperíodo de 16 horas/luz e intensidad luminosa aproximada de 3000 lux.
- **Yacón:** El material a micropropagar ya venía establecido in vitro y de acuerdo a las indicaciones del CIP se realizó micropropagación en un medio MS suplementado (ver anexo 1) manteniéndose a 18 °C, fotoperíodo de 16 horas/luz e intensidad luminosa aproximada de 3000 lux.

Aclimatación y Endurecimiento

Para observar el comportamiento de las plántulas micropropagadas parte de estas fueron trasplantadas a sustrato para posterior aclimatación y endurecimiento. Ambas especies presentaron enraizamiento espontáneo en la etapa de micropropagación, por lo cual después de permitir el desarrollo de raíces in vitro se pasó a la etapa de aclimatación en las siguientes condiciones, para ambas especies:

Cama caliente, T° sustrato	25 °C
Temperatura ambiente promedio	20 °C
Humedad promedio	85 %

Sustrato:	10 % Perlita
	10 % Vermiculita
	50 % Turba
	30 % Arena
Tiempos:	3 semanas cama caliente
	6 semanas maceta

Endurecimiento: Condiciones ambientales, a la sombra por 2 semanas.

Producción de Callos

Se seleccionaron láminas de hojas de plantas micropropagadas tanto de Yacón como Topinambur como material adecuado para la producción de callos, se cortaron trozos de alrededor de 3 mm², se cultivan en medio sólido en placa (MS básico, ver anexo 1, suplementado con ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) (10 mg/l)) y a los trozos se le realizaron pequeños cortes con la punta de la hoja del bisturí.

Resultados y Conclusiones

En las condiciones descritas se logró micropropagar en forma rutinaria tanto Yacón como Topinambur, además de lograr traspasar este material a condiciones de campo, obteniéndose en el segundo año microtubérculos en las raíces. A futuro se deberán comparar rendimientos de tubérculos y material aéreo entre plantas provenientes de micropropagación in vitro y plantas de cultivo tradicional. Si esta comparación es positiva se puede pensar incluso en la comercialización de los microtubérculos como "semilla" para cultivo tradicional.

Se logró establecer un sistema continuo de producción de callos, ya que no depende de la disponibilidad de material fresco en el campo. La masa celular, proveniente de los callos, que se utiliza en bioreactores para la producción extracelular de enzimas de interés presentes en los tubérculos de estas especies (por ejemplo inulinasas).

Anexo 1

Medio MS básico (Murashige y Skoog, 1962)

(A) Macronutrientes		mg/l
NH ₄ NO ₃		1650
KNO ₃		1900
CaCl ₂ * 2H ₂ O		440
MgSO ₄ * 7 H ₂ O		370
KH ₂ PO ₄		170
(B) Hierro		mg/l
Na ₂ EDTA		37.25
FeSO ₄ * 7H ₂ O		27.85
(C) Micronutrientes		mg/l
MnSO ₄ * 4H ₂ O		22.3
ZnSO ₄ * 4H ₂ O		8.6
H ₃ BO ₃		6.2
KI		0.83
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O		0.25
CuSO ₄ * 5H ₂ O		0.025
CoCl ₂ * 6H ₂ O		0.025
(D) Vitaminas		mg/l
glicina		2
ácido nicotínico		0.5
piridoxina HCl		0.5
tiamina HCl		0.1
		mg/l
mio-inositol		100
sacarosa		30000
agar (sólo en medio sólido)		10000
pH		5.7 – 5.8
Medio Micropropagación Yacón:		
MS básico		1 lt.
Pantotenato de calcio (1000 ppm)		2 ml
ANA (1000 ppm)		0.05 ml
GA3 (1000 ppm)		2 ml



Distintos aspectos de la micropropagación de Topinambur y Yacón. Callos resultantes.



Secuencia de la fase de endurecimiento de Topinambur y Yacón provenientes de la micropropagación.



[Obtención de Fructooligosacáridos y Fructosa a partir de Inulina: *Bioreactor Enzimático*]

La inulina y los fructooligosacáridos pertenecen a una clase de carbohidratos conocida como fructanos, considerados como ingredientes de alimentos funcionales ya que afectan procesos fisiológicos y bioquímicos que implican una mejor salud y reducen el riesgo de muchas enfermedades.

La inulina es un polímero de fructosa lineal (de 15 o más unidades o grado de polimerización, DP) con enlaces β 2-1, con una unidad de glucosa terminal (ver figura 1). Se encuentra en forma natural como carbohidrato de reserva en varias familias mono y dicotiledoneas. Algunas importantes fuentes de inulina se resumen en la tabla 1. En Liliacea, Ameryllidaceae y Compositae la inulina es normalmente almacenada en órganos tales como bulbos, tubérculos y raíces tuberosas, los cuales por la ausencia de componentes de interferencia permiten la fácil extracción y procesamiento para la obtención de productos purificados útiles para la explotación industrial. En la industria se utiliza corrientemente *Helianthus tuberosus* (Topinambur) y *Cichorium intybus* (achicoria) para la obtención de inulina.

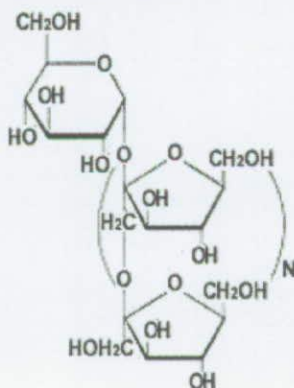


Figura 1: Representación de una molécula de inulina

FUENTE	INULINA (%)
Ajo	15 - 20
Raíz Espárrago	10 - 15
Topinambur	15 - 20
Tuberculos de Dalia	15 - 20
Raíz de achicoria	15 - 20
Yacón	15 - 20

Tabla 1: Importantes fuentes de inulina y su contenido en base a peso fresco (Kaur and Gupta, 2002)

La inulina es considerada como un prebiótico, o ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al hospedero por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas en el colon, que pueden mejorar la salud del hospedero. Además, un prebiótico puede reprimir el crecimiento de patógenos. La configuración b del cuerpo de carbonos en los monómeros de fructosa evita la hidrólisis por las enzimas digestivas de humanos y algunos animales llegando así sus moléculas intactas al tracto gastrointestinal donde son parcialmente digeridas por la actividad enzimática bacteriana resultando un crecimiento predominante de bifidobacterias, bacterias esenciales en la prevención de varias enfermedades y mantención de una buena salud, ver figura 2, por lo cual la inulina es considerada además un compuesto bifidogénico, Crow (2000), Kaur and Gupta (2002), .



Figura 2: Potenciales propiedades promotoras de la salud asociadas con bifidobacterias.

Otros efectos fisiológicos asociados al consumo de inulina en el organismo son: aumento del flujo sanguíneo, regulador intestinal, aumenta la absorción de minerales, hipoglucémico e hipocolesterolémico.

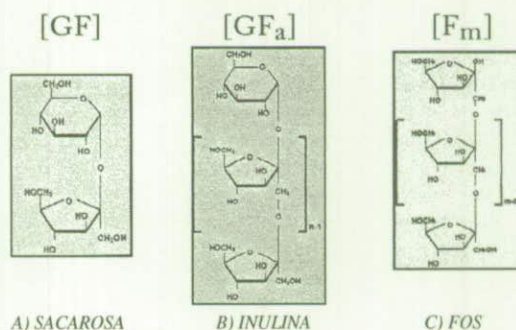
Adicionalmente, la inulina se utiliza como materia prima en la producción de concentrados de fructosa, fructooligosacáridos, sorbitol entre otros.

Los fructooligosacáridos (FOS) son un polímero de fructosa lineal (de 15 o menos unidades o grado de polimerización, DP) con enlaces β 2-1, con una unidad de glucosa terminal (ver figura 3). Químicamente son cadenas como la inulina pero de menor número de monómeros. Se encuentra en forma natural como carbohidrato de reserva en varias familias mono y dicotiledoneas. Pero su concentración en la naturaleza dependerá de condiciones de manejo, almacenaje y etapas del cultivo utilizado como fuente, lo que hace muy difícil su obtención a nivel industrial directamente desde la fuente de origen.

Los fructooligosacáridos poseen las mismas propiedades de la inulina sobre la salud humana y animal, es decir, son prebióticos, bifidogénico, también se les asocia a efectos fisiológicos como aumento del flujo sanguíneo, regulador intestinal, aumenta la absorción de minerales, hipoglucémico e hipocolesterolémico, pero tienen algunos atributos funcionales diferentes debido a la diferencia en su largo de cadena. La inulina es menos soluble que los fructooligosacáridos y tiene la capacidad de formar microcristales de inulina cuando entra en contacto con agua o leche, formando una estructura cremosa que se siente en la boca como grasa, por lo que permite reemplazar a la grasa en productos de panadería, lácteos, postres y similares Kaur and Gupta (2002).

Además los fructooligosacáridos compuestos de cadenas cortas poseen cualidades similares al azúcar o jarabes de glucosa desde el punto de vista del dulzor pero con menos calorías, no provoca caries, enriquecen en fibra.

Actualmente la inulina es procesada por las industrias de alimentos para producir ya sea fructooligosacáridos, como resultado de una hidrólisis enzimática parcial, principalmente con endoinulinasas de distintos orígenes microbianos o para producir cadenas largas de fructanos mediante técnicas de separación. Además de la inulina y su hidrolizado, la industria de alimentos también pro-



duce fructanos sintéticos mediante el uso de enzimas de microorganismos como hongos, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. Adicionalmente, a partir de inulina o fructooligosacáridos se puede producir fructosa por hidrólisis mediante exoinulinasas proceso más eficiente y menos engorroso que la obtención de fructosa a partir de almidón.

Los fructanos son los ingredientes que cubrirán las necesidades de la industria de los alimentos para alimentos saludables en un futuro a corto plazo, mediano y largo plazo.

Inulinasas y su aplicación industrial

La inulina es hidrolizada por inulasas. Las inulinasas han sido producidas y purificadas a partir de levaduras, hongos y bacterias con potenciales y reales usos para la industria de alimentos. Las inulinasas que se encuentran en microorganismos son clasificadas en dos tipos por su modo de acción sobre la inulina, ver Figura. Uno, endoinulinasas (2,1-b-D-fructanohidrolasa, E.C. 3.2.1.7), que actúan sobre los enlaces internos entre fructosas, liberando fructooligosacáridos y el otro exoinulinasas (E.C. 3.2.1.80), que actúan sobre el enlace de la fructosa del extremo libre liberando fructosa. Las inulinasas han sido caracterizadas a partir de los tejidos de almacenaje de inulina de las plantas pero su cantidad no ha sido suficiente para explotarla a nivel comercial, por lo cual las inulinasas de microorganismos han adquirido un papel fundamental para la obtención industrializada de fructooligosacáridos y fructosa a partir de inulina natural, Ertan et al (2003)

a) $G - F - F - F - F - (F)n - F - F - F - F$

b) $G - F - F - F - F - (F)n - F - F - F - F - F$

Figura: Representación básica de acción de las dos clases de inulinasas sobre la inulina a) endoinulinasas; b) exoinulinasas.

La inulina es de gran interés porque es relativamente económica y un sustrato abundante para la producción de concentrados de fructosa. Debido a su mala solubilidad en agua, es hidrolizada en un medio ácido a altas temperaturas (80–100°C), aunque bajo estas condiciones la fructosa puede degradarse fácilmente, se

producen sub productos no deseados. Las inulinasas microbianas y de plantas hidrolizan la inulina a fructosa u otros oligosacáridos bajo reacciones más suaves, representando una alternativa apropiada para producir los compuestos buscados. Estas aplicaciones biotecnológicas de las inulinasas explican claramente la creciente atención hacia estas enzimas. Arand et al., 2202.

A pesar de la eficiencia de las inulinasas provenientes de microorganismos siempre existe el riesgo de contaminación de la enzima con componentes no deseados del microorganismo, ya que una de las etapas críticas en la producción de enzimas de uso comercial es el aislamiento y purificación de las enzimas de las células que la producen, riesgo que está acentuado cuando se trata de microorganismos con algún grado de toxicidad para el consumidor final del FOS y/o fructosa.

Además siempre existe la posibilidad de contaminación del cultivo ya sea de hongos, bacterias o levaduras con microorganismos similares, que puedan tener características dañinas para el consumidor.

Por lo expuesto anteriormente se plantearon los siguientes objetivos para el desarrollo del proyecto:

El objetivo principal del presente proyecto fue obtener extractos enzimáticos con actividad inulinasa a partir de células vegetales, evitando así añadir componentes biológicos extraños a la fuente de origen de la materia prima, inulina.

Otro objetivo del presente proyecto fue obtener extractos enzimáticos con actividad inulinasa a partir de células bacterianas, a partir de bacterias con nivel de riesgo para la salud humana y animal muy bajo.

Otro objetivo fue determinar el procedimiento para la obtención extracelular de la actividad inulinasa en ambos sistemas.

Un objetivo adicional fue obtener concentrados de FOS por acción de los extractos enzimáticos obtenidos, utilizables como ingredientes de alimentos funcionales, determinando a la vez el procedimiento para su obtención.

Un objetivo adicional fue la obtención de concentrados de Fructosa por acción de los extractos enzimáticos obtenidos, utilizables como ingredientes de alimentos funcionales, determinando a la vez el procedimiento para su obtención.

Materiales y Métodos

El objetivo principal del presente proyecto fue obtener extractos enzimáticos con actividad inulinasa a partir de células vegetales, evitando así añadir componentes biológicos extraños a la fuente de origen de la materia prima, inulina. Para esto se siguieron los siguientes pasos:

Se desarrollaron dos tipos de extractos enzimáticos con actividad tipo inulinasa

i) Proceso de obtención de extracto enzimático con actividad tipo endoinulinasa:

a) generación de callos in vitro a partir de explantes de las plantas Topinambur: Se cortaron y sumergieron en hipoclorito de sodio al 2 % discos de hojas de alrededor de 3 milímetros.

Se colocan en Medio MS sólido ver anexo 1, suplementado con ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) (10 mg/l) y se realizan pequeñas heridas en los explantes.

Las placas con los trozos de tejidos fueron colocadas en estufa de incubación a 25 °C, sin luz. Después de cuatro semanas de incubación el material seleccionado fue subdividido con una espátula fina y subcultivado nuevamente por otras cuatro semanas en el medio.

b) aislación de los callos generados y disgregación de las células contenidas en él.

Después de tres subcultivos del material se aislaron los callos y se disgregaron por medios mecánicos.

c) colocación de las células provenientes de los callos (10 a 30 mg/ml) en un medio líquido MS basal (ver anexo 1) sin fuente de carbono y se agregó inulina (30 g/l) con DP superior a 15.

d) incubación de dicha suspensión celular en agitación de 75 a 100 rpm con una temperatura de 25 a 28 °C durante 24 a 48 horas.

e) separación en forma estéril de las células provenientes de la suspensión celular del extracto, mediante filtración y/o centrifugación.

f) el extracto se concentra 10 veces por precipitación selectiva con sulfato de amonio al 30 %, Resultando el extracto enzimático deseado, en este caso con actividad tipo endoinulinasa sobre inulina.

ii) Proceso de obtención de extracto enzimático con actividad tipo exoinulinasa:

a) generación de callos in vitro a partir de explantes de las plantas Topinambur:

Se cortaron y sumergieron en hipoclorito de sodio al 2 % discos de hojas de alrededor de 3 milímetros.

Se colocan en Medio MS sólido ver anexo 1, suplementado con ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) (10 mg/l) y se realizan pequeñas heridas en los explantes.

Las placas con los trozos de tejidos fueron colocadas en estufa de incubación a 25 °C, sin luz. Después de cuatro semanas de incubación el material seleccionado fue subdividido con una espátula fina y subcultivado nuevamente por otras cuatro semanas en el medio.

b) aislación de los callos generados y disgregación de las células contenidas en él.

Después de tres subcultivos del material se aislaron los callos y se disgregaron por medios mecánicos.

c) colocación de las células provenientes de los callos (10 a 30 mg/ml) en un medio líquido MS basal (ver anexo 1) sin fuente de carbono y se agregó FOS (30 g/l) con DP inferior a 15.

d) incubación de dicha suspensión celular en agitación de 75 a 100 rpm con una temperatura de 25 a 28 °C durante 24 a 48 horas.

e) separación en forma estéril de las células provenientes de la suspensión celular del extracto, mediante filtración y/o centrifugación.

f) el extracto se concentra 10 veces por precipitación selectiva con sulfato de amonio al 30 %, Resultando el extracto enzimático deseado, en este caso con actividad tipo exoinulinasa.

Tanto la actividad tipo endoinulinasa como exoinulinasa se determina mediante CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION (HPLC-GP).

Otro objetivo del presente proyecto fue obtener extractos enzimáticos con actividad inulinasa a partir de células bacterianas, a partir de bacterias con nivel de riesgo para la salud humana y animal muy bajo.

Se desarrollaron dos tipos de extractos enzimáticos con actividad tipo inulinasa

i) Proceso de obtención de extracto enzimático con actividad tipo endoinulinasa:

- a) Crecimiento de la cepa bacteriana *Bacillus subtilis*:

Se siembra la bacteria en agar nutritivo.

Se hizo crecer a 33 °C durante 72 h.

- b) se coloca un inóculo de bacteria en un medio líquido, agua peptonada, suplementada con inulina (30 g/l) con DP superior a 15.

- c) incubación de dicha suspensión celular en agitación de 75 a 100 rpm con una temperatura de 33 °C durante 24 a 48 horas.

- d) separación en forma estéril de las bacterias del extracto, mediante filtración.

- e) el extracto se concentra 10 veces por precipitación selectiva con sulfato de amonio al 30 %, resultando el extracto enzimático deseado, en este caso con actividad tipo endoinulinasa sobre inulina.

- ii) Proceso de obtención de extracto enzimático con actividad tipo exoinulinasa:

- a) Crecimiento de la cepa bacteriana *Bacillus subtilis*: Se siembra la bacteria en agar nutritivo.

Se hizo crecer a 33 °C durante 72 h.

- b) se coloca un inóculo de bacteria en un medio líquido, agua peptonada, suplementada con FOS (30 g/l) con DP menor a 15.

- c) incubación de dicha suspensión celular en agitación de 75 a 100 rpm con una temperatura de 33°C durante 24 a 48 horas.

- d) separación en forma estéril de las bacterias del extracto, mediante filtración.

- e) el extracto se concentra 10 veces por precipitación selectiva con sulfato de amonio al 30 %, resultando el extracto enzimático deseado, en este caso con actividad tipo exoinulinasa sobre inulina.

Tanto la actividad tipo endoinulinasa como exoinulinasa se determina mediante CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN (HPLC-GP).

Un objetivo adicional fue obtener concentrados de FOS por acción de los extractos enzimáticos obtenidos, utilizables como ingredientes de alimentos funcionales, determinando a la vez el procedimiento para su obtención.

- a) Se prepara un bioreactor, tipo tanque agitado, con el extracto enzimático con actividad tipo endoinulinasa obtenida ya sea de las células vegetales o bien de la cepa bacteriana. En una concentración final al 1 % v/v.

- b) En el bioreactor se agrega una solución al 10 % de inulina (DP>15), solución que se mantiene en contacto con el extracto enzimático de 30 minutos a 5 horas.

- c) la solución final obtenida, rica en fructooligosacáridos es secada en secador spray.

Se obtiene un producto final concentrado en Fructooligosacáridos caracterizado porque contiene:

- **Con el extracto de Células Vegetales:** Un mínimo de 60 % de Fructooligosacáridos, menos de un 5 % de carbohidratos menores (glucosa, fructosa, sacarosa) y menos de un 35 % de inulina.
- **Con el extracto de la cepa bacteriana:** Un mínimo de 50 % de Fructooligosacáridos, menos de un 25 % de carbohidratos menores (glucosa, fructosa, sacarosa) y menos de un 25 % de inulina.

Un objetivo adicional fue la obtención de concentrados de Fructosa por acción de los extractos enzimáticos obtenidos, utilizables como ingredientes de alimentos funcionales, determinando a la vez el procedimiento para su obtención

- a) Se prepara un bioreactor, tipo tanque agitado con el extracto enzimático con actividad tipo exoinulinasa obtenida ya sea de las células vegetales o bien de la cepa bacteriana. En una concentración final al 1 % v/v.

- b) En el bioreactor se agrega una solución al 10 % de inulina o fructooligosacáridos solución que se mantiene en contacto con el extracto enzimático de 1 hora a 24 horas.

- c) la solución final obtenida, rica en fructosa puede opcionalmente ser secada en secador spray.

Se obtiene un producto final concentrado en Fructooligosacáridos caracterizado porque contiene:

- **Con el extracto de Células Vegetales:** Un mínimo de 70 % de Fructosa, menos de un 5 % de carbohidratos menores (glucosa, sacarosa) y menos de un 25 % de FOS/inulina.
- **Con el extracto de la cepa bacteriana:** Un mínimo de 70 % de Fructosa, menos de un 5 % de carbohidratos menores (glucosa, sacarosa) y menos de un 25 % de FOS/inulina.

Discusión y Comentarios

Se obtiene un extracto enzimático para obtención de FOS a partir de inulina el cual puede ser utilizado a nivel industrial en forma replicable y controlada, muy eficiente en el caso del extracto proveniente de células vegetales.

Se le denomina extracto con actividad tipo endoinulinasa ya que en vegetales no ha sido claramente publicado que exista la enzima endoinulinasa como tal, pero si se ha reportado actividad inulinasa, por lo tanto con este nivel de investigación no podemos asegurar que se trate de una enzima con esa actividad o bien participe un pool de enzimas que incluso incluyan enzimas de síntesis.

Además se obtiene un extracto enzimático para obtención de Fructosa a partir de inulina y/o FOS el cual puede ser utilizado a nivel industrial en forma replicable y controlada, muy eficiente.

También le denominamos extracto tipo exoinulinasa ya que no se estudió el mecanismo de reacción. Tanto para plantas como para bacterias se ha informado la existencia de la enzima exoinulinasa.

Los productos finales obtenidos tienen aplicación tanto a nivel de alimentación humana como animal.

Proyecciones del Proyecto

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proyecto FIA y los conocimientos capturados de la ejecución de éste, se pueden proyectar desarrollos en las siguientes áreas asociadas:

- **Producción de enzimas industriales:** Observando como se está desarrollando el mercado de los alimentos funcionales y los conceptos de alimentación sana y calidad de vida que maneja el consumidor, es posible esperar que en el mediano plazo el desarrollo de la industria en esta área requiera de estos insumos (inulinasas) para poder hacer más eficiente sus procesos, tanto para la obtención de FOS como de fructosa.
- **Utilización de FOS en producción animal:** El FOS al ser incorporado como insumos alimenticio en animales cumple la función de prebiótico, con lo cual se favorece el estado sanitario de éstos, previniendo la aparición de enfermedades que provocan pérdidas importantes en los sistemas productivos. Existe una tendencia a eliminar o reducir el empleo de sustancias antibióticas en los sistemas productivos, con lo cual la proyección de uso del FOS, inulina o Topinambur en la alimentación animal aumenta, convirtiéndose en una alternativa real de profilaxis.
- **Producción Industrial de FOS:** La producción industrial de FOS es una alternativa real para las agroindustrias interesadas en incorporarse en los mercados de alimentos funcionales. Este mercado si bien está desarrollado en mayor medida en países europeos, asiáticos y norteamericanos, las condiciones actuales del país en el marco de los tratados de libre comercio firmados, permiten efectuar el desarrollo en esta línea. La versatilidad del producto para incorporarlo en productos de consumo humano como por ejemplo, lácteos, panificación, confitería, bebidas y jugos, entre otros, entrega un abanico amplio de alternativas de comercialización.
- **Servicios Asociados:** Con el desarrollo del proyecto se desarrollaron técnicas de laboratorio que son posibles de aplicar en términos de mantener un control de calidad de los productos finales originados del desarrollo del proceso industrial. Además, se cuenta con la experiencia agronómica necesaria para iniciar una posible etapa de escalamiento comercial de la producción de tubérculos, pudiendo dar asesoría a pequeños productores interesados en el futuro en cultivar este vegetal para uso industrial.



Bibliografía

- AGUILAR C.; CAMIRUAGA M.; CAÑAS R.; GASMAN M. Y SERANI J.**, 1993. Utilización de la inulina del topinambur (*Helianthus tuberosa*) por aves y cerdos. Ciencia e Investigación Agraria. 10 (1): 19-25.
- BAKER, L.; HENNING, J.C.; THOMASSIN, P.S.**, 1990. The economic competitiveness of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosa*) as an agricultural feedstock for ethanol production for transportation fuels. Canadian Journal of Agricultural Economics. 38 (4):981-990.
- BECKER, R.**, 1982. Evaluación del uso de topinambur (*Helianthus tuberosa*) en engorda de cerdos. Tesis Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile. 98 p.
- CAÑAS R.; ROZAS R. Y CATRILEO A.**, 1980. *Helianthus tuberosa*. Evaluación agronómica, determinación de zonas de cultivo y su valor nutritivo. Tesis Departamento de Zootecnia, Facultad de Agronomía, P. Universidad Católica de Chile. 1980
- CONNERS I.L.**, 1967. An annotated index of plant diseases in Canada. Can. Dept. Agr., Ottawa, Ont. Publ. 1251.
- DUAN, Z.; DUVNJAK, Z.; TURCOTTE, G.**, 1991. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied microbiology and Biotechnology. 35(6):711-715.
- DUNCAN, C.** 2000, "Inulin-A comprehensive Scientific Review", www.members.shaw.ca
- ERTAN, F., EKONOC, F. AND AKTAC, T.** 2003 "Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viridae*". Pakistan Journal of Biological Sc. (6) 1332-1335
- GALLYAS, P.**, 1969. El topinambur. El campesino. 9:42-45.
- GARCIA, J.**, 1985. Evaluación del uso del topinambur (*Helianthus tuberosa*) en engorda invernal de novillos. Tesis Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile. 102p.
- GEISLER, G.**, 1980. Ein Lehrbuch- Biologische Grundlagen und Technik der Pflanzenproduktion. Berlin, Paul Parey Ed. 479 p.
- KAPPERT, H.; RUDOLF, W.**, 1958. Handbuch der Pflanzen Zuchtung, Berlin, Paul Parey Ed. 351 p.
- KAUR, N. AND GUPTA, A.** 2002, "Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition", J.Biosci (27) 703-714
- LABERGE Y SACKSTON**, 1987. Adaptability and diseases of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in Quebec. Can. J. Plant Sci. 67: 349-352.
- OPAZO, R.**, 1939. Plantas forrajeras, plantas industriales. Santiago, La Nación. Ed. 943 p.
- SEILER, G.J.**, 1988. Nitrogen and mineral content of selected wild and cultivated genotypes of Jerusalem artichokes. Agronomy Journal. 80(4):681-687.
- SWANTON C.J. Y CAVERS P.B.**, 1988. Regenerative capacity of rhizomes and tubers from two populations of *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem Artichoke). Weed Research. Vol 28 : 339-345.
- SWANTON C.J.**, 1987. Ecological aspects of growth and development of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Dissertation Abstracts International. Vol 47 N° 10 April.
- VENEGAS R.**, 1994. Antecedentes sobre el cultivo de Topinambur (*Helianthus tuberosa* L.) en Chiloé. Informe de actividades trimestral. Proyecto FONDEF PI-21.
- WYSE D.J. Y WILFAHRT L.**, 1982. Today's weed: Jerusalem Artichoke. Weeds Today. 13: 14-16.

