



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA

FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
INDUSTRIALES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



"EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE  
EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO (*Vaccinium  
floribundum* Kunth) CON SACCHAROMYCES CERÉVISIAE  
Y RHIZOPUS (*Oryzae*)"

Mary Trini Coari Coila

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Asesora: D.Sc. Elizabeth Huanatico Suarez

Co-asesor: M.Sc. Adaliht Jhony Arisaca Parillo

Juliaca, 2023





UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA

FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
INDUSTRIALES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



"EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE  
EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO (*Vaccinium  
floribundum* Kunth) CON SACCHAROMYCES CERÉVISIAE  
Y RHIZOPUS (*Oryzae*)"

Mary Trini Coari Coila

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Asesora: D.Sc. Elizabeth Huanatico Suarez  
Co-asesor: M.Sc. Adaliht Jhony Arisaca Parillo

Juliaca, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA  
FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
INDUSTRIALES  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



“EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE  
EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO (*Vaccinium  
floribundum* Kunth) CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE  
Y RHIZOPUS (*Oryzae*)”

Mary Trini Coari Coila

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Asesora: D.Sc. Elizabeth Huanatico Suarez

Co-asesor: M.Sc. Adaliht Jhony Arisaca Parillo

Juliaca, 2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

Coari, M. (2023). *Evaluación de antocianinas a través del método de extracción por fermentación del Ccomayo (Vaccinium floribundum kunth) con Saccharomyces cerevisiae y Rhizopus (Oryzae)*. (Tesis de ingeniería). Universidad Nacional de Juliaca.

**AUTOR:** Mary Trini Coari Coila

**TÍTULO:** Evaluación de antocianinas a través del método de extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum kunth*) con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus Oryzae*.

**PUBLICACIÓN:** Juliaca, 2023

**DESCRIPCIÓN:** Cantidad de páginas (108 pp)

**NOTA:** Tesis de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias – Universidad Nacional de Juliaca

**CÓDIGO:** 03-000023-03/C72

**NOTA:** Incluye bibliografía

**ASESOR:** D.Sc. Elizabeth Huanatico Suarez

**CO-ASESOR:** M.Sc. Adaliht Jhony Arisaca Parillo

**PALABRAS CLAVES:** Antocianinas, fermentación, extracción, rhizopus.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS INDUSTRIALES**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**“EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS A TRAVÉS DEL MÉTODO  
DE EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO  
(*Vaccinium floribundum* Kunth) CON SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE Y RHIZOPUS (*Oryzae*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Presentada por:**

**Mary Trini Coari Coila**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

**Dr. Julio Machaca Yana**

\_\_\_\_\_  
**PRESIDENTE DE JURADO**

**Mtra. Tania Jakeline Choque Rivera**

\_\_\_\_\_  
**JURADO (secretario)**

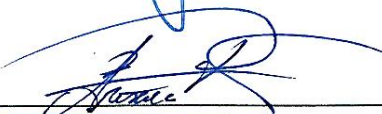
**M.Sc. Lenin Quille Quille**

\_\_\_\_\_  
**JURADO (vocal)**

  
\_\_\_\_\_  
**D.Sc. Elizabeth Huanatico Suarez  
ASESOR DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
**2° MIEMBRO**

  
\_\_\_\_\_  
**3° MIEMBRO**

  
\_\_\_\_\_  
**M.Sc. Adaliht Jhony Arisaca Parillo  
CO-ASESOR DE TESIS**

## DEDICATORIA

A Dios, por darme las fuerzas necesarias  
para seguir adelante a pesar de las  
dificultades que se presentaron a lo largo de  
este proyecto de investigación.

A mis padres, por su apoyo incondicional y  
persistencia, por la motivación constante  
para culminar la tesis; por sus sabios  
consejos y amor en los momentos difíciles.

A mis hermanos, por su apoyo moral.

A mis sobrinos, Mía y Alessandro por ser  
tan dulces, cariñosos y sobre todo por ser  
mi distracción en los momentos más  
difíciles.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Juliaca por ser mi alma mater, la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias por brindarme las herramientas necesarias en mi formación profesional.

A la D. Sc. Elizabeth Huanatico Suarez, por el asesoramiento, su motivación, su tiempo y dedicación quien hizo posible la ejecución de este proyecto de tesis.

Al M.Sc. Adalht Jhony Arisaca Parillo, por su tiempo y confianza durante este proceso.

Un especial agradecimiento al Dr Sc. Cesar Julio Larico Mamani por su tiempo y apoyo en la ejecución del proyecto de investigación.

A la Ingeniera Nora Ortiz del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, por su grata compañía, tiempo y apoyo ofrecido en este trabajo de investigación.

A mis jurados, el D.Sc. Julio Machaca Yana, la M.Sc. Tania Jakeline Choque Rivera el M.Sc. Lenin Quille Quille por las observaciones y recomendaciones realizadas para una buena ejecución y desarrollo de la presente investigación.

A mis dos grandes amigos Yudy y José, por su apoyo, motivación y por estar siempre conmigo de manera incondicional, alentándome a seguir.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	xvi

### CAPÍTULO I

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.2.1. Objetivo general.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3

### CAPÍTULO II

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CCOMAYO ( <i>Vaccinium floribundum</i> , Kunth).....	5
2.1.1. Aspectos Generales.....	5
2.1.2. Clasificación Taxonómica.....	5
2.1.3. Características botánicas.....	6
2.1.4. Composición química y valor nutricional.....	7
2.2. ANTIOXIDANTES.....	9
2.3. ANTOCIANINAS.....	10
2.3.1. Generalidades.....	10
2.3.2. Estructura química y clasificación de las antocianinas.....	10

2.3.3. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas .....	13
2.4. ANTOCIANINA COMO COLORANTES NATURALES .....	16
2.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	18
2.5.1. Generalidades .....	18
2.5.2. Levaduras .....	19
2.5.4. <i>Rhizopus</i> .....	21
2.5.5. Métodos de extracción de antocianinas.....	23

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. HIPÓTESIS.....	25
3.1.1. Hipótesis general.....	25
3.1.2. Hipótesis específicas .....	25
3.2. ÁMBITO DE ESTUDIO .....	25
3.3. MATERIALES Y EQUIPOS.....	26
3.4. METODOLOGÍA .....	27

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. PERFIL DE ANTOCIANINAS DEL FRUTO CCOMAYO.....	37
4.2. EVALUACIÓN DEL TIPO DE INÓCULO ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i> ) SOBRE EL RENDIMIENTO DE ANTOCIANINAS EN LA EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	40
4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE PROCESO (TEMPERATURA, pH Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN) EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL FRUTO CCOMAYO ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) POR FERMENTACIÓN.....	43

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. CONCLUSIONES.....	48
5.2. RECOMENDACIONES .....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización química y nutricional del <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (Ccomayo).....	8
Tabla 2: Grupos sustituyentes en la estructura de las antocianinas.....	12
Tabla 3: Contenido de antocianinas en frutos de baya.....	13
Tabla 4: Principales componentes de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
Tabla 5: Factores y niveles utilizados para el diseño Box – Behnken.....	34
Tabla 6: Matriz del diseño experimental (diseño Box-Behnken).....	35
Tabla 7: Análisis fisicoquímicos de la pulpa de Ccomayo ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	39
Tabla 8: Rendimiento de inóculos en la extracción de antocianinas del Ccomayo ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth).....	40
Tabla 9: Análisis estadístico con la prueba “t” para dos muestras suponiendo varianzas iguales.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Frutos del Ccomayo ( <i>Vaccinium floribundum</i> , Kunth).....	7
Figura 2: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas. ....	11
Figura 3: Estructura de las antocianinas a diferentes pH's, donde R1= H o glúcido, R2 y R3 = H o metilo.....	15
Figura 4: <i>Rhizopus oryzae</i> . Esporangio y columnela (a), esporangiosporas (b).....	22
Figura 5: Diagrama de flujo de la obtención del extracto de antocianinas.....	29
Figura 6: Balance de materia en la extracción de antocianinas del Ccomayo.....	36
Figura 7: Cromatografía HPLC – de antocianinas identificadas del fruto Ccomayo ( <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth). ....	37
Figura 8: Cromatografía HPLC – del patrón estándar de la antocianidina (Cianidina -3- glucósido). ....	38
Figura 9: Gráfico de efectos principales para el rendimiento obtenido con el inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
Figura 10: Grafica de efectos principales para rendimiento obtenido con el inóculo de <i>Rhizopus oryzae</i> . ....	46
Figura 11: Arbustos del fruto Ccomayo .....	58
Figura 12: Recolección de Ccomayo en la comunidad de Pataquitum (Coasa).....	58
Figura 13: Limpieza y selección de frutos en estado de madures comercial para la ejecución del proyecto. ....	59
Figura 14: Desinfección y pesado del fruto Ccomayo. ....	59
Figura 15: Acetato de potasio 0,5 M y Ácido acético 0,1 N. ....	60
Figura 16: Pesado y dilución del agar Sabouraud .....	60
Figura 17: Esterilización de materiales de laboratorio para el cultivo .....	61
Figura 18: Plaqueado del medio con agar sabouraud diluido.....	61
Figura 19: Cultivo del <i>Rhizopus oryzae</i> en las placas esterilizadas .....	62
Figura 20: Medios de cultivo incubados a 27 °C .....	62
Figura 21: Trituración del Ccomayo .....	62
Figura 22: Medición del pH y grados °Brix .....	63
Figura 23: Pesado de la levadura liofilizada, fosfato de amonio y sacarosa .....	63
Figura 24: Inoculo del fruto con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	64
Figura 25: Inoculación del <i>rhizopus</i> a las muestras a experimentar.....	64
Figura 26: Fruto triturado (Ccomayo) a diferentes pH.....	64

Figura 27: Fermentación de muestras en la incubadora con agitador orbital a 120 oscilaciones .....	65
Figura 28: Extracto de antocianinas Fermentados después de 72 hrs .....	65
Figura 29: Medición del volumen obtenido y centrifugado .....	66
Figura 30: Extracto de antocianinas con levaduras y hongos.....	66
Figura 31: Pesado del extracto de Ccomayo .....	67
Figura 32: Homogenización de la muestra .....	68
Figura 33: Evaporación de etanol.....	68
Figura 34: Purificación con cartucho C18 del Ccomayo.....	68
Figura 35: Secado a presión reducida y muestra redisuelta para el HPLC.....	69
Figura 36: Cromatograma del extracto fermentado denominado S1 en 5μ.....	70
Figura 37: Cromatograma del extracto fermentado denominado S2 en 5μ.....	70
Figura 38: Cromatograma del extracto fermentado denominado S3 en 5μ.....	70
Figura 39: Cromatograma del extracto fermentado denominado S4 en 5μ.....	71
Figura 40: Cromatograma del extracto fermentado denominado S5 en 5μ.....	71
Figura 41: Cromatograma del extracto fermentado denominado S6 en 5μ.....	71
Figura 42: Cromatograma del extracto fermentado denominado S7 en 5μ.....	72
Figura 43: Cromatograma del extracto fermentado denominado S8 en 5μ.....	72
Figura 44: Cromatograma del extracto fermentado denominado S9 en 5μ.....	72
Figura 45: Cromatograma del extracto fermentado denominado S10 en 5μ.....	73
Figura 46: Cromatograma del extracto fermentado denominado S11 en 5μ.....	73
Figura 47: Cromatograma del extracto fermentado denominado S12 en 5μ.....	73
Figura 48: Cromatograma del extracto fermentado denominado S13 en 5μ.....	74
Figura 49: Cromatograma del extracto fermentado denominado S14 en 5μ.....	74
Figura 50: Cromatograma del extracto fermentado denominado S15 en 5μ.....	74
Figura 51: Cromatograma del extracto fermentado denominado R1 en 5μ .....	75
Figura 52: Cromatograma del extracto fermentado denominado R2 en 5μ .....	75
Figura 53: Cromatograma del extracto fermentado denominado R3 en 5μ .....	75
Figura 54: Cromatograma del extracto fermentado denominado R4 en 5μ .....	76
Figura 55: Cromatograma del extracto fermentado denominado R5 en 5μ .....	76
Figura 56: Cromatograma del extracto fermentado denominado R6 en 5μ .....	76
Figura 57: Cromatograma del extracto fermentado denominado R7 en 5μ .....	77
Figura 58: Cromatograma del extracto fermentado denominado R8 en 5μ .....	77
Figura 59: Cromatograma del extracto fermentado denominado R9 en 5μ .....	77

Figura 60: Cromatograma del extracto fermentado denominado R10 en 5 $\mu$ .....	78
Figura 61: Cromatograma del extracto fermentado denominado R11 en 5 $\mu$ .....	78
Figura 62: Cromatograma del extracto fermentado denominado R12 en 5 $\mu$ .....	78
Figura 63: Cromatograma del extracto fermentado denominado R13 en 5 $\mu$ .....	79
Figura 64: Cromatograma del extracto fermentado denominado R14 en 5 $\mu$ .....	79
Figura 65: Cromatograma del extracto fermentado denominado R15 en 5 $\mu$ .....	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Imágenes tomadas durante la ejecución del proyecto de investigación.....	58
Anexo 2. Preparación de las soluciones buffer para la extracción de antocianinas .....	60
Anexo 3. Preparación de medios de cultivo para el <i>Rhizopus oryzae</i> .....	60
Anexo 4. Preparación de los inóculos con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Rhizopus oryzae</i> .....	62
Anexo 5. Balance de materia en la extracción de antocianinas del Ccomayo por el método de fermentación: .....	67
Anexo 6. Purificación de antocianinas .....	67
Anexo 7. Análisis de antocianinas por HPLC (Inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	70
Anexo 8. Análisis de antocianinas por HPLC (Inóculo de <i>Rhizopus oryzae</i> ) .....	75
Anexo 9. Resultados del análisis de laboratorio de la cuantificación de antocianinas con HPLC.....	80
Anexo 10. Resultados de la optimización con el inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	83
Anexo 11. Resultados de la optimización con el inóculo de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	84
Anexo 12. Rendimientos obtenidos con el inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	85
Anexo 13. Rendimientos obtenidos con el inóculo de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	86
Anexo 14. Datos experimentales obtenidos en el laboratorio con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	87
Anexo 15. Datos experimentales obtenidos en el laboratorio con <i>Rhizopus oryzae</i> .....	90
Anexo 16. Ubicación UTM del proyecto .....	93

## RESUMEN

Las antocianinas son flavonoides que se encuentran dentro de la composición de distintos frutos responsables de brindar el color, siendo una de ellas el fruto silvestre Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth). Así mismo estos compuestos son interesantes debido a su impacto en las características sensoriales de los alimentos y también se pueden utilizar como colorantes naturales en la industria alimentaria. El objetivo de la presente investigación fue evaluar las antocianinas a través del método de extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus* (*Oryzae*). Para poder evaluar el tipo de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) sobre el rendimiento de antocianinas y evaluar el efecto de las variables de proceso (tiempo, temperatura y pH) en la extracción de antocianinas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), por fermentación. Se trabajó con 15 tratamientos bajo el diseño de superficie respuesta Box-Behnken, realizando la inoculación de dos cepas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) en el extracto de Ccomayos a fermentar en las mismas condiciones y parámetros. Logrando determinar que los fermentos con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron diferencias significativas superiores ( $p < 0.005$ ), a los extractos inoculados con *Rhizopus oryzae* a un nivel de confianza del 95%. De la evaluación de las variables de proceso se determinó que en 72 hrs a 30°C y pH 3 se obtuvo el mejor rendimiento con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* y en 48 hrs a 40°C a pH 4 se obtuvo los mejores rendimientos con el inóculo de *Rhizopus oryzae*. Por medio del HPLC, se logró identificar la presencia de la Cianidina-3-glucósido en el fruto Ccomayo.

**Palabras clave:** Antocianinas, fermentación, extracción, rhizopus.

## ABSTRACT

Anthocyanins are flavonoids found within the composition of different fruits responsible for providing color, one of which is the wild fruit Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth). Likewise, these compounds are interesting due to their impact on the sensory characteristics of food and can also be used as natural colorants in the food industry. The objective of this research was to evaluate the influence of process variables (temperature, pH and time) on the extraction of anthocyanins from Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) by fermentation. In order to evaluate the type of inoculum (*Saccharomyces cerevisiae* and *Rhizopus oryzae*) on the yield of anthocyanins and to evaluate the effect of process variables (time, temperature and pH) on the extraction of anthocyanins from the Ccomayo fruit (*Vaccinium floribundum* Kunth), by fermentation. We worked with 15 treatments under the Box-Behnken response surface design, inoculating two strains (*Saccharomyces cerevisiae* and *Rhizopus oryzae*) in the Ccomayos extract to ferment under the same conditions and parameters. Managing to determine that the ferments with the inoculum of *Saccharomyces cerevisiae* showed higher significant differences ( $p < 0.005$ ), than the extracts inoculated with *Rhizopus oryzae* at a confidence level of 95%. From the evaluation of the process variables, it was determined that in 72 hrs at 30°C and pH 3 the best performance was obtained with the inoculum of *Saccharomyces cerevisiae* and in 48 hrs at 40°C at pH 4 the best yields were obtained with the *Rhizopus oryzae* inoculum. Through HPLC, it was possible to identify the presence of Cyanidin-3-glucoside in the Ccomayo fruit.

**Keywords:** Anthocyanins, fermentation, extraction, *Rhizopus*.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú se encuentra una gran diversidad de plantas silvestres que aún no han sido estudiados ni caracterizados, las cuales pueden ser una fuente importante para la obtención de colorantes naturales. Dentro de ello se encuentra el Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), una planta perteneciente a la familia Ericaceae y al género *Vaccinium*, que abunda en la ceja de selva de nuestra región Puno, en las zonas templadas y frías. Este fruto es consumido por los pobladores de la zona, sin saber el alto contenido de antocianinas y los beneficios que tienen estas para la salud.

Las antocianinas son pigmentos vegetales con gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos; por tanto es de gran importancia conocer los aspectos bioquímicos que enmarcan estos pigmentos (Parra, 2014). Es así que hoy en día se tiene una importante demanda de colorantes naturales como alternativa a los colorantes sintéticos, debido a que presenta toxicidad en algunos alimentos, productos de belleza y medicamentos (Garzon, 2008).

El interés en los pigmentos de las antocianinas y la investigación científica sobre ellas ha aumentado en los últimos años, no solo porque agregan color a los productos que las contienen, sino también por su papel potencial en la reducción de algunas enfermedades como el cáncer, la diabetes y entre otras. Por lo tanto, las antocianinas además de su función como colorante, son agentes potenciales en la elaboración de productos con valor agregado. Aunque las antocianinas tienen ventajas como sustitutos de los pigmentos artificiales, existen factores como su baja estabilidad y la falta de material vegetal que restringen su utilización de manera comercial.

El objetivo principal de la siguiente investigación radica en evaluar las antocianinas a través del método de extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*. Para promover y motivar el cultivo de este fruto, para luego obtener colorantes naturales.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la región de Puno, encontramos una gran cantidad de frutos silvestres con un elevado contenido de sustancias bioactivas como colorantes naturales, siendo una de ellas el fruto denominado Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) por los pobladores de la zona en estudio. Este fruto puede obtenerse de manera silvestre, para el uso de este tipo de colorantes, a su vez podría ser una alternativa de colorantes artificiales utilizados en la Industria Alimentaria. Las antocianinas son estudiadas en la industria alimentaria, principalmente por su pigmentación natural, siendo un potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos en alimentos (Garzon, 2008). El interés en estos compuestos, ha propiciado que nuestra sociedad está experimentando un cambio en el concepto de alimento y en su forma de alimentarse, exigiendo la presencia de sustancias nutritivas con propiedades funcionales. Por tanto, se han utilizado antocianinas en lugar de pigmentos sintéticos (Fan, Han, Gu, y Gu, 2008).

Las antocianinas se obtienen normalmente por la extracción de plantas. Los métodos de extracción utilizados en la actualidad son el metanol, etanol, acetona y agua, sin embargo la estabilidad de estas antocianinas son fácilmente afectadas debido a las modificaciones estructurales y factores ambientales como tales como la temperatura y luz (Wrolstad, 2004). Por lo tanto la extracción por fermentación de antocianinas con la ayuda de hongos y levaduras son más puras que las extraídas por químicos (Fan, Han, Gu, *et al.*, 2008).

La fruta silvestre denominado Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) contiene una considerable cantidad de antocianinas por presentar similares características al arándano perteneciente a la misma familia, por ello se evaluó el tipo de inóculo para la extracción de antocianinas por el método fermentación, misma que es influenciada por las variables de proceso. Por ello se plantea las siguientes interrogantes:

### **1.1.1. Pregunta general**

¿Las antocianinas aumentarán a través del método de extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus Oryzae*?

### **1.1.2. Preguntas específicas**

- ¿Cuál es el tipo de inóculo más adecuado *Saccharomyces cerevisiae* o *Rhizopus oryzae* para la extracción por fermentación de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth)?
- ¿Cómo afectan las variables de proceso (tiempo, temperatura y pH) en la extracción de antocianinas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) por fermentación?

## **1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.2.1. Objetivo general**

Evaluar el contenido de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) extraídos mediante el método de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus Oryzae*

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el tipo de inóculo *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae* sobre el rendimiento de antocianinas en la extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth).
- Evaluar el efecto de las variables de proceso (tiempo, temperatura y pH) en la extracción de antocianinas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) por fermentación.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad existe una preocupación pública debido a la seguridad de los colorantes sintéticos en los alimentos generando una demanda de pigmentos naturales como solución al pigmento sintético, el rojo 40, debido a que se utiliza como un aditivo en la industria de alimentos (dulces, galletas, yogures, condimentos, etc.) e incluso también son utilizados en medicamentos y cosméticos (Garzón, 2010). El uso de estos colorantes se ha incrementado debido a que es un indicador de aceptación del consumidor, esto se viene dando desde hace muchos años atrás, con los diversos estudios realizados se demostraron la aceptación de un producto por parte del consumidor con una buena medida de apariencia y color. Esta es una de las razones por el cual se utilizan los colorantes en los alimentos y productos con un valor subjetivo del que no genere riesgos en la salud humana. Es por ello que el consumidor ha optado por utilizar colorantes naturales en lugar de colorantes sintéticos, es así que en este trabajo de investigación se orienta a la obtención de un colorante natural.

Las antocianinas son un grupo de biomoléculas altamente sensibles a los cambios químicos y físicos (Garzón, 2010), que se encuentran dentro de la composición de los pigmentos vegetales de diferentes colores tales como el azulado, rojo oscuro o morado, que contienen las plantas. Actualmente los métodos de extracción más empleados son el metanol, etanol, acetona y agua. Sin embargo, las estabilidades de estas antocianinas son fácilmente modificados estructuralmente debido a los factores ambientales, así como la luz y la temperatura, por lo tanto, a menudo se agrega ácido clorhídrico o ácido fórmico a los disolventes para evitar la degradación de las antocianinas (Mirko *et al.* 2006). Pero en estos extractos, hay más impurezas como amilosa y proteínas a diferencia de la extracción con microorganismos. A su vez estos métodos de extracción requieren un costo relativamente alto debido al uso de varios disolventes para la purificación de antocianinas. Por lo tanto con el método de fermentación con microorganismos (*Saccharomyces* y *rhizopus*) es menos costosa, y se extraen más puras las antocianinas (Fan, Han, Gu, *et al.*, 2008).

En la presente investigación se deduce que el Ccomayo, tiene un alto contenido de antocianinas debido a la coloración que esta presenta, y a su vez tiene la gran importancia de combatir enfermedades cardiovasculares, cáncer y problemas de enfermedades crónicas de esta época (Oblitas y Perez, 2019). Por lo tanto, la extracción de pigmentos a partir del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), será una opción para los comuneros

del distrito de Coasa, beneficiando a los pequeños productores a fortalecer la agricultura, a su vez contribuirá económicamente, ya que hoy por hoy ya no se necesita de una tecnología avanzada, pero sobre todo siendo una opción para la industria de alimentos, ya que el extracto de las antocianinas pueden sustituir a los colorantes sintéticos, dando una mayor seguridad al consumidor final.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 2.1. CCOMAYO (*Vaccinium floribundum*, Kunth)

##### 2.1.1. Aspectos Generales

El Ccomayo (*Vaccinium floribundum*, Kunth), es un fruto climatérico de la familia Ericaceae, es una mata de origen andino, se encuentra de manera silvestre en los páramos de la sierra andina, a una altitud que va desde los 2800 hasta los 4000 msnm (Racines *et al.*, 2016); su crecimiento se da en climas templados y fríos en bosques seco montanos y húmedos a una temperatura de 3 a 17 °C (Meléndez *et al.*, 2021).

En la actualidad el empleo de estos frutos es muy poco común para su consumo en fresco ya sea en jugos, mermeladas y jaleas (Coba *et al.*, 2012). Tiene un gran potencial agroindustrial debido a sus propiedades físico-químicos; el *Vaccinium floribundum* puede ser refrigerado sin alterar sus características organolépticas y nutricionales, ni variar en peso y volumen. Y esto puede facilitar la elaboración de productos alimenticios, incluso fuera de las épocas de cosecha (Racines *et al.*, 2016). Estos frutos tienen contenidos importantes de antioxidantes, azúcares, minerales, vitaminas del complejo B, C y minerales como potasio, calcio y fósforo (Morales, 2011). Para poder expandir y producir a gran escala este frutal andino se tienen varias limitaciones tales como la falta de conocimiento de su ecología con respecto al tipo de clima y suelo que estos necesitan, lo cual claramente no permite la domesticación de estos cultivos (Vasco *et al.*, 2009).

##### 2.1.2. Clasificación Taxonómica

El Ccomayo se conoce científicamente como *Vaccinium floribundum*, Kunth según la identificación taxonómica de especímenes vegetales por el Dr. Hugo Dueñas Linares, Especialista Forestal en Identificación Taxonómica de especies en flora silvestre – SERFOR.

Según Freire (2004), el Ccomayo está ubicada dentro de la familia Ericaceae y se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Ericales*

Familia: *Ericaceae*

Sub – familia: *Vaccinioideae*

Género: *Vaccinium*

Especie: *Floribundum*

Nombre común: *mortiño, ccomayo, licuna, uvita de monte.*

### **2.1.3. Características botánicas**

Las plantas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum*, Kunth), son arbustos ramificados de hasta 2,5 m, hojas muy pequeñas con protuberancias redondeadas, flores de 1 centímetro de diámetro, tubo del cáliz articulado, corola con los pétalos soldados en toda su longitud, hipanto globoso, pueden ser de color blanco o rosada, con 8 o 10 estambres, tan largos como el tubo de la corola, filamentos sueltos. Los frutos del *Vaccinium floribundum* generalmente son casi esféricas logrando a tener un rango de diámetro que va de 5 a 8 mm, con un epicarpio de color azul (Coba *et al.*, 2012).

El género *Vaccinium* se caracteriza por crecer de forma silvestre y reproducirse de manera vegetativa. Como consecuencia existe mucha diversidad de esta planta de la familia Ericaceae (Meléndez *et al.*, 2021). En Ecuador y Colombia se han reportado en este género *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium meridionale* y *Vaccinium corymbodendron*. con consumo de los frutos (Dávila, 2001).

Los nombres vulgares más conocidos del *Vaccinium floribundum*, en Ecuador son: mortiño, uva de los Andes, manzanilla de cerro, uva de monte; en Colombia se lo conoce como agraz, y en Perú como macha macha, congama, pushgay (Coba *et al.*, 2012).

En el Perú se puede encontrar materiales de *Vaccinium floribundum*, del cual se utiliza su germoplasma para el mejoramiento genético de diferentes géneros comerciales de *Vaccinium* (Mendoza *et al.*, 2020).



**Figura 1: Frutos del Ccomayo (*Vaccinium floribundum*, Kunth).**

#### **2.1.4. Composición química y valor nutricional**

En la Tabla N° 2 se muestra la composición química y el valor nutricional del *Vaccinium floribundum* Kunth. (Ccomayo). Principalmente están compuestos de agua en un 80% a 90% y su composición sólida está hasta en un 20% y el otro 80% le corresponde a las proteínas, carbohidratos y lípidos.

**Tabla 1: Caracterización química y nutricional del *Vaccinium floribundum* Kunth. (Ccomayo)**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Componentes aproximados</b>	
Humedad (g/100 g)	81.0 ± 2.0
Grasa (g/100 g)	1.0 ± 0.04
Proteína (g/100 g)	0.7 ± 0.02
Ceniza (g/100 g)	0.4 ± 0.03
Carbohidratos totales (g/100 g)	16.9 ± 0.1
Fibra dietética Total (g/100 g)	7.6 ± 2.2
Fibra dietética Soluble (g/100 g)	1.2 ± 1.0
Fibra dietética Insoluble (g/100 g)	6.5 ± 2.5
<b>Azúcares solubles</b>	
Fructosa (g/100 g)	4.4 ± 0.4
Glucosa (g/100 g)	2.6 ± 0.3
<b>Valor calórico (kcal/100 g)</b>	84.0 ± 0.4
<b>Ácidos orgánicos</b>	
Ácido cítrico (mg/100 g)	3 142 ± 614
Ácido málico (mg/100 g)	1 823 ± 274
<b>Iones metálicos</b>	
Fe (mg/100 g)	0.64 ± 0.2
K (mg/100 g)	607 ± 73
Ca (mg/100 g)	17.0 ± 2.3
Mg (mg/100 g)	10.2 ± 1.1
Cu (mg/100 g)	0.12 ± 0.02
Zn (mg/100 g)	0.13 ± 0.02
<b>Componentes antioxidantes</b>	
Ácido ascórbico (mg /100 g)	9.0 ± 2.0
Contenido de fenoles solubles totales (mg AG /100 g)	882 ± 38
Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox TEAC	1 203 ± 94

FUENTE: Vasco *et al.* (2009).

## 2.2. ANTIOXIDANTES

Se denomina “antioxidante” a “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula” (López *et al.*, 2013) o también “a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres” (Fernandez y Puma, 2021). Estas propiedades antioxidante se estudian por su interacción químico – biológico en el deterioro oxidativo de los alimentos (Coronado *et al.*, 2015). La oxidación es una reacción química en la que los elementos se oxidan debido a la presencia de oxígeno; transfiere electrones e hidrógeno a los elementos reductores, y estas reacciones de oxidación se promueven en una cadena de los radicales libres (Cofré, 2015). Los radicales libres son cualquier tipo de molécula o ion que contiene un electrón desapareado en su última órbita de energía y puede permanecer de forma independiente reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los antioxidantes también pueden inhibir algunas reacciones de oxidación y se pueden definir como agentes reductores (Patthamakanokporn *et al.*, 2008).

Los antioxidantes se clasifican en dos principales sistemas, enzimáticos y no enzimáticos, también conocidos como endógenos y exógenos. (López *et al.*, 2013).

El sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno están definidos por una familia de compuestos nombrados como depuradores de radicales libres, que intervienen difiriendo la formación y acción de los radicales libres. Algunos de los antioxidantes no enzimáticos en las células son los bioflavonoides, la bilirrubina, el glutatión, las ubiquinonas, ácido lipoico, la vitamina E (alfa tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetil – L – carnitina, coenzima Q10, curcumina, Nacetil - cisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio son algunas de las estructuras moleculares de las enzimas antioxidantes. Las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio y los flavonoides son las partículas químicas antioxidantes (Venereo, 2002). Los sistemas de defensa correspondientes a las enzimas antioxidantes incluyen a catalizadores como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (GSHPX), tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa. La superóxido dismutasa es una metaloenzima omnipresente en las células procariotas y eucariotas, que convierte los iones superóxido en peróxido de hidrógeno y es inhibida por el sistema catalasa/glutatión peroxidasa, convirtiéndolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado (Korc *et al.*, 2004).

## **2.3. ANTOCIANINAS**

### **2.3.1. Generalidades**

Las antocianinas se encuentran en los frutos de la especie *Vaccinium floribundum* así como la cianidina y delphinidina (Meléndez *et al.*, 2021). Estos compuestos son sustancias químicas encargadas de otorgar los colores rosa, malva, rojo, azul y violeta que se encuentran en los frutos y flores (Coultate, 2013). Además, las antocianinas tienen un carácter no tóxico son inocuos e hidrosolubles, lo que hace interesante para su uso en la industria alimentaria (Limaymanta, 2016). Por otro lado resaltamos sus propiedades antioxidantes, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, neuropatía y diabetes (Castañeda *et al.*, 2009; Meléndez *et al.*, 2021; Arteaga y Arteaga, 2016; Vásquez *et al.*, 2012).

Badui (2006), menciona que las antocianinas se encuentran en una subclase de los flavonoides; igualmente conocidos como flavonoides azules. Son una composición de vegetales no nitrogenados que pertenecen a la familia de flavonoides, en la naturaleza. Aunque contiene pocos grupos cromóforos, se ha logrado identificar 300 de estos compuestos, que son los encargados de una amplia gama de colores, a partir de un incoloro hasta el púrpura.

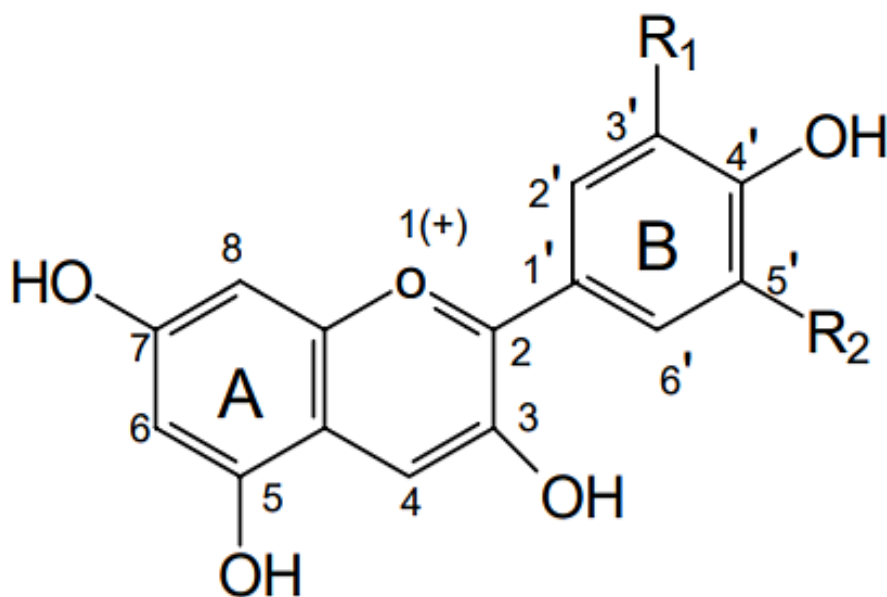
Para plantear este reto es más práctico estudiar la estructuras químicas de estos compuestos y los diversos factores que pueden afectar su estabilidad (Zapata, 2014).

### **2.3.2. Estructura química y clasificación de las antocianinas**

Las antocianidinas o agliconas son glucósidos de las antocianinas, que son pertenecientes al conjunto de los flavonoides. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, llamado también 2-fenil-benzopirilio (Rafael, 2017), las cuales están formados por dos anillos aromáticos, que están adheridos con tres enlaces de carbono y en el anillo “B” es donde la partícula especifica el tipo de aglicona, a la cual se suma la sacarosa por medio de un enlace glucosídico (Aguilera *et al.*, 2011). Se han detallado diversas antocianidinas, donde la Pelargonidina, Cianidina y delphinidina son más constantes en los frutos, cabe destacar también que en las plantas las agliconas no se muestran directamente sino de manera glucosilada, lo cual indica que está unida a un azúcar y es conocido como una antocianina. La sacarosa que se encuentra como molécula es la que concede una gran solubilidad y estabilidad, uniéndose a la aglicona o antocianidina (Araceli Castañeda *et*

al., 2009). Según (Garzón, 2010); las seis antocianinas que se encuentran frecuentemente en el anillo “B” son:

- Cianidina: Dispone un sustituyente hidroxilo y un hidrogeno, siendo muy común con un espectro visible de color naranja-rojo.
- Peonidina: Dispone un sustituyente metoxilo y un hidrogeno, con un espectro visible de color naranja-rojo.
- Pelargonidina: Dispone dos sustituyentes hidrogeno, con un espectro visible de color naranja.
- Malvinidina: Dispone dos sustituyentes metoxilo, con un espectro visible de color azul-rojo.
- Delfinidina: Dispone dos sustituyentes hidroxilo, con un espectro visible de color azul-rojo.
- Petunidina: Dispone un sustituyente metoxilo y un hidrogeno, con un espectro visible de azul-rojo.



**Figura 2: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.**

FUENTE: Garzón (2010).

La estructura química de las antocianidinas puede variar (se han descrito más de 700 antocianinas como glucósidos de 27 antocianidinas diferentes (Mazza, 2007)), hay seis antocianidinas que predominan en la naturaleza: cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina y Petunidina. Siendo la cianidina y la delfinidina las más

abundantes (Wrolstad, 2004). Estos compuestos aportan a los órganos de la planta una plétora de colores rojos, azules o violetas y son sensibles a variaciones de pH, temperatura, luz, oxígeno, iones metálicos, asociación intramolecular o asociación intermolecular con otros compuestos (Ruta y Farcasanu, 2019).

**Tabla 2: Grupos sustituyentes en la estructura de las antocianinas.**

Antocianidinas	Sustituyente		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) Espectro visible
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	
Pelargonidina	- H	- H	494
Cianidina	- OH	- H	506
Peonidina	- OCH <sub>3</sub>	- H	508
Delfinidina	- OH	- OH	506
Petunidina	- OCH <sub>3</sub>	- OH	508
Malvinidina	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>	510

FUENTE: Garzón (2010).

La incorporación de estas antocianinas mejora la apariencia de los alimentos además de ser muy benéficas para nuestra salud. Muchos estudios nos dan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la visión, actuar como antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. También juegan un papel en las propiedades antidiabéticas como; control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectivos (Shipp y Abdel, 2010).

Las antocianinas ocupan un lugar especial en el grupo de Polifenoles ya que se encuentran en las bayas en gran cantidad (Szajdek y Borowska, 2008). Se distribuyen en mayor proporción en la cascara y luego en las vacuolas de la célula sin antocianinas en la pared celular (Arias, 2013).

En la tabla N° 4 se muestra el contenido total de antocianinas en especies seleccionadas de bayas. Siendo el Ckokeberry (*Aronia melanocarpa*) una de las bayas con mayor contenido de antocianinas y el Grosellero (*Ribes rubrum*) con menos contenido de estos compuestos.

**Tabla 3: Contenido de antocianinas en frutos de baya**

<b>Especie</b>	<b>Antocianinas (mg/100g PF)</b>
Arándano ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	214.7 – 299.6
Mortiño ( <i>Vaccinium floribundum kunth</i> )	345
Zarzamora ( <i>Rubus fruticosus</i> )	134.6 – 152.2
Grosella negra ( <i>Ribes nigrum</i> )	128 – 411
Arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> )	62.6 – 331
Ckokeberry ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	311.02 – 460.5
Arándano agrio ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )	19.8 – 65.6
Frambuesa ( <i>Rubus idaeus</i> )	19 – 65.6
Grosellero ( <i>Ribes rubrum</i> )	7.5 – 7.8
Fresa ( <i>Fragaria x ananassa</i> )	20.07 – 39.8

FUENTE: Szajdek y Borowska (2008).

### **2.3.3. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas**

La estabilidad de las antocianinas se ve afectada por varios factores. De hecho, la estructura química de las antocianinas puede verse afectada en cualquier etapa del proceso tecnológico, como por ejemplo, durante la extracción de antocianinas de vegetales, durante el tratamiento térmico o durante el almacenamiento de productos que contienen antocianinas. Las razones más importantes que afectan la estabilidad de las antocianinas se exponen a continuación.

#### **a. Temperatura**

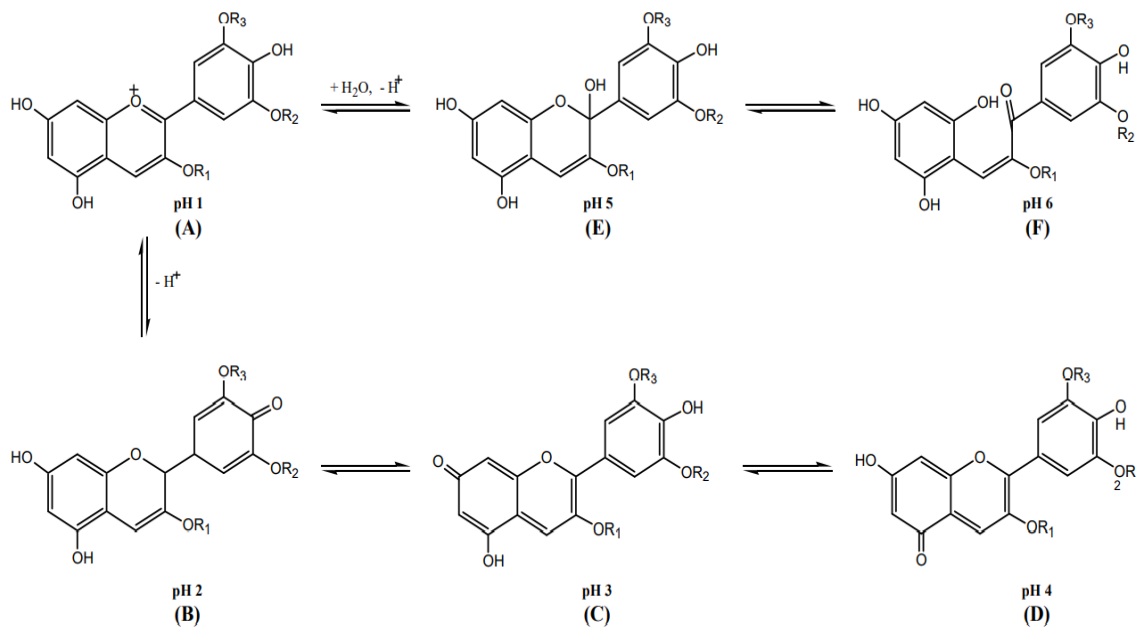
La temperatura es uno de los principales factores para determinar la estabilidad de las antocianinas (Xie *et al.*,2018). Esta afecta considerablemente la estabilidad de los pigmentos antociánicos, en los alimentos (Fennema, 2000). Las cuales poseen una resistencia en los procesos térmicos durante un corto tiempo a altas temperaturas. La degradación por efecto de calor por encima de los 60°C, ocurre según una cinética de primer orden. Por lo general las características estructurales del pH mayores a 3, conllevan a una degradación simultanea convirtiendo al ion flavilio a una forma más frágil (Zapata, 2014; Andersen, 2002).

La degradación de las antocianinas a altas de temperatura sucede por dos mecanismos: los enlaces glucosídicos se hidrolizan formando con facilidad las antocianidinas o por el rompimiento de hidrólisis que producen las chalconas (Viquez, 2010). Las temperaturas altas también alteran la estructura de las antocianinas altamente hidrolizadas volviéndolas menos estables que las metiladas y acetiladas (Fennema, 2000).

#### **b. pH**

El pH es uno de los factores más importantes que tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (Garzón, 2010). Las antocianinas son muy estables a pH ácido tomando una coloración roja, pero esta estabilidad disminuye a medida que el pH se acerca a la neutralidad y se vuelven incoloras, a un pH de 7 estas se degradan completamente tomando una coloración azul o verdosa (Ortega *et al.*, 2007).

Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas que dependen del pH de la solución (Araceli Castañeda *et al.*, 2009). En la estructura química de las antocianinas, a pH 1 prevalece el catión flavilio siendo la más estable de las antocianinas tomando un color rojo, en un rango de pH que va de 2 a 4 se da la pérdida de un protón y al adicionar agua estas antocianinas formaran quinodales de color azul. A un pH de 5 y 6 encontramos la pseudobase carbinol y chalcona de forma incolora y de color amarillo, ambas son bastante inestables (L. Zapata, 2014). A un pH superior a 7, la degradación de las antocianinas es muy rápida debido a la oxidación con el aire adquiriendo colores intensos en la gama de los azules, verdes y amarillos, gracias al predominio de conformaciones neutras o aniónicas con una fuerte conjugación (Herrera, 2017). Los cambios mencionados en la estructura de antocianinas debido al pH se ven representadas en la figura 3.



**Figura 3: Estructura de las antocianinas a diferentes pH's, donde R1= H o glúcido, R2 y R3 = H o metilo.**

FUENTE: Castañeda *et al.*, (2009).

En el procesamiento de alimentos que poseen antocianinas, cuanto más bajo es el pH menor es la descomposición; lo cual quiere decir que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, en tanto el pH sea más elevado la descomposición será más rápido (Marañón *et al.*, 2015). Es así que el uso de las antocianinas es más recomendable en alimentos de acidez intermedia para que prevalezca el catión flavilio (Herrera Aliaga, 2017).

### c. Luz

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas, que son muy inestables y a su vez muy susceptibles a la fotodegradación cuando esta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (L. Zapata, 2014). Por otro lado, la copigmentación retrasa la alteración de las antocianinas por efecto de la luz (fotodegradación), de la misma manera que otros tratamientos con diferentes condiciones de almacenamiento, a su vez la aplicación de nuevas tecnologías de estabilización como la encapsulación preservan mejor las antocianinas aisladas (Araceli Castañeda *et al.*, 2009).

Por lo cual resulta importante proteger los productos con antocianinas, no solo del oxígeno, sino también de la luz.

#### **d. Oxígeno**

Las antocianinas consiguen oxidarse por reacción directa del oxígeno, o si no también por una oxidación indirecta por compuestos ya oxidados, formando un color marrón o incoloro en los productos (Herrera, 2017). El oxígeno tiene la capacidad de formar radicales libres que actúan como antioxidantes de las antocianinas. También, los mecanismos de oxidación se ven beneficiados con la elevación de temperatura (Zapata, 2014).

La degradación de antocianinas causada por la oxidación es más crucial en zumos y bebidas que en productos con menor capacidad de agua, debido a que en fuentes acuosas puede disolverse mayor cantidad de oxígeno (Hernández 2014).

#### **e. Copigmentación**

La copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de las antocianinas (Aliaga, 2017). Las formas coloreadas de las antocianinas se pueden estabilizar al interactuar con componentes llamados copigmentos (Aguilera *et al.*, 2011). Estos copigmentos pueden ser de tres: otras antocianinas (autoasociación), compuestos incoloros llamados flavonoides (copigmentación intermolecular) y ácidos hidroxicinámicos (copigmentación intramolecular) (Hernández 2014).

La interacción entre las molécula de la antocianina y el copigmento se produce a través de un enlace débil que genera fuerzas hidrofóbicas en la estructura, protegiendo a los átomos de carbono C2 y C4 del catión flavilio del ataque nucleofílico del H<sub>2</sub>O. Así mismo, la copigmentación constituido con el catión flavilio es más estable que aquellas constituidas con una base quinonoidal, lo que señala que a pH bajo predomina el catión flavilio, proporcionando una mejor protección (Araceli Castañeda *et al.*, 2009).

## **2.4. ANTOCIANINA COMO COLORANTES NATURALES**

En la actualidad el consumidor además de elegir un producto saludable prefiere adquirir un producto con buena apariencia, siendo el color una de las características que el consumidor nota primero para la elección de un producto.

Existen dos tipos de colorantes en el mercado: naturales y sintéticos. Los colorantes sintéticos además de ser mucho más fáciles de utilizar que los colorantes naturales, tienen

la ventaja de conceder mayor intensidad de coloración y se utilice en menor cantidad al momento de su adición, en general los colorantes artificiales son más resistentes a los tratamientos térmicos, pH extremos, luz, etc., que los colorantes naturales (Giusti y Wrolstad, 2003). Sin embargo presentan desventajas muy importantes relacionadas con la salud de algunas personas así como hiperactividad de niños en edad escolar y gastroenteritis alérgica (Prado *et al.*, 2012). Los colorantes sintéticos en altas dosis presentan problemas de toxicidad por lo que su empleo está siendo restringido y observado por organismos reguladores (L. Zapata, 2014). En la actualidad el estudio de los colorantes naturales es un área extensa y activa de investigación debido al creciente interés de los consumidores de sustituir los colorantes sintéticos con efectos tóxicos (Castañeda y Guerrero, 2015). La seguridad de los colorantes sintéticos ha sido cuestionada en los últimos años, lo que ha llevado a una reducción del número de colorantes permitidos. El interés por los colorantes naturales ha aumentado significativamente como consecuencia de la acción legislativa y conciencia del consumidor sobre el uso de aditivos sintéticos en sus comidas, a pesar de que los colorantes sintéticos poseen mejores características funcionales y tecnológicas que los naturales (Giusti y Wrolstad, 2003). Es por ello que se está buscando desarrollar investigaciones orientadas a la obtención de pigmentos a partir de materias primas de origen animal, mineral y fundamentalmente vegetal; debido a que presentan una menor toxicidad pero son muy caras, menos estables y menos potentes (Oplatowska *et al.*, 2017).

Los colorantes naturales constan de dos grupos químicos: cromóforos y auxocromos. Los cromóforos, suelen ser anillos aromáticos y están asociados a las propiedades de un colorante. Contiene enlaces insaturados como  $-C=C$ ,  $=C=O$ ,  $-C-S$ ,  $=C-NH$ ,  $-CH=N$ ,  $-N=N-$  y  $-N=O$ , cuyo número determina la intensidad del color. Los grupos auxocromos son sustitutos de los cromóforos que aumentan la intensidad del color (Riva, 2007).

Además, las antocianinas son los encargados de conferir los colores rojo, azul y violeta en vegetales, granos de cereales, flores y frutos (Andersen, 2002) especialmente en arándano, uva y manzana (L. Zapata, 2014). El empleo de las antocianinas como colorantes se encuentra contemplado dentro de los colorantes alimentarios permitidos por la Unión Europea (Alfonso *et al.*, 2021).

Las antocianinas juegan un papel muy importante en la aceptabilidad de los alimentos en la industria de colorantes, ya que debido a sus colores atractivos se puede utilizar como

colorantes naturales y por sus beneficios potenciales en la salud humana (Tan *et al.*, 2022; Ruta y Farcasanu, 2019; Cosavalente *et al.*, 2016; Aguilera-Otíz *et al.*, 2011).

El interés por las antocianinas de recursos naturales ha aumentado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. El estudio de los colorantes naturales es un área extensa y activa de investigación debido al creciente interés de sustituir los sintéticos colorantes con efectos tóxicos en humanos (Brouillard, 1982). Al ingresar al torrente sanguíneo de los mamíferos desde el tracto digestivo, las antocianinas permanecen intactas (Garzón, 2010) y tienen efectos terapéuticos conocidos, que incluyen la reducción de las enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. El efecto terapéutico de las antocianinas está relacionado con su actividad antioxidante (Aguilera-Otíz *et al.*, 2011; Cosavalente *et al.*, 2016; Castañeda *et al.*, 2009).

Las Antocianinas tienen actividad antioxidante y pueden reaccionar con los radicales libres. Estos últimos incluyen los radicales libres  $\text{OH}\cdot$  (hidroxilo) y  $\text{O}_2\cdot$  (superóxido), que pueden atacar proteínas, carbohidratos, grasas y ADN en el cuerpo, causando oxidación que puede dañar las células (Venereo, 2002).

Por consiguiente, la obtención de un producto rico en antocianinas derivado del Ccomayo podría tener un impacto positivo, dado que:

Se obtendría un colorante natural, el cual sustituiría a los colorantes sintéticos.

Se dispondría de una fuente de antioxidantes de origen natural.

Se ofrecería una alternativa de industrialización del *Vaccinium floribundum* Kunth (Ccomayo) que no pueden introducirse en el mercado de consumo en fresco, aumentando así la rentabilidad.

## **2.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

### **2.5.1. Generalidades**

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que se lleva a cabo en tejidos vegetales, en algunos hongos y exclusivamente en levaduras (Carbonero, 1975). Este proceso de fermentación en carencia de oxígeno, es originado por algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener alcohol en forma de

etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ),  $\text{CO}_2$  y moléculas de ATP que son ingeridos por los microorganismos en su metabolismo (Vázquez y Dacosta, 2007).

A su vez la fermentación alcohólica tiene el objetivo de proveer energía anaeróbica a las levaduras en carencia de oxígeno donde se separan las moléculas de glucosa buscando obtener la energía necesaria para sobrevivir, produciendo dióxido de carbono y alcohol como residuos a consecuencia de la fermentación (Vázquez, 2007). Los microorganismos (levaduras y bacterias) son causantes muy habituales de estos fenómenos, tanto los cereales como las frutas son los encargados de proporcionar en gran medida al sabor de los productos fermentados.

En la fermentación alcohólica se utilizan las levaduras, siendo el carbohidrato empleado como materia prima, es así que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se emplean en la fermentación de hexosas, lactosa y pentosas. Los rendimientos de alcohol etílico son constantemente superiores al 90% sobre el azúcar consumido, debido a su tolerancia al alcohol (Carbonero, 1975). El tiempo de fermentación varía según la temperatura, la concentración de azúcar y la cepa fermentadora.

### **2.5.2. Levaduras**

Son cuerpos unicelulares de un tamaño de 2 a 4  $\mu\text{m}$  generalmente sus células son ovaladas, que se encuentran de manera natural en algunas frutas, verduras y cereales. Se reproducen por bipartición, en algunos casos pueden ser dimórficas creciendo en el medio como micelios en condiciones ambientales específicos (Zinser & Daum, 1995). Estos son denominados organismos anaeróbicos facultativos, lo cual quiere decir que pueden iniciar su crecimiento biológico sin oxígeno (Beltran *et al.*, 2002). Las levaduras toleran un cierto rango de pH que va de 3 a 10, pero un medio ligeramente ácido es favorable para su crecimiento con un pH de 4.5 a 6.5 (Suárez *et al.*, 2016). En algunos estudios recientes se ha descubierto que es mejor reducir el movimiento en algunos casos, de algunas levaduras para que puedan atacar enzimáticamente mejor y con mayor eficiencia sobre el sustrato de hidratos de carbono, para lo cual sugieren emplear “fijadores” tales como el agar, alginato de calcio, etc. A su vez existen tres tipos de microorganismos responsables de la fermentación tales como las bacterias, mohos y levaduras (Vázquez, 2007).

### 2.5.3. *Saccharomyces cerevisiae*

El *Saccharomyces cerevisiae*, es una levadura heterótrofa muy conocida y de importancia industrial que obtiene energía a partir de la glucosa y a su vez tiene una elevada capacidad fermentativa (Querol *et al.*, 2003).

**Tabla 4: Principales componentes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Componentes (%)	(36), cit. (38)	(37)	(38)	(39)
Polisacáridos	29,71	34,1	36	31,40
Trehalosa	NR	5	NR	NR
Ácidos nucleicos y nucleótidos	10,65*	10,8	7,41*	9,00*
Fosfolípidos	1,18	4,5	2,63	0,5
Triglicéridos	NR	2,5	NR	NR
Esteroles	NR	1	NR	NR
Ceniza	8,32	3,1	7,34	4,60
Proteína	40,20	39	44,7	42,67

NR (No referido). \*(Expresado en ARN).

FUENTE: (Vázquez, 2007).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es muy utilizada desde tiempos muy antiguos en la producción de alcohol es por ello que Suárez y Guevara (2017), explican la producción de alcohol por fermentación mediante la conversión de hexosas en etanol mediante la siguiente ecuación:



La levadura, al ser un elemento catalizador en la reacción forma un producto inevitable, pudiendo disminuir su reproducción, pero no eliminarla del todo. La miel final es convertida de forma directa en hexosas, por la acción de la enzima invertasa, producida

por la propia levadura en el transcurso del proceso (Vázquez, 2007). A su vez la levadura crece al mismo tiempo que la producción de alcohol. La rapidez con la que se da la fermentación sube hasta llegar a un máximo de 15 horas. A partir de las 24 a 30 horas de manera decreciente baja la producción de alcohol.

### **Factores importantes para el crecimiento y desarrollo de la *Saccharomyces cerevisiae***

Estos factores son mencionados por (Vázquez, 2007):

- Temperatura: de manera que la temperatura sube se produce la disminución de proteínas, RNA y aminoácidos libres en la membrana celular. Así mismo, las levaduras al encontrarse a temperaturas bajas detienen su desarrollo quedándose en un estado de latencia.
- Luz: para el crecimiento de microorganismos que no tienen clorofila o pigmento alguno la luz es nociva para su crecimiento.
- pH: existe un rango óptimo de pH para el crecimiento de estos microorganismos, que va de 4 a 5. Los *Saccharomyces cerevisiae* crecen en medios ácidos, en comparación a otros microorganismos, lo cual es aprovechado en algunos procesos industriales y les facilita el control de bacterias para que puedan competir con el sustrato.

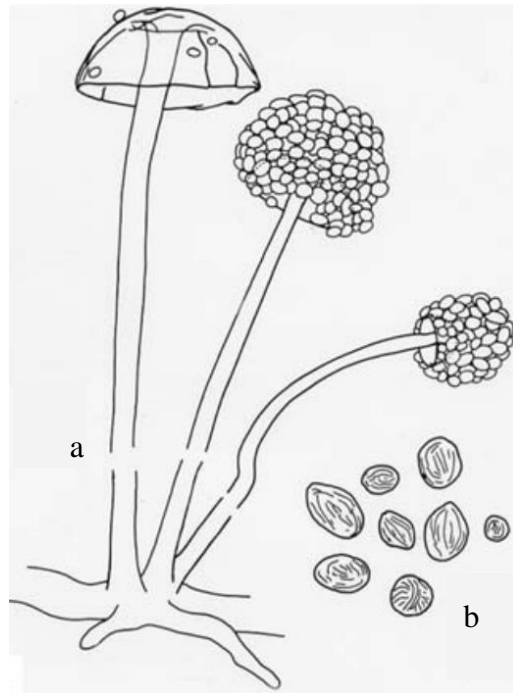
#### **2.5.4. *Rhizopus***

*Rhizopus*, es un género de mohos ubicuo que se propaga por esporangiosporas hidrofóbicas que se encuentran fácilmente en el suelo, frutas, vegetales y residuos (Ibarruri, 2019). A su vez se ha descrito que estas especies de *rhizopus* producen esporas asexuales y sexuales dentro de los esporangios y se liberan al madurar.

##### **a. *Rhizopus oryzae***

El *Rhizopus oryzae* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Ghosh y Ray, 2011), en regiones subtropicales. Además, el *Rhizopus oryzae* ha sido aislado de diferentes sustratos tales como frutas, vegetales semillas y suelos. Es conocido como colonizador primario, debido a su acelerado crecimiento en sustratos ricos en azúcares simples. Por otra parte el *Rhizopus* está implicado en el deterioro de los alimentos

mayormente de los cultivos provocando grandes pérdidas económicas en el almacenamiento y el transporte (Ma *et al.*, 2009).



**Figura 4: *Rhizopus oryzae*. Esporangio y columnela (a), esporangiosporas (b).**

FUENTE: Pitt y Hocking (2013).

#### **b. Características metabólicas del *Rhizopus oryzae***

El *Rhizopus oryzae* al ser conocido como primer colonizador de sustratos fácilmente degrada carbohidratos como el almidón, pectina y las hemicelulosas. También pueden degradar la celulosa estas especies, pero a un nivel más lento en comparación con otros hongos más agresivos.

Así mismo, los sustratos y condiciones derivados del azúcar se transfieren a través del piruvato, que es el centro del catabolismo de carbohidratos en *Rhizopus*. Normalmente, el piruvato se convierte en etanol cuando el oxígeno es limitado, esto depende de la cepa que se vaya a utilizar, resultando 2 mol de ATP por cada hexosa (Ibarruri, 2019).

#### **c. Condiciones de cultivo del *rhizopus oryzae***

El *Rhizopus oryzae* es de gran interés en la aplicación de la industria biotecnológica debido a su rápida degradación de sustratos y costos bajos (Ghosh y Ray, 2011). También a que necesita muy pocos nutrientes, extensos intervalos de temperatura (25 a 45°C) y un pH (4.5 a 7.5) de crecimiento, a su vez una gran variedad de sustratos fermentativos

(Londoño-Hernández *et al.*, 2017). A su vez el género de *Rhizopus oryzae* genera una extensa lista de enzimas siendo las más conocidas las amilasas, lipasas, proteasas, celulosas, pectinasas y entre otras enzimas, las cuales nos permiten metabolizar el sustrato y producir un abanico de compuestos de interés en la fermentación (Denter *et al.*, 1998). Para el crecimiento adecuado del *Rhizopus oryzae* necesitaremos de una fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y metales. Además estos microorganismos tienden a crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, aunque a condiciones aeróbicas es más recomendable (Nagel *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2012), esto dependerá mucho del producto en estudio por lo tanto las condiciones óptimas tendrán que variar.

El *Rhizopus oryzae*, es muy utilizado desde tiempos pasados en la producción de tempeh, y otros productos alimenticios en los países asiáticos. El tempeh es uno de los alimentos de soja fermentada más importantes, conocido por su sabor, textura y digestibilidad (Nout & Aidoo, 2002). Estas propiedades son bien conocidas y es por eso que algunos investigadores han estudiado el uso culinario de *Rhizopus oryzae* para la fermentación de nueces, legumbres y frutas y también para la producción de vino de arroz (Hachmeister & Fung, 1993).

### **2.5.5. Métodos de extracción de antocianinas**

Las antocianinas son compuestos que se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Wrolstad, 2004). Donde la extracción se clasifica dependiendo del estado físico de los materiales ya sea sólido – líquido o líquido – líquido, dado que por sus características la extracción se puede dar de manera continua o discontinua (Marcano, 2018).

El método más utilizado es la extracción por solventes llevada a cabo con metanol, etanol o acetona débilmente acidificada (Herrera, 2017), esto se conoce mejor como extracción sólido – líquido. Dicho método es una operación básica destinada a separar uno o más componentes en una fase sólida, utilizando una fase líquida o un solvente. Uno o más componentes que pasan de la fase sólida a la fase líquida se denominan solutos, mientras que los sólidos insolubles se denominan inertes (L. Zapata, 2014).

Sin embargo, los científicos Japoneses desarrollaron un nuevo método alternativo que implica la fermentación (Fan, Han, Gu, *et al.*, 2008). Este método de extracción de antocianinas por fermentación de sustrato es una tecnología relativamente nueva y no ha

sido investigada a fondo (Virgilio y Justo, 2016), quienes estudiaron la extracción de antocianinas por fermentación de papas moradas mezcladas con arroz. Estos autores afirmaron que las antocianinas extraídas por este método son más puras que las obtenidas por extracción sólido-líquido, pero, no aportaron datos sobre la composición de las antocianinas extraídas y de su estabilidad (Fan, Han, Gu, *et al.*, 2008). Por otro lado, durante la fermentación, las levaduras producen metabolitos secundarios como alcoholes superiores, éter etílico y ácidos grasos a partir de azúcares existentes en el sustrato y el medio. Estos metabolitos secundarios pueden combinarse con las antocianinas para formar proantocianidinas, que son más estables que las primeras (Pretorius, 2000). Dado que este último método es una alternativa a la extracción por solventes, se consideró muy interesante profundizar en sus posibilidades.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

##### **3.1.1. Hipótesis general**

La extracción de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) extraídos mediante el método de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* se incrementa y con *Rhizopus Oryzae* disminuye.

##### **3.1.2. Hipótesis específicas**

El tipo de inóculo *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae* para la extracción por fermentación de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) influirá sobre el rendimiento de antocianinas.

Las variables de proceso (temperatura, pH y tiempo) tendrán efectos en la extracción de antocianinas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), por fermentación.

#### **3.2. ÁMBITO DE ESTUDIO**

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología general de la Universidad Nacional de Juliaca, en el laboratorio de Sanidad Vegetal de los Mega Laboratorios administrado por la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Altiplano Puno y en el laboratorio de Cromatografía y Espectrometría – Pabellón de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias de la Universidad San Antonio Abad del Cusco.

### 3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

#### **Materia prima**

El Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), fue recolectado en un estado de madurez comercial en la Comunidad Campesina de Pataquitum, del Distrito de Coasa, Provincia de Carabaya, de la Región de Puno.

#### **Material biológico**

- *Saccharomyces cerevisiae* (Variedad bayanaus)
- *Rhizopus Oryzae*

#### **Insumos**

- Sacarosa

#### **Materiales de laboratorio**

En el desarrollo de este proyecto de investigación se utilizó:

- Matraz Erlenmeyer de (200 y 250 ml)
- Vasos precipitados de (200 y 500 ml, pírex)
- Pipetas graduadas de (1, 5 y 10 ml, pírex)
- Tubos cónicos de falcon de (15 ml)
- Probetas de (100 y 200 ml, DELTALAB)
- Goteros de (5 ml)
- Espátulas de laboratorio
- Propipetas
- Varillas de vidrio
- Mortero con pilon de porcelana
- Lunas de reloj
- Placas petri
- Mechero de alcohol
- Asa de siembra microbiológica
- Cintas indicadores de pH
- Bandejas de plástico
- Agua destilada

## Equipos

- Incubadora con agitador orbital integrado “311DS” (Marca: LABNET)
- Potenciómetro digital portátil (Marca: HANNA INSTRUMENTS; Modelo: HI9816X)
- Centrifuga de mesa digital (Marca: CENTURIUM SCIENTIFIC)
- Autoclave eléctrica vertical (Marca: JSRESERCH; Modelo: JSAT 85)
- Cabina de bioseguridad (Marca: BIOLOGICAL SAFETY CABINET; Modelo: BSC-1500IIA2-X )
- Incubadora (Marca: MEMMERT; Modelo: IN75)
- Balanza analítica (Marca: ADAM EQUIPMET; Modelo: NIMBUS NBL 2141)
- Microscopio óptico (Marca: ; Modelo: )
- Refractómetro de mano (Marca: ATAGO)
- Refrigeradora (Marca: LG ; Modelo: LT32WPP)
- Cromatógrafo líquido HPLC Agilent serie 1200.

## Reactivos Químicos

- Agar SABOURAUD – Merck
- Cloranfenicol
- Tinción Azul de metileno
- Fosfato de amonio
- Ácido cítrico 0,1 N
- Ácido acético 0,1 N
- Acetato de potasio 0,5 M

## 3.4. METODOLOGÍA

### Para el objetivo N° 1

Evaluar el tipo de inóculo *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae* sobre el rendimiento de antocianinas en la extracción por fermentación del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth).

## **Variables**

### **Variables independientes:**

- Tipo de inóculo

*Saccharomyces cerevisiae*

*Rhizopus oryzae*

### **Variables dependientes:**

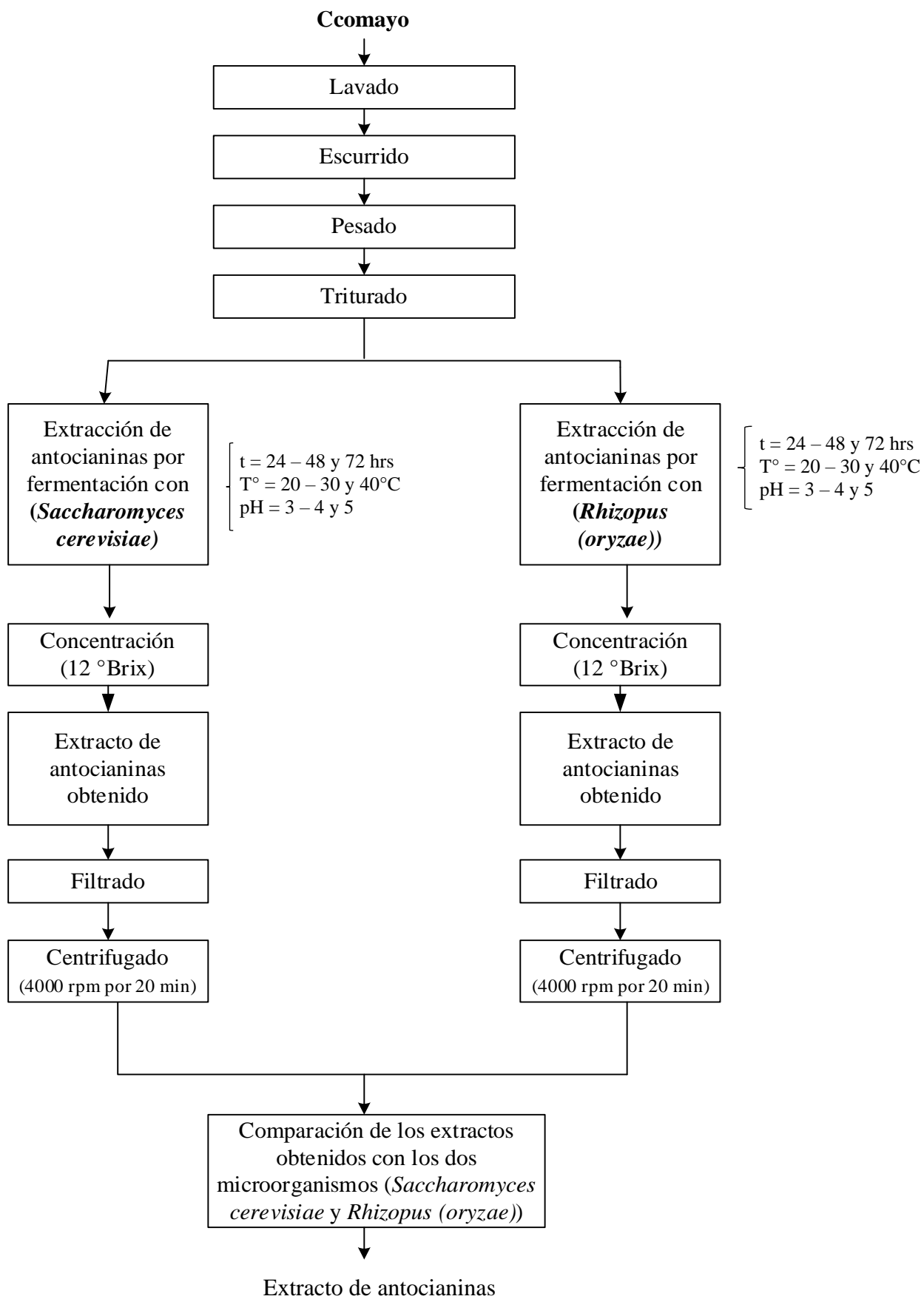
- Rendimiento de antocianinas totales

En el presente trabajo, se utilizó el método de extracción por fermentación relativamente novedosa que es muy poco usual, desarrollada por científicos Japoneses siendo una metodología alternativa que nos permite obtener antocianinas más puras (Fan *et al.*, 2008; Zapata, 2014). Para la cual se evaluaron dos inóculos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) en la extracción de antocianinas para maximizar el rendimiento.

Así mismo, en el presente estudio se utilizó el Ccomayo como materia prima, para luego realizar la extracción de antocianinas por un proceso fermentativo empleando dos inóculos, en una incubadora con agitador orbital incorporado 311DS, LABNET a diferentes temperaturas de 20°C, 30°C y 40°C, a un pH de 3, 4 y 5, durante 24, 48 y 72 hrs. Según la metodología descrita en la descripción del diseño experimental tabla 5, para luego determinar el contenido de antocianinas en el Ccomayo y finalmente realizar una comparación de rendimientos con los microorganismos utilizados.

#### **3.4.1. Preparación de la materia prima para la obtención de antocianinas**

En el presente trabajo de investigación se inició con la preparación de la materia prima (Ccomayo), para luego realizar el método de extracción por fermentación en la investigación desarrollándose de la siguiente manera:



**Figura 5: Diagrama de flujo de la obtención del extracto de antocianinas.**

**Recolección:** Los frutos de Ccomayo para este estudio fueron recolectados en la comunidad campesina de Pataquitum del Distrito de Coasa, en un estado de madurez comercial en fresco. Esto debido a su rápida pérdida de calidad una vez recolectada y también por la proliferación de microorganismos. Después de su recolección, se colocó en un cooler para su traslado hasta el laboratorio, para luego ser almacenados en refrigeración a 4°C, y así ser utilizadas en los diferentes experimentos de la investigación. Después de la recolección el tiempo transcurrido y la realización de los experimentos no superaron ni una semana, por lo que los Ccomayos se conservaron debidamente.

**Selección:** Luego de haber realizado la recolección de los frutos se pasó a la clasificación de estas descartando los frutos con defectos morfológicos y en mal estado, con la finalidad de evitar la proliferación de microorganismos, que puedan influir en la fermentación.

**Lavado:** Se realizó con agua potable bajo chorro, en bandejas.

**Ecurrido:** Se realizó en un recipiente adecuado (colador), dando suaves movimientos para evitar daños en la fruta.

**Pesado:** Posteriormente, se pesaron 100 gr de fruta en una balanza de precisión de 1600g  $\pm$  0.01g de capacidad.

**Triturado:** Los frutos se trituraron en un mortero de porcelana con la ayuda de un pilón, a su vez se determinó la concentración de sólidos solubles y pH.

**Extracción:** Se realizó con dos inóculos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*), a una temperatura de 20, 30 y 40 °C durante 24, 48 y 72 horas, a un pH de 3,4 y 5.

**Concentración:** La concentración de sólidos solubles se ajustó a 12 °Brix con sacarosa.

**Filtrado:** Se pasó por papel filtro el sustrato fermentado, separando el bagazo y quedando el extracto líquido concentrado con las antocianinas del Ccomayo.

**Centrifugado:** Se realizó durante 20 minutos a 4000 rpm para descartar el residuo sobrante.

### **3.4.2. Obtención de los extractos fermentados de antocianinas a partir del Ccomayo**

Después de obtener los Ccomayos triturados, se preparó los inóculos para posteriormente realizar la fermentación para la extracción de antocianinas.

- **Preparación de los inóculos**

Se preparó dos inóculos con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*.

Para el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*; se trituró una fracción de 50 gr. de Ccomayos a la cual se ajustó la concentración de azúcares a 12°Brix adicionando sacarosa y también se agregó 0.05% del peso final de fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y fósforo para favorecer el crecimiento de las levaduras. Luego, se inoculó un 0.05% de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizadas al sustrato. Seguido de ello se procedió a incubar la mezcla a condiciones aeróbicas, en una incubadora con agitación orbital a 120 oscilaciones por minuto a 30°C durante 24 hrs. Obteniendo de esta manera una suspensión de levaduras a la cual se denominó inóculo 1.

Para el inóculo de *Rhizopus (oryzae)*; se preparó varias placas petri debidamente esterilizadas con agar Sabouraud. Luego se procedió a la siembra del hongo y se incubaron a 28°C durante 9 días. Pasado los días mencionados se tomó una placa al azar, la cual fue diluida con 3 ml de agua destilada esterilizada con la ayuda de un dispersor celular se distribuyó el agua haciendo presión suave sobre el cultivo de manera que se fueron despegando las esporas quedando el micelio adherido al agar, disolviendo solo la parte aérea. Obteniendo de esta manera una suspensión de esporas a la cual se denominó inóculo 2.

Después de obtener los inóculos de extracción, se procedió a la extracción de antocianinas por fermentación.

- **Extracción de antocianinas por fermentación con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus (oryzae)*.**

Una vez obtenido los inóculos se inició con el proceso de extracción de antocianinas por fermentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrito por (Pretorius, 2000), con algunas modificaciones, misma que consistió en un proceso fermentativo en el que los Ccomayos triturados fueron fermentados con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*. Con este método de fermentación, por acción de las levaduras y hongos a partir de los azúcares que tienen de manera natural los Ccomayos (*Vaccinium*

*floribundum* Kunth), se obtuvo una solución alcohólica del sustrato fermentado, donde se solubilizaron las antocianinas.

En primer lugar, se adecuó el sustrato para la extracción. Para lo cual se ajustó a 3 diferentes pH, adicionando ácido cítrico o buffers citrato según al diseño experimental que corresponda la cual se midió con un potenciómetro digital HANNA. Para ello también se ajustó la concentración de sólidos solubles del sustrato a 12°Brix adicionando sacarosa se midió con un Refractómetro de mano ATAGO. Seguido de ello se adicionó 1 gr. del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* a las 15 muestras evaluadas y a las otras 15 muestras se inocularon con 1 ml de *Rhizopus (oryzae)*, para que se lleve a cabo la fermentación durante 24, 48 y 72 hrs y a diferentes temperaturas de 20, 30 y 40°C según el diseño experimental. Una vez finalizada la fermentación, el sustrato fue filtrado y luego centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos descartándose el residuo. Finalmente se obtuvo el extracto diluido de antocianinas por el método de extracción por fermentación.

El número total de experiencias de extracción por fermentación fue 15 y se describe en el diseño experimental (tabla N° 5).

### **3.4.3. Extracción de antocianinas**

Se siguió el método propuesta por (Giusti y Wrolstad, 2001) con algunas modificaciones, para el perfil de antocianinas se trituraron los Ccomayos en una licuadora, luego se pesó 0.1 gr del fruto a la cual se adicionó 5 ml de acetona al 70 % y 0.1 ml de ácido fólico, la cual fue homogenizado durante 5 minutos en un vortex mezclador 230 VAC, seguido de ello se filtró usando un embudo buchner. Se puso el filtrado a un tubo cónico falcon y se le agregó 2 ml de cloroformo para luego ser centrifugado durante 10 minutos. La fase acuosa (parte superior) fue colectada y colocada en un rotavapor a 40°C durante 10 minutos, hasta que la acetona residual se haya evaporado.

- **Purificación de las antocianinas**

La purificación se realizó con el objetivo de separar compuestos relativamente hidrofóbicos como las antocianinas de los azúcares y ácidos utilizando el cartucho C-18, se inició limpiando el cartucho con agua ultra pura y se activó con metanol acidificado. Luego se retiró el metanol residual con agua acidulada, seguido de ello se pasó 100 µl del extracto acuoso más agua acidulada de antocianinas del ccomayo a través del cartucho C-18, donde se observó la fase sólida del cartucho coloreado. Para lo cual el contenido de

antocianinas retenidas fueron eluidas con metanol y HCl 1%; finalmente el pigmento purificado fue colocado en un vial de HPLC, para identificar y cuantificar las antocianinas del Ccomayo se utilizó un patrón puro de Cianidina-3-glucósido.

- **Cuantificación e identificación de antocianinas por HPLC**

La determinación e identificación de antocianinas (cianidina-3-glucósido) en el Ccomayo (*Vaccinium florimbundum* Kunt) se realizaron en un cromatógrafo Agilent serie 1200 con detector de matriz de diodos a 520 nm. La separación de las antocianinas se llevó a cabo usando una columna Zorbax XDB-C18 (75 x 4.6 mm diámetro interno, tamaño de partícula 3.5 µm). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo 0.5 ml/min, volumen de inyección 5 µl, temperatura 40.0°C y disolventes ácido acético: acetonitrilo: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10%:5%:1%) (A) y acetonitrilo (B), grado HPLC. El sistema de análisis consistió en: 0-40% de B por 4 min, 0-40% de B por 11 min. Para la cuantificación se utilizó un patrón estándar de Cyanidin-3-glucoside.

La identificación de los picos de antocianinas fue realizada en el software Chemstation V03.02, corrido bajo las mismas condiciones del patrón antes mencionado realizando la comparación que nos ayudó a identificar los picos del cromatograma.

- **Rendimiento de antocianinas**

El rendimiento de la extracción de antocianinas se calculó como el porcentaje de extracción de antocianinas de una determinada cantidad de Ccomayos, con la siguiente expresión:

$$RAT(\%) = \frac{M \cdot AT}{M_C \cdot AT_C} \times 100$$

Donde:

RAT : Rendimiento de extracción de antocianinas (%)

M : Masa del extracto del Ccomayo (gr)

AT : Concentración de antocianinas totales del proceso fermentativo (mg Cianidina-3-glucosido/100gr)

M<sub>C</sub> : Masa de Ccomayos (gr)

AT<sub>C</sub> : concentración de antocianinas totales en los Ccomayos (mg Cianidina-3-glucosido/100gr de Ccomayo).

### Para el objetivo N° 2

Evaluar el efecto de las variables de proceso (tiempo, temperatura y pH) en la extracción de antocianinas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth), por fermentación, para la cual se consideró las siguientes variables:

- a) Variables independientes
  - Temperatura: 20 – 30 – 40°C
  - pH: 3 – 4 – 5
  - Tiempo: 24 – 48 – 72hrs
- b) Variables dependientes
  - Antocianina

### Matriz de diseño experimental para la extracción de antocianinas por fermentación

Para estimar las mejores combinaciones de las variables, para la extracción de antocianinas por fermentación se realizó los experimentos utilizando tres factores tiempo, temperatura y pH, bajo el diseño de Box – Behnken a través de la metodología superficie de respuesta obteniendo una combinación de tres niveles de cada factor, con niveles mínimos y máximos (tabla 5), con la finalidad de maximizar el rendimiento de las antocianinas. Obteniendo 15 tratamientos, a partir de las diferentes combinaciones de los factores en estudio de manera aleatorizada, como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 5: Factores y niveles utilizados para el diseño Box – Behnken**

Variables independientes	Niveles		Unidades
	Mínimo	Máximo	
Tiempo	24	72	T
Temperatura	20	40	°C
pH	3	5	

**Tabla 6: Matriz del diseño experimental (diseño Box-Behnken)**

Número de tratamientos	DATOS CODIFICADOS			DATOS REALES		
				Tiempo (h)	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	0	24	20	4
2	1	-1	0	48	40	5
3	-1	1	0	48	20	5
4	1	1	0	72	20	4
5	0	-1	-1	72	40	4
6	0	1	-1	72	30	5
7	0	-1	1	72	30	3
8	0	1	1	24	30	5
9	-1	0	-1	24	30	3
10	1	0	-1	48	20	3
11	-1	0	1	24	40	4
12	1	0	1	48	40	3
13	0	0	0	48	30	4
14	0	0	0	48	30	4
15	0	0	0	48	30	4

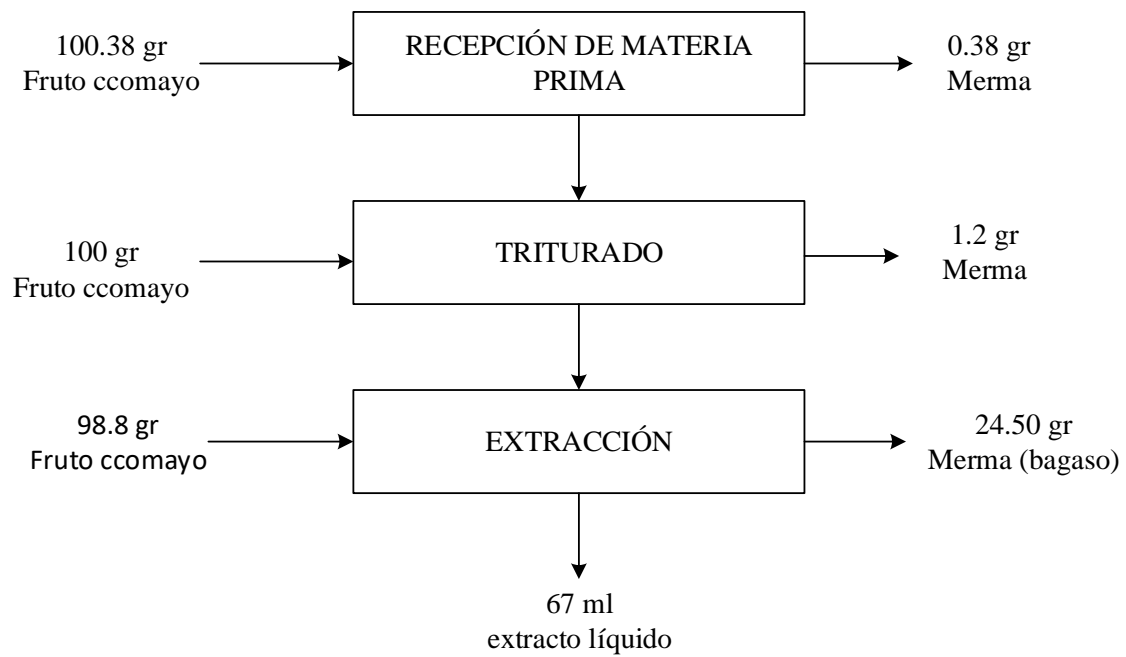
Este diseño experimental fue utilizado para la serie de experimentos de extracción por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*.

#### ANÁLISIS DE MUESTRAS:

Una vez obtenida los extractos por el método de fermentación, estas fueron llevadas al laboratorio de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco para ser cuantificadas (total de antocianinas).

#### BALANCE DE MATERIA

El balance de materia se realizó en la extracción de antocianinas del fruto fresco del Ccomayo triturado.



**Figura 6: Balance de materia en la extracción de antocianinas del Ccomayo**

### 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

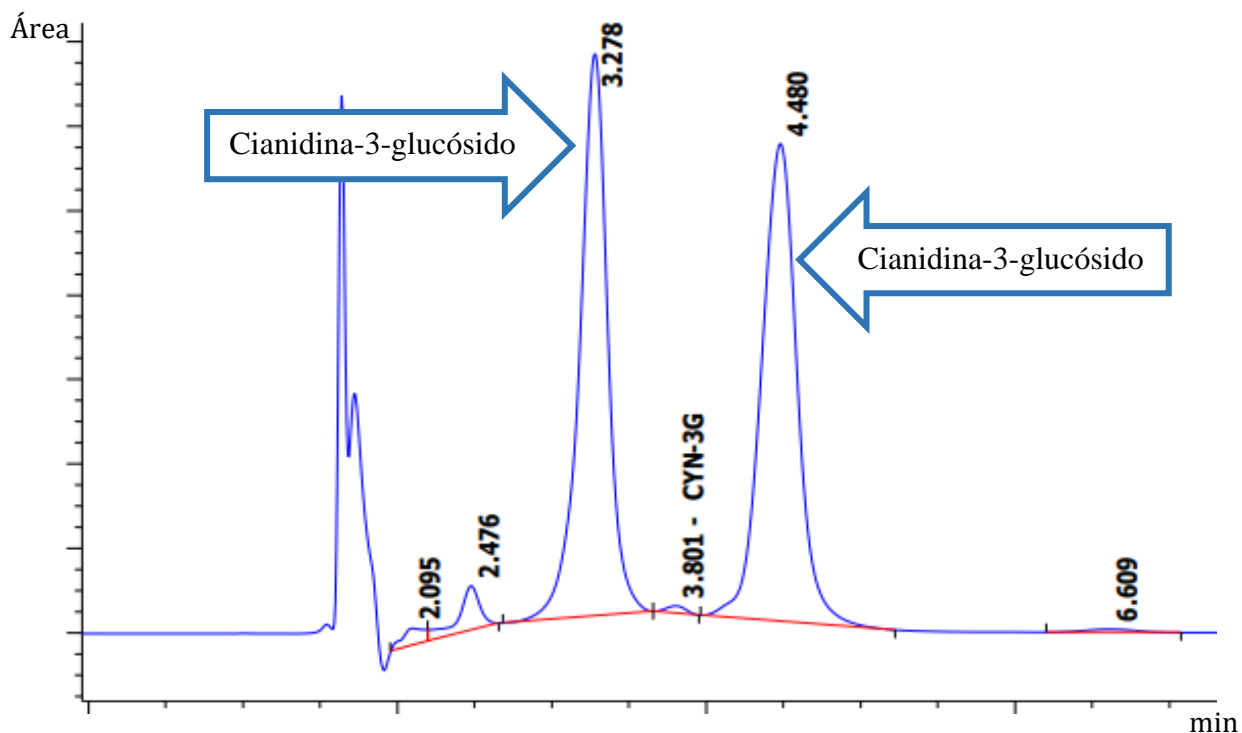
Con la finalidad de estudiar la influencia de las variables de proceso tales como el tiempo, temperatura y pH, en el proceso de extracción por fermentación se realizó una formulación de los diseños experimentales, con la ayuda del software STATGRAPHICS CENTURION del cual se generaron dos superficies de respuesta, tanto para la extracción de antocianinas por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*.

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PERFIL DE ANTOCIANINAS DEL FRUTO CCOMAYO

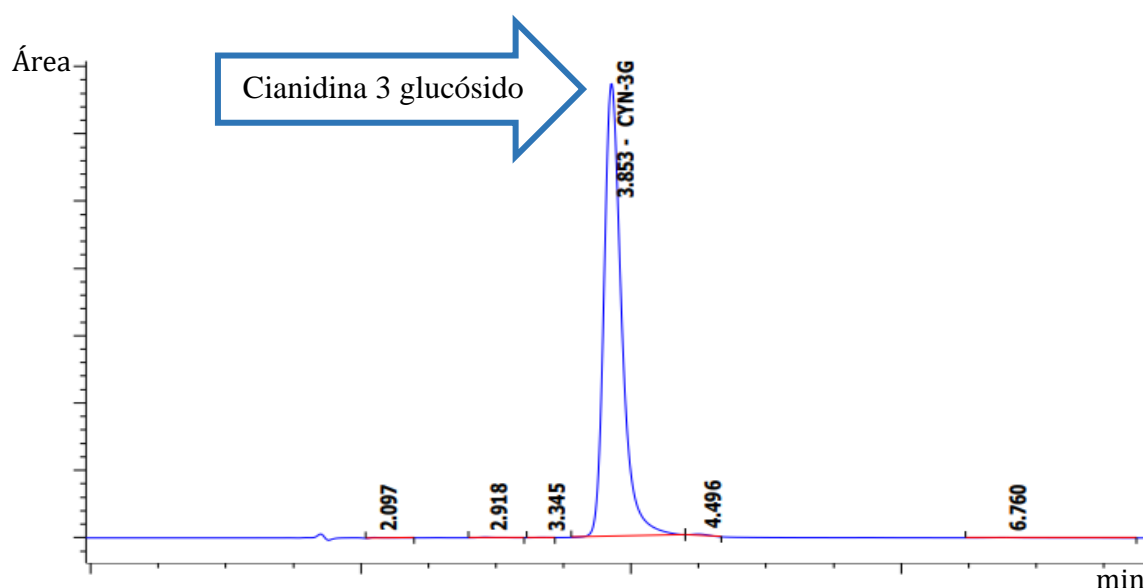
#### 4.1.1. Identificación de antocianinas en el Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En el Ccomayo (*Vaccinium floribundum* kunth) se encontró 6 picos como se muestra en el cromatograma de la figura 6, siendo todas identificadas como **Cianidina-3-glucósido**.



**Figura 7:** Cromatografía HPLC – de antocianinas identificadas del fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth).

Para identificar las antocianinas se realizó la comparación de los picos mostrados en la figura 6 con la figura 7, donde se observa el cromatograma del extracto de antocianinas. Las evidencias más claras se muestran en los picos más altos de retención en los tiempos de 3.278 y 4.480 minutos del total de antocianinas presentes en el fruto Ccomayo, estos picos fueron comparados con el patrón estándar de la siguiente antocianidina (Cianidina-3-glucósido) ya que presentaron la mayor similitud en comparación con los picos pequeños, haciendo una previa comparación estos picos si coinciden con los picos del patrón estándar que se muestra en la figura 7. Por lo tanto, podemos inferir que en el fruto Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) existe la antocianidina (Cianidina-3-glucósido).



**Figura 8: Cromatografía HPLC – del patrón estándar de la antocianidina (Cianidina-3- glucósido).**

Estos resultados concuerdan con lo identificado en la investigación de Aroni (2013), donde menciona que identificó Cianidina-3-glucósido en el *Vaccinium floribundum* Kunth.

Así mismo, en la investigación de Guerrero (2016), reportó la identificación de Cianidina-3-glucósido en muestra seca de *Vaccinium floribundum* Kunth.

#### 4.1.2. Caracterización de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth) en estado fresco

En la tabla 7, se muestra los resultados de la caracterización fisicoquímica del Ccomayo proveniente del distrito de Coasa.

**Tabla 7: Análisis fisicoquímicos de la pulpa de Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth)**

Parámetro	Valor promedio
pH	3.06±0.1
Sólidos solubles (°Brix)	6.5±0
Antocianinas (mg CYA-3G/100grPF)	407±0.2

Los frutos de origen natural, presentan un cierto complejo al momento de obtener una composición química de manera detallada. Es por ello que en este trabajo para una caracterización general de material de partida se tomó en cuenta los siguientes parámetros indicados en la tabla 7. El pH de carácter ácido, muestra ser un poco más elevado con respecto a las especies como el *Vaccinium manbranaceum* y *Vaccinium ovatum* (Taco, 2017). Por otra parte reportamos los sólidos solubles en grados °Brix la cual se encuentra próximo a los obtenidos por Vasco *et al.*, (2009).

También el contenido de antocianinas en el fruto es una de las características más importantes, ya que esta mostró ser mayor en comparación con los resultados obtenidos reportados por Vasco *et al.*, (2009). Este valor puede variar en función de la procedencia y grado de madurez mencionado por Siriwoharn *et al.*, (2004). Otros aspectos que pueden afectar el contenido de antocianinas son las condiciones de transporte y almacenamiento del fruto debido a la inestabilidad que presentan estos compuestos a su vez se debe tomar en cuenta aspectos como el tratamiento de la muestra, técnicas de extracción y el método de cuantificación reportado por Lee *et al.*, (2004).

Los parámetros mencionados anteriormente, dependerán mucho del lugar de procedencia del fruto a evaluar es por ello que es conveniente investigar las características del material de partida, ya que puede influir al momento de la extracción de antocianinas.

#### 4.2. EVALUACIÓN DEL TIPO DE INÓCULO (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) SOBRE EL RENDIMIENTO DE ANTOCIANINAS EN LA EXTRACCIÓN POR FERMENTACIÓN DEL CCOMAYO (*Vaccinium floribundum* Kunth)

En este trabajo en primer lugar, se evaluó el tipo de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*), que maximice el rendimiento de antocianinas mediante el método de extracción por fermentación a partir de los frutos del Ccomayo. Utilizando las siguientes variables de extracción tales como el tiempo de extracción (24, 48 y 72 hrs), temperatura (20, 30 y 40 °C) y pH (3, 4 y 5) en el proceso fermentativo. Estos experimentos fueron realizados siguiendo el diseño experimental de la (tabla 5), y como respuesta para evaluar la eficiencia de los tratamientos, se consideró el rendimiento de antocianinas, las cuales se reportan en la siguiente tabla 8.

**Tabla 8: Rendimiento de inóculos en la extracción de antocianinas del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* Kunth)**

Variables			Rendimiento de antocianinas totales (%)	
t (hrs)	T° (°C)	pH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
24	20	4	23.10 ± 0.39	25.19 ± 0.10
48	40	5	21.31 ± 0.26	15.10 ± 0.59
48	20	5	26.75 ± 0.67	20.62 ± 0.35
72	20	4	38.04 ± 0.84	15.75 ± 0.47
72	40	4	33.57 ± 0.53	17.25 ± 0.54
72	30	5	23.11 ± 0.85	36.11 ± 0.41
72	30	3	56.79 ± 0.98	28.61 ± 0.28
24	30	5	20.10 ± 0.56	35.63 ± 0.45
24	30	3	41.80 ± 0.66	28.11 ± 0.44
48	20	3	36.84 ± 1.09	26.79 ± 0.65
24	40	4	23.00 ± 0.47	10.82 ± 0.26
48	40	3	34.20 ± 0.42	22.24 ± 0.81
48	30	4	54.23 ± 0.60	38.16 ± 0.41
48	30	4	51.99 ± 0.76	37.80 ± 0.58
48	30	4	54.86 ± 0.90	38.76 ± 0.65

En la tabla 8, se muestra los resultados del rendimiento obtenido con los dos inóculos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*). Donde se observa que el mayor rendimiento de antocianinas, se encuentran en un rango de tiempo que va de 48 a 72 hrs, a una temperatura de 30 a 40°C con un pH de 3 a 4 obteniendo así un mayor rendimiento de antocianinas con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en un tiempo de 72 horas, a una temperatura de 30°C con pH 3 del 56.79% de rendimiento. Pitt y Hocking (2013), reportaron que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* crecen a temperaturas óptimas de 25 a 34°C a un pH de 3 a 4.5 para facilitar su desarrollo, es así que podemos observar los parámetros utilizados (tabla 8) del inóculo en estudio *Saccharomyces cerevisiae*, se encuentran en un medio óptimo para su crecimiento por ende producen etanol en el medio y se incrementa la extracción de antocianinas eso explica la obtención de los altos rendimientos obtenidos con este inóculo. Por otra parte Vázquez (2007), también reporta valores óptimos de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una temperatura de 30 a 34°C a un pH de 3 a 6.5 los cuales se encuentran dentro del rango utilizado en la extracción de antocianinas.

A diferencia del rendimiento con el inóculo de *Rhizopus oryzae*, que presentó valores más bajos, alcanzando un valor máximo de 38.76 % de rendimiento en un tiempo de extracción de 48 hrs a temperatura de 30°C a pH 4. Londoño *et al.*, (2017), reportaron que la temperatura y pH óptima de crecimiento para los hongos de la especie *Rhizopus oryzae* oscila de 25 a 45°C y de 4.5 a 7.5, no obstante, el inóculo de *Rhizopus oryzae* en estudio con referencia a la temperatura se encuentra dentro del rango reportado a diferencia del pH que es menor con referente a lo reportado, entonces esto pudo haber sido uno de los factores que afectó en el rendimiento evitando el crecimiento en el medio adecuado del microorganismo, también pudo haber sido causado por el tipo de sustrato en el que creció o en todo caso la genética propia del *Rhizopus oryzae* (Huang *et al.*, 2005). Por otro lado Carrillo, *et al.*, (2007), menciona que el crecimiento de las cepas de *Rhizopus oryzae* oscilan a temperaturas de 20 a 30 °C y se desarrollan en un pH de 3 a 5, lo cual concuerda y se encuentra dentro de los parámetros en estudio. Entonces, podemos inferir que las interacciones de las variables y el tipo de sustrato en estudio, modifican los factores de crecimiento del *Rhizopus oryzae* siendo el pH la variable que más afecta en el rendimiento de extracción de antocianinas.

Para ver si existe una diferencia significativa entre ambos inóculos utilizados en la extracción de antocianinas por fermentación sobre el rendimiento total, se aplicó una

prueba t-student para muestras independientes, utilizando los datos obtenidos en la tabla 8.

**Tabla 9: Análisis estadístico con la prueba “t” para dos muestras suponiendo varianzas iguales**

	<i>Inóculo 1</i>	<i>Inóculo 2</i>
Media	35.9787516	26.4636462
Varianza	177.135622	87.7531816
Observaciones	15	15
Grados de libertad	28	
Estadístico t	2.26426594	
P(T<=t) una cola	0.01574709	
Valor crítico de t (una cola)	1.70113093	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	<b>0.03149417</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2.04840714	

**Dónde:**

Inóculo 1: *Saccharomyces cerevisiae*

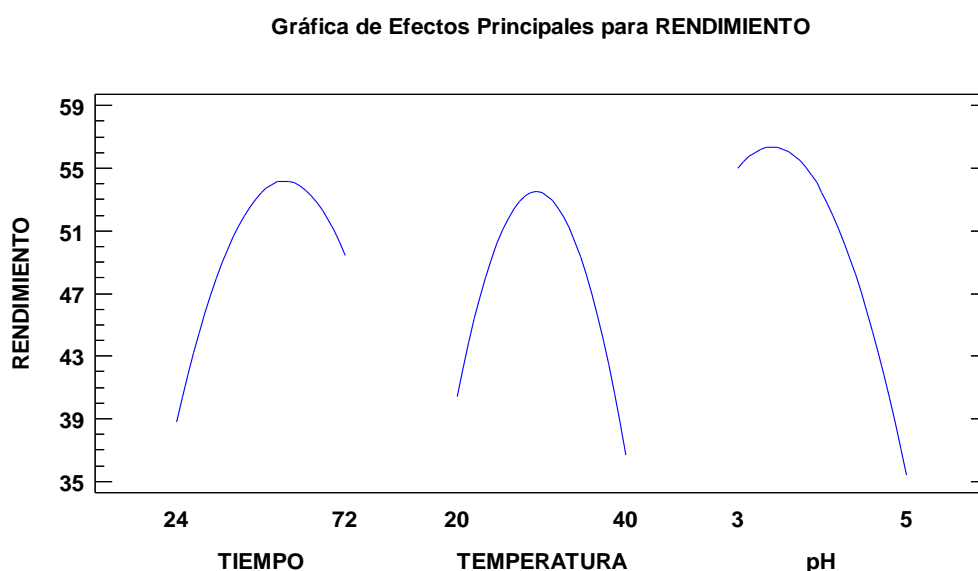
Inóculo 2: *Rhizopus oryzae*

Se observa que los resultados del rendimiento de antocianinas obtenidos del extracto de antocianinas fermentados con el inóculo 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) son significativamente superiores a los obtenidos con el inóculo 2 (*Rhizopus oryzae*), a un nivel de confianza utilizado para la prueba de t-student del 95% ( $P \leq 0.005$ ).

En los anexos 6 y 7 se reportaron la cuantificación de antocianinas realizados en el HPLC, obtenidos con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*.

### 4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE PROCESO (TEMPERATURA, pH Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN) EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL FRUTO CCOMAYO (*Vaccinium floribundum* Kunth) POR FERMENTACIÓN

Para la evaluación del efecto de la temperatura (20, 30 y 40°C), pH (3, 4 y 5) y tiempo (24, 48 y 72 hrs) de extracción de antocianinas por fermentación a partir del Ccomayo. Se analizó la influencia de las variables de proceso de extracción sobre el rendimiento de antocianinas reportados en la tabla 8. En donde se muestran los valores del rendimiento obtenido con los dos inóculos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) experimentados.



**Figura 9:** Gráfico de efectos principales para el rendimiento obtenido con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la figura 9, se observa que el tiempo, temperatura y pH influyen en el rendimiento de antocianinas, por otro lado, la experimentación muestra que a partir de las 24 horas a una temperatura de 20 °C el rendimiento de antocianinas aumenta conforme se eleva la temperatura hasta llegar a 30 °C aproximadamente y el pH a 4, observando así el mayor rendimiento de antocianinas extraídas y por encima de dicho valor se observa la disminución. Es así, que el mayor rendimiento de antocianinas obtenidas durante la

extracción por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* fue con los siguientes tratamientos; S7 (t = 72 hrs, T = 30 °C, pH = 3) y S15 (t = 40 hrs, T = 30 °C, pH = 4).

En la extracción de antocianinas para determinar el rendimiento se consideró varios factores que influyen en ella tales como la estabilidad de las antocianinas y la producción de etanol por parte de los microorganismos. Entonces podemos observar que la temperatura y pH del rendimiento más alto se encuentran dentro del rango del crecimiento del *Saccharomyces cerevisiae* (Pitt & Hocking, 2013), por lo tanto se encuentra en un medio óptimo para su crecimiento y por ende se produce etanol en el medio y así se incrementa la extracción de antocianinas como también su solubilidad y coeficiente de difusión (Zapata, 2014).

Las temperaturas mayores a 35°C afectan considerablemente el crecimiento de estos microorganismos, ya que dejan de producir alcohol y dan paso a la producción de chalconas ocasionando reacciones de deterioro de las antocianinas esto es debido a que son endotérmicas (Garzon, 2008). Por lo tanto, la temperatura y pH son importantes durante la extracción de antocianinas por fermentación.

Por otro lado, en el ANEXO 9, se muestran el análisis de varianza, donde se evaluó la significancia de los efectos e interacciones. Donde el modelo obtenido en este caso, nos muestra que 2 factores son significativos a un valor de probabilidad  $p < 0.5$  para un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes de tiempo ( $p = 0.0178$ ) y pH ( $p = 0.0053$ ) resultaron significativos en relación al rendimiento, en cuanto a la temperatura su efecto fue no significativo.

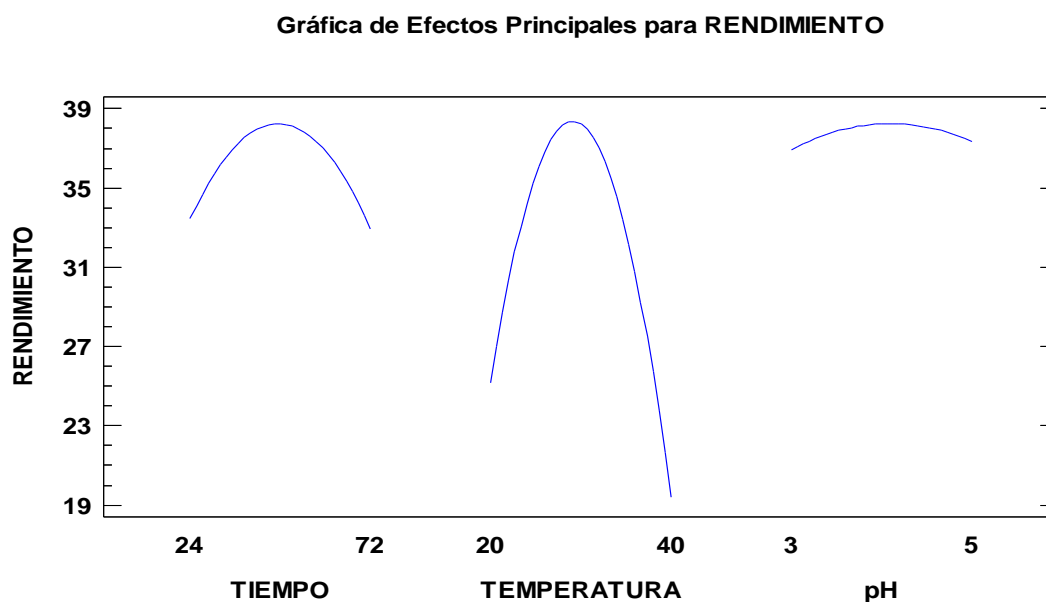
Después de obtener estas variables significativas, se observa que la temperatura y pH actúan de manera independiente. En varios estudios de investigación de extracción de antocianinas se observa que estas variables tienen un efecto significativo durante la extracción de antocianinas (Sotomayor *et al.*, 2017). De acuerdo a la literatura, al incrementar la temperatura aumenta el rendimiento de la extracción de pigmentos esto se debe a la solubilidad de las antocianinas (Cacace & Mazza, 2003), a su vez a menor pH el rendimiento es mucho mejor (Luz *et al.*, 2014). Al revisar otros estudios encontramos que las variables de temperatura y pH coinciden con los datos obtenidos en la investigación de (Heras *et al.*, 2013), quien reportó la extracción óptima en un rango de 30 a 60°C a un pH de 3. Por otro lado Zapata, (2014), reportó una temperatura óptima de 28.1 °C a un pH de 4.2.

En la extracción de antocianinas del arándano (*Vaccinium corymbosum*) con el método de extracción por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, Zapata (2014), reportó que pasado las 72 horas a una temperatura de 28.1°C y pH 4.2 obtuvo un máximo rendimiento del 49 %, estos resultados se encuentran por debajo de lo obtenido en la presente investigación. Por su parte Fernandez y Jihullanca (2021), hicieron una comparación de tres extractos (arándano, mashua y maíz morado) utilizando el método de extracción por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* en su trabajo de investigación donde reportaron que a 72 horas a una temperatura de 30°C a un pH de 3, obtuvo la mayor cantidad de antocianinas totales en el arándano la cual fue mínima en comparación a los otros extractos (mashua y maíz morado), y en comparación al presente trabajo de investigación, pero las obtuvo con las mismas variables en estudio que se utilizó en el presente trabajo, por lo cual podríamos inferir que estos parámetros podrían ser óptimos para maximizar el rendimiento en la extracción de antocianinas totales por fermentación.

El pH es muy importante dentro del crecimiento del *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que presenta un efecto contrapuesto hacia la temperatura. Es por ello, que cuanto menor es el pH, más se ve favorecida la estructura del catión flavilio (forma más estable de las antocianinas); a un pH de 5 se ve favorecida la formación de especies pseudobase carbinol que son incoloras (Castañeda *et al.*, 2009; Pitt y Hocking, 2013).

Por lo expuesto en el punto anterior, podemos deducir que a un pH bajo mejor será la extracción de antocianinas, pero es muy importante tener en cuenta que no se vea afectado el microorganismo (*Saccharomyces cerevisiae*), ya que a pH alto se limita su crecimiento y se deteriora.

- **Rhizopus oryzae**



**Figura 10:** Grafica de efectos principales para rendimiento obtenido con el inóculo de *Rhizopus oryzae*.

En la Figura 10, se observa la influencia de las variables de tiempo, temperatura y pH respecto al rendimiento obtenido en la extracción de antocianinas con el inóculo de *Rhizopus oryzae*, donde el mayor porcentaje de rendimiento se va incrementando a partir de las 24 hrs descendiendo a las 48 hrs aproximadamente a una temperatura de 30 °C. Así mismo, el pH también tiene una relación proporcional con la misma respecto al porcentaje del rendimiento, un aumento de pH de 3 a 5 podría ocasionar un aumento en el % de rendimiento debido a que estos microorganismos se desarrollan a pH 4.5 a 7.5 (Ibarruri, 2019).

El valor óptimo encontrado es de 38.7% en la extracción de antocianinas con *Rhizopus oryzae*, en comparación al valor óptimo obtenido con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* evidentemente es menor. A pesar de que estos microorganismos se encuentran en un mismo rango de crecimiento y en las mismas condiciones de extracción (variables de estudio). Probablemente sea por el alto contenido de azúcares libres en el sustrato las cuales fueron favorables para la reproducción de *Saccharomyces cerevisiae*, y sirvieron para obtener un buen rendimiento al momento de la extracción de antocianinas por fermentación en comparación con el *Rhizopus oryzae* estos probablemente no fueron el

mejor sustrato para la formación de micelios del hongo debido a la menor biodisponibilidad de estos (Ibarruri & Hernández, 2018). Así mismo, en la investigación de Londoño (2017), menciona que la acción de los *Rhizopus* se da a partir de los azúcares que se encuentran en el sustrato a fermentar para así obtener etanol en una solución acuosa la cual permite la solubilización de las antocianinas.

Es importante destacar que el *Rhizopus oryzae*, en la producción de alimentos proteicos tiene la habilidad de mejorar la digestibilidad como en el caso del tempeh y la producción de aromas y etanol en condiciones de oxígeno limitado.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos con las dos cepas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*) de extracción, presentaron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de antocianinas. Logrando determinar que la extracción de antocianinas por fermentación con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* fue la más adecuada, ya que se solubilizaron mejor las antocianinas en el etanol producido por esta cepa, lo cual se vio reflejado en los rendimientos obtenidos. El mayor porcentaje del rendimiento más alto de extracción de antocianinas se obtuvo cuando la fermentación del inóculo con *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en un sustrato con una concentración de sólidos solubles de 12 °Brix, en un tiempo de 72 hrs, temperatura de 30 °C y un pH de 3; logrando obtener un 56.79 % de antocianinas en el fruto Ccomayo por el método de extracción por fermentación.

Las variables de proceso estudiadas (tiempo, temperatura, pH), tuvieron una influencia significativa en la extracción de antocianinas por fermentación del fruto Ccomayo con las dos cepas en estudio. Se observó que el rendimiento de antocianinas fue mayor con valores bajos de pH, mientras que las variables de tiempo y temperatura presentaron un valor proporcional lo cual maximizó el rendimiento. Estadísticamente para el tiempo de extracción se encontró que a partir de las 48 a 72 hrs a una temperatura de 30 °C a 40 °C se presentan un máximo rendimiento de antocianinas con las dos cepas. Por otra parte, las antocianinas obtenidas por este método indican que se obtienen más puras en comparación a otros métodos de extracción.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio del Ccomayo (*Vaccinium floribundum* kunth) y sus propiedades beneficiosas para la salud.
- Estudiar a profundidad la extracción de antocianinas por fermentación con el inóculo de *Rhizopus oryzae* y aplicarlo en algún alimento previo evaluaciones y así darle un valor agregado.
- Utilizar otros estándares de antocianina para una mejor cuantificación de estas en el Ccomayo (*Vaccinium floribundum* kunth).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera-Otíz, M., Reza-Vargas, M. del C., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *BIOtecnica*, 13(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Alfonso Pellicer, M., & Dominguez Gómez, M. J. (2021). *Revisión bibliográfica sobre los efectos adversos de los colorantes sintéticos de 2008 a 2021*. 28. Retrieved from [https://riucv.ucv.es/bitstream/handle/20.500.12466/1903/Revisión bibliográfica sobre los efectos adversos de los colorantes sintéticos de 2008 a 2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riucv.ucv.es/bitstream/handle/20.500.12466/1903/Revisión_bibliográfica_sobre_los_efectos_adversos_de_los_colorantes_sintéticos_de_2008_a_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Andersen, Ø. M. (2002). Chemistry of Anthocyanins. *Life Sciences*.
- Arias, J. (2013). *Estudio del efecto de pre-tratamiento en la deshidratación de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) sobre la velocidad de secado y contenido de polifenoles solubles y antocianinas*. 157. Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/5525/1/CD-4623.pdf>
- Aroni, J. (2013). *Evaluación de la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de Hesperomeles escalloniifolia Schltld (capachu), Berberis cummutata Eichler (huancachu), Berberis humbertiana J.F. Macbr (cheqche) y Vaccinium floribundum Kunth (alaybilí) frente al pH*. 179. Retrieved from [http://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/201/07-2013-EPIA-Aroni Huaman-antocianinas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/201/07-2013-EPIA-Aroni_Huaman-antocianinas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Arteaga, A., & Arteaga, H. (2016). Optimization of the antioxidant capacity, anthocyanins and rehydration in powder of cranberry (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulated with mixtures of hydrocolloids. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 191–200. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.05>
- Badui Dergal, S. (2006). Salvador Badui Dergal. In *Química de los alimentos*.
- Barnita Ghosh, & Ray, R. R. (2011). Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Applied Sciences*, Vol. 11, pp. 2470-2486.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., ... Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287–293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>
- Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. *Anthocyanins As Food*

- Colors*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-472550-8.50005-6>
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Carbonero Zalduegui, P. (1975). Bioquímica de las fermentaciones. *Monografías de La Universidad Politécnica de Madrid*, 50. Retrieved from <https://oa.upm.es/55235/1/Fermentaciones.pdf>
- Carrillo, M. L., Zavala, D., & Alvarado, B. (2007). Modelado del efecto de la temperatura, actividad de agua y pH sobre el crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Informacion Tecnologica*, 18(4), 57–62. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000400009>
- Castañeda, A., & Guerrero, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 9, 25–33.
- Castañeda, Araceli, Pacheco, L., Páez, E., Rodríguez, J., & Galán, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, 16(2), 5. <https://doi.org/10.17163/lgr.n16.2012.01>
- Cofré, A. (2015). Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (*Ugni molinae Turcz*) Obtenido por Condensación de Vapor. *Universidad Austral de Chile*, 45. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fac675d/doc/fac675d.pdf>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015). Antioxidants: Present perspective for the human health. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Cosavalente Burgos, K. S., Ruiz Reyez, S. G., & Ganoza Yupanqui, M. L. (2016). Antocianinas totales y capacidad antioxidante in vitro de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* “Arándano.” *Ucv-Scientia*, 8(1), 44–48. <https://doi.org/10.18050/revucv-scientia.v8n1a5>
- Dávila, D. (2001). Reseña de “Las Ericáceas en la web: Neotropical Blueberries; The Plant Family Ericaceae.” *Biota Colombiana*, 2(3), 291–293. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49120307>
- Denter, J., Rehm, H. J., & Bisping, B. (1998). Changes in the contents of fat-soluble

- vitamins and provitamins during tempe fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 45(2), 129–134. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00155-X)
- Fan, G., Han, Y., Ā, Z. G., & Chen, D. (2008). *Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology ( RSM )*. 41, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.019>
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., & Gu, F. (2008). Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1412–1416. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.003>
- Fennema, O. (2000). Introducción a la química de los alimentos. In *2a ed. Zaragoza: Acribia*. Retrieved from <https://sceqa.files.wordpress.com/2014/05/quc3admica-de-los-alimentos-fennema.pdf>
- Fernandez Gallardo, Allen y Puma Jihullanca, R. (2021). *Comparación de la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas en el extracto fermentado de tropaeolum tuberosum (mashua) frente a los extractos fermentados de zea mays l. (maiz morado) y vaccinium corymbosum l. (arándano)*. Universidad Católica de Santa María Facultad.
- Freire, A. F. (2004). Botánica Sistemática Ecuatoriana. In *Botánica Sistemática Ecuatoriana: Vol. Missouri B* (p. pag. 209).
- Garzon, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.
- Garzón, G. A. (2010). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biologica Colombiana*, 13(3), 27–36.
- Giusti, Mónica; Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Unit F1.2.:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125373>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Guerrero, V. (2016). Universidad Central Del Ecuador. *Universidad Central Del Ecuador*, 90. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10078>
- Hachmeister, K. A., & Fung, D. Y. C. (1993). Tempeh: A Mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, 19(3), 137–188. <https://doi.org/10.3109/10408419309113527>

- Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Informacion Tecnologica*, 24(5), 93–102. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011>
- Herrera Aliaga, M. A. (2017). *Estabilidad térmica del extracto colorante de orujos de uvina (Vitis aestivalis – cinérea x vitis vinífera) en una bebida modelo*. 128. Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2968/Q05-H47-T.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Huang, L. P., Jin, B., Lant, P., & Zhou, J. (2005). Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*, 23(3), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.009>
- Ibarruri, J. (2019). *Valorización de subproductos de la industria alimentaria mediante fermentación sólida y sumergida con Rhizopus sp.* 1–261.
- Ibarruri, J., & Hernández, I. (2018). *Rhizopus oryzae* as Fermentation Agent in Food Derived Sub-products. *Waste and Biomass Valorization*, 9(11), 2107–2115. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0017-8>
- Javier Vázquez, H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 8(4), 249–259. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2007.08n4.020>
- Korc , D. I., Bidegain, M., & Martell, M. (2004). Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *REVISIÓN Rev Med Uruguay*, 11, 121–135.
- Lee, J., Finn, C. E., & Wrolstad, R. E. (2004). Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *Vaccinium ovatum* native to the Pacific Northwest of North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7039–7044. <https://doi.org/10.1021/jf049108e>
- Limaymanta, M. (2016). *Extracción y cuantificación de antocianinas monoméricas totales del cultivo Macha Macha sp .* 152. Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4743/Limaymanta\\_Solano-Ramos\\_Ibañez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4743/Limaymanta_Solano-Ramos_Ibañez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-

- Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2017). *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Ma, L. J., Ibrahim, A. S., Skory, C., Grabherr, M. G., Burger, G., Butler, M., ... Wickes, B. L. (2009). Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000549>
- Marañón, Virginia; Romero, María; Chiu, Roger; Castañeda, Jesús; Mora, Miguel; Ladón, H. (2015). *Estabilización de antocianinas mediante nanoencapsulación de sílice*. 1–5.
- Marcano, D. (2018). Introducción a la Química de los Colorantes. In *Colección Divulgación Científica y Tecnológica*.
- Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>
- Mendoza-Miranda, W., López-Medina, S., Mostacero-León, J., Gil-Rivero, A., López Zavaleta, A., & De La Cruz-Castillo, A. (2020). Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4 diclorofenoxiacético y Kelpak en el enraizamiento de estacas de *Vaccinium floribundum* Kunth “pushgay” | Mendoza | Manglar. *Manglar*, 17(1), 21–25. Retrieved from <http://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/141/249>
- Nagel, F. J., Oostra, J., Tramper, J., & Rinzema, A. (1999). Improved model system for solid-substrate fermentation: Effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochemistry*, 35(1–2), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00034-5)
- Nout, M. J. R., & Aidoo, K. E. (2002). Asian Fungal Fermented Food. *Industrial Applications*, 23–47. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-10378-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-10378-4_2)

- Oplatowska-Stachowiak, M., & Elliott, C. T. (2017). Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 524–548. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.889652>
- Ortega, G., Bermello, A., Guerra, M., Michelina, G., & Castillo, G. (2007). *Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de Botryodiplodia theobromae*. XLI, 27–34.
- Parra, V. (2014). *Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*. Universidad Austral de Chile.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.002>
- Pitt, J. I. ., & Hocking, A. D. (2013). Fungi and Food Spoilage. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Prado Lobato, Simón; Hernández Castillo, Manilo; Mogica del Ángel, Marisol; Moreno Miranda, Roberto; Preciado Márquez, F. (2012). Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. *Pediatría de México*, 77(3), 239–246. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062006000300002>
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2)
- Querol, A., Belloch, C., Fernández-Espinar, M. T., & Barrio, E. (2003). Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *International Microbiology*, 6(3), 201–205. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0134-z>
- Racines-Oliva, M. A., Hidalgo-Verdezoto, M. R., & Vasquez-Castillo, W. A. (2016). Domesticación de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.): frutal andino con gran potencial para la industria alimenticia. *Agronomía Colombiana*, (March 2021), s51–s53. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58296>
- Rafael, E. (2017). Extracción y cuantificación de antocianinas de maíz morado (zea mays l.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción. Retrieved from <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/672%0Ahttp://190.116.36.86/bitstream/h>

- andle/UNC/3378/Informe de tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Riva, R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*, 92(7), 916–925.
- Ruta, L. L., & Farcasanu, I. C. (2019). Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Products in. *Antioxidants*, 8(182), 1–13.
- Shipp, J., & Abdel-Aal, E.-S. M. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4(1), 7–22. <https://doi.org/10.2174/1874256401004010007>
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021–8030. <https://doi.org/10.1021/jf048619y>
- Sotomayor, F., David, C., Arroyo, V., & Agr, E. (2017). *María Fernanda Sotomayor Carrasco David Andrés Vargas Arroyo Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras*.
- Suárez-machín, C., Garrido-carralero, N. A., & Guevara-rodríguez, C. A. (2016). *Levadura Saccharom myces cerevisiae y la producción de alcohol . Revisión bibliográfica*.
- Suárez, C., & Guevara, C. (2017). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 51(2), 21–30.
- Sun, J., Zhu, J., & Li, W. (2012). L-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 47, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.011>
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0097-5>
- Taco, M. A. (2017). *Uso de pigmentos naturales de mortiño (vaccinium floribundum) como sensibilizadores en celdas solares DSSC*.
- Tan, J., Han, Y., Han, B., Qi, X., Cai, X., Ge, S., & Xue, H. (2022). Extraction and purification of anthocyanins: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 8(March), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100306>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum kunth*). *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281.  
<https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Vásquez, S.; Guillen, R.; Jaramillo, S.; Jimenez, A. . R. R. (2012). Funcionalidad de Distintas Variedades de Arándanos. In *VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*. España.
- Vázquez, H. (2007). Fermentación alcohólica. *Journal of Experimental Botany*, VIII, 4, 249-259.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Viquez, N. (2010). Estructura de las antocianinas. *Factores Que Afectan Los Extractos Vegetales*. Retrieved from [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lqf/sordo\\_s\\_jp/capitulo3.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/sordo_s_jp/capitulo3.pdf)
- Virgilio, E., & Justo, B. (2016). *Evaluación del tiempo de fermentación con orujos del mosto de uva merlot ( Vitis vinifera L .) Assessment of time fermentation orujos of grape merlot ( Vitis vinifera L .) For anthocyanin extraccion*. 31–34.
- Wrolstad, E. R. (2004). Anthocyanin Pigments - Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419–C425. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x/abstract>
- Xie, L., Su, H., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 72, 13–24.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.002>
- Zapata, L. (2014). Obtención De Extracto De Antocianinas a Partir De Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante Y Colorante En La Industria Alimentaria. *Universitat Politècnica de Valencia*, 1–248. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión 3 Tesis Luz Marina Zapata.pdf %281%29.PDF?sequence=21](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión%203%20Tesis%20Luz%20Marina%20Zapata.pdf%281%29.PDF?sequence=21)
- Zapata, Luz, Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente, G., & Cárcel, J. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25(49), 166–192.
- Zinser, E., & Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(6), 493–536.  
<https://doi.org/10.1002/yea.320110602>

## ANEXOS

### Anexo 1. Imágenes tomadas durante la ejecución del proyecto de investigación



Figura 11: Arbustos del fruto Ccomayo



Figura 12: Recolección de Ccomayo en la comunidad de Pataquitum (Coasa)



Figura 13: Limpieza y selección de frutos en estado de madures comercial para la ejecución del proyecto.



Figura 14: Desinfección y pesado del fruto Ccomayo.

## Anexo 2. Preparación de las soluciones buffer para la extracción de antocianinas

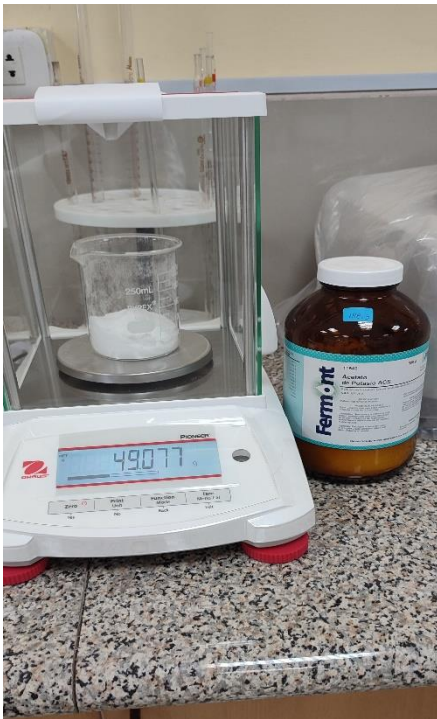


Figura 15: Acetato de potasio 0,5 M y Ácido acético 0,1 N.

## Anexo 3. Preparación de medios de cultivo para el *Rhizopus oryzae*

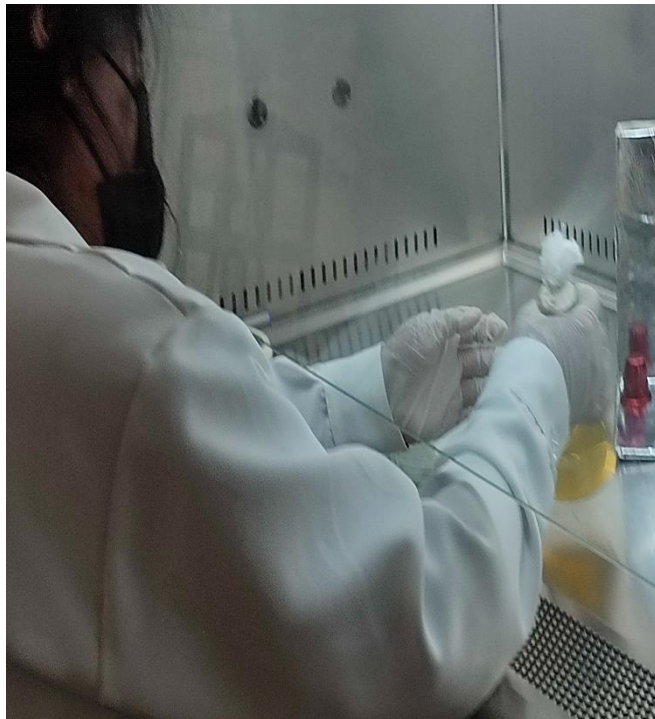


Figura 16: Pesado y dilución del agar Sabouraud



Figura 17: Esterilización de materiales de laboratorio para el cultivo

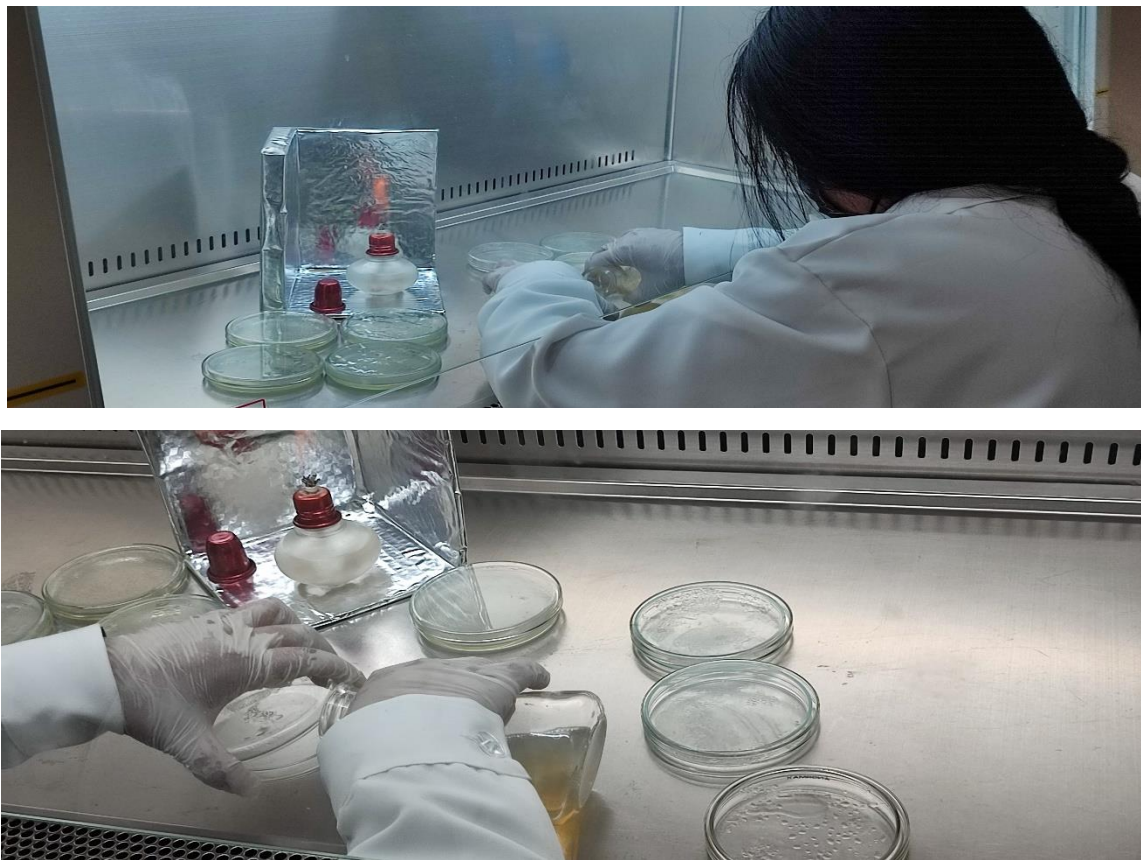
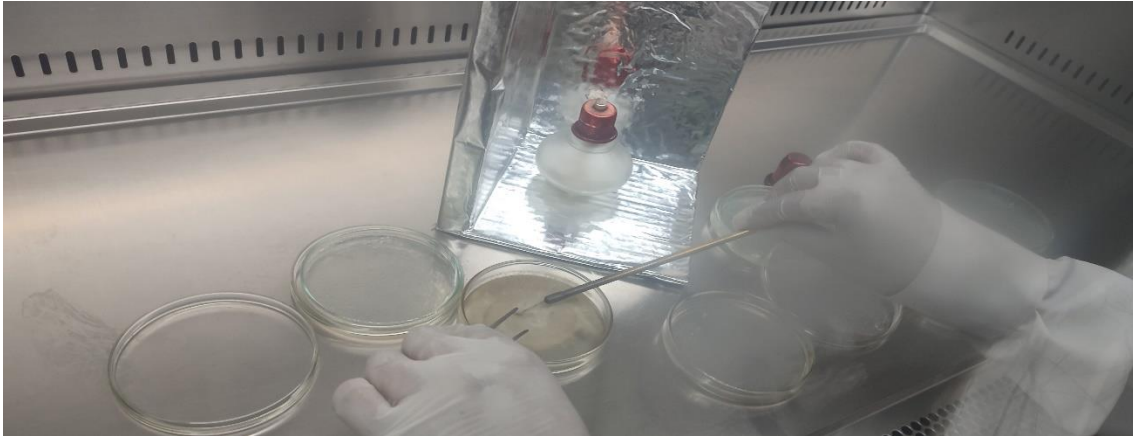


Figura 18: Plaqueado del medio con agar sabouraud diluido

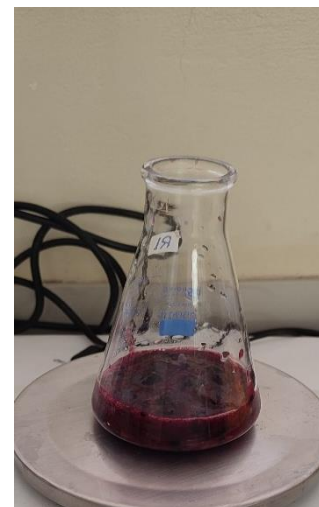
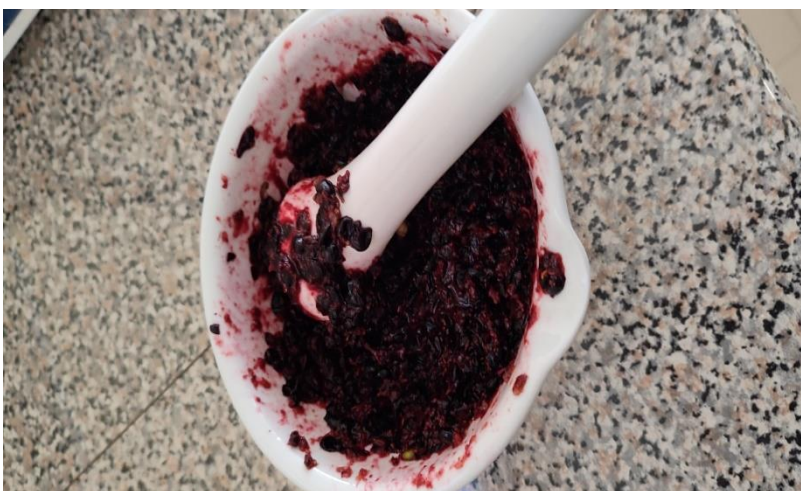


*Figura 19: Cultivo del Rhizopus oryzae en las placas esterilizadas*



*Figura 20: Medios de cultivo incubados a 27 °C*

#### **Anexo 4. Preparación de los inóculos con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae***



*Figura 21: Trituración del Ccomayo*



Figura 22: Medición del pH y grados °Brix

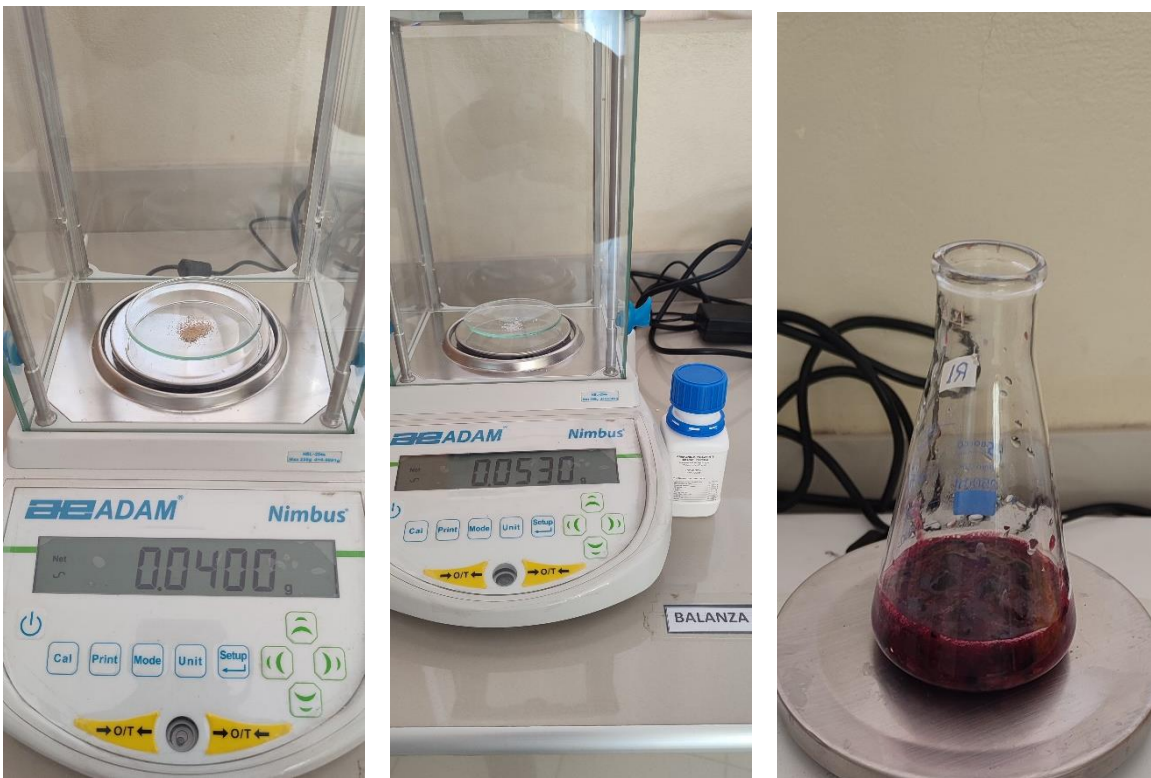


Figura 23: Pesado de la levadura liofilizada, fosfato de amonio y sacarosa

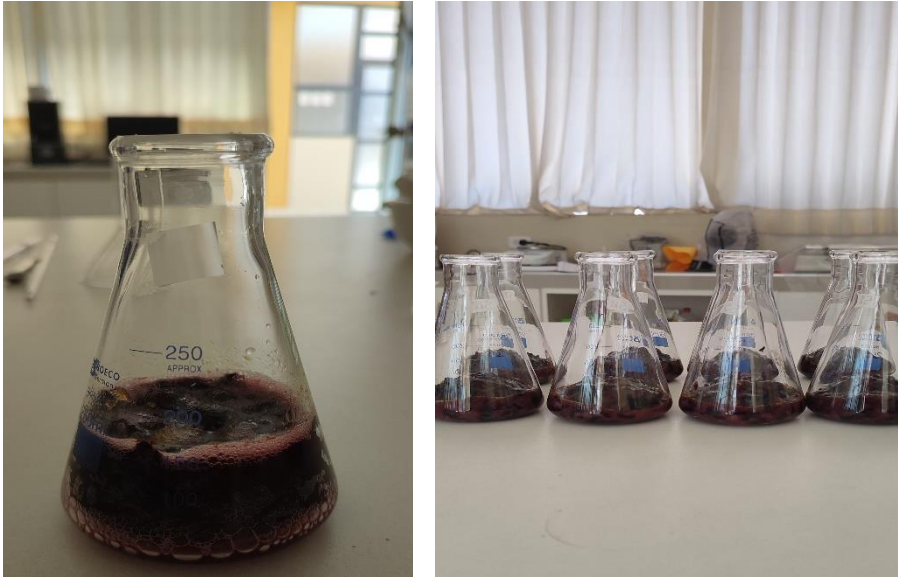


Figura 24: Inoculo del fruto con *Saccharomyces cerevisiae*

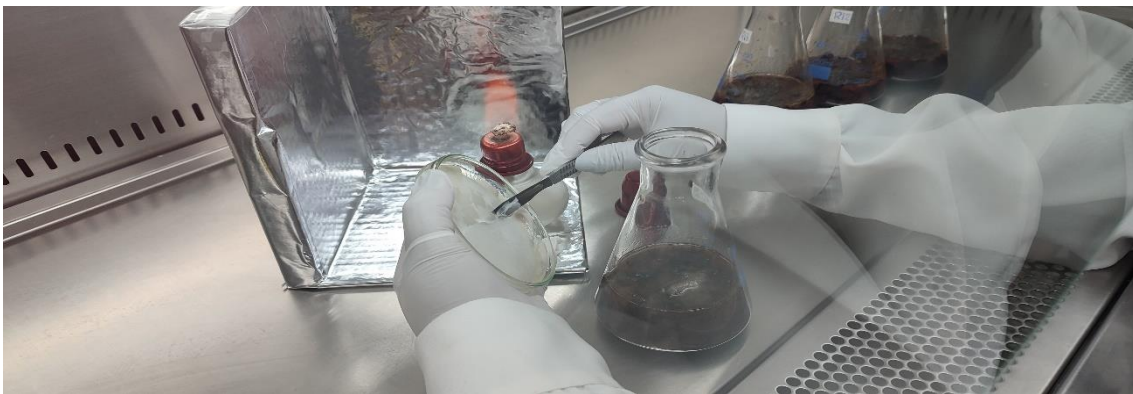


Figura 25: Inoculación del rhizopus a las muestras a experimentar



Figura 26: Fruto triturado (Ccomayo) a diferentes pH



Figura 27: Fermentación de muestras en la incubadora con agitador orbital a 120 oscilaciones



Figura 28: Extracto de antocianinas Fermentados después de 72 hrs



Figura 29: Medición del volumen obtenido y centrifugado

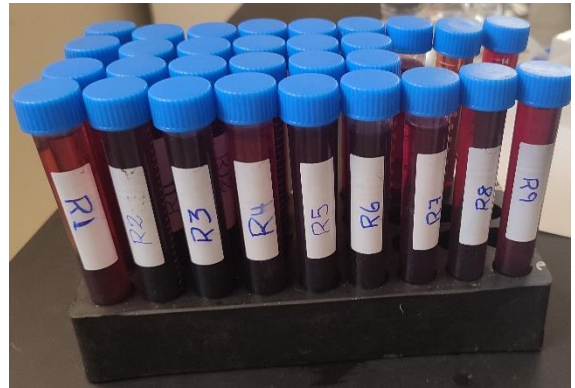
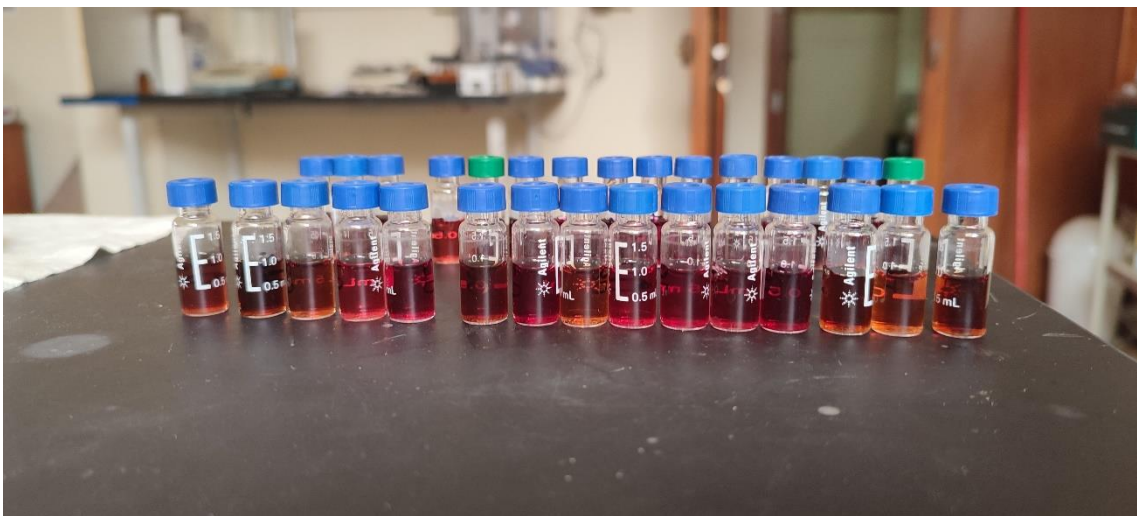
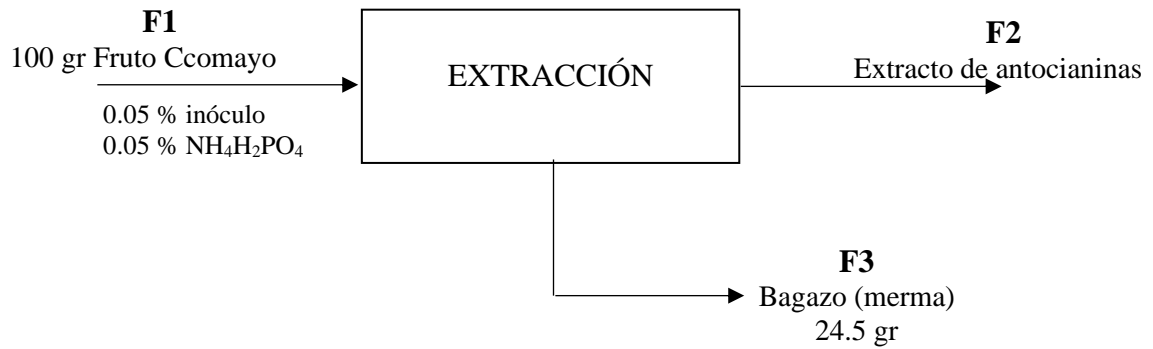


Figura 30: Extracto de antocianinas con levaduras y hongos



Anexo 5. Balance de materia en la extracción de antocianinas del Ccomayo por el método de fermentación:



Balance de materia:

$$F1 = F2 + F3$$
$$100 = F2 + 24.5$$
$$F2 = 75.5 \text{ gramos}$$

### Anexo 6. Purificación de antocianinas



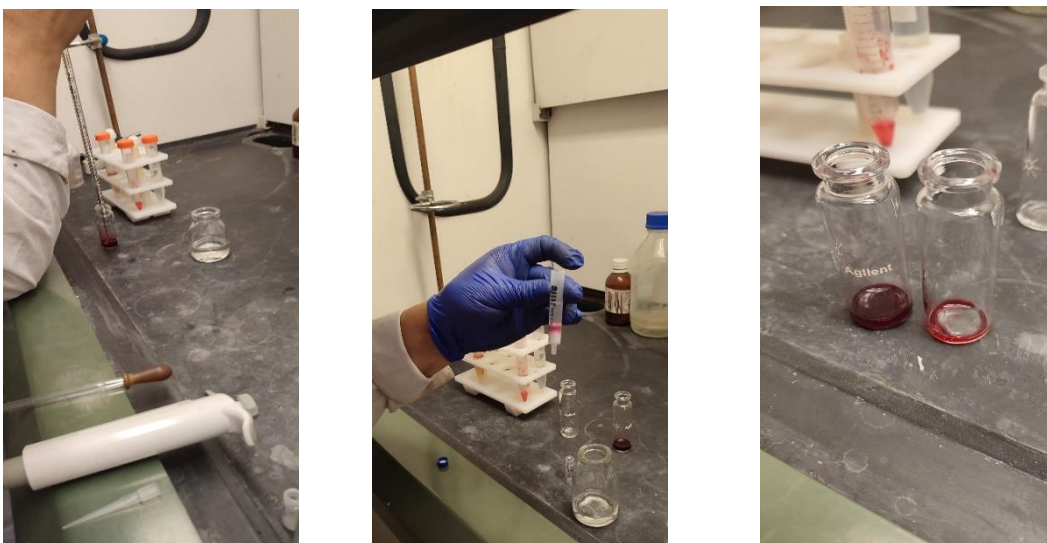
Figura 31: Pesado del extracto de Ccomayo



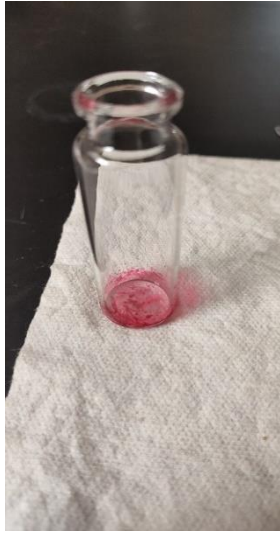
*Figura 32: Homogenización de la muestra*



*Figura 33: Evaporación de etanol*



*Figura 34: Purificación con cartucho C18 del Ccomayo*



*Figura 35: Secado a presión reducida y muestra redisuelta para el HPLC*

## Anexo 7. Análisis de antocianinas por HPLC (Inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*)

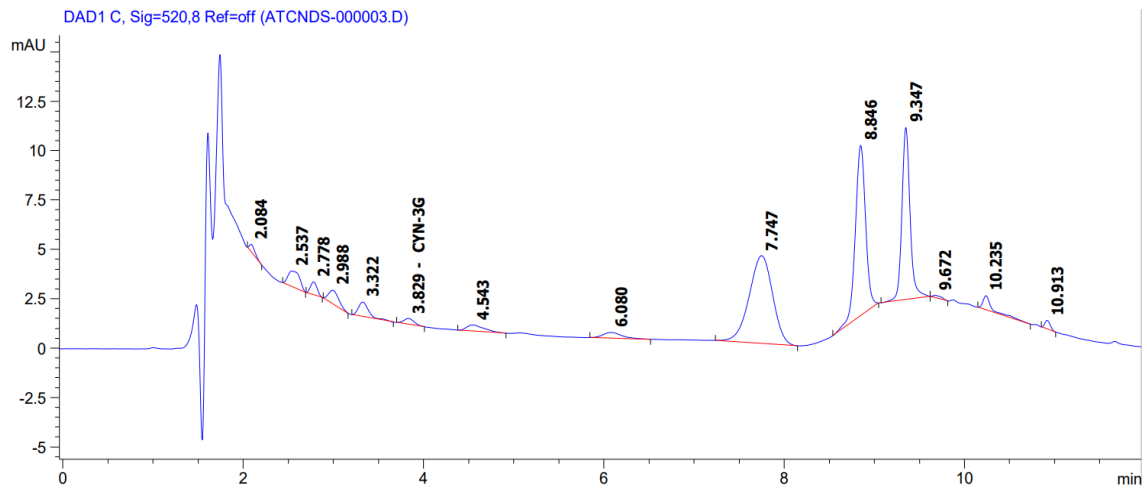


Figura 36: Cromatograma del extracto fermentado denominado S1 en 5 $\mu$

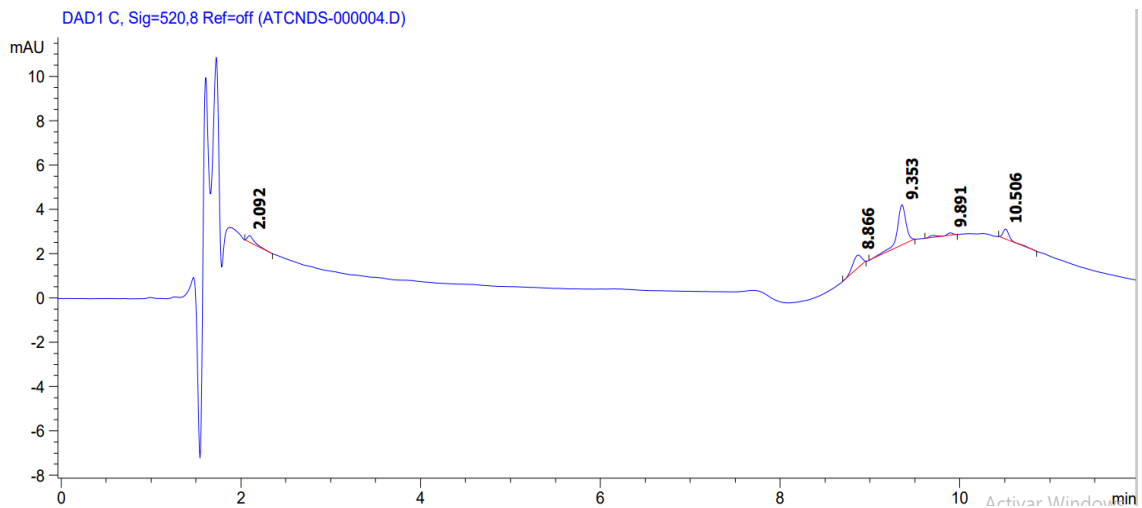


Figura 37: Cromatograma del extracto fermentado denominado S2 en 5 $\mu$

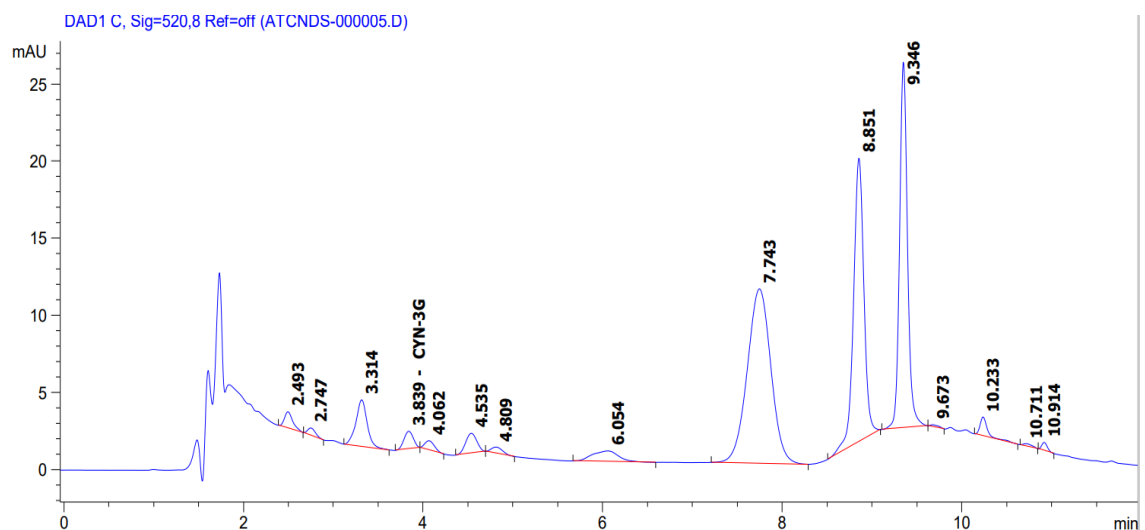


Figura 38: Cromatograma del extracto fermentado denominado S3 en 5 $\mu$

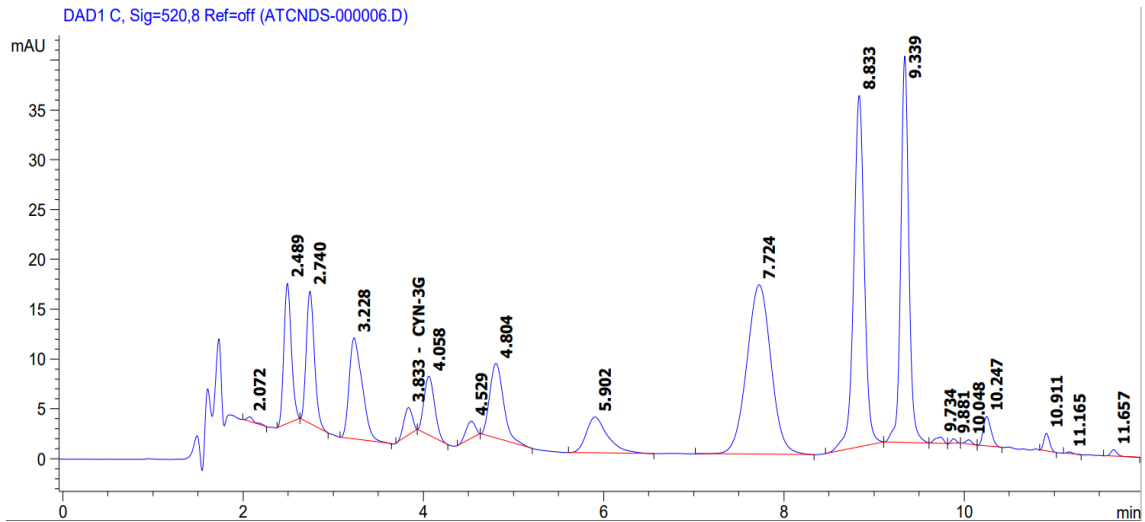


Figura 39: Cromatograma del extracto fermentado denominado S4 en 5 $\mu$

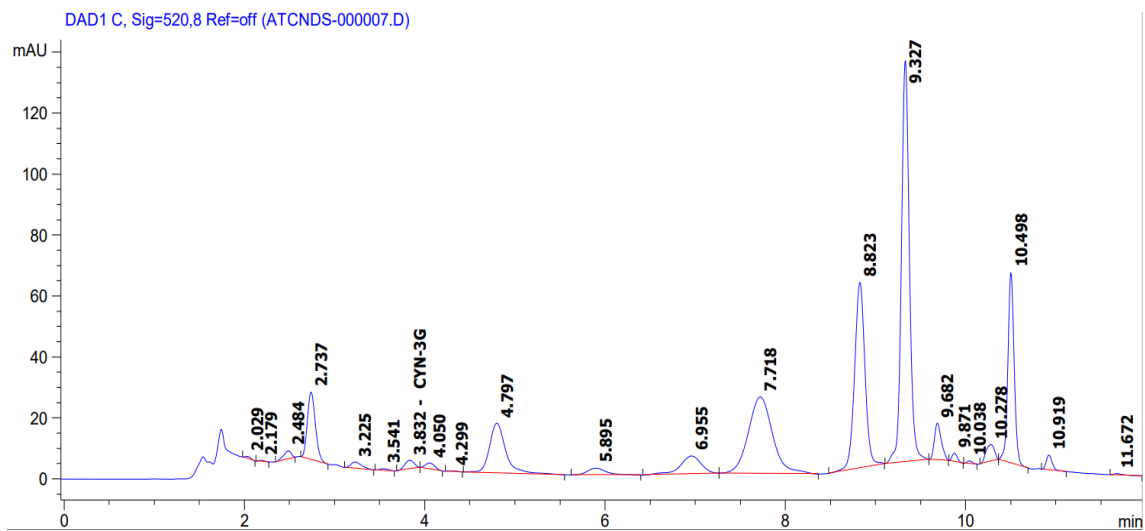


Figura 40: Cromatograma del extracto fermentado denominado S5 en 5 $\mu$

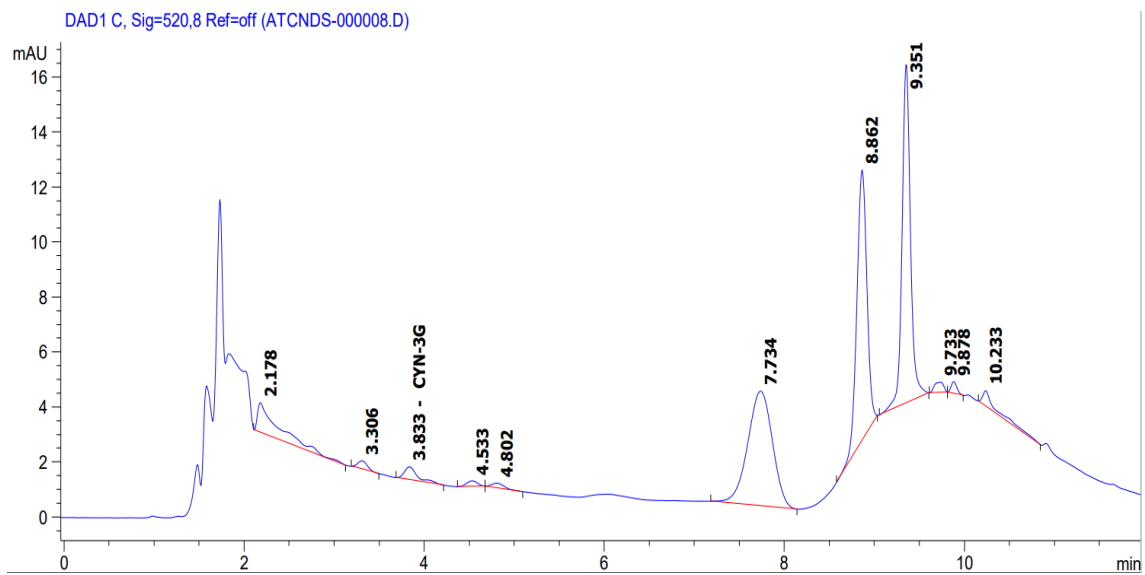


Figura 41: Cromatograma del extracto fermentado denominado S6 en 5 $\mu$

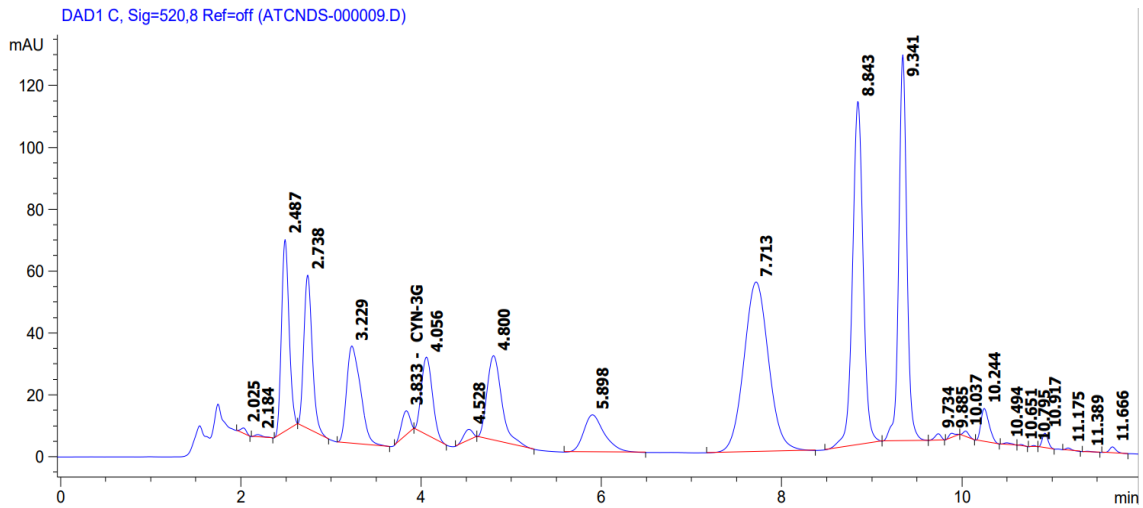


Figura 42: Cromatograma del extracto fermentado denominado S7 en 5 $\mu$

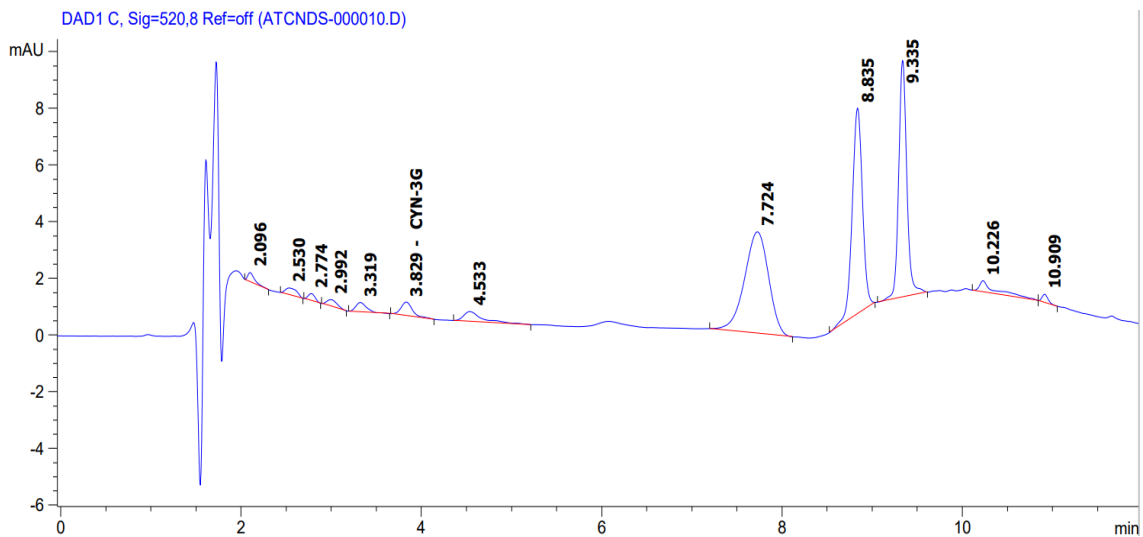


Figura 43: Cromatograma del extracto fermentado denominado S8 en 5 $\mu$

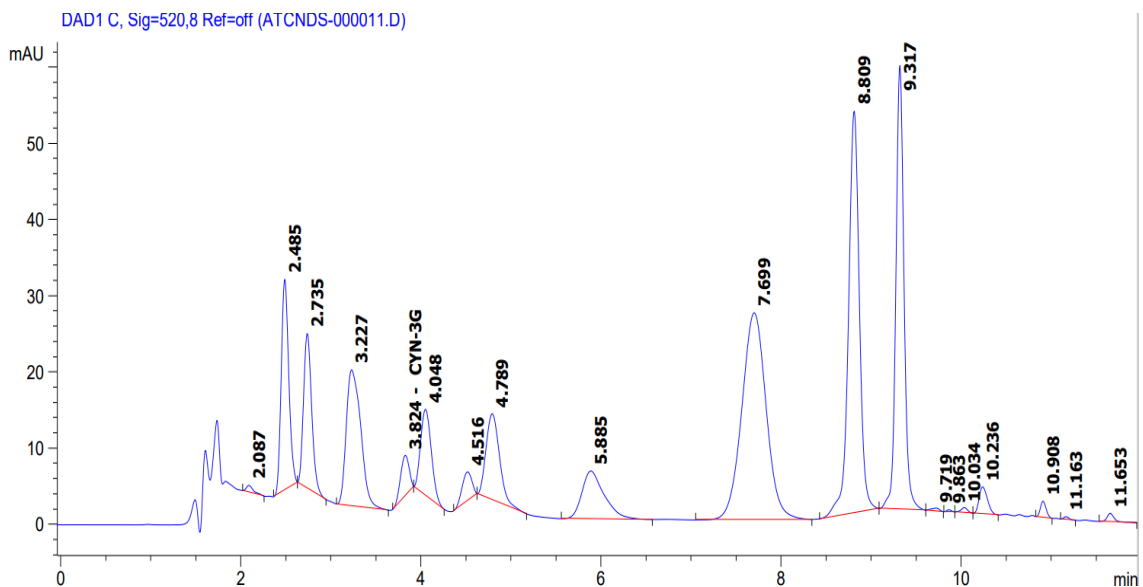


Figura 44: Cromatograma del extracto fermentado denominado S9 en 5 $\mu$

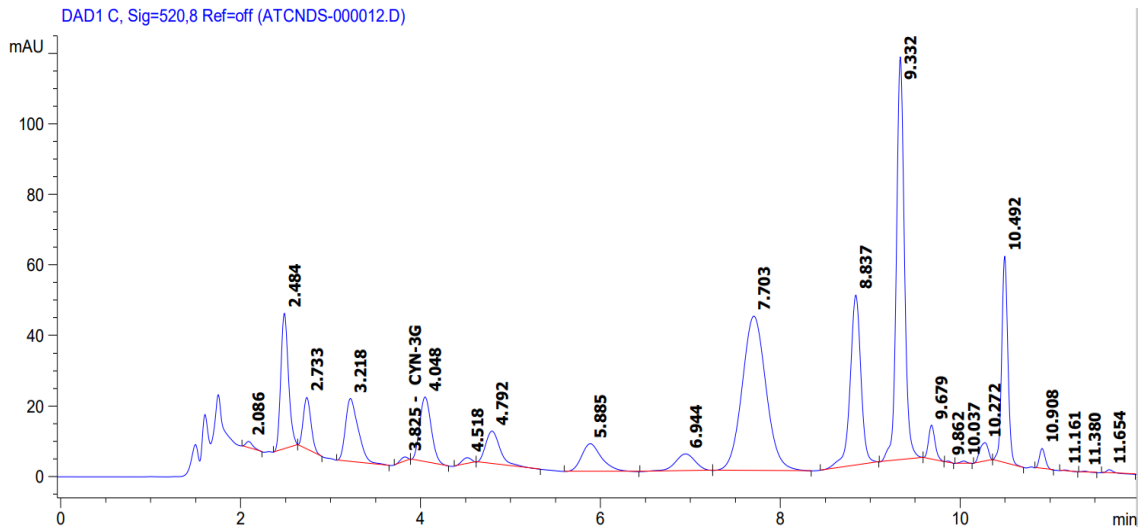


Figura 45: Cromatograma del extracto fermentado denominado S10 en 5 $\mu$

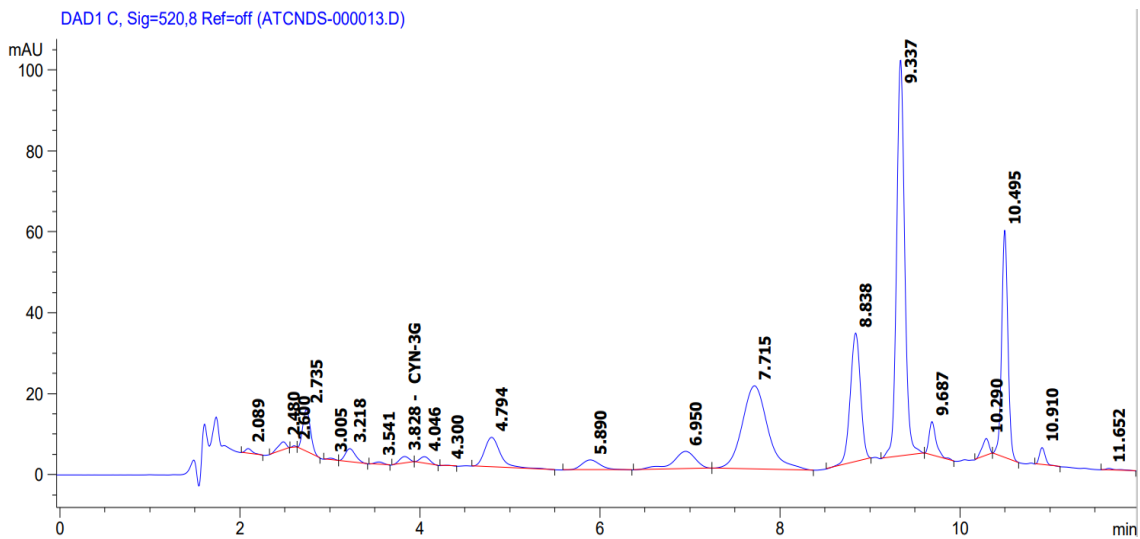


Figura 46: Cromatograma del extracto fermentado denominado S11 en 5 $\mu$

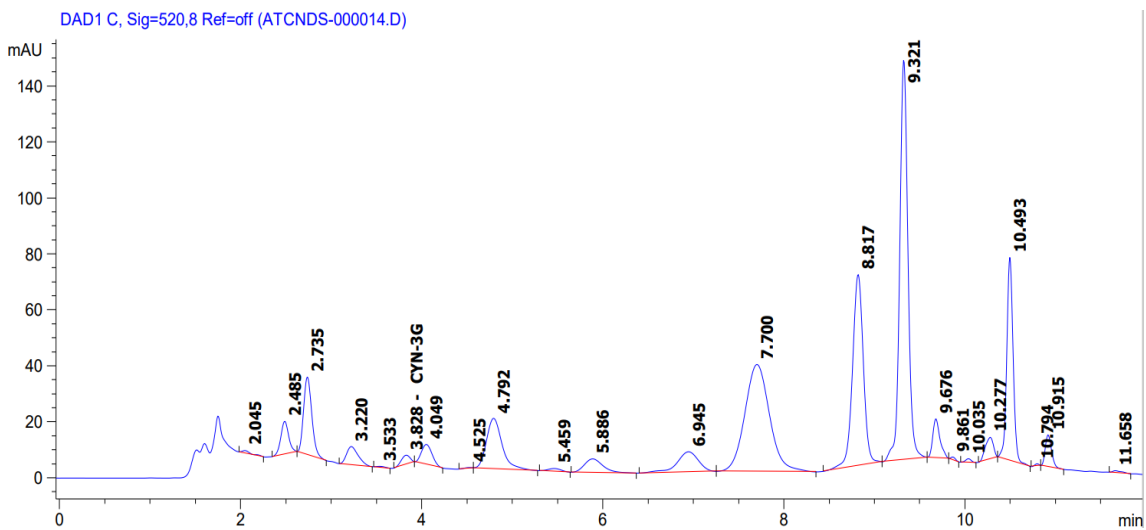


Figura 47: Cromatograma del extracto fermentado denominado S12 en 5 $\mu$

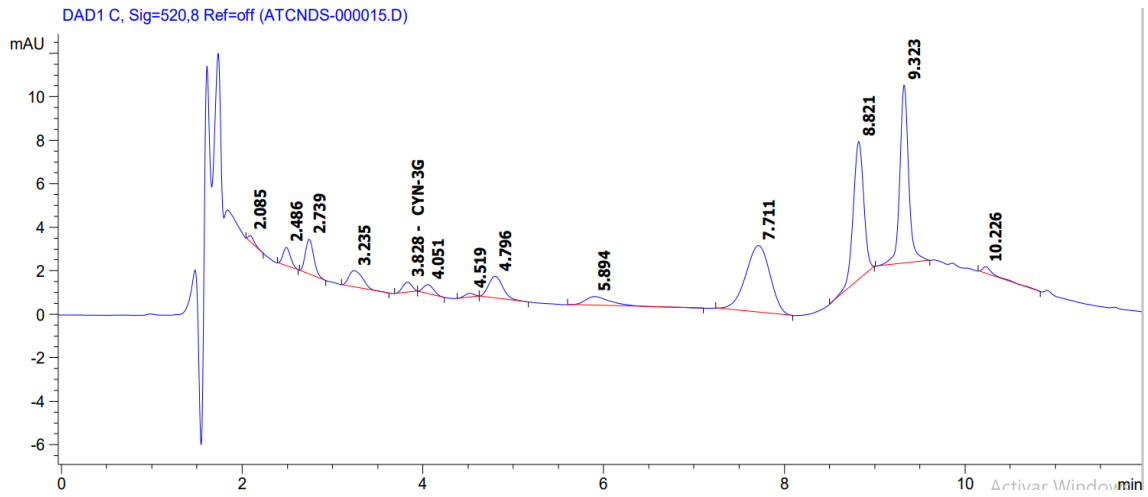


Figura 48: Cromatograma del extracto fermentado denominado S13 en 5 $\mu$

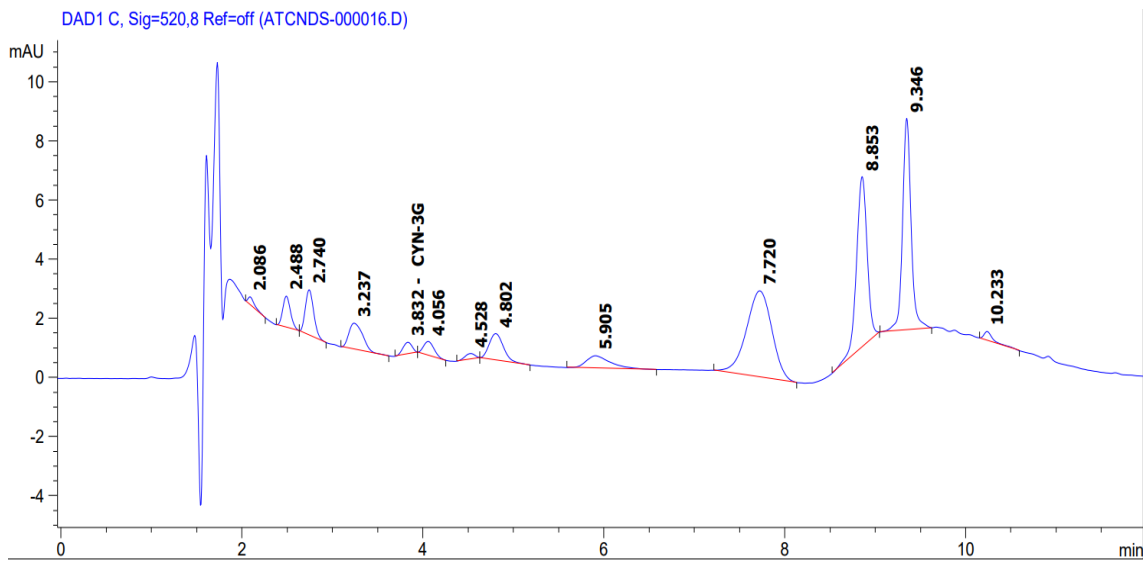


Figura 49: Cromatograma del extracto fermentado denominado S14 en 5 $\mu$

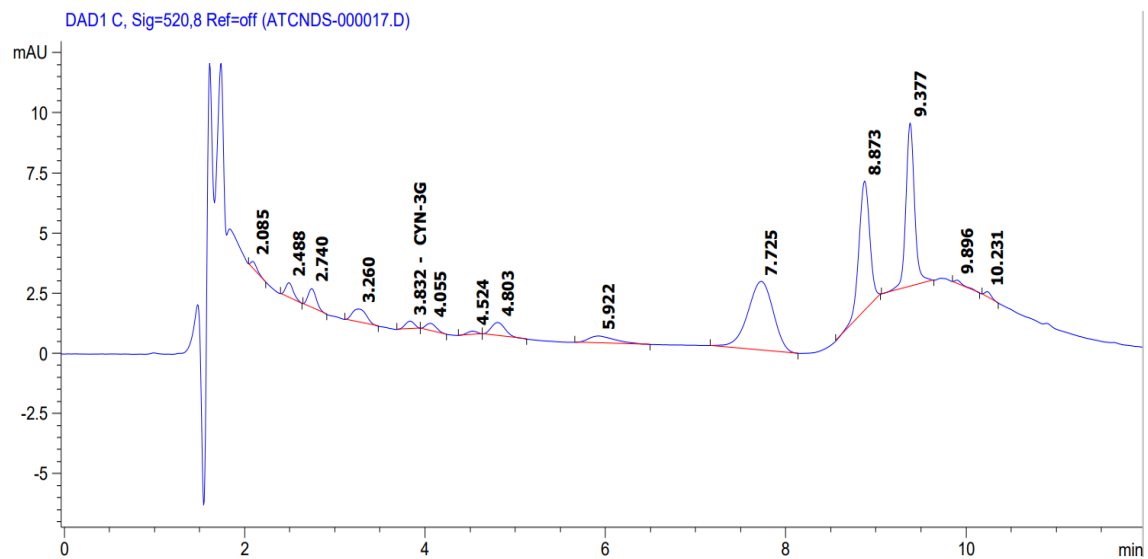


Figura 50: Cromatograma del extracto fermentado denominado S15 en 5 $\mu$

## Anexo 8. Análisis de antocianinas por HPLC (Inóculo de *Rhizopus oryzae*)

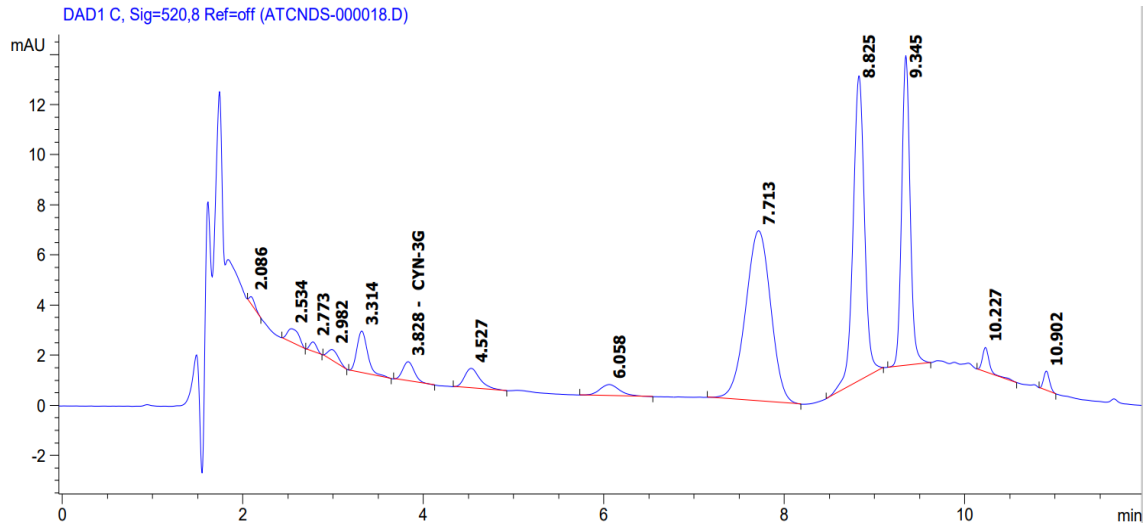


Figura 51: Cromatograma del extracto fermentado denominado R1 en 5 $\mu$

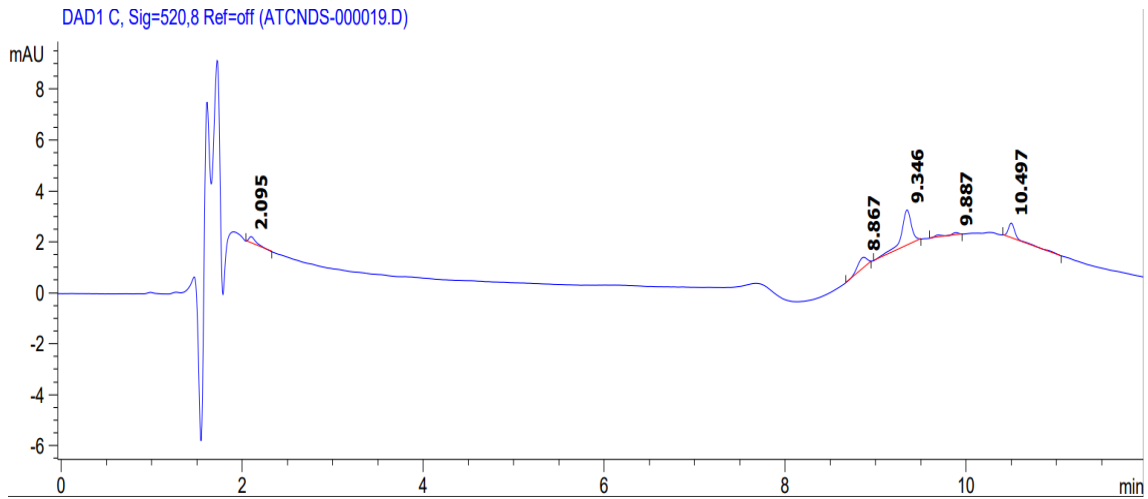


Figura 52: Cromatograma del extracto fermentado denominado R2 en 5 $\mu$

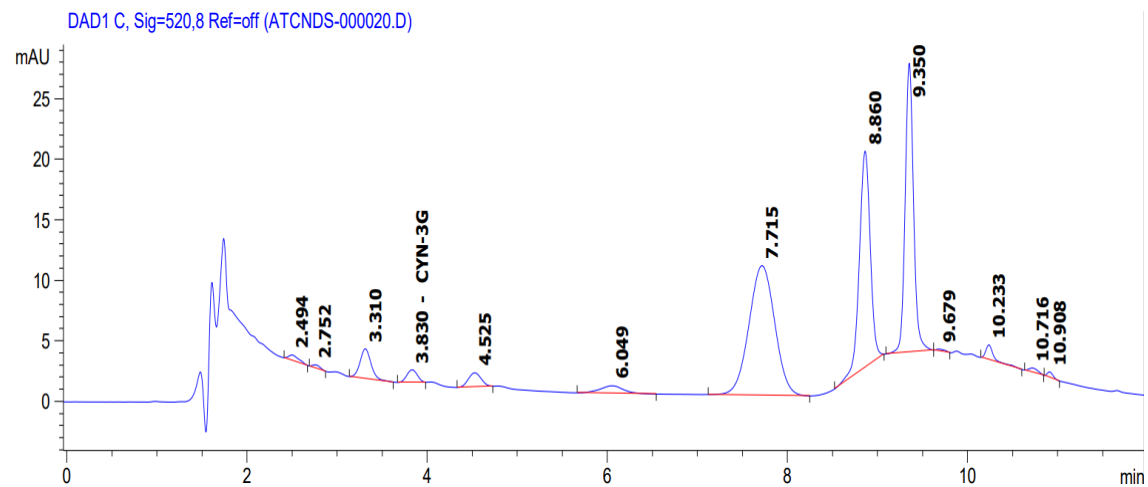


Figura 53: Cromatograma del extracto fermentado denominado R3 en 5 $\mu$

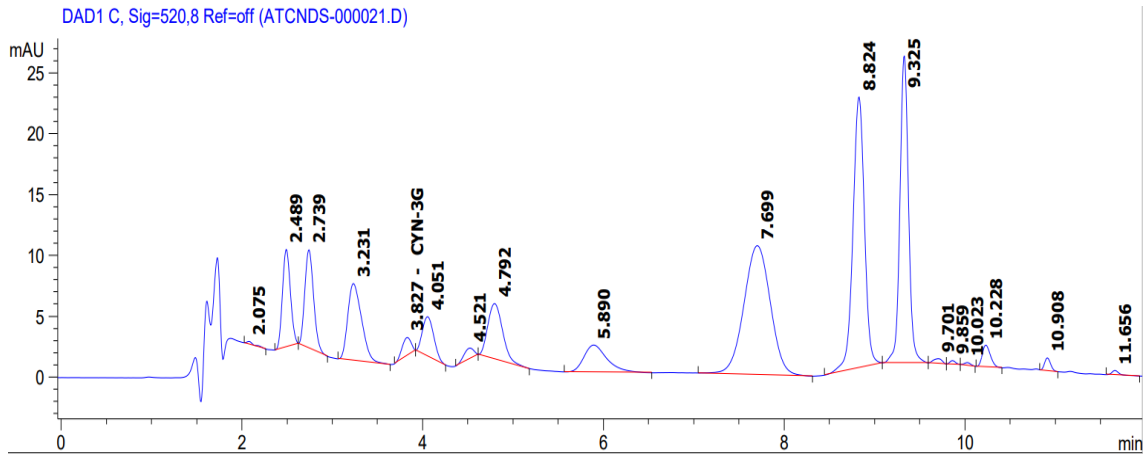


Figura 54: Cromatograma del extracto fermentado denominado R4 en 5 $\mu$

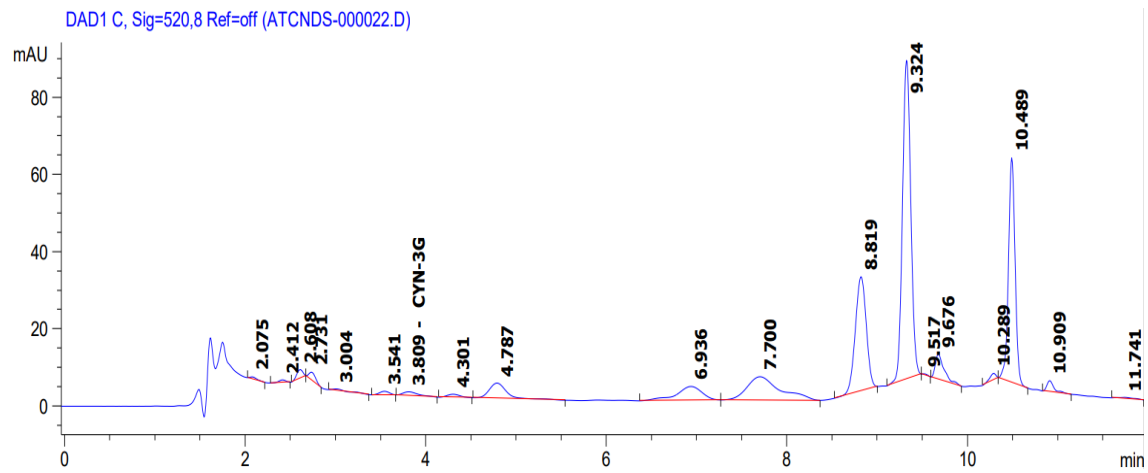


Figura 55: Cromatograma del extracto fermentado denominado R5 en 5 $\mu$

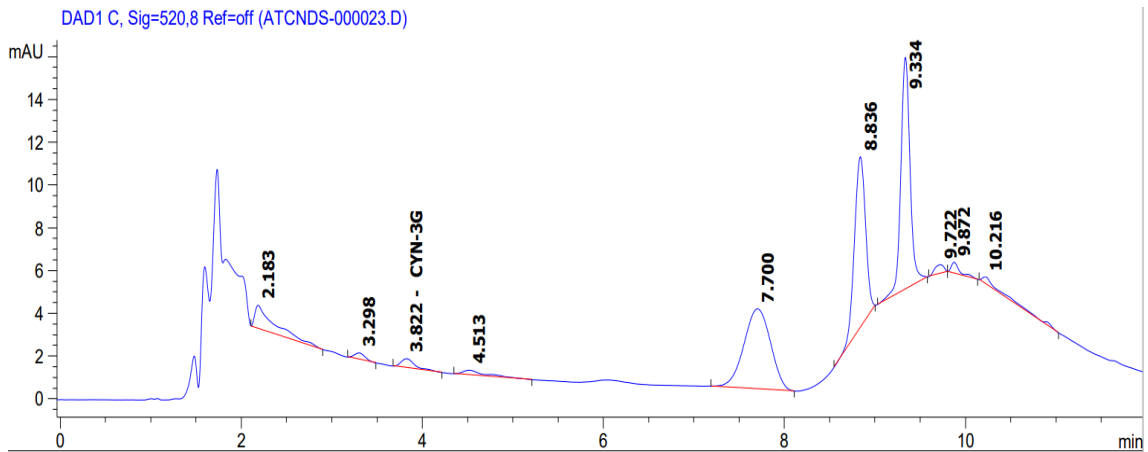


Figura 56: Cromatograma del extracto fermentado denominado R6 en 5 $\mu$

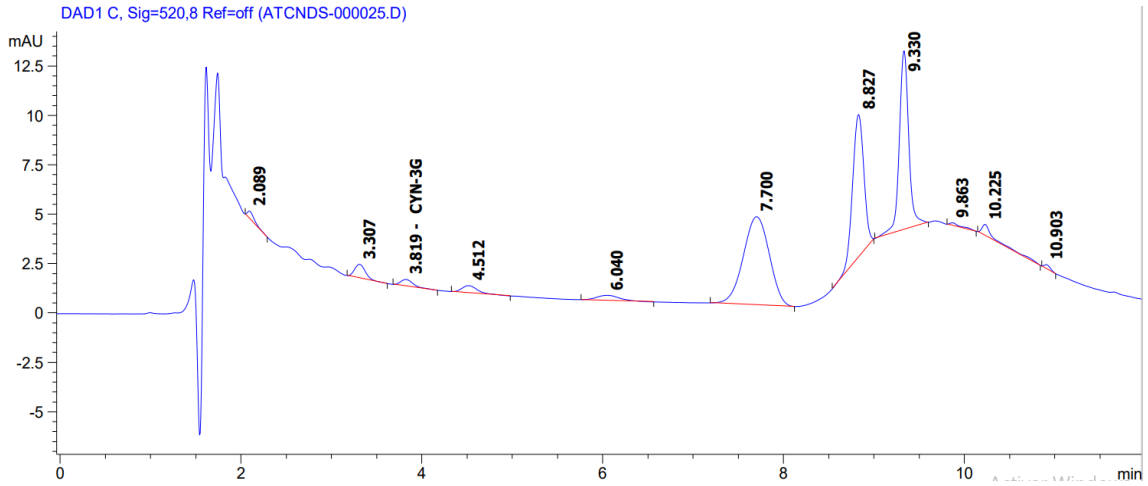


Figura 57: Cromatograma del extracto fermentado denominado R7 en 5 $\mu$

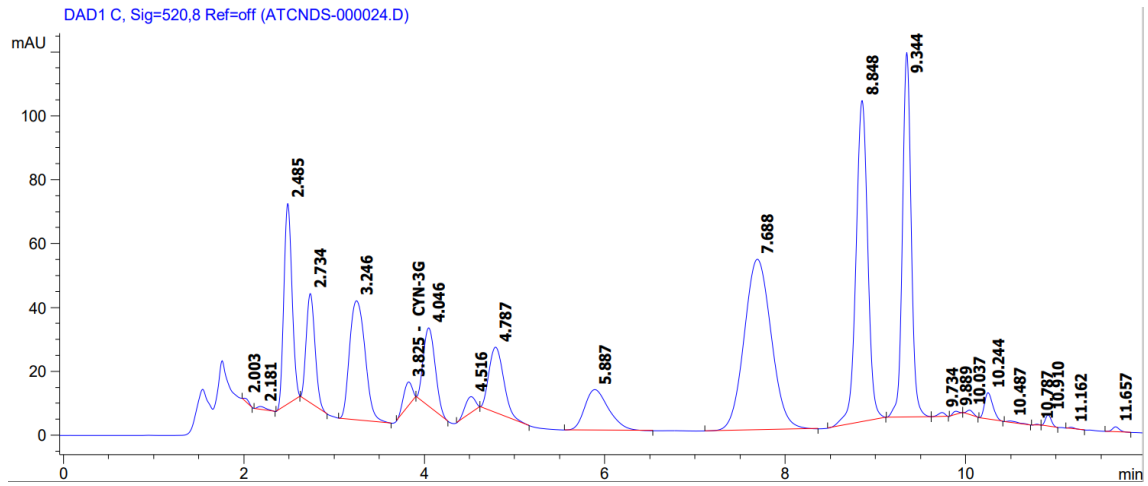


Figura 58: Cromatograma del extracto fermentado denominado R8 en 5 $\mu$

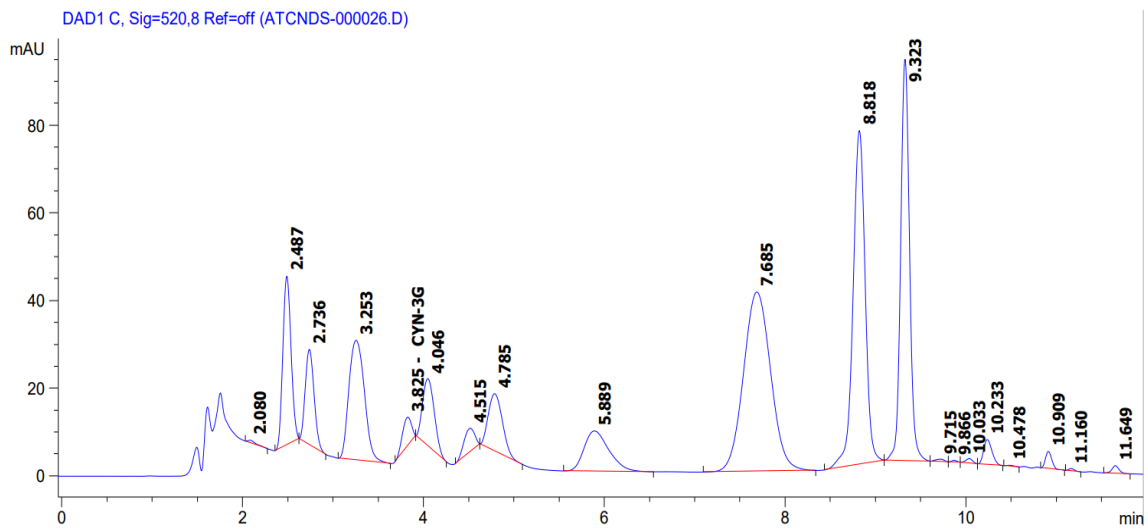


Figura 59: Cromatograma del extracto fermentado denominado R9 en 5 $\mu$

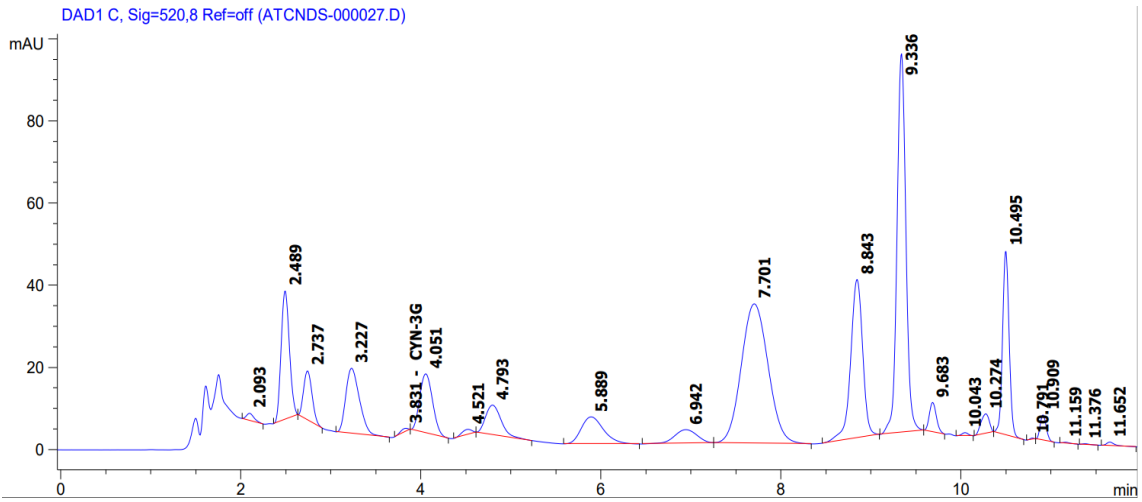


Figura 60: Cromatograma del extracto fermentado denominado R10 en 5 $\mu$

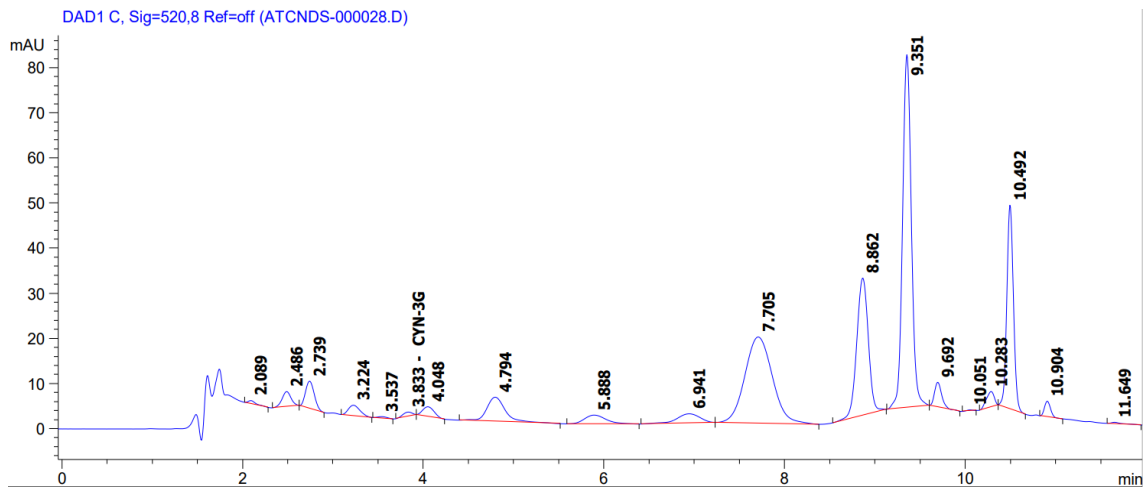


Figura 61: Cromatograma del extracto fermentado denominado R11 en 5 $\mu$

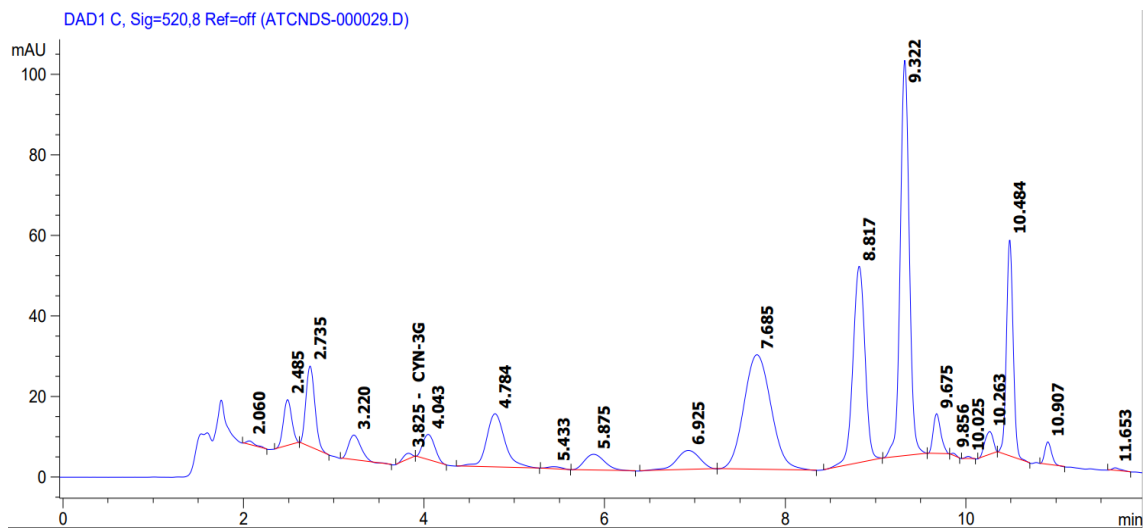


Figura 62: Cromatograma del extracto fermentado denominado R12 en 5 $\mu$

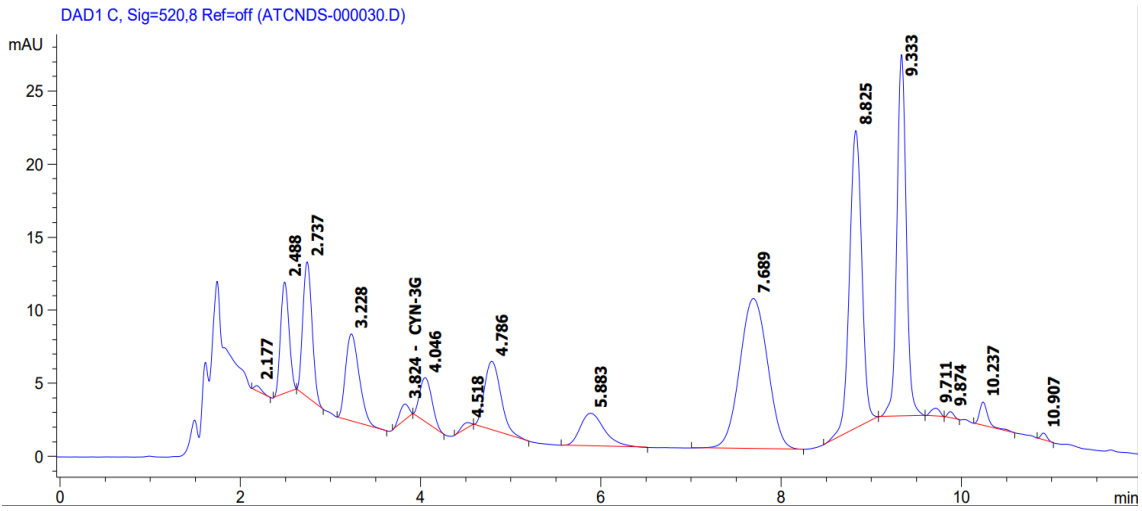


Figura 63: Cromatograma del extracto fermentado denominado R13 en 5 $\mu$

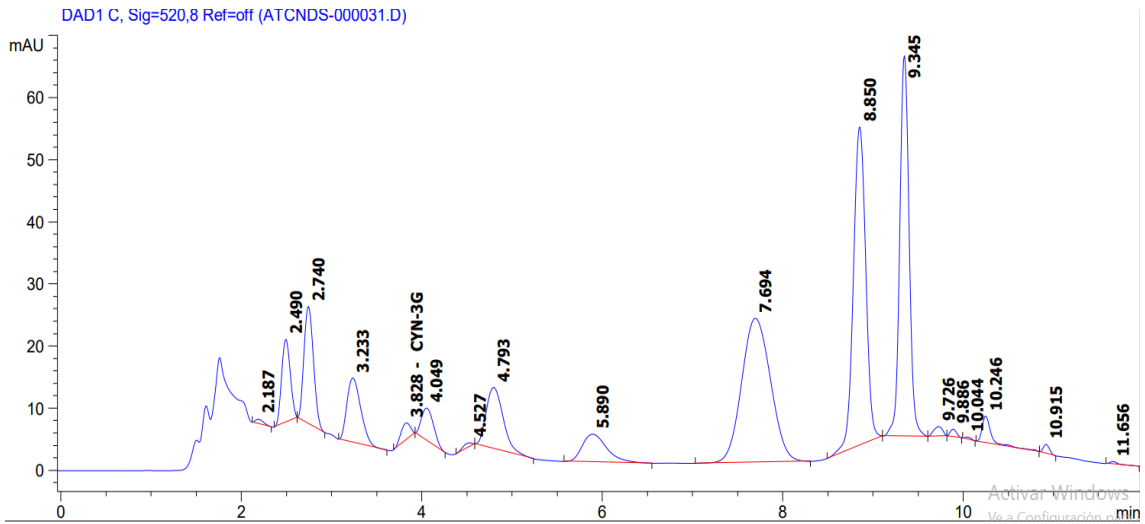


Figura 64: Cromatograma del extracto fermentado denominado R14 en 5 $\mu$

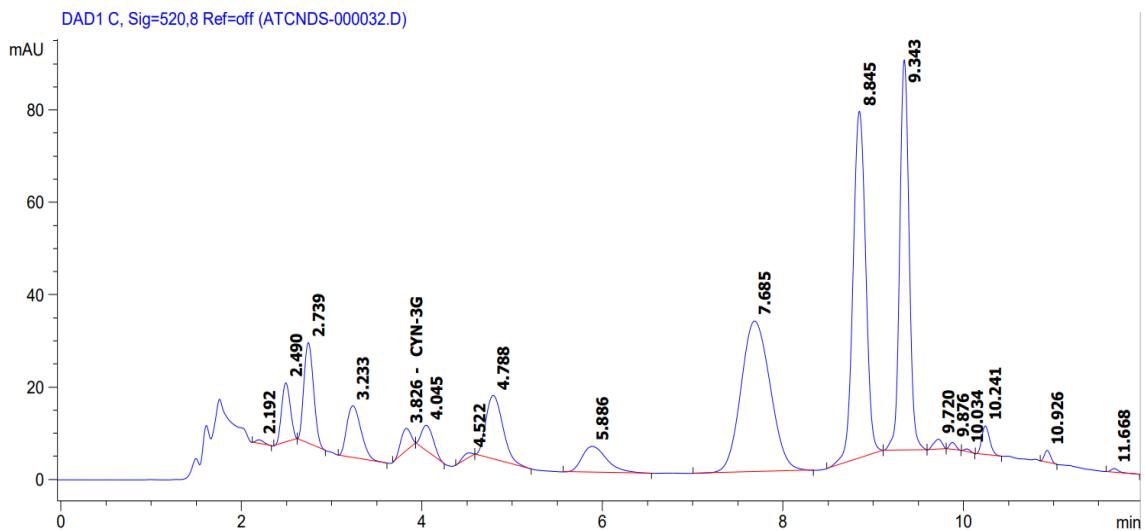


Figura 65: Cromatograma del extracto fermentado denominado R15 en 5 $\mu$

## Anexo 9. Resultados del análisis de laboratorio de la cuantificación de antocianinas con HPLC



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
 FACULTAD DE CIENCIAS  
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad  
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

### RESULTADOS

Cusco, 03 de Octubre del 2022

Solicitantes : Mary Trini Coari Coila  
 Tipo de Análisis : Determinación de Antocianinas por HPLC  
 Tipo de Muestras : Frutos de Comayo fermentados con Saccharomyces cerevisiae a diferentes pH, tiempos y temperaturas  
 Almacenamiento : 4 °C.

Fruto Ccomayo 4.07 mg Equivalentes de cianidina 3 glucosido CYA-3G /gr fruto

Tratamiento Fermentados		Repeticiones			Promedio
		1	2	3	EQ CYA-3G ug/ml fruto
1	S1	42.44	42.36	43.21	42.67
2	S2	61.25	61.32	61	61.19
3	S3	52.87	51.34	52.61	52.27
4	S4	37.17	37.12	37.64	37.31
5	S5	94.95	94.63	93.89	94.49
6	S6	55.59	55.26	55.03	55.29
7	S7	116.98	115.94	116.45	116.46
8	S8	32.70	32.71	32.26	36.56
9	S9	70.24	70.38	70.54	70.39
10	S10	80.65	79.75	79.34	79.91
11	S11	39.30	39.82	39.26	39.46
12	S12	67.10	67.54	68.15	67.60
13	S13	102.04	100.52	103.48	102.01
14	S14	100.15	100.64	101.31	100.70
15	S15	102.27	101.65	103.67	102.65

**Nota:**

Se ha detectado la presencia de Antocianinas en las muestras, para la detección y cuantificación se utilizó una curva de calibración de diferentes concentraciones del estándar Cianidina 3 Glucósido, donde se evaluó la similitud del espectro UV del estándar frente a las señales de las muestras, los resultados expresan el contenido en miligramos de antocianinas por gramo de fruto.



*(Handwritten Signature)*

Químico. Jorge Choquenaira Pari  
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría – UNSAAC,  
 COP - 914



## RESULTADOS

Cusco, 03 de Octubre del 2022

Solicitantes : Mary Trini Coari Coila  
Tipo de Análisis : Determinación de Antocianinas por HPLC  
Tipo de Muestras : Frutos de Comayo fermentados con *Rhizopus oryzae* a diferentes pH, tiempos y temperaturas  
Almacenamiento : 4 °C.


Fruto Ccomayo 4.07 mg Equivalentes de cianidina 3 glucosido CYA-3G /gr fruto

Tratamiento Fermentados	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	EQ CYA-3G ug/ml fruto
1 R1	37.23	37.64	37.21	37.36
2 R2	42.16	40.64	41.29	41.36
3 R3	35.58	35.31	35.01	35.30
4 R4	23.54	23.14	23.16	23.28
5 R5	56.93	55.21	55.49	55.88
6 R6	81.14	81.65	80.43	81.07
7 R7	62.11	62.58	63.65	62.78
8 R8	118.01	118.12	118.23	118.12
9 R9	57.22	57.31	57.74	57.42
10 R10	48.52	48.62	48.94	48.69
11 R11	19.98	20.31	20.32	20.20
12 R12	54.26	54.78	52.81	53.95
13 R13	43.82	43.16	45.24	44.07
14 R14	46.67	47.29	46.32	46.76
15 R15	48.74	48.32	48.21	48.42

### Nota:

Se ha detectado la presencia de Antocianinas en las muestras, para la detección y cuantificación se utilizó una curva de calibración de diferentes concentraciones del estándar Cianidina 3 Glucósido, donde se evaluó la similitud del espectro UV del estándar frente a las señales de las muestras, los resultados expresan el contenido en miligramos de antocianinas por gramo de fruto.

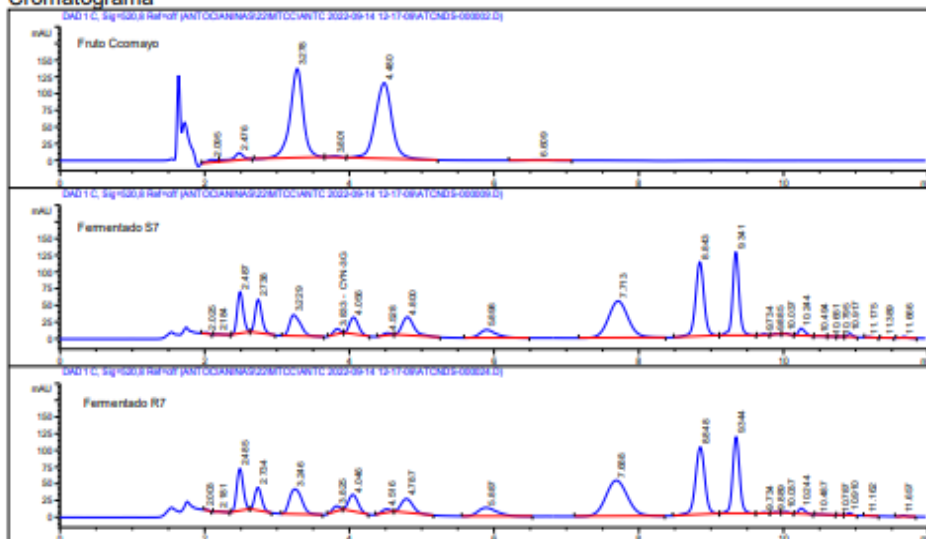


  
Quipico Jorge Chequenaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría - UNSAAC,  
CQP - 914



## RESULTADOS

### Cromatograma



### Condiciones de Análisis por HPLC para Antocianinas

Cromatógrafo: Agilent serie 1200  
Software: Chemstation V03.02  
Columna: Zorbax XDB-C18, 4.6 x 75mm, 3.5um  
Pre Columna: Zorbax XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5um  
Flujo de Columna: 0.5 ml/min.  
Solvente A: Acido Acético : Acetonitrilo : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10%:5%:1%)  
Solvente B: Acetonitrilo  
Sistema de Análisis: 0 a 4 min 0% de B, de 4 a 11 min 40% de B  
Detección DAD: 520 nm  
Temperatura del Horno: 40.0°C  
Tiempo de Análisis: 12 min.  
Volumen de Inyección: 5.0 µl  
Estándar: Cyanidin 3-O-glucoside chloride N° sc-235457 Lot C2913  
Santa Cruz biotechnology

### Referencia

1. Lee, J, Rennaker C, Wrolstad, R. 2008 Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods J. Food Chemistry 110 (2008) 782–786.
2. Qin, C. Li, Y. Niu, W. Ding, Y. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit Czech J. Food Sci. Vol. 28, 2010, No. 2: 117–126
3. Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 00(1), F1.1.1-F1.1.11. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0101s00>



Químico. Jorge Choquenaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría – UNSAAC.  
CQP - 914

## Anexo 10. Resultados de la optimización con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*

### Análisis de varianza para RENDIMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:TIEMPO	226.1	1	226.1	54.83	0.0178
B:TEMPERATURA	27.417	1	27.417	6.65	0.1232
C:pH	767.928	1	767.928	186.24	0.0053
AA	320.837	1	320.837	77.81	0.0126
AB	4.0	1	4.0	0.97	0.4285
AC	27.1962	1	27.1962	6.60	0.1240
BB	818.813	1	818.813	198.58	0.0050
BC	2.08802	1	2.08802	0.51	0.5505
CC	249.129	1	249.129	60.42	0.0162
Falta de ajuste	128.24	3	42.7467	10.37	0.0892
Error puro	8.24667	2	4.12333		
Total (corr.)	2415.32	14			

R-cuadrada = 94.3491 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 84.1775 por ciento

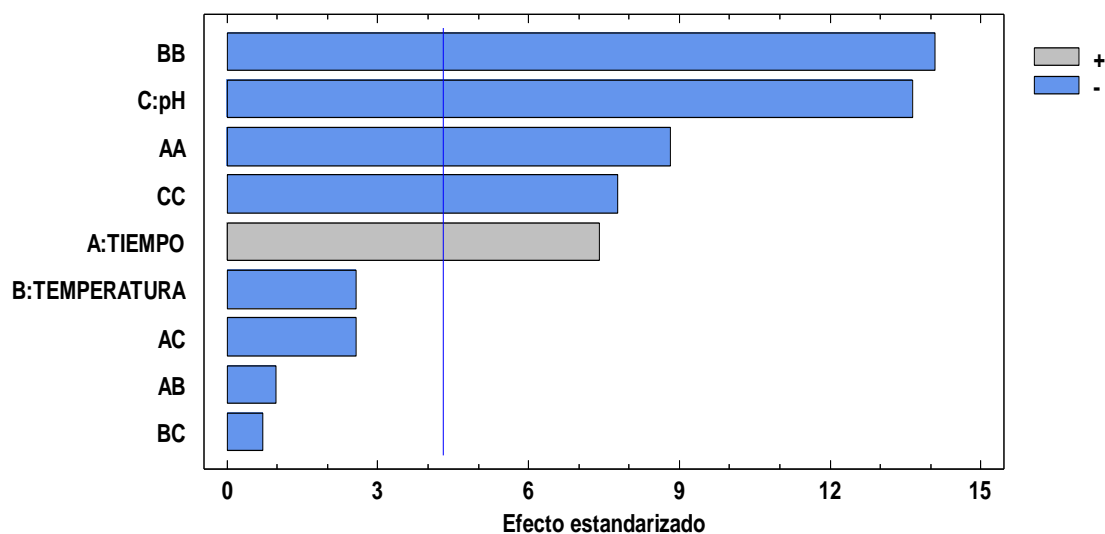
Error estándar del est. = 2.0306

Error absoluto medio = 2.60678

Estadístico Durbin-Watson = 2.05969 (P=0.3891)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.12124

Diagrama de Pareto Estandarizada para RENDIMIENTO



## Anexo 11. Resultados de la optimización con el inóculo de *Rhizopus oryzae*

### Análisis de varianza para RENDIMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:TIEMPO	0.45125	1	0.45125	1.85	0.3064
B:TEMPERATURA	58.32	1	58.32	239.67	0.0041
C:pH	0.28125	1	0.28125	1.16	0.3948
AA	89.8626	1	89.8626	369.30	0.0027
AB	73.1025	1	73.1025	300.42	0.0033
AC	0.36	1	0.36	1.48	0.3479
BB	964.031	1	964.031	3961.77	0.0003
BC	0.2025	1	0.2025	0.83	0.4579
CC	3.57026	1	3.57026	14.67	0.0619
Falta de ajuste	110.747	3	36.9158	151.71	0.0066
Error puro	0.486667	2	0.243333		
Total (corr.)	1259.59	14			

R-cuadrada = 91.169 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 75.2732 por ciento

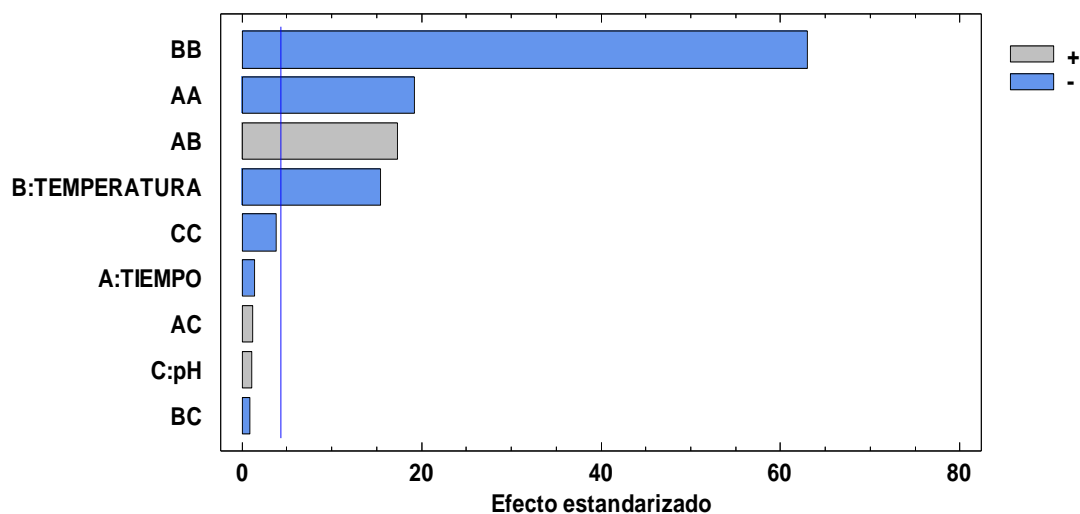
Error estándar del est. = 0.493288

Error absoluto medio = 2.17222

Estadístico Durbin-Watson = 2.61087 (P=0.7448)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.350773

Diagrama de Pareto Estandarizada para RENDIMIENTO



**Anexo 12. Rendimientos obtenidos con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae***

N°	TRATAMIENTOS			REPETICIONES (RENDIMIENTO %)			$\bar{x}$	$\sigma$
	t (hrs)	T° (°C)	pH	X1	X2	X3		
1	24	20	4	23.338913	23.304002	22.654076	23.0989971	0.3857084
2	48	40	5	21.280688	21.063980	21.583176	21.3092813	0.2607760
3	48	20	5	27.520978	26.344069	26.374466	26.7465043	0.6708864
4	72	20	4	37.705175	38.998581	37.416071	38.0399424	0.8426961
5	72	40	4	33.104749	33.446289	34.145046	33.5653616	0.5302720
6	72	30	5	24.070607	22.799385	22.452897	23.1076293	0.8517672
7	72	30	3	56.616021	57.840775	55.912416	56.7897374	0.9758460
8	24	30	5	20.391302	19.454170	20.442979	20.0961506	0.5565716
9	24	30	3	42.513045	41.203785	41.688389	41.8017396	0.6619490
10	48	20	3	37.933480	35.758902	36.827762	36.8400481	1.0873409
11	24	40	4	22.72579	22.722314	23.54523833	22.9977806	0.4741155
12	48	40	3	34.581658	34.27679	33.74836541	34.2022714	0.4216149
13	48	30	4	54.893107	53.71165	54.08170143	54.2288195	0.6043123
14	48	30	4	51.676219	51.441469	52.85853022	51.9920728	0.7594987
15	48	30	4	54.843049	53.976636	55.77513081	54.8649385	0.8994472

**Anexo 13. Rendimientos obtenidos con el inóculo de *Rhizopus oryzae***

N°	TRATAMIENTOS			REPETICIONES (RENDIMIENTO %)			$\bar{x}$	$\sigma$
	t (hrs)	T° (°C)	pH	X1	X2	X3		
1	48	40	3	25.139306	25.309009	25.129646	25.1926537	0.1008822
2	24	20	4	15.123155	14.500512	15.68352	15.1023957	0.5917769
3	72	30	3	20.25301	20.649338	20.951777	20.6180418	0.3504331
4	48	40	5	15.744616	15.2796	16.21921	15.7478089	0.4698133
5	72	30	5	17.079	17.853136	16.805736	17.2459574	0.5432935
6	72	20	4	36.035012	36.557258	35.737884	36.1100512	0.4148094
7	48	20	5	28.516273	28.391748	28.93563	28.6145501	0.2849487
8	24	30	5	35.597847	35.206065	36.096794	35.6335689	0.4464377
9	24	40	4	28.232714	27.350879	28.759756	28.1144495	0.7118452
10	24	30	3	26.641843	26.230842	27.504331	26.7923387	0.6499463
11	48	20	3	10.7892	11.084335	10.573946	10.8158269	0.2562339
12	72	40	4	22.763603	21.309382	22.655776	22.2429205	0.8102638
13	48	30	4	38.23464	38.524046	37.718619	38.1591020	0.4079921
14	48	30	4	37.63744	38.448741	37.320818	37.8023331	0.5817603
15	48	30	4	38.747222	38.123829	39.417032	38.7626945	0.6467402

**Anexo 14. Datos experimentales obtenidos en el laboratorio con *Saccharomyces cerevisiae***

<b>1RA REPETICIÓN</b>							
<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>S1</b>	24	20	4	100	37	50.41	188.43
<b>S2</b>	48	40	5	100	40	29.46	294.00
<b>S3</b>	48	20	5	100	66	26.75	418.73
<b>S4</b>	72	20	4	100	70	49.15	312.23
<b>S5</b>	72	40	4	100	47	25.16	535.52
<b>S6</b>	72	30	5	100	70	20.98	466.96
<b>S7</b>	72	30	3	100	67	24.50	940.52
<b>S8</b>	24	30	5	100	60	35.25	235.44
<b>S9</b>	24	30	3	100	62	33.11	522.59
<b>S10</b>	48	20	3	100	62	25.73	600.04
<b>S11</b>	24	40	4	100	48	40.86	226.37
<b>S12</b>	48	40	3	100	54	32.37	434.81
<b>S13</b>	48	30	4	100	57	32.01	697.95
<b>S14</b>	48	30	4	100	53	33.02	636.95
<b>S15</b>	48	30	4	100	55	32.47	677.42

<b>2DA REPETICIÓN</b>							
<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>S1</b>	24	20	4	100	38	49.01	193.5264
<b>S2</b>	48	40	5	100	40	29.16	294
<b>S3</b>	48	20	5	100	65	26	412.386
<b>S4</b>	72	20	4	100	71	50.12	316.6884
<b>S5</b>	72	40	4	100	48	24.89	546.912
<b>S6</b>	72	30	5	100	72	19.32	480.2976
<b>S7</b>	72	30	3	100	67	25.03	940.5192
<b>S8</b>	24	30	5	100	59	34.2	231.516
<b>S9</b>	24	30	3	100	60	33.16	505.728
<b>S10</b>	48	20	3	100	63	23.87	609.714
<b>S11</b>	24	40	4	100	49	40.02	231.084
<b>S12</b>	48	40	3	100	53	32.69	426.756
<b>S13</b>	48	30	4	100	55	32.46	673.464
<b>S14</b>	48	30	4	100	53	32.87	636.954
<b>S15</b>	48	30	4	100	54	33.03	665.1072

<b>3RA REPETICIÓN</b>							
<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>S1</b>	24	20	4	100	36	50.29	183.3408
<b>S2</b>	48	40	5	100	41	29.15	301.35
<b>S3</b>	48	20	5	100	65	26.03	412.386
<b>S4</b>	72	20	4	100	69	49.48	307.7676
<b>S5</b>	72	40	4	100	48	25.41	546.912
<b>S6</b>	72	30	5	100	70	19.57	466.956
<b>S7</b>	72	30	3	100	65	24.94	912.444
<b>S8</b>	24	30	5	100	61	34.76	239.364
<b>S9</b>	24	30	3	100	61	33	514.1568
<b>S10</b>	48	20	3	100	62	24.98	600.036
<b>S11</b>	24	40	4	100	50	40.64	235.8
<b>S12</b>	48	40	3	100	54	31.59	434.808
<b>S13</b>	48	30	4	100	56	32.1	685.7088
<b>S14</b>	48	30	4	100	54	33.15	648.972
<b>S15</b>	48	30	4	100	55	33.51	677.424

**Anexo 15. Datos experimentales obtenidos en el laboratorio con *Rhizopus oryzae***

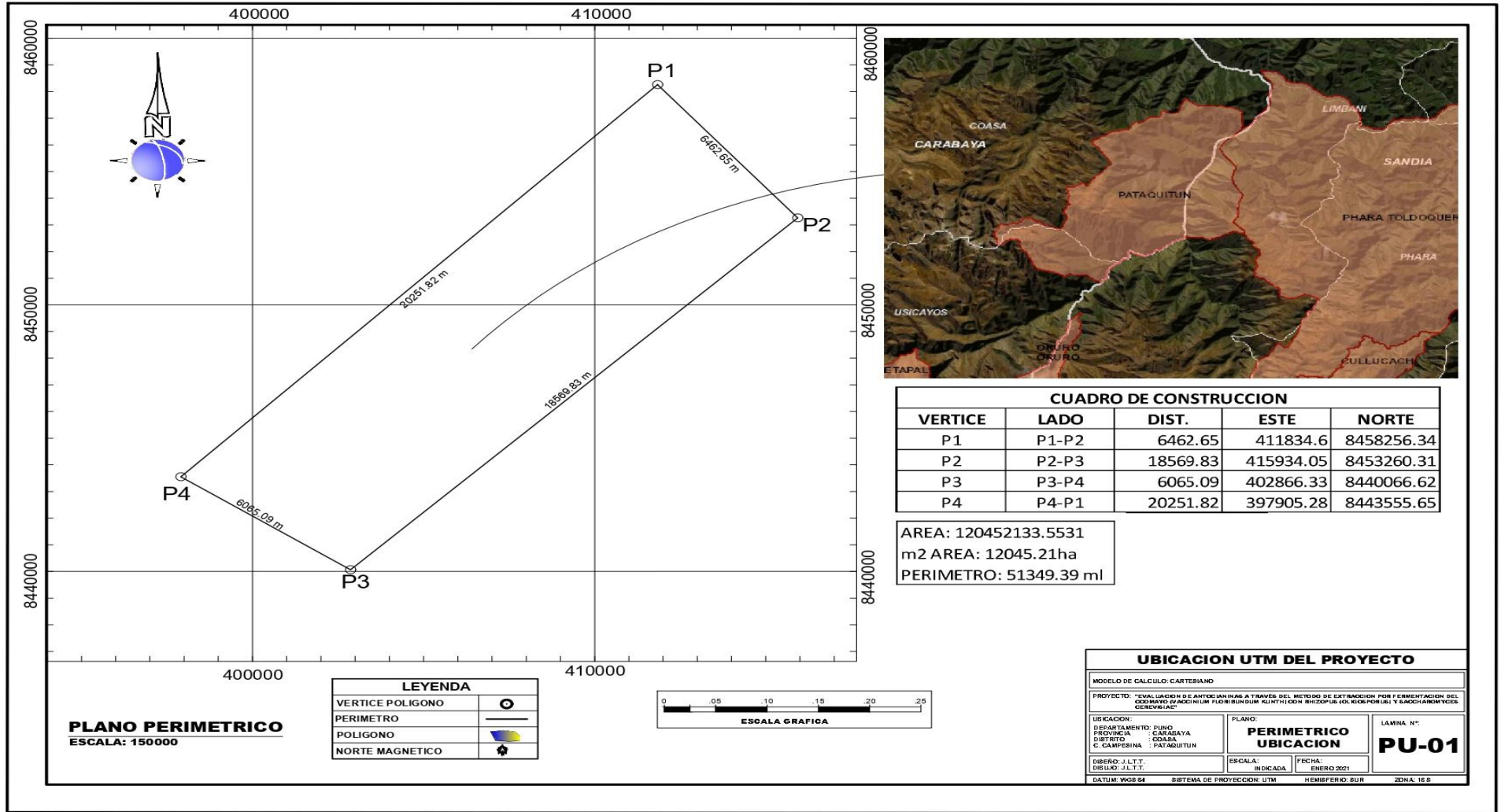
<b>1RA REPETICIÓN</b>							
<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>R1</b>	24	20	4	100	44	52.05	196.57
<b>R2</b>	48	40	5	100	54	22.53	273.20
<b>R3</b>	48	20	5	100	69	27.98	294.60
<b>R4</b>	72	20	4	100	50	45.37	141.24
<b>R5</b>	72	40	4	100	37	27.5	252.77
<b>R6</b>	72	30	5	100	69	21.83	671.84
<b>R7</b>	72	30	3	100	68	22.9	506.82
<b>R8</b>	24	30	5	100	65	15.74	920.48
<b>R9</b>	24	30	3	100	71	23.57	487.51
<b>R10</b>	48	20	3	100	61	30.53	355.17
<b>R11</b>	24	40	4	100	55	33.3	131.87
<b>R12</b>	48	40	3	100	51	27.9	332.07
<b>R13</b>	48	30	4	100	64	46.24	336.54
<b>R14</b>	48	30	4	100	59	46.36	330.42
<b>R15</b>	48	30	4	100	59	45.7	345.08

<b>2DA REPETICIÓN</b>							
<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>R1</b>	24	20	4	100	43	53.62	192.11
<b>R2</b>	48	40	5	100	53	22.01	268.14
<b>R3</b>	48	20	5	100	70	28.12	298.87
<b>R4</b>	72	20	4	100	50	44.03	141.24
<b>R5</b>	72	40	4	100	38	27.99	259.60
<b>R6</b>	72	30	5	100	70	21.83	681.58
<b>R7</b>	72	30	3	100	68	22.8	506.82
<b>R8</b>	24	30	5	100	62	16.32	877.99
<b>R9</b>	24	30	3	100	70	23.16	480.65
<b>R10</b>	48	20	3	100	60	30.56	349.34
<b>R11</b>	24	40	4	100	56	33.6	134.27
<b>R12</b>	48	40	3	100	50	26.64	325.56
<b>R13</b>	48	30	4	100	64	46.59	336.54
<b>R14</b>	48	30	4	100	60	46.57	336.02
<b>R15</b>	48	30	4	100	58	45.74	339.23

### 3RA REPETICIÓN

<b>ENSAYO</b>	<b>TIEMPO (hrs)</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>PESO INICIAL DE LA MUESTRA (gr)</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>BAGASO (gr)</b>	<b>ANTOCIANINAS (mg/gr)</b>
<b>R1</b>	24	20	4	100	44	52.03	196.57
<b>R2</b>	48	40	5	100	55	22.94	278.26
<b>R3</b>	48	20	5	100	71	28.13	303.14
<b>R4</b>	72	20	4	100	52	44.94	146.89
<b>R5</b>	72	40	4	100	37	27.06	252.77
<b>R6</b>	72	30	5	100	69	21.65	671.84
<b>R7</b>	72	30	3	100	69	22.9	514.27
<b>R8</b>	24	30	5	100	64	16.21	906.32
<b>R9</b>	24	30	3	100	71	24.01	487.51
<b>R10</b>	48	20	3	100	62	31.01	360.99
<b>R11</b>	24	40	4	100	54	33.24	129.47
<b>R12</b>	48	40	3	100	53	26.72	345.09
<b>R13</b>	48	30	4	100	63	46.34	331.28
<b>R14</b>	48	30	4	100	59	45.97	330.42
<b>R15</b>	48	30	4	100	59	46.49	345.08

## Anexo 16. Ubicación UTM del proyecto







**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**  
*"Universidad Pública de Calidad"*