

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES
ÓPTIMAS DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE DEXTRANO
DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)”**

PRESENTADO POR:

Bach. CHIA CONCEPCIÓN Carol Carla Geraldine

Bach. SOTELO GANOZA Kimy Yaan

ASESOR:

Dr. CASTILLO CALDERON Augusto

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Nuevo Chimbote – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

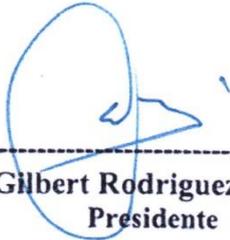
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

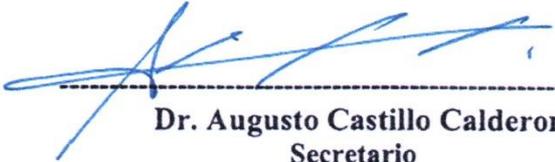


HOJA DEL AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado “**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES ÓPTIMAS DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE DEXTRANO DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)**” para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por las bachilleres: **CAROL CARLA GERALDINE CHIA CONCEPCION** y **KIMY YAAN SOTELO GANOZA**, que tienen como asesor al docente Dr. **AUGUSTO CASTILLO CALDERON** designado por resolución N°427-2017-UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 09 de Enero del 2019 por el siguiente jurado evaluador, designado mediante resolución N°673-2018-UNS-CFI.



Dr. Gilbert Rodriguez Paucar
Presidente



Dr. Augusto Castillo Calderon
Secretario



Dr. Elsa Aguirre Vargas
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA
E.P. DE INGENIERÍA DE AGROINDUSTRIAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12. pm del 09 de Enero del 2019 se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 673-2018-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Gilbert Rodriguez Paucar (Presidente)**
- **Dr. Augusto Castillo Calderon (Secretario)**
- **Dr. Elsa Aguirre Vargas (Integrante);** para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“Determinación de las Condiciones Ambientales Óptimas de la Hidrolisis Enzimática de Dextrano del Jugo de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum*)”, elaborada por el (os) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

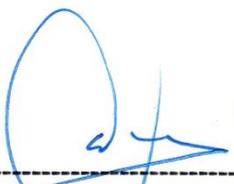
- **Bach. Carol Carla Geraldine Chia Concepción**
- **Bach. Kimy Yaan Sotelo Ganoza**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: Dr. Augusto Castillo Calderon, según Resolución. N° 427-2017-UNS-FI. Finalizada la sustentación, el (os) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente. El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
Carol Carla Geraldine chia Concepcion.	18	Bueno

Siendo la 3: pm del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

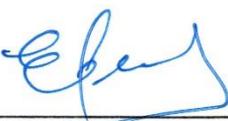
Nuevo Chimbote, 09 de Enero del 2019



Dr. Gilbert Rodriguez Paucar
Presidente



Dr. Augusto Castillo Calderon
Secretario



Dr. Elsa Aguirre Vargas
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA



FACULTAD DE INGENIERÍA
E.P. DE INGENIERÍA DE AGROINDUSTRIAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12 pm del 09 de Enero del 2019 se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 673-2018-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Gilbert Rodriguez Paucar (Presidente)**
- **Dr. Augusto Castillo Calderon (Secretario)**
- **Dr. Elsa Aguirre Vargas (Integrante);** para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“Determinación de las Condiciones Ambientales Óptimas de la Hidrolisis Enzimática de Dextrano del Jugo de Caña de Azúcar (*Saccharum Officinarum*)”, elaborada por el (os) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **Bach. Carol Carla Geraldine Chia Concepción**
- **Bach. Kimy Yaan Sotelo Ganoza**

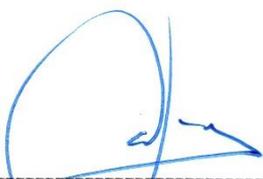
Asimismo, tienen como Asesor al docente: Dr. Augusto Castillo Calderon, **según Resolución. N° 427-2017-UNS-FI.** Finalizada la sustentación, el (os) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

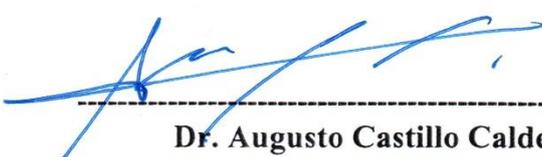
BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
<i>Kimy Yaan Sotelo Ganoza</i>	<i>18</i>	<i>Bueno</i>

Siendo la 1: pm del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 09 de Enero del 2019



Dr. Gilbert Rodriguez Paucar
Presidente



Dr. Augusto Castillo Calderon
Secretario



Dr. Elsa Aguirre Vargas
Integrante

DEDICATORIA

A Dios, por su infinito amor, porque todo lo realizado y conseguido es para Él. A mi madre Noemi C., por haberme apoyado en todo momento de manera incondicional con el gran amor que siempre me brindó, por los valores inculcados, por sus consejos y el ejemplo de mujer luchadora que me han permitido ser una persona de bien y realizar las cosas con dedicación. Así como a mi papito Felix quien fue el sostén de mi madre y la mía. A todas las personas quienes confiaron en mí y apoyaron mis proyectos; a mi tía Esperanza C., mi abuela Honorata P., mi tío Jaime A., mi compañero de vida Gerald G. y demás familiares. A todos ellos muchas gracias.

Carol

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio. A mis familiares, a mi hermana Leila por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles; a mi madre Ana Isabel, a mi padre Juan, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. A mis amigos que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Verito Yanamango, Jeimo Bazán, Mabo López, Jenrro Avalos, Momo Morales y Ricardo Antonio, por haberme ayudado a realizar este trabajo; gracias a ustedes.

Kimy

AGRADECIMIENTO

Agradecer primeramente a Dios por la vida, salud, fuerzas y vitalidad que nos brinda día a día, para no desfallecer ante cualquier adversidad y continuar con nuestros proyectos.

Así también de manera muy especial a todas y cada una de las personas que colaboraron con nosotras para la realización de este trabajo: a nuestros familiares, docentes quienes a través de sus enseñanzas nos han permitido crecer intelectualmente y contribuido a nuestra vida profesional; al Ms Williams Castillo Martínez por el apoyo en uso de los programas estadísticos.

Al Dr. Augusto Castillo Calderón por el apoyo en todo momento, a través de su asesoría, consejos, sugerencias, comentarios, direccionándonos hacia el objetivo final de nuestro trabajo; agradecemos su confianza y dedicación profesional.

A los técnicos de laboratorio de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, los ingenieros Lennin Ambrocio, Jhon Gonzales y Berenice Córdova por facilitarnos los diferentes ambientes en cada uno de los laboratorios requeridos y el soporte para llevar a cabo nuestro trabajo de investigación, además de la orientación y motivación brindado. Así como a la bibliotecaria Silvia, por apoyarnos con el material de información requerida.

Carol y Kimy

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCION	18
II.	MARCO TEORICO	20
2.1.	Antecedentes.....	20
2.2.	Caña de azúcar y jugo de caña.....	22
2.2.1.	Definición:.....	22
2.2.2.	Composición química de la caña de azúcar y el jugo de caña de azúcar.	23
2.2.3.	Características físico-química de la caña de azúcar y el jugo de caña de azúcar.	24
2.2.4.	Problemática en las industrias azucareras.	26
2.3.	Dextrano.....	28
2.3.1.	Breve concepto	28
2.3.2.	Composición química.....	29
2.3.3.	Reacciones que intervienen en la formación de dextrano	30
2.3.4.	Síntesis del dextrano.....	31
2.4.	Hidrólisis enzimática.	36
2.4.1.	Actividad enzimática.	37
2.4.2.	Concentración de proteínas.	39
2.4.3.	Parámetros cinéticos (cinética de Michaelis-Menten).....	40
2.5.	Dextranasa.	41
2.5.1.	Origen.....	41
2.5.2.	Producción.....	43
2.5.3.	Mecanismo de acción	44
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1.	Lugar de ejecución.....	50
3.2.	Materiales.....	50
3.2.1.	Materia prima.	50
3.2.2.	Enzima.....	50
3.2.3.	Dextrano.	51
3.2.4.	Reactivos.	51
3.2.5.	Materiales de vidrio y otros.....	52
3.2.6.	Equipos e instrumentos.....	53

3.2.7.	Equipos y software para procedimiento de datos.	53
3.3.	Metodología y Procedimiento experimental.....	54
3.3.1.	Descripción de cada etapa del diagrama de flujo:	54
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	70
4.1.	Caracterización de la enzima.	70
4.1.1.	Determinación de proteínas, rango de linealidad y Actividad enzimática de la enzima comercial Dextranfree.....	70
4.1.2.	Determinación de parámetros cinéticos.....	73
4.2.	Hidrolisis enzimática del simulado de caña.....	74
4.2.1.	Obtención del simulado y su caracterización.	74
4.2.2.	Optimización de hidrólisis enzimática de dextrano utilizando el DCCR en el medio simulado.	75
4.2.3.	Concentración de azúcares reductores después del proceso de hidrolisis del dextrano.....	98
4.3.	Validación de resultados. Hidrolisis enzimática en jugo de caña de azúcar..	104
4.3.1.	Obtención del jugo de caña de azúcar y caracterización fisicoquímica proximal del jugo de caña de azúcar.	104
4.3.2.	Hidrolisis enzimático de dextrana del jugo de caña con la dextranasa Dextranfree, bajo condiciones ambientales óptimas.	105
4.3.3.	Caracterización fisicoquímica proximal del jugo de caña de azúcar luego de ser hidrolizado.	105
V.	CONCLUSIONES	107
VI.	RECOMENDACIONES	108
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
VIII.	ANEXOS	114

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: COMPOSICIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR EN 100G.	24
TABLA 2: ESPECIES MICROBIOLÓGICAS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	27
TABLA 3: TIPOS DE HOMOPOLISACARIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS SE ÁCIDO LÁCTICO	29
TABLA 4: COMPOSICIÓN DE DEXTRANOS PRODUCIDAS POR ENZIMAS PROCEDENTES DE DIVERSOS MICROORGANISMOS.	32
TABLA 5: VALORES ÓPTIMOS DE PH Y LA TEMPERATURA DE DEXTRANASAS SINTETIZADAS POR DIFERENTES MICROORGANISMOS ...	45
TABLA 6: LIBERACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DE VARIOS DEXTRANOS POR LAS DEXTRANASAS	46
TABLA 7: RENDIMIENTOS RELATIVOS DE GLUCOSA, ISOMALTOSA E ISOMALTOTRIOS A PARTIR DE ISOMALTODEXTRINAS Y DEXTRANO EN HIDRÓLISIS CON DEXTRANASAS	48
TABLA 8: VARIABLES INDEPENDIENTES DEL ESTUDIO.....	65
TABLA 9: DISEÑO EXPERIMENTAL DCCR PARA EL HIDRÓLISIS DE DEXTRANO POR ACCIÓN DE LAS ENZIMA COMERCIAL DEXTRAFREE.....	65
TABLA 10: CARACTERÍSTICAS DEL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA.....	75
TABLA 11: VALORES DE VARIABLES INDEPENDIENTES A DIFERENTES NIVELES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN DCCR.....	75
TABLA 12: MATRIZ DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL PARA LAS VARIABLES INDEPENDIENTES EN SU FORMA CODIFICADA Y NATURAL.	76
TABLA 13: PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN CADA CONDICIÓN DE LA MATRIZ EXPERIMENTAL	77
TABLA 14: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL MODELO DE SEGUNDO ORDEN DE LA RESPUESTA %REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN EL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA; HIDROLIZADO CON LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE.	80
TABLA 15:ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL MODELO REDUCIDO DE SEGUNDO ORDEN DE LA RESPUESTA DE PORCENTAJE DE REDUCCIÓN	

DE DEXTRANO EN SIMULADO DE JUGO DE CAÑA, UTILIZANDO LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE.....	83
TABLA 16: SIGNIFICANCIA DE CADA COEFICIENTE CODIFICADO (FACTOR REAL)	84
TABLA 17: VALORES ÓPTIMOS DETERMINADOS A PARTIR DEL MODELO MATEMÁTICO EXPERIMENTAL, %REDUCCIÓN DE DEXTRANO, AJUSTADO PARA LAS EXPERIENCIAS DE VALIDACIÓN.	85
TABLA 18: VALORES DE VARIABLES INDEPENDIENTES A DIFERENTES NIVELES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN DCCR.....	98
TABLA 19: MATRIZ DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL PARA LAS VARIABLES INDEPENDIENTES EN SU FORMA CODIFICADA Y NATURAL. MOSTRANDO EL NIVEL DE CONCENTRACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES EN EL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA DESPUÉS DE LA HIDROLISIS.....	99
TABLA 20.PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO Y PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE AZUCARES REDUCTORES.	102
TABLA 21: CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR.....	104
TABLA 22: CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL JUGO DE CAÑA HIDROLIZADO.....	105
TABLA 23: VALORES DE ABSORBANCIA PARA DIFERENTES DILUCIONES DE GLUCOSA	114
TABLA 24: PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE DEXTRANA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	115
TABLA 25: CONSTANTE DE VISCOSÍMETRO CANNON- FENSKE.....	117

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1: ESTRUCTURA GENERAL DE LOS DEXTRANOS DE CLASE 1 CONSISTENTES EN UNA CADENA PRINCIPAL LINEAL DE REPETICIÓN DE D-GLUCOPIRANOSILO CON ENLACES A (1 → 6) UNIDADES. EL DEXTRANO PUEDE TENER RAMAS DE CADENAS MÁS PEQUEÑAS DE D-GLUCOSA UNIDAS A LA CADENA PRINCIPAL POR A (1 → 2) -, A (1 → 3) - O A (1 → 4) - ENLACES GLICOSÍDICOS. 35
- FIGURA 2: SÍNTESIS GENERAL DE LA DEXTRANO A PARTIR DE LA SACAROSA..... 36
- FIGURA 3: PERFIL DE RANGO DE LINEALIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMAS CON SUSTRATO CONSTANTE. 38
- FIGURA 4: PERFIL APROPIADA DE CONCENTRACIÓN DE ENZIMA ÓPTIMO 39
- FIGURA 5. ACCIÓN DE LA DEXTRANASA EN LA DEXTRANO, ISOMALTODEXTRINAS Y ISOMALTODEXTRINAS MODIFICADAS ___, A – 1-6 ENLACE; ..., A-ENLACE; G, UNIDAD DE GLUCOSIL; R, GLUCOSA, FRUCTOSA, SORBITOL O GRUPO METIL; - - - , PUNTOS PRINCIPALES DE HIDROLISIS..... 47
- FIGURA 6. MODE OF ENDOHYDROLYSIS ACTION OF DEXTRANASE (1→6) GLYCOSIDE LINKAGES IN RANDOM SITES OF HMW DEXTRAN. DOTS AND CONNECTING LINES REPRESENT CHAINS OF GLUCOSE MOLECULES LINKED BY -(1→6) BONDS IN THE DEXTRAN MOLECULE. REACTION TIME IS NOT REPRESENTED. * IN DEXTRANASE APPLICATION IN THE SUGAR INDUSTRY, GLUCOSE AS THE END PRODUCT RARELY OR NEVER OCCURS. FROM EGGLESTON ET AL. (2007) 47
- FIGURA 7: UN DIAGRAMA DEL CONTACTO ENTRE DEXTRANO (SUSTRATO) Y DEXTRANASA (ENZIMA) EN SOLUCIONES DE TRABAJO DE FÁBRICA DE DEXTRANASA "CONCENTRADA". LAS SOLUCIONES DE TRABAJO REPRESENTAN LA MISMA CONCENTRACIÓN DE PPM DE MOLÉCULAS DE ENZIMA (MOSTRADAS COMO CUADRADOS), PERO VOLÚMENES MÁS GRANDES (REPRESENTADOS POR CÍRCULOS) PARA MEJORAR EL CONTACTO. LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO DE DEXTRANASAS "CONCENTRADAS" ES MUCHO MÁS RENTABLE QUE LA ADICIÓN DE DEXTRANASAS "NO CONCENTRADAS" DIRECTAMENTE. 49
- FIGURA 8. DIAGRAM TO ILLUSTRATE THE CONTACT BETWEEN DEXTRANASE AND DIFFERENT CONCENTRATIONS OF DEXTRAN. CIRCLES

DEPICT VOLUMES AND SQUARES DEPICT ENZYME MOLECULES. THE ACTION OF A WORKING SOLUTION OF “CONCENTRATED” DEXTRANASE (>25,000 – 58,000 DU/ML) TO IMPROVE CONTACT IN FACTORYPROCESS IS ALSO SHOWN. MODIFIED FROM EGGLESTON ET AL. (2006).....	49
FIGURA 9: CAÑA DE AZÚCAR QUEMADA. VARIEDAD MÉXICO 73.....	50
FIGURA 10. MUESTRA DE ENZIMA COMERCIAL DEXTRANFREE.....	51
FIGURA 11. PRIMERA ETAPA DEL PROCESO DE HIDROLISIS DE DEXTRANO (HIDROLISIS AL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR).....	54
FIGURA 12: VELOCIDAD DE REACCIÓN FRENTE CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO (V VS. [S]).....	57
FIGURA 13: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA.....	58
FIGURA 14 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FRENTE AL AUMENTO DE TEMPERATURA.....	58
FIGURA 15. GRÁFICA DE LINEWEAVER – BURK PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	59
FIGURA 16: SIMULADO DE JUGO DE CAÑA ELABORADO	61
FIGURA 17: SEGUNDA ETAPA DEL PROCESO DE HIDROLISIS DE DEXTRANO (HIDROLISIS DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR	66
FIGURA 18: PERFILES DE RANGO DE LINEALIDAD (DILUCIONES 1:2, 1:4, 1:5 Y 1:10 ACTUANDO SOBRE LA DEXTRANO).	70
FIGURA 19. EFECTO DE CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO (DEXTRANO) EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	73
FIGURA 20. GRÁFICA DE LINEWEAVER –BURK PARA DETERMINACIÓN DE PARÂMETROS CINÉTICOS	74
FIGURA 21. GRÁFICO DE PARETO DE LOS FACTORES Y SUS EFECTOS ESTANDARIZADOS PARA EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN EL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA (%). EN EL HIDROLIZADO EN EL CUAL SE UTILIZÓ LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE. LAS VARIABLES INDEPENDIENTES FUERON CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA (PPM), TIEMPO DE REACCIÓN (MIN) Y TEMPERATURA DE REACCIÓN (°C).....	79
FIGURA 22. GRÁFICO DE PARETO DE LOS VALORES DE LOS EFECTOS ESTANDARIZADOS PARA EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO	

EN EL SIMULADO DE JUGO DE CAÑA (%); EN EL HIDROLIZADO EN EL QUE SE UTILIZÓ LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE. LAS VARIABLES INDEPENDIENTES FUERON CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA (PPM), TIEMPO DE REACCIÓN (MIN) Y TEMPERATURA DE REACCIÓN (°C).....	83
FIGURA 23. PLANOS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA Y CONTORNO PARA OPTIMIZAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA REALIZADO CON LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE; TOMANDO COMO EJES DOS DE SUS FACTORES, CONCENTRACIÓN DE ENZIMA (Y), TIEMPO DE REACCIÓN (X).	87
FIGURA 24: CONTORNO DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA DEXTRANO.	89
FIGURA 25: PLANOS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA Y CONTORNO PARA OPTIMIZAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA REALIZADO CON LA ENZIMA COMERCIAL DEXTRAN FREE; TOMANDO COMO EJES DOS DE SUS FACTORES, TEMPERATURA DE REACCIÓN (Y), TIEMPO DE REACCIÓN (X).	91
FIGURA 26: CONTORNO DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA DEXTRANO.	92
FIGURA 27. SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA OPTIMIZAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO EN EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA; TOMANDO COMO EJES DOS DE SUS FACTORES, CONCENTRACIÓN DE ENZIMA (Y), TIEMPO DE REACCIÓN (X).	94
FIGURA 28: CONTORNO DE SUPERFICIE RESPUESTA PARA EL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA DEXTRANO.	96
FIGURA 29: CURVA DE CALIBRADO DE GLUCOSA	114
FIGURA 30: CURVA DE CALIBRADO DE DEXTRANA	116
FIGURA 31: CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL	121
FIGURA 32: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL SIMULADO DE CAÑA	121
FIGURA 33: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	122
FIGURA 34: MEDICIÓN DE °POL DEL JUGO DE CALA DE AZÚCAR.....	122
FIGURA 35: MEDICIÓN DE °BRIX.....	122

FIGURA 36: FILTRADO AL VACÍO DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR.....	123
FIGURA 37: HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR.	123
FIGURA 38: AGREGADO DE ETANOL ABSOLUTO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEXTRANA.....	124
FIGURA 39: MEDICIÓN DE DEXTRANA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO	124

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA AZÚCARES REDUCTORES.....	114
ANEXO 2 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA DEXTRANA:	115
ANEXO 3: VISCOSIMETRO CAPILAR	117
ANEXO 4: BOLETIN TECNICO DEXTRANFREE.....	118
ANEXO 5: DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	121

RESUMEN

Uno de los problemas en las agroindustrias azucareras para la producción de azúcar son los dextranos. Existen métodos físicos conocidos eficientes para controlarlos, sin embargo su complejidad y las condiciones de operación en la Industria azucarera han dificultado su empleo. Existe otra manera de poder combatirlos, mediante la hidrólisis enzimática. Por lo que, el presente trabajo tuvo como objetivo general estudiar las condiciones ambientales óptimas de la hidrólisis enzimática del dextrano en jugo de caña de azúcar.

Se realizó la caracterización enzimática de la dextranasa comercial Dextranfree, en la que se determinó la concentración de proteínas, la actividad específica y sus parámetros cinéticos. Luego se procedió con la hidrólisis enzimática. El desarrollo experimental, fue realizado con un diseño Compuesto Central Rotacional, evaluando el efecto de 3 variables; concentración de enzima, tiempo y temperatura, sobre el porcentaje de reducción de dextrano en la muestra. Esto se realizó empleando un simulado de jugo de caña de azúcar preparado. Conseguido las condiciones óptimas de hidrólisis, se aplicó en la hidrólisis del jugo de caña de azúcar.

El contenido de proteínas de la dextranasa comercial Dextranfree fue 89.41mg/L, la actividad enzimática de 4253.96 UD/mg y sus parámetros cinéticos, V_{max} 0.006 g/L min, K_{max} 0.213 g/L. Las condiciones ambientales óptimas de hidrólisis de la dextrano del simulado de jugo de caña fueron: concentración de enzima de 224 ppm, un tiempo de 32 minutos y una temperatura de reacción de 46 °C, dándose un 70% de reducción de dextrana. Aplicado las condiciones óptimas en la hidrólisis enzimática de dextrano del jugo de caña se redujo en 69% la concentración de dextrano contenida.

Palabras Claves: Dextrana, Dextranasa, Hidrólisis enzimática, Jugo de Caña de azúcar.

ABSTRACT

One of the problems in the sugar agroindustries for the production of sugar are the dextrans. There are known physical methods efficient to control them, however their complexity and the operating conditions in the sugar industry have made their use difficult. There is another way to combat them, by enzymatic hydrolysis. Therefore, the present work had as general objective to study the optimal environmental conditions of the enzymatic hydrolysis of dextran in sugar cane juice.

The enzymatic characterization of the commercial dextranase Dextranfree was carried out, in which the protein concentration, the specific activity and its kinetic parameters were determined. Then we proceeded with the enzymatic hydrolysis. The experimental development was carried out with a Rotational Central Composite design, evaluating the effect of 3 variables; enzyme concentration, time and temperature, on the percentage of dextran reduction in the sample. This was done using a simulated sugarcane juice prepared. Achieved optimal hydrolysis conditions, was applied in the hydrolysis of sugarcane juice.

The protein content of the commercial dextranase Dextranfree was 89.41 mg/L, the enzymatic activity of 4253.96 UD/mg and its kinetic parameters, V_{max} 0.006 g/L min, K_{max} 0.213 g/L. The optimum environmental conditions for hydrolysis of the dextran from the simulated cane juice were: enzyme concentration of 224 ppm, a time of 32 minutes and a reaction temperature of 46°C, giving a 70% reduction of dextran. Applied the optimal conditions in the dextran enzymatic hydrolysis of cane juice, the contained dextran concentration was reduced by 69%.

Key words: Dextrana, Dextranase, enzymatic hydrolysis, sugarcane juice.

I. INTRODUCCION

Las dextranas, son compuestos producido por microorganismos contaminantes (como el *Leuconostoc mesenteroides*) a partir de la sacarosa, que causan problemas tanto en el jugo como en el azúcar, siendo el principal, la pérdida de sacarosa. Mucho indica que, las pérdidas económicas ocasionadas por las dextranas son continuas a lo largo de la producción de azúcar, ya que el valor de la cantidad de azúcar calculada es incrementada de manera falsa, alterando los indicadores productivos de la fábrica; además incrementan la viscosidad en los flujos y los tiempos de proceso, siendo también perjudiciales (Verde y Quiroz, 2014).

Existen métodos físicos conocidos o puestos en práctica para tratar la dextrana, sin embargo su complejidad y las condiciones de operación en la Industria azucarera han dificultado y encarecido su empleo; por tanto quedando como la opción más recomendada la Hidrólisis enzimática de los dextranos mediante la enzima Dextranasa (alfa- D-1.6-glucano-6-glucanohidrolasa), ya que es específica para romper los enlaces alfa-1.6 formando moléculas de oligosacáridos de menor tamaño (Verde y Quiroz, 2014).

Es importante combatir el problema del dextrano ante de realizar los procesos de obtención de azúcar. En la molienda es donde los dextranos se reproducen a gran escala, aumentando la degradación de la sacarosa y formando gomas que se pegan alrededor de la superficie de los molinos. Por ende, se pretende que los ingenios azucareros puedan implementar la hidrolisis de dextrano. Sin embargo, es importante conocer las condiciones ambientales óptimas de la hidrolisis enzimática de dextranos del jugo de caña, para poder realizar este proceso de manera eficaz. Existen estudios antiguos empleado la hidrolisis enzimática de dextrano como opción para combatirlos como el caso de Eggleston & Mongeb (2005), en los Estados Unidos, que empleó dextranasas de

origen *Chaetomium Gracile* y *Chaetomium Erraticum*, además que definió que, las aplicaciones en el jugo son más eficientes y económicas que añadiéndolos a los jarabes. Para realizar la hidrólisis enzimática como opción de disminución de dextrano es conveniente ejecutar un estudio de los factores que afectan a la actividad de la enzima (pH, temperatura, tiempo de reacción y concentración de enzima).

En el Perú aún no se realizan muchos estudios sobre el empleo de hidrólisis enzimático de dextrano. Teniendo un estudio de este, podría emplearse condiciones ambientales óptimas para así reducir la concentración de dextranos en el jugo de caña de manera eficaz. Por ello, el objetivo general del presente estudio es determinar las condiciones ambientales óptimas de la hidrólisis enzimática de dextranos del jugo de caña para la elaboración de azúcar. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinar la actividad enzimática de la dextranasa comercial Dextranfree y los parámetros cinéticos.
- Determinar las condiciones ambientales óptimas de la dextranasa en la hidrólisis de dextranos de un medio simulado de jugo de caña, según el diseño experimental de optimización DCCR.
- Caracterizar de manera físicoquímicamente el jugo de caña de azúcar (°Brix, viscosidad, pH, porcentaje de pol, azúcares reductores, dextranos).
- Realizar la hidrólisis enzimática de dextrana del jugo de caña con la dextranasa Dextranfree, bajo condiciones ambientales óptimas (Temperatura, Tiempo de reacción, concentración).
- Evaluar las características físicoquímicas del jugo de caña de azúcar tratado (°Brix, viscosidad, pH, porcentaje de pol, azúcares reductores, dextranos).
- Comparar los resultados de la hidrólisis enzimática del simulado de jugo de caña con el jugo de caña de azúcar.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes.

Desde el siglo pasado las industrias de rubro azucarero, ha sido afectada por la formación de gomas (dextranos) durante la producción de sacarosa a partir del jugo extraído de la caña de azúcar, este problema no solo ocasiona pérdidas en el azúcar, esto también puede ocasionar problemas de obstrucción (taponear) de las bombas y la tuberías, un aumento en la viscosidad la solución (jugo de caña de azúcar) y por otro lado ocasiona la modificación en la estructura o forma de cristales de sacarosa. Una de las principales causas de este fenómeno, es la capacidad de sintetizar, desde la sacarosa, polímeros extracelulares, con la presencia de microorganismos (Vega. et al, 2012).

Las dextranos han sido reconocidas desde hace mucho tiempo como los contaminantes que en el procesamiento del azúcar y otros alimentos. La formación de esta goma fue demostrada por Pasteur debido a la actividad de los microbios en 1861. (Loloya y Díaz, 2013).

En 1874 Scheibler denominó la sustancia responsable del aumento de la viscosidad en los jugos de caña de azúcar y de remolacha como dextrano, que demostró ser una molécula de carbohidrato de fórmula ($C_6H_{10}O_6$) y tener una rotación óptica positiva. Sin embargo, en 1861 Pasteur ya había visto que el aumento de la viscosidad y la gelificación de los jarabes de caña de azúcar se produjeron debido a la acción de un microorganismo. Más tarde, el linaje *Leuconostoc mesenteroides*, responsable de la producción dextrano, fue aislada e identificada. (Zuker, 2017).

En 1876 Durin completo la definición al plantear que las unidades de glucosa se encuentran unidas fundamentalmente por enlaces ($\alpha 1-6$). El microbiólogo de origen ruso Cienkowski nombro como *Leuconostoc mesenteroides* a las bacterias sintetizadoras de

dextranos y fue Jam Tieghem quien mostro que las responsables de la síntesis eran las enzimas liberadas al actuar sobre la sacarosa. En los comienzos del siglo XX se completaron los conocimientos básicos sobre la síntesis de la dextrano. En la década del 30 Pedersony Hucker, lograron clasificar dos especies de microorganismos capaces de sintetizar dextranos, ambos del género *Leuconostoc*: *L. mesentemides* y *L. dextmnicum*. Más tarde, las investigaciones químicas y microbiológicas mostraron que las propiedades de la dextrano pueden variar en dependencia de las condiciones en que se produzca y convertir las desventajas que provoca en el azúcar en propiedad favorable para otras industrias. Por algunos años se comenzaron los estudios sobre las estructuras del polímero y se desarrolló un intenso trabajo en la síntesis enzimática, lográndose controlar las condiciones en que se producen dextranos de bajos pesos moleculares. (Florez, 2014).

Los problemas de alta viscosidad, cristalización demorada y cristales alargados se le atribuían al polisacárido dextrano producido, fundamentalmente, por el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*. Cuando se detecta la presencia de dextrano en el jugo lo más fácil es tratarlo con desinfectantes de relativo bajo costo (medios químicos); cuando el problema de la dextrano no se resuelve con el uso de desinfectantes y la presencia de dextrano eleva en demasía la viscosidad del jugo de caña se utiliza un agente tensoactivo de costo de nivel medio, estos agentes se aplican en los cristalizadores, tachos y las centrifugas dependiendo del comportamiento operativo del proceso mismo. Y por último si el problema de dextrano no se resuelve con estas dos opciones anteriores, es necesario eliminar la dextrano antes de la cocción, para lo cual se le adiciona una enzima Dextranasa.

2.2. Caña de azúcar y jugo de caña

2.2.1. Definición:

La caña de azúcar es uno de los cultivos con grandes producciones en el mundo, la cual crece principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Proporcionando como cosecha el 80% del azúcar del mundo (Largo et al., 2013).

La caña de azúcar pertenece a la familia de las gramíneas y el género *Saccharum*, en el cual existen seis especies: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule* y *S. officinarum*; existen clones las cuales son derivados de las combinaciones entre las seis especies anteriores mencionadas, predominando las características de *S. officinarum* como productora de azúcar (Cobeña y Loor, 2016), que es la mayormente utilizada en el Perú. Tiene una vida útil de 8 a 12 años (Godoy y Garzón, 2015). Estas pueden llegar a crecer entre 3 y 5 metros de altura; y contienen una gran cantidad de sacarosa, por ello su importancia en la obtención de azúcar (Loyola y Díaz, 2013).

En la producción de azúcar, la caña de azúcar llega a la fábrica, se descarga sobre las mesas de recepción y luego es picado y desfibrado, para ingresar posteriormente al tándem de molinos, donde se realiza la extracción del jugo y siendo la primera e importante etapa de la obtención de sacarosa. El jugo se vierte en la batea y así sucesivamente hasta que la caña es despojada de todo o casi todo el jugo que contiene, quedando como residuo solamente la parte fibrosa de la misma.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) a lo largo del tiempo ha sido muy empleada por la alta concentración de carbohidratos (75 a 92%) en el jugo extraído de ella por esta misma razón es la más empleada en la industria azucarera (Estrada et

al., 2013). El jugo de caña de azúcar tiene de 16 a 20% de materia seca y está constituido principalmente por sacarosa y azúcares reductores como la glucosa y fructuosa, su contenido de proteína es despreciable (Sarria et al. citado en Cobeña y Loor, 2016).

2.2.2. Composición química de la caña de azúcar y el jugo de caña de azúcar.

La caña de azúcar está constituida principalmente por Jugo y Fibra, siendo la Fibra la parte insoluble en agua formada por Celulosa, y estas están compuestas de azúcares simples como la Glucosa (Loyola y Díaz, 2013), Los sólidos solubles en agua son expresados como porcentaje y representados por la Sacarosa, (Larrahondo citado en Cobeña y Loor, 2016).

El jugo de caña está compuesto por azúcares y agua. La sacarosa es el principal azúcar, seguido en menor concentración la glucosa, fructosa y los oligosacáridos. Los no azúcares son sales de ácidos orgánicos e inorgánicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas, polisacáridos solubles, almidón, ceras y grasa y otros compuestos minoritarios, tales como flavonoides, polifenoles, entre otros (Loyola y Díaz, 2013)

Tabla 1: composición de caña de azúcar en 100g.

COMPONENTES DE CAÑA DE AZÚCAR	(%)		(%)
Agua	74.50		74.50
		SiO ₂	0.25
		K ₂ O	0.12
		Na ₂ O	0.01
		CaO	0.02
Cenizas	0.50	MgO	0.01
		Fe ₂ O ₃	Vestigios
		P ₂ O ₅	0.07
		SO ₃	0.02
		Cl	Vestigios
		Celulosa	5.50
Fibra	10.00	Pentosa Xylan	2.00
		Goma (Araban)	0.50
		Lignina, etc.	2.0
		Sacarosa	12.5
Azúcares	14.0	Dextrosa	0.9
		Nebulosa	0.6
Grasa y Cera	0.20		0.20
Peptina (gomas)	0.20		0.20
Ácidos libres	0.08		0.08
Ácidos combinados	0.12		0.12

Fuente: Loyola y Díaz (2013)

2.2.3. Características físico-química de la caña de azúcar y el jugo de caña de azúcar.

Entre los jugos que salen de cada uno de los molinos existen diferencias debido a las diferentes presiones y grados de saturación empleados. Se da el caso que a medida que se dan las compresiones, ocurren disminuciones de °Brix, de la polarización y la pureza, con el consiguiente aumento en los azúcares orgánicos e inorgánicos. Por tanto, el jugo del rodillo bagacero es de °Brix y pureza mayor que el de cañero, porque este extrae el agua superficial de imbibición del exterior de las partículas de

bagazo, mientras que el bagacero extrae parte del jugo que contiene las células internas (Spencer citado por Chumioque y Flores, 2016).

Los °BRIX, pol% jugo y pureza son indicadores de calidad del jugo de caña en la industria azucarera (Zossi et al., 2010). Los azúcares reductores y otros componentes, comúnmente se les conoce también como Brix, la relación entre el contenido de Sacarosa presente en el jugo y el Brix se denomina Pureza del Jugo. El contenido “Aparente” de Sacarosa, expresado como un % en peso y determinado por polarimetría, se conoce como “Pol”. Los Sólidos Solubles diferentes de la Sacarosa, que contempla los Azúcares Reductores como la Glucosa y la Fructuosa y otras sustancias orgánicas e inorgánicas, se denominan usualmente “No Pol” o “No Sacarosa”, los cuales corresponden porcentualmente a la diferencia entre °BRIX y Polarimetría (Cobeña y Loor, 2016).

- **Grados Brix.**

Los °Brix determinan la concentración de sólidos solubles en una solución de sacarosa, basándose en una relación entre los índices refractivos a 20°C y el porcentaje de masa total de sólidos solubles de una solución acuosa de sacarosa pura. (Laboratory Manual for South Africa Sugar Factories citado en Cobeña y Loor, 2016).

- **pH y acidez.**

La caña de azúcar por lo general tiene un pH neutro en su estado natural, pero una vez extraído no siempre conserva esa neutralidad, en el jugo de la planta madura normal de caña de azúcar varía su pH entre 4,73 y 5,63, pero el valor corriente oscila entre 5,2 y 5,4. Por lo general, la caña dañada posee un jugo con valores muy bajos de pH (Cobeña y Loor, 2016).

- **Pol.**

La medición de dicha característica se realiza por un aparato llamado polarímetro; La cual es el resultado de los azúcares simple y sacarosa. Sin embargo por el haz de luz respecto a la rotación se puede definir el azúcar medido (Cobeña y Loor, 2016).

- **Pureza.**

La relación de la lectura del polarímetro (Pol) con el ° Brix permite determinar la pureza de una solución en términos de sacarosa (Cobeña y Loor, 2016).

- **Azúcares reductores.**

Se refiere a otros azúcares (fructosa y glucosa) presentes en el jugo. Un menor nivel de azúcares reductores indica que la mayoría de ellos han sido convertidos en sacarosa. El jugo de caña de azúcar debe tener un mínimo de azúcares totales de 75% (expresados como sacarosa), así como un nivel máximo del 10% para azúcares reductores, ya que reduce los cambios reológicos y favorece la granulometría. Los azúcares reductores mayormente formados por la inversión de sacarosa (Cobeña y Loor, 2016).

2.2.4. Problemática en las industrias azucareras.

El principal problema de las industrias es cuando se obtiene bajos rendimientos de sacarosa, esto ocasionado principalmente por el deterioro que sufre la materia prima y que se manifiesta en la calidad. El deterioro inicia casi inmediatamente después del corte, aumentando conforme el tiempo de permanencia en los patios del molino o en el campo sea mayor.

Es así que, desde el momento que se corta la caña hasta que se clarifica el jugo extraído a altas temperaturas, la sacarosa está expuesta a la acción enzimática de una multitud de microorganismos presentes en la caña, esto se dan favorecidos por

factores como las operaciones de quema, corte, condiciones de temperatura, alta humedad y tiempos entre corte y molienda (Loyola y Díaz, 2013).

Tabla 2: Especies microbiológicas de la caña de azúcar

ORGANISMO	PRODUCTO	INVESTIGADOR
Leuconostoc mesenteroides	Dextrano	Cienkowski, Van Thiegham
Leuconostoc dextranicum	Dextrano	Zettnow
Bacillus Subtilis	Levana	Beijerinck
Bacillus mesentericus	Levana	Owen
Bacillus vulgatus	Levana	Owen
Bacillus Levaniformans	Levana	Greig-Smith y Steel

Fuente: Honig (1960) citado en Cobeña y Loor (2016)

Las poblaciones microbiológicas que degradan la sacarosa y los azúcares reductores presentes en el jugo determinan las características físico/químicas de los mismo e influyen en el desarrollo posterior del proceso de extracción.

La operación del quemado para eliminar las hojas pueden aumentar la temperatura del tallo 55 – 85 °C. Estas temperaturas no destruyen aparentemente, muchas bacterias sensibles al calor. El Leuconostoc mesenteroide ha sido detectado en las cañas aproximadamente con la misma frecuencia antes y después del quemado, además, este microorganismo aumenta considerablemente a medida que pasa el tiempo tras la operación de quemado (Silliker et al. citado en Chumioque y Flores, 2016).

Como se indica en el cuadro 2 el Leuconostoc mesenteroides es el principal productor de dextrano, ya que su formación ocurre por la acción de la enzima dextranasacarasa que hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Junto con el jugo, estas dextranas se extraen en los molinos y contaminan los flujos del central, y su nivel en el jugo llega a exceder las 10 000 ppm (1%) en los casos extremos pasando por las pérdidas que

se producen en la cristalización, y el enriquecimiento de las melazas con sacarosa (Loyola y Díaz, 2013).

El jugo mixto es un medio ideal para el crecimiento de muchos microorganismos, si bien solo unos cuantos lo logran con éxito. El jugo tiene un grado Brix de 10 a 18, un pH de 5 a 5.6, abundantes sales orgánicas e inorgánicas, aminoácidos y otros nutrientes y una temperatura media entre 25 y 30 °C (Loyola y Díaz, 2013).

Las pérdidas de sacarosa se producen desde el momento mismo en que ésta empieza a desdoblarse en sus monómeros, glucosa y fructosa, pasando por las pérdidas que se producen en la cristalización, y el enriquecimiento de las melazas con sacarosa. Además de la pérdida de sacarosa a consecuencia de la formación de dextranas, estos polímeros incrementan la viscosidad de los jugos, creando problemas en los evaporadores y tachos. Adicionalmente las dextranas causan elongación en los cristales de azúcar a lo largo del eje “c”, lo cual se denomina técnicamente como cristal aguja, incrementando las pérdidas de la sacarosa en forma de mieles y aguas de lavado (Loyola y Díaz, 2013).

2.3. Dextrano

2.3.1. Breve concepto

La familia del *Leuconostoc mesenteroides* que recibe mayor atención y ha sido utilizada para la producción de dextrano comercialmente es la NRRL B512F. El microorganismo excreta Dextranasacarase en medio de cultivo que contiene sacarosa, usando este sustrato para la producción de la dextrano por la transferencia de las moléculas de glucosa para el sitio receptor del polímero y liberando simultáneamente moléculas de fructosa. (Castellano y Peraza, 2015).

Una enzima de gran aplicabilidad es la Dextranasacarasa, la cual está vinculada a formación de un polímero de origen microbiano. Se promueve la conversión del sustrato en un biopolímero denominado dextrano, bajo determinadas condiciones de temperatura y pH, que son factores considerados extremadamente importantes en la síntesis enzimática. (Valero, Ortegón y Uscategui, 2013).

2.3.2. Composición química

Los Homopolisacaridos más ampliamente producidos son los α -D-glucanos y han sido descritos en los géneros Lactobacillus, Leuconostoc, Oenococcus, Streptococcus y Weissella. Los dextranos son homopolisacaridos de elevada masa molecular que presentan un 50 % de enlaces α -(1,6) en su cadena principal y diferentes tipos de ramificaciones, principalmente α -(1,3), pero también α -(1,2) o α -(1,4) en función de la cepa como se observa en el Cuadro 3 (Nácher, 2015).

Tabla 3: Tipos de homopolisacaridos producidos por Bacterias se ácido láctico

α - Glucanos			
Nombre	Enlace principal	Ramificaciones	Especies de BAL productoras
Glucano	α - (1,2)		Lc. Mesenteroides; Streptococcus salivarius; Streptococcus sobrinus
Mutano	α - (1,3)		Lactobacillus reuteri; Lc. mesenteroides; Streptococcus downei; Streptococcus mutans; S. salivarius; S. sobrinus
Reuterano	α - (1,4)		Lb. Reuteri Lactobacillus animalis; Lactobacillus curvatus; Lactobacillus fermentum;
Dextrano	α - (1,6)	α - (1,2) α - (1,3) α - (1,4)	Lactobacillus hilgai; Lactobacillus parabuchneri; Lb. reuteri; Lb. sakei; Lc. mesenteroides ; S. downei; Streptococcus gordonii; S. mutans; S. salivarius; S. sobrinus
Alterano	α - (1,6), α - (1,3)		Lc. Mesenteroides

Fuente: Nácher, 2015.

La dextransacarasa actúa transfiriendo el grupo glucosil del donante, la sacarosa, al sentido, la cadena de dextrano en formación. Es una de las pocas enzimas que no requiere la presencia de cofactores o intermediarios fosforilados de alta energía, pues la energía requerida para la condensación de las dos unidades glicosil es suministrada por la hidrólisis de la sacarosa.

Varios factores pueden influir en la producción de la enzima Dextransacarasa, como por ejemplo, la temperatura, pH, concentración de sacarosa, actividad y estabilidad enzimática (Alves, 2013).

2.3.4. Síntesis del dextrano.

La producción del dextrano se da generalmente en cultivos de bacterias de origen láctico este caso podrían ser como el *Streptococcus*, *Acetobacter* o *Leuconostoc*, en medios donde se encuentra incluida la sacarosa. Una enzima inducible llamada dextransucrasa es secretada por las células en proceso de crecimiento, esta enzima convierte el exceso de sacarosa en dextrano mediante el proceso de hidrólisis y liberando fructosa al medio como subproducto. (Velázquez y Robles, 2013).

La producción del polímero se debe a la enzima extracelular “dextransacaeasa”: 1, 6 – α – D – glucan 6 – α – D – glucosiltransferasa de acuerdo a la siguiente reacción:



Un punto interesante es la constatación que el proceso de síntesis del polímero mencionado, no requiere de cofactores, tampoco monómeros activados a diferencia de los clásicos mecanismos de síntesis de polisacáridos celulares debido a que la energía para realizar la síntesis del dextrano se obtiene de la hidrólisis del enlace glucosídico de la sacarosa. (Vega. et al, 2012).

Los dextranos son homopolisacáridos formados de unidades de glucosa en su forma piranosa. En general, los enlaces de la cadena principal son en α -1,6 existiendo

porcentajes de variables ramificaciones en α -1,2, α -1,3, α -1,4, dependiendo del microorganismo productor de la enzima.

En el cuadro 4, se muestra la composición de diversos dextranos en función a la fuente. Una primera excepción la constituyen las enzimas de las cepas *L. mesenteroides* NRRL B – 1355, que producen un polímero donde se alternan en la cadena principal enlaces α -1,6 con α -1,3, por lo que ha sido denominado como “alterano” y la enzima como “alternansacarasa”.

La segunda excepción incluye a los polímeros cuya estructura principal es en α -1,3 y las ramificaciones en α -1,6, conocidos como “mutanos”, siendo así el caso de las cepas *L. mesenteroides* NRRL B – 523 y B – 1149, así como de una de las fracciones de *S. mutans* 6715. (Vega. et al, 2012).

Tabla 4: Composición de dextranos producidas por enzimas procedentes de diversos microorganismos.

Microorganismos	% de residuos glucopiranososa			
	α (1 - 6) Isomaltosa	α (1 - 4) Maltosa	α (1 - 3) Nigerosa	α (1 - 2) Kojibiosa
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>				
NRRL B- 512 F	95	-	5	-
NRRL B- 742 S	60	-	50	-
NRRL B- 742 L	87	13	-	-
NRRL B- 1299 L	49	-	19	32
NRRL B- 1355 L	95	-	5	-
NRRL B- 1355 S	54	-	46	-
<i>Streptococcus Mutans</i>				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37.5	-	62.5	-
6715 S	64	-	36	-
6715 I	4	-	96	-
<i>Streptococcus Sanguis</i> 804				
Complejo Tibi	90	1.5	8.5	-

- S = Fracción soluble
- Fracción poco soluble
- L = Soluble
- Fracción insoluble
- I = Fracción insoluble para casos de cepas que producen más de un tipo de dextrano

Fuente: Garibay, 1993

En la industria la cepa que posee mayor interés es el *L. mesenteroides* NRRL B – 512F, el cual posee la característica de producir dextranos con un peso molecular muy elevado y aunque existe cierta controversia en relación con el tamaño de las cadenas, éstas alcanzan un peso molecular superior a 2 millones. Las soluciones que contienen dextranos poseen el comportamiento reológico de los fluidos no Newtonianos, del tipo pseudoplástico.

Los dextranos son polisacáridos con pesos moleculares $\geq 1,000$ Dalton, que tienen una cadena principal lineal de α -glucopiranosilo unido unidades repetitivas. Tres clases de dextranos se pueden diferenciar por sus características estructurales. La estructura del anillo de piranosa contiene cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno. Los dextranos de clase 1 contienen el enlace α (1 \rightarrow 6) D-glucopiranosilo estructura modificada con pequeñas cadenas laterales de ramas de d-glucosa con α (1 \rightarrow 2), α (1 \rightarrow 3) y α (1 \rightarrow 4) - vinculación (ver Figura 1). Los dextranos de clase 1 varían en su peso molecular, disposición espacial, tipo y grado de ramificación y longitud de las cadenas de ramas, dependiendo de las cepas productoras microbianas y las condiciones de cultivo (Spotti, 2013).

La isomaltosa y la isomaltotriosa son oligosacáridos con la estructura del esqueleto de dextrano de clase 1. Dextranos de clase 2 (alternan) contienen una estructura de

la columna vertebral de alternancia de unidades de d-glucopiranosilo α (1 \rightarrow 3) y α (1 \rightarrow 6) -linked con α (1 \rightarrow 3) - ramas vinculadas. Los dextranos de clase 3 (mutans) tienen una estructura principal de d-glucopiranosilo con enlaces a (1 \rightarrow 3) consecutivos unidades con ramas vinculadas a α (1 \rightarrow 6). (Spotti, 2013).

El mecanismo postula la presencia de intermediarios en la fase de enzima – glucosa y enzima – dextrano. Cada glucosa nueva incorporada a la dextrano, se agrega como complejo enzima – dextrano mediante un ataque nucleofílico del oxígeno del carbono 1 del dextrano, para formar un enlace α -1,6. Esta unidad de glucosa nueva, procedentes del complejo enzima – glucosa se suma al complejo enzima - dextrano, justamente en el punto de asociación, de manera simultánea una nueva molécula de sacarosa es hidrolizada para dar lugar al complejo enzima – glucosa. La cadena de dextrano crece así, en principio ininterrumpidamente. Solo la presencia de los aceptores detiene el crecimiento y en el medio de síntesis por lo general solo existe la fructosa como aceptor débil. Cuando la fructosa actúa sobre el complejo enzima – dextrano se libera el polímero, mientras que cuando actúa sobre el complejo enzima – glucosa, se produce un disacárido conocido como leucrosa. Es importante mencionar que la maltosa es el aceptor conocido de mayor potencia, por lo que se le adiciona al principio de la reacción, se obtiene como producto una mezcla oligodextranos.

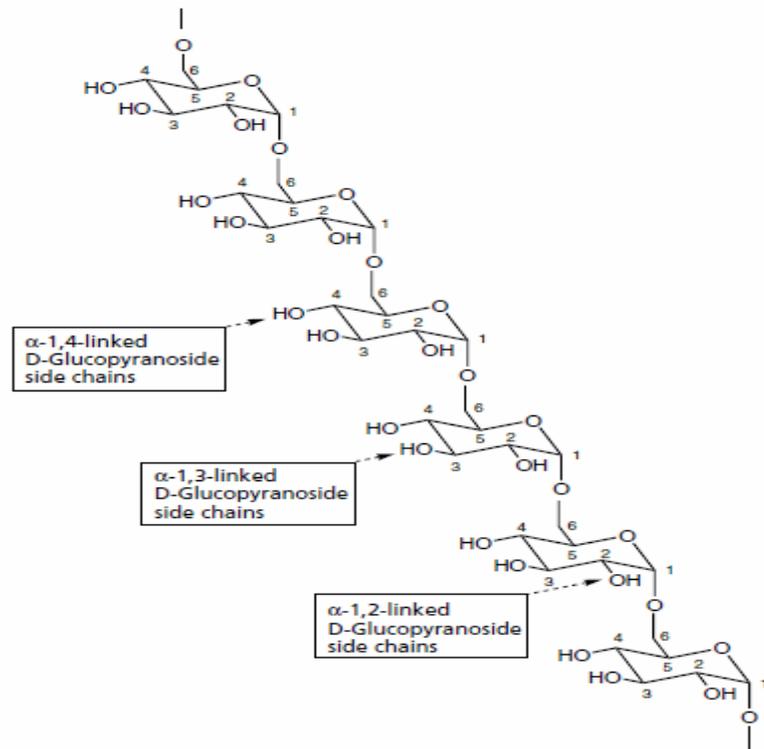


Figura 1: Estructura general de los dextranos de clase I consistentes en una cadena principal lineal de repetición de d-glucopiranosilo con enlaces a (1 → 6) unidades. El dextrano puede tener ramas de cadenas más pequeñas de d-glucosa unidas a la cadena principal por α (1 → 2) -, α (1 → 3) - o α (1 → 4) - enlaces glicosídicos.

Por medio de la fermentación bacteriana o enzimática se da la síntesis de dextrano. El *Leuconostoc mesenteroides* de las cepas NRRL B-512F, 512 y B1299; es el microorganismo empleado y es sólo con la cepa B-512F se produce dextrano a escala industrial, a partir de sacarosa comercial. (Spotti, 2013). Este proceso puede verse en la Figura 2:

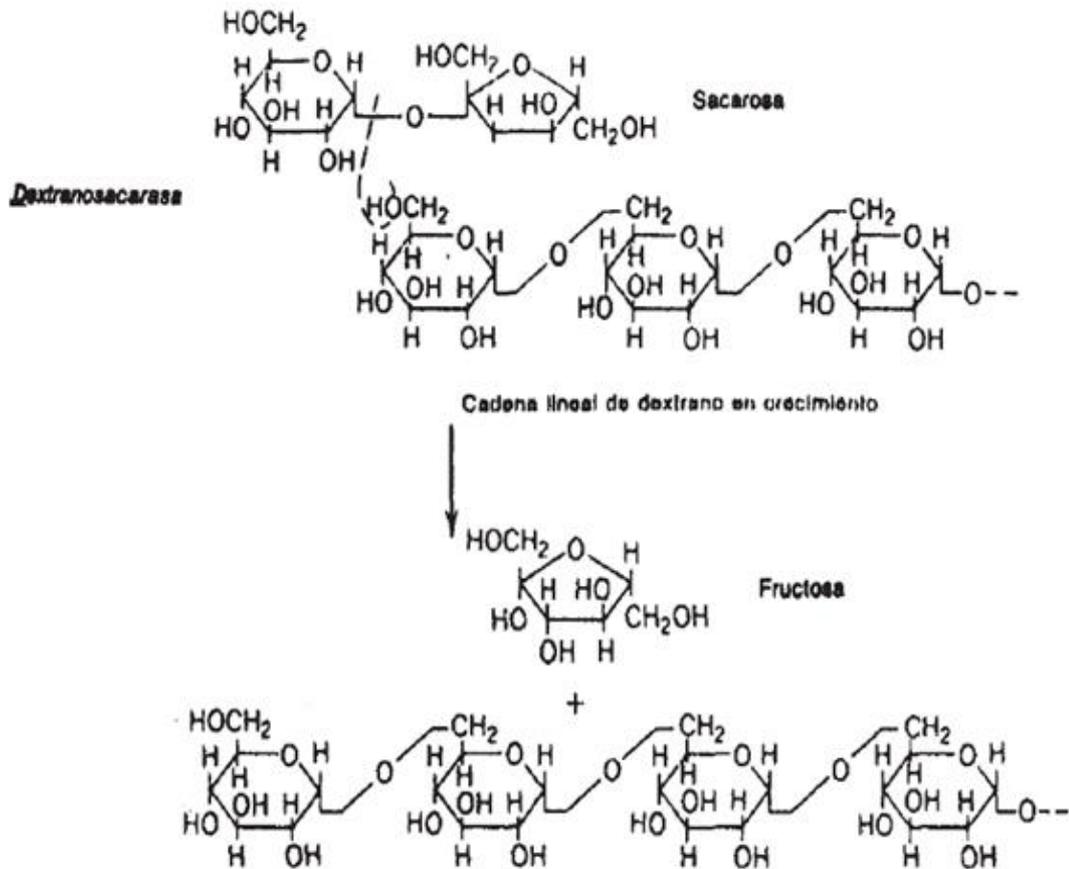
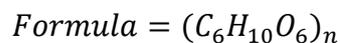


Figura 2: Síntesis general de la dextrano a partir de la sacarosa.

El dextrano es un polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa, formando unidades en cadenas de longitud variable. Su fórmula subdesarrollada es la siguiente:



(Loyola y Diaz, 2013).

2.4. Hidrólisis enzimática.

Este proceso se da gracias a grupos de enzimas llamadas hidrolasas, las que provocan la ruptura de los enlaces por agua. Este proceso va depender según los grupos de enzimas, y estos según los tipos de enlaces o compuestos.

Se menciona que los polisacáridos a comparación de las proteínas son bastante menos estables a su rotura hidrolítica. La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar; el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar.

Las dextranasas son enzimas que hidrolizan al dextrano. Estas quiebran al dextrano y los convierte en estructuras más pequeñas y más manejables. Eventualmente en oligosacáridos, con isomaltos isomaltrosas y glucosa, siendo los principales. (Eggleston & Mongeb, 2005).

2.4.1. Actividad enzimática.

La actividad enzimática se considera como una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones, que deben ser especificadas cuando se dan valores de actividad. Así también, la producción de enzimas se expresa en términos de actividad enzimática (U), es decir, como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto, en condiciones ambientales definidas, tales como son: concentración de sustrato saturante, pH y temperatura óptimas (Illanes citado en Castillo, 2013).

Como se mencionó la actividad enzimática viene limitada por diferentes factores como puede ser el sustrato, la concentración de enzimas y la disponibilidad de cofactores; dándose además que la velocidad de reacción está involucrada directamente con la concentración de enzima, por lo que la velocidad es diferente para cada tipo de enzima.

- **Concentración de enzima:**

Para realizar la caracterización de la enzima y su estudio debe saberse respecto a la concentración de enzima ideal, asegurándose que existe una relación lineal entre la concentración de enzima presente en una muestra y la velocidad de la reacción catalizada por la misma, a una concentración de sustrato dada. Realizando lo que se denomina Rango de Linealidad.

En la figura 3 muestra el comportamiento de la cantidad de producto formado en función del tiempo de incubación, así en ella se muestran varias curvas correspondientes a diferentes concentraciones de enzimas en órdenes crecientes desde E1 a E4. Todas estas curvas muestran que a tiempos cortos la velocidad de la reacción es igual a la velocidad inicial. A tiempos largos, la cantidad de producto formada se mantiene constante, es decir, se llegó al equilibrio.

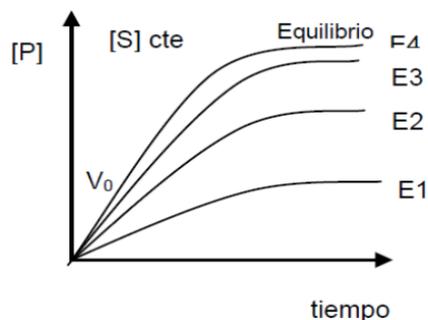


Figura 3: Perfil de rango de linealidad a diferentes concentraciones de enzimas con sustrato constante.

Esta relación lineal entre concentración de enzima y velocidad inicial se observa en la figura 4, la que se considera hasta llegar a una concentración de enzima tal que el sustrato comienza a transformarse en reactivo limitante y se pierde la proporcionalidad.

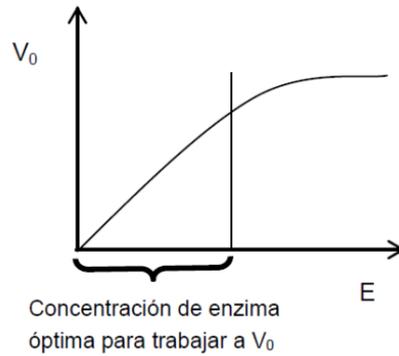


Figura 4: Perfil apropiada de concentración de enzima óptimo

- **pH:**

Todas las enzimas tienen un pH óptimo de actividad o supervivencia el cual se encuentra entre un valor mínimo y máximo. Es altamente dependiente de la temperatura, el sustrato y la concentración de enzimas. El pequeño cambio de esta puede ocasionar la desnaturalización de la proteína. (Villada, 2010).

- **Temperatura:**

La temperatura es otra condición importante ya que, las reacciones enzimáticas catalíticas obtienen óptimas condiciones de reacción al encontrarse en la temperatura más adecuada para llevar a cabo la reacción. La temperatura óptima de reacción es dependiente del tipo de enzima y proceso que se pretende utilizar (Villada, 2010)

- **Concentración de sustrato:**

La cantidad de sustrato utilizado para la reacción catalizada enzimáticamente afecta la naturaleza de la relación enzima – sustrato, afectando las funciones estructurales que los relacionan y confieren las características de selectividad ocasionando una inestabilidad de la enzima (Villada, 2010).

2.4.2. Concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de una proteína en una solución es importante en muchos casos, tales como en procesos enzimáticos. Esto surge a que casi todas las

variables que caracterizan a una proteína deben ser normalizadas por la masa o por la concentración molar. Este es el caso, por ejemplo, de la actividad enzimática específica, la estequiometría de unión de un ligando, la potencia biológica de un polipéptido, el coeficiente de extinción en la absorción electrónica, etc.

2.4.3. Parámetros cinéticos (cinética de Michaelis-Menten).

Es de suma importancia conocer el comportamiento enzimático ante cualquier estudio, tal es el caso de la cinética enzimática, que considera que la velocidad de la reacción catalizada es proporcional a la concentración de proteína enzimática activa en la zona de linealidad de la relación producto tiempo (velocidad inicial). Salvo situaciones muy excepcionales, esto es válido.

La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima y esta velocidad es diferente para cada enzima. La expresión matemática para un modelo cinético generalizado considera reacciones esencialmente irreversible del tipo $S \rightarrow P$ y se expresa según la ecuación de Michaelis-Menten: $v = V_{ap} \cdot S / (K_{ap} + S)$ (Castillo, 2013).

Donde K_{ap} y V_{ap} son los parámetros cinéticos denominados, constante de la afinidad aparente del enzima por el sustrato y la velocidad máxima aparente de reacción (reactividad del complejo activo enzima sustrato) respectivamente (Castillo, 2013)

La expresión cinética anterior, es utilizada conjuntamente con el balance de materia respectivo, en el diseño y evaluación del comportamiento del reactor enzimático.

Para ser aplicada requiere de la evaluación experimental de todos los parámetros cinéticos que la conforman. La forma usual es a través de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato o concentraciones de efectores.

La cinética de Michaelis-Menten representa la velocidad de reacción de reacciones enzimáticas. Este modelo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la de enzima y para cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es constante (estado estacionario). Para determinar la velocidad máxima (V_{max}) de una reacción enzimática, la concentración de sustrato $[S]$ se aumenta con el fin de saturar los sitios activos de la enzima y así alcanzar una velocidad constante de formación de producto.

La validación de la dependencia de v y S y la determinación de los parámetros o constantes cinéticos se realizan por interpolación lineal, usando la ecuación de Lineaweaver- Burk, obtenida a partir de la ecuación de Michaelis-Menten (Ricca citado en Castillo, 2013): $1/v = K_{ap}/V_{ap} \cdot S + 1/V_{ap}$.

2.5. Dextranasa.

El uso de la enzima Dextranasa es el método más eficiente para la hidrólisis de los dextranos en el ingenio azucarero y refinерías, existe un mal entendido acerca de los fungicidas, ya que estos no eliminan los dextranos, sólo ayudan a mantener el nivel. Por su lado, la Dextranasa ayuda a los siguientes aspectos: ayuda a eliminar problemas de viscosidad, elimina la distorsión del cristal de azúcar, aumenta la recuperación de azúcar, elimina las sanciones por la presencia de dextranos en el azúcar, mejora los procesos de refinación.

2.5.1. Origen.

Desde el inicio, las puntuales fuentes enzimáticas que se identificaron fueron las bacterias y los hongos que se consideraron como los microorganismos capaces para hidrolizar los dextranos. Un equipo de investigadores de origen japonés a inicios de los años cincuenta, lograron identificar cepas provenientes de los hongos *Penicillium*

(*funiculosum* y *lilacinum*), que eran capaces de producir Dextranasas en presencia del dextrano y, un tiempo después en los años sesenta, se lograron caracterizar diferentes cepas de los hongos *Chaetomium gracile* y *Gibellela funiculosum*. (Florez, G. 2014).

En 1981, fue publicada la caracterización de las Dextranasa originada por la cepa del hongo *Chaetomium gracile*. La enzima identificada resulto ser estable con un pH. 5.5 - 11.0, en la cual indicaba que su actividad óptima se obtenía manteniendo un pH de 5.5, temperatura de 65 °C, resaltando que puede ser muy estable a temperaturas inferiores a la mencionada anteriormente (Verde. y Quiroz. 2014)

En el año 1986 apareció la solución enzimática Dextranex, producido por una compañía norteamericana llamada Miles Laboratories, a partir de la cepa de *Chaetomium sp.*. Este preparado se propuso para aplicarla en la industria azucarera, no obstante, no aparece información disponible sobre su modo de empleo o uso. Entre los primeros compuestos enzimáticos de Dextranasa sacados al mercado, emergieron también el DN 25 L y, después, el DN 50 L, los dos de la compañía de origen danes Novo Nordisk A/S, elaborados con el uso de la cepa de *Penicillium lilacinum*, la que después surgió renombrada como *Paecilomyces lilacinum* en la solución enzimática Dextranose 50 L. (Verde y Quiroz 2014).

Los desenlaces experimentales demostraron que con la elevación de la concentración de azúcar en la solución hasta 65 °Brix, las enzimas Dextranasas secretadas por los hongos *Chaetomium gracile* y *C. erraticum*, elevaron el nivel de estabilidad térmica hasta 85 °C, pero este incremento del Brix disminuyo la velocidad de la hidrólisis de la dextrano. Se propuso entonces que cuando la concentración de azúcares es de 60 °Brix, la actividad enzimática decrece entre 30 y 40%. (Loyola y Diaz, 2013).

2.5.2. Producción.

Las Dextranasas son producidas fundamentalmente para ingenios azucareros, en los que la contaminación con dextranos producidas por *Leuconostoc mesenteroides* requiere de un tratamiento enzimático. Se obtienen de cepas de *Penicillium funiculosum*, *P. lilaceum* y *Chaetomium gracilae*, requiriendo de dextranos como inductor. Existen una gran variedad de enzimas portadoras en la literatura con actividad hacia diversos tipos de dextrano, ya que las enzimas comerciales solo presentan alta actividad hacia los enlaces α 1-6, pero existen dextranos con alto contenido de enlaces α 1-3 y/o α 1-2. (Florez, 2014).

En la actualidad el empleo de la enzima Dextranasa es un método muy utilizado. El empleo de estas enzimas tiene muchas ventajas como:

- a) Son naturales.
- b) No predisponen reacciones indeseables de efecto secundario debido a que son muy específicas en su manera de actuar.
- c) No requiere de condiciones de proceso radicales que puedan llegar a alterar el producto, tampoco necesita ningún equipo que sea costoso. Ya que actúan en condiciones moderadas ya sea de temperatura o pH.
- d) Pueden actuar con bajas concentraciones.
- e) Se inactivan de manera fácil. (Oliart et al, 2016).

Desde otra perspectiva, las restricciones en el uso de Dextranasa en la industria azucarera se puede deber al costo de elaboración de cultivo y su misma purificación.

Del mismo modo existe una confusión sobre que Dextranasa usar, como y donde agregarla. . (Oliart et al, 2016).

2.5.3. Mecanismo de acción

La Dextranasa posee una enorme facultad para erradicar dextrano que se forma antes y durante el proceso de elaboración del azúcar, según investigación diez unidades de Dextranasa podrían llegar a eliminar el contenido de dextrano hasta en un 67% en tiempo de 24 horas y el 56% en 72 horas a partir del jugo proveniente de la caña de azúcar. Estas propiedades lo transforman en un biocatalizador prometedor en la industria.

Las Dextranasas en niveles de concentración bajo se emplean antes de la clarificación lo que baja de manera significativa la viscosidad del jarabe tratado. De otro modo, altos niveles de Dextranasa se necesitan durante el proceso de mieles (Cassaroti et al, 2012).

Tabla 5: Valores óptimos de pH y la temperatura de Dextranasas sintetizadas por diferentes microorganismos

Dextranasas	Fuente	Valor Optimo		
		pH	Temperatura	
Naturales	Hongos	Penicillium lilacinum	5.0 - 5.5	53 - 60 °C
		Penicillium luteum	4.0 - 6.0	50 °C
		Penicillium funiculosum	6	NR
		Penicillium aculeatum	4.5 - 5.6	50 °C
		Penicillium minioluteum	4.5 - 5.0	35 °C
		Penicillium notatum	5	50 °C
		Chaetomium gracile (dos enzimas)	5.5 - 11.0	55 - 65 °C
	Bacterias	Fusarium Miliformr	5.5	55 °C
		Sporothrix Schenkii	5	NR
		Brevibacterium fuscun var.		
		Dextranlyticum	7.0 - 7.5	NR
		streptococcus mutans	5.5	37 °C
		Streptomyces snulatus (dos enzimas)	7	40 y 50 °C
		Flavobacterium sp. M-73	7	35 °C
		Termoanaerobacter wiegelii	5.5	70 °C
Levadura	Cepa del genero thermoanaerobacter	4.5 - 5.5	80 °C	
	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	5.5	65 - 70 °C	
	Lipomyces Starkeyi	5	55 °C	
	Paecilomyces lilacinum en			
Recombinantes	Hongos	Aspergilus, Fusarium y Griberella	NR	60 °C
	bacterias	Penicillium minioluteum en pichia pastoris	4.0 - 5.0	57 °C
		Streptococcis sobrinus en Echerichia Coli	5.3	39 °C

Fuente: Rodríguez, 2015.

En el cuadro 5 abrevia las primordiales propiedades de algunas de las Dextranasas mencionadas. La oposición de los rangos del pH temperatura óptimos entre estas, en relación con la fuente de origen es indiscutible. En el caso de las d. fúngicas, los valores óptimos del pH son, ligeramente ácidos y en el caso de las bacterianas, el pH se encuentra más cercano al valor neutro. De forma excluyente solo se encuentran las enzimas del hongo Chaetomium gracile que mantiene su actividad óptima en el rango del pH entre 5.5 y 11.0.

Por lo general, la temperatura óptima de las Dextranasas de los hongos se comporta entre 50 y 60 °C, ligeramente superiores a la de las bacterias que están alrededor de

40 °C, con excepción, nuevamente, de una de las enzimas del hongo *Chaetomium gracile*, cuya temperatura máxima es igual a 65 °C.

La hidrólisis enzimática de la dextrano se desarrolla con enzima Dextranasa. Esta enzima es generada por una variedad de especies de bacterias aerobias y hongos *penicillium* y *Aspergillus*. En dependencia de la acción de la enzima puede clasificarse como exógena o endógena. En la hidrólisis de la dextrano nativa para la obtención de dextranos de bajo y mediano peso molecular se han empleado endoDextranasas, con resultados muy similares en la Distribución de pesos Moleculares (DPM) al obtenido por la hidrólisis ácida. Sin embargo, parece ser muy importante la selección de la enzima comercial, pues varía considerablemente el DPM resultante debido a la acción de enzimas de diferentes proveedores. (Florez, 2014).

Según el origen de la dextrano esta presenta cierto porcentaje de enlaces en su estructura, estos enlaces pueden ser enlaces α 1-6, α 1-4, α 1-3, α 1-2; esto depende esencialmente del origen de la dextrano.

Tabla 6: Liberación de azúcares reductores de varios dextranos por las Dextranasas

Origen de la dextrano	Porcentaje de Enlaces Presentes			
	α 1 --> 6	α 1 --> 4	α 1 --> 3	α 1 --> 2
S. Bovis	100	-	-	-
L. mesenteroides (Birmigham; NRRL B - 1375) modificada	98	-	2	-
L. mesenteroides (NRRL B - 512)	95	-	5	-
L. mesenteroides (NRRL B - 1383)	84	16	-	-
L. mesenteroides (Birmigham; NRRL B - 1375)	81	6	13	-
L. mesenteroides (NCIB 2706)	79	3	18	-
L. mesenteroides (NRRL B - 742)	67	21	12	-
L. mesenteroides (NRRL B - 1399)	65	6	-	29

Fuente: Bourne et al 1962.

Como se puede comprobar en la figura presentada, los diferentes dextranos presentan en su estructura los diferentes enlaces ya mencionados, con ello se puede reforzar lo mencionado anteriormente que el comportamiento de la enzima se ve afectado con la estructura de la dextrano y la naturaleza de sus enlaces.

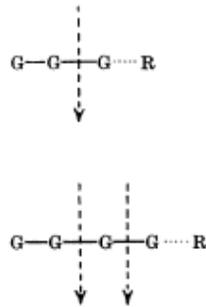


Figura 5. Acción de la Dextranasa en la dextrano, isomaltodextrinas y isomaltodextrinas modificadas —, $\alpha - 1-6$ enlace; ..., α -enlace; G, unidad de glucosil; R, glucosa, fructosa, sorbitol o grupo metil; - - -, puntos principales de hidrolisis.

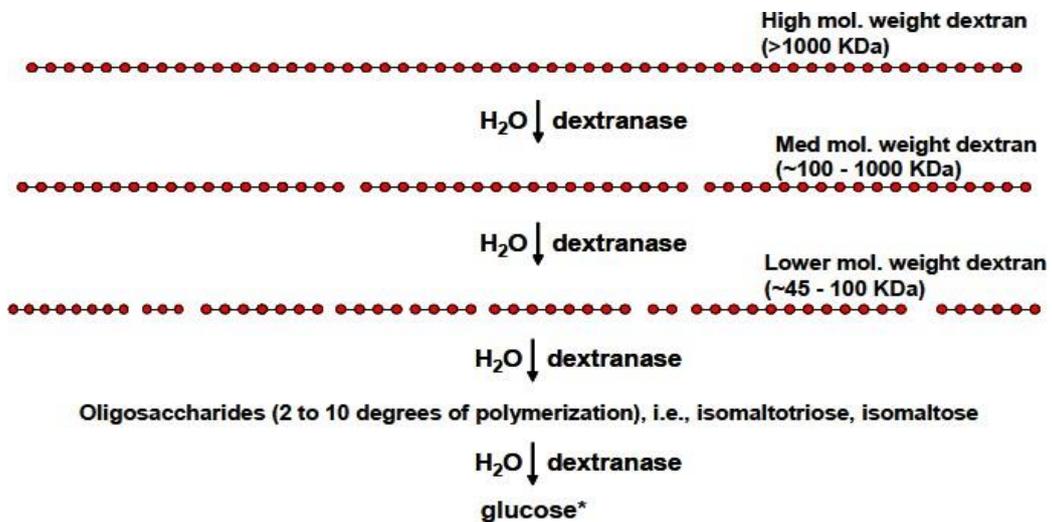


Figura 6. Mode of endohydrolysis action of dextranase (1→6) glycoside linkages in random sites of HMW dextran. Dots and connecting lines represent chains of glucose molecules linked by $-(1 \rightarrow 6)$ bonds in the dextran molecule. Reaction time is not represented. * In dextranase application in the sugar industry, glucose as the end product rarely or never occurs. From Eggleston et al. (2007)

Tabla 7: Rendimientos relativos de glucosa, isomaltosa e isomaltotriosa a partir de isomaltodextrinas y dextrano en hidrólisis con Dextranasas

Sustrato	Productos		
	Glucosa	Isomaltosa	Isomaltotriosa
Dextranasa A en:			
Isomaltotetrosa	16	100	18
Isomaltopentosa	27	100	79
Isomaltohexosa	23	100	47
S. Bovis dextran	20	100	59
Dextranasa B en:			
Isomaltotetrosa	18	100	10
Isomaltopentosa	23	100	41
Isomaltohexosa	33	100	46
S. Bovis dextran	38	100	46

Fuente: Bourne, 1962.

Según Aguilar (2010). En su investigación titulada “Kinetic Model Of Hydrolysis Of Sugarcane Waste” el tratamiento del molino jugo con Dextranasa redujo el contenido de dextrano en un 78%. La concentración de enzima fue de 300 unidades / 100 ml de jugo, y se usaron tiempos de reacción de 40-60 minutos a 43 ° C. Cuando la concentración de enzima se redujo a 30 unidades / 100 ml de jugo y el tiempo de reacción se redujo a 30 minutos, se eliminó el 76% del dextrano. El propósito del presente trabajo fue definir las condiciones óptimas para la eliminación económica de dextrano de jugo mixto mediante tratamiento con Dextranasa.

Según Eggleston et al (2007) Antes de aplicar la enzima al jugo de caña se debe considerar el contacto entre la enzima y el sustrato. Los volúmenes más pequeños demorarán más en dispersarse en el tanque de jugo y la Fig. 8 también ilustra el problema del contacto bajo entre la dextranasa y el dextrano cuando solo se agregan pequeños volúmenes de una dextranasa "concentrada". Para resolver esto, se aplicaron soluciones de trabajo de la dextranasa "concentrada", que representan la misma

concentración final de dextranasa pero en volúmenes más grandes para mejorar el contacto (ver Fig. 7).

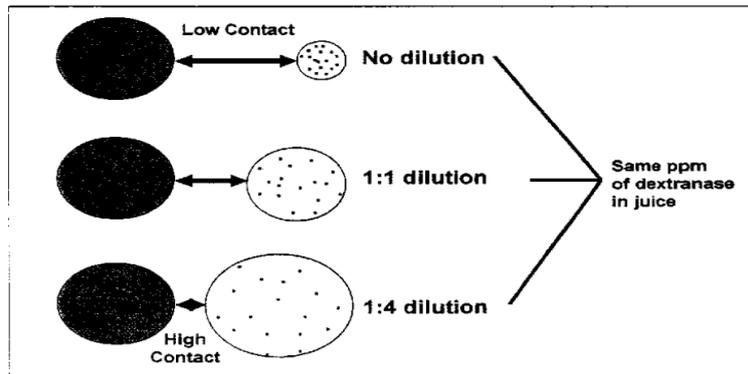


Figura 7: Un diagrama del contacto entre dextrano (sustrato) y dextranasa (enzima) en soluciones de trabajo de fábrica de dextranasa "concentrada". Las soluciones de trabajo representan la misma concentración de ppm de moléculas de enzima (mostradas como cuadrados), pero volúmenes más grandes (representados por círculos) para mejorar el contacto. La preparación de soluciones de trabajo de dextranasas "concentradas" es mucho más rentable que la adición de dextranasas "no concentradas" directamente.

La explicación para la hidrólisis más fácil de los niveles altos de dextrano se ilustra en la Fig. 8. Cuando inicialmente está presente un nivel bajo de dextrano, el contacto entre la dextranasa y el dextrano es bajo, es decir, la relación enzima / sustrato es alta. A la inversa, cuando un alto nivel de dextrano está presente, el contacto es mayor.

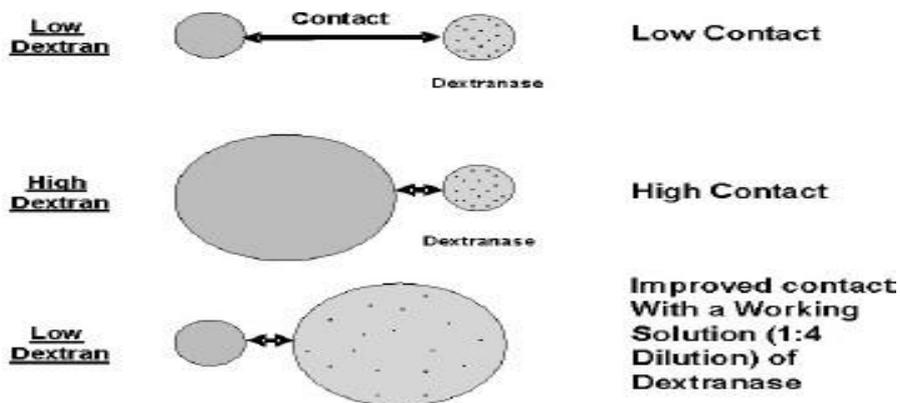


Figura 8. Diagram to illustrate the contact between dextranase and different concentrations of dextran. Circles depict volumes and squares depict enzyme molecules. The action of a working solution of "concentrated" dextranase (>25,000 – 58,000 DU/mL) to improve contact in factory process is also shown. Modified from Eggleston et al. (2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución.

El trabajo de investigación presente fue realizado en los laboratorios prácticos de la Universidad Nacional Del Santa:

- Química Orgánica y Bioprocesos.
- Composición de Alimentos Agroindustriales.
- Automatización y operaciones unitarias.

3.2. Materiales.

3.2.1. Materia prima.

La materia prima que se utilizó fue la caña de azúcar, variedad México-73 proveniente de Caylan, Valle de Nepeña, Santa, Áncash



Figura 9: Caña de azúcar quemada. Variedad México 73

3.2.2. Enzima.

La enzima que se utilizó fue la enzima comercial DEXTRANFREE XE, la cual fue donada por la empresa Enmex de México; su origen de extracción es de la Enzima: 1,6- α -D-Glucano 6-glucanohidrolasa derivada de la Cepa: *Chaetonium erraticum*. (Ver Ficha Técnica en Anexos).

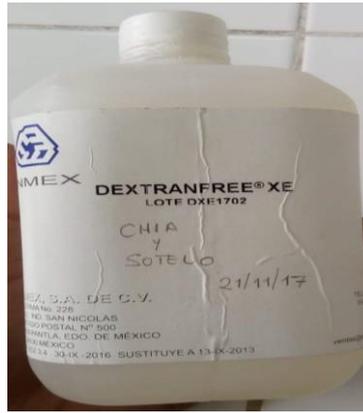


Figura 10. Muestra de enzima comercial Dextranfree

3.2.3. Dextrano.

La dextrano T-2000 procedente del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512F, fue donada por la Empresa Agroindustria San Jacinto S.A.C. La cual es distribuida por la empresa Sigma Aldrich. Este reactivo es de grado analítico, su presentación es en polvo y su calidad técnica del Dextran T-2000 es una fracción de dextrano de alta pureza con un peso promedio y distribución de peso molecular seleccionados.

3.2.4. Reactivos.

- Reactivo DNS
- Reactivo de Bradford
- Ácido 3.5 – dinitrosalicílico (sigma Aldrich)
- Hidróxido de sodio NaOH (Merck)
- Tartrato de Sodio y Potasio $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (Merck)
- Ácido Acético 0.2 M
- Acetato de sodio 0.2 M
- Dextrano T – 2000 (Sigma Aldrich)
- D(+)-Glucosa (Merk, 97.2% Pureza)
- Azul de coomassie G – 250

- Etanol al 98% - Sigma
- Ácido Fosfórico al 85%
- Agua destilada
- Sacarosa pura $C_{12}H_{22}O_{11}$, Bioextra $\geq 99.5\%$ (GC)
- Ácido tricloroacético $C_2HCl_3O_2$ al 10% , CDH Microgen
- Cloruro de Bario al 10% CHD
- Buffer acetato pH 5.5

3.2.5. Materiales de vidrio y otros.

- Buretas de 25 ml
- Embudo de vidrio
- Fiolas de 50ml, 100ml, 125ml, 1Lt
- Vasos de precipitado 50ml, 250ml, 500ml
- Tubos de ensayo
- Espátulas
- Gradillas de metal
- Matraz Erlenmeyer 50, 125, 250 ml
- Balones de fondo plano de 50ml
- Puntas de plástico para pipetas (5000, 1000, 50, 20 uL)
- Pipetas graduadas 1, 2, 5 y 10ml
- Tubos con tapa de 25ml y 10ml
- Papel aluminio
- Papel filtro Whatman, 125mm.
- Celdas de plástico para espectrofotómetro
- Pera de succión
- Probetas de 50 y 100ml

- Pinzas para tubos
- Soporte universal

3.2.6. Equipos e instrumentos.

- Agitador Magnético. Marca Thermolyne Corporation. Nuova II. Modelo N°S18520-26.
- Balanza analítica. Marca: Prease Gravimetrics AG 221LX
- Balanza digital: Precisa XB-320M
- Bomba de Vacío. Marca: GE Motors. Modelo: Mod 5KH 33DN1 + 6GX.
- Baño María: Electronic Thermo Stat BRT – 65
- pH – metro: Orion Star A211 Thermo Scientific
- Refractómetro digital: Rudolph Research J157
- Estufa eléctrica: P-selecta 209
- Espectrofotómetro UV/VIS: Genesys 20 Thermo Scientific
- Polarímetro automático: Analytical Autopol I Rudolph Research
- Viscosímetro capilar de Ostwald
- Trapiche Extractor Exprimidor de prensa de caña de azúcar de Laboratorio
- Mechero Bunsen
- Refrigerador

3.2.7. Equipos y software para procedimiento de datos.

- Computadora HP pavilion core i5
- Microsoft Word versión 2013
- Microsoft Excel versión 2013
- Software estadística V7

3.3. Metodología y Procedimiento experimental

El desarrollo de este trabajo se efectuó en dos etapas: La primera fue la hidrólisis enzimática efectuada a la solución con patrón estándar de Dextrano T-2000 donde se determinaron las condiciones ambientales óptimas de la hidrólisis; y la segunda, la hidrólisis enzimática al jugo de caña contaminado con dextrano.

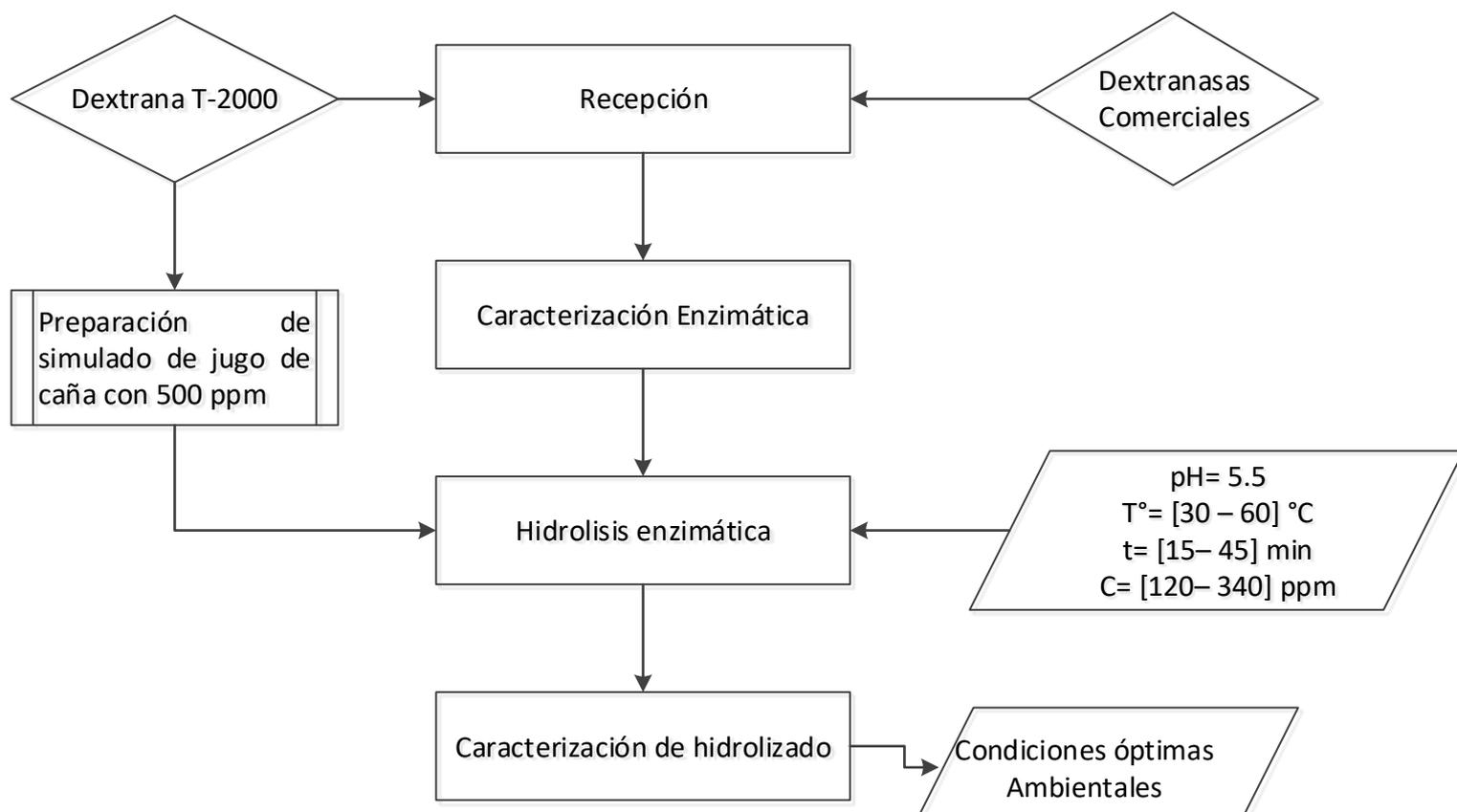


Figura 11. Primera etapa del proceso de hidrólisis de dextrano (Hidrólisis al simulado de jugo de caña de azúcar)

3.3.1. Descripción de cada etapa del diagrama de flujo:

- Recepción De Materia Prima.

Recepción de la sacarosa pura $\geq 99.5\%$, grado analítico obtenida de la empresa Bioextra, Dextrano T-2000 donado por la empresa San Jacinto procedente de la

empresa Sigma Aldrich y el buffer acetado pH 5.5 preparado previamente en el laboratorio de química orgánica.

- **Caracterización enzimática:**

Preparación de muestras y reactivos para caracterización enzimática.

Se prepararon las soluciones y reactivos necesarios para la caracterización enzimática. En primer lugar se preparó el reactivo buffer acetato a un pH 5.5, para preparar este reactivo en un volumen de 1Lt se mezcló ácido acético (0.2M, 11.55ml) y acetato de sodio (0.2M, 27.2gr) en vaso de precipitado de 500 ml y se procedió a controlar el pH, regulándolo con un ácido o una base si en caso este no se encontrara en el pH requerido, luego se vertió en una fiola de 1Lt de volumen, y se procedió a aforarla con agua destilada; esta solución sirvió para diluir la dextrano T – 2000 en una fiola 500ml a una concentración de 500ppm, ya obtenida esta solución se tenía preparado el sustrato para la caracterización.

Por otro lado se prepararon las diferentes diluciones enzimáticas, las diluciones a analizar fueron las siguientes: 1:2, 1:4, 1:5, 1:10; utilizando como solución el buffer acetato y como soluto la enzima DEXTRAN FREE.

Determinación de proteína (Método de Bradford 1976).

Para determinación de proteínas de la enzima dextranfree se utilizó el método de Bradford. El procedimiento de análisis se explica a continuación:

- Como primer paso se agrega en un tubo de ensayo de capacidad 500 ul de muestra diluida de manera conveniente.
- Se añade 5 ml del reactivo Bradford (cada muestra) y se deja reaccionar un tiempo de 5 minutos.

- Se lectura la absorbancia en una longitud de onda de 595 nm, la cual se contrasta con un blanco de agua destilada. La concentración se obtiene interceptando la medida de la absorbancia en la curva de calibrado.

Determinación de rango de linealidad.

La experiencia se realizó efectuando una serie de ensayos de hidrólisis variando la concentración enzimática DEXTRAN FREE. Se empleó diferentes diluciones del concentrado enzimático: 1:2,1:4,1:5,1:10 se graficó la concentración de Sustrato o Producto contra tiempo de reacción (tiempo vs. Sustrato o Tiempo vs. Producto).

Procedimiento:

- Se preparó 5 tubos de ensayo, se agregó a cada uno 2,7 ml de solución de dextrano a la concentración definida (0.5 g/L) y a pH de 5.5 y se colocó en un baño María a 45°C durante tres minutos.
- Se agregó 0.25 ml del concentrado enzimático Dextranasa a cada uno de los 5 tubos de ensayo y se dejó reaccionar por los tiempos requeridos para el experimento. 0, 10, 20 y 30 minutos respectivamente.
- Se detuvo la reacción introduciendo cada tubo en baño de agua a 100°C por 3 minutos. Se retiró los tubos del baño hirviendo y se colocó en hielo.
- Simultáneamente en otros dos tubos se realizó los blancos para el sustrato y para la enzima. (Blanco Enzima= 0.3 ml Enzima + 2.7 ml de tampón (tiempo= 5 min.) Blanco Sustrato= 2.7 Sustrato + 0.3 ml de tampón (tiempo= 10 min.)
- Se realizó la determinación de azúcares reductores.

Determinación de actividad enzimática.

- Tiempo de incubación:

Se fijó un tiempo de 9hrs, variando el tiempo de manera que los puntos puedan demostrar el comportamiento más acertado de la enzima durante el cual se consume una cantidad mensurable de sustrato.

La gráfica que se muestra en la figura 12, es la que se debe de encontrar:

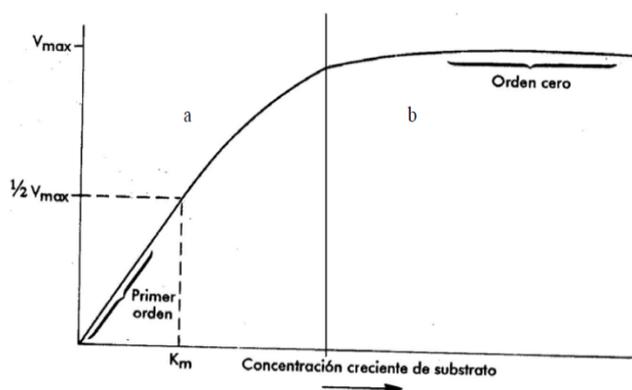


Figura 12: Velocidad de reacción frente concentración del sustrato (V vs. [S])

Se puede optar por cualquier intervalo contenido dentro de la línea a y se debe excluir el intervalo representado por la línea b, para poder analizar la reacción, el tiempo debe confiable de tal modo que se pueda hacer una determinación confiable de la actividad.

- Concentración de enzima:

Se incubarán las soluciones de reacción el tiempo predeterminado pero con diluciones diferentes de enzimas (1:2, 1:4, 1:5, 1:10); si el sustrato se encuentra en exceso, se debe hallar una proporcionalidad directa entre la actividad y la concentración de enzima (Figura 13). Se debe elegir una cantidad de enzima que permita una determinación confiable de la actividad.

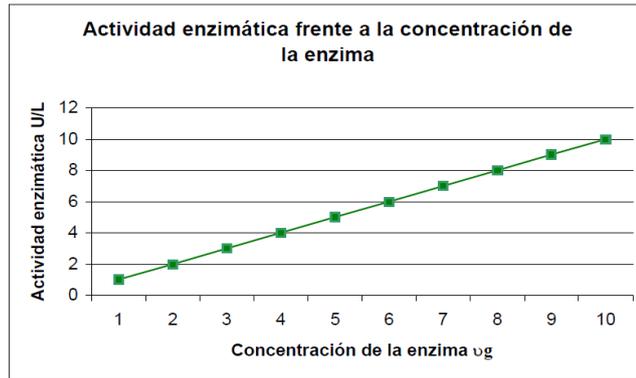


Figura 13: Actividad enzimática frente a la concentración de enzima.

- **Temperatura de incubación:**

La temperatura de reacción se determinó incubando bajo condiciones constantes de tiempo y concentración enzimática ya determinados y se varió el parámetro de temperatura en una rango de (20 a 70°C); la gráfica es la mostrada en la Figura 14.

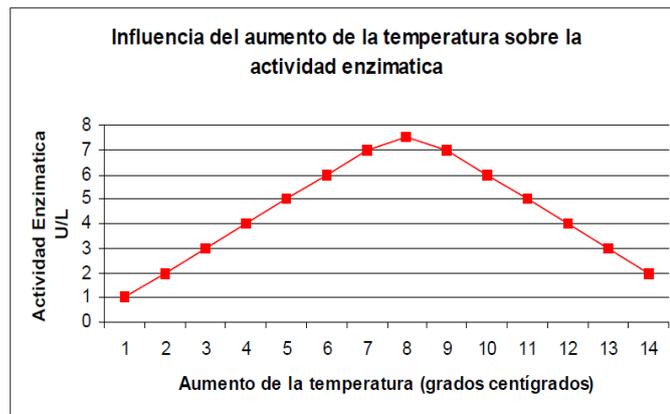


Figura 14 Actividad enzimática frente al aumento de temperatura.

Determinación de parámetros cinéticos

Se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción.

Los parámetros cinéticos se realizó con dilución de enzima que se obtenga un comportamiento lineal por más tiempo, asimismo se requiriere de un sustrato, a diferentes diluciones, para propiciar la reacción enzima–sustrato. En este caso para llevar a la solución de dextrano a un estado de saturación se realizaron diluciones de 200, 300, 400, 500, 600 ppm respectivamente.

Para la determinación de los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} , se utilizó la ecuación de Michaelis–Menten, que expresa la cinética enzimática (Figura 15), en cuanto a la representación de los datos cinéticos, para una reacción característica catalizada por una enzima con un solo sustrato, se hace uso de la gráfica de Lineweaver –Burk, que implica tomar simplemente los recíprocos de ambos lados de la expresión de la ecuación de Michaelis – Menten, como se puede observar en la Figura 12, ya que en una curva hiperbólica es difícil determinar con precisión V_{max} , y en consecuencia, K_m .

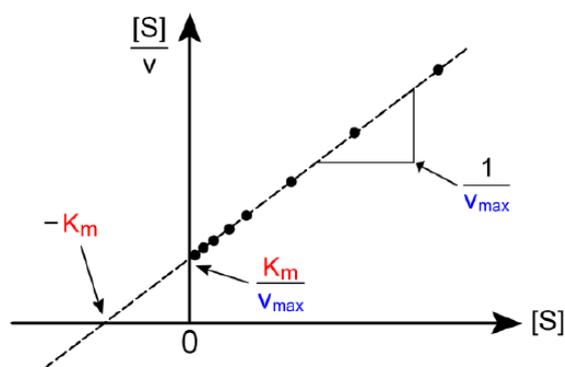


Figura 15. Gráfica de Lineweaver – Burk para la determinación de parámetros cinéticos

- Hidrolisis enzimática.

Se efectuó en dos etapas: la primera mediante la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) con un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) con tres factores; concentración de enzima, tiempo y temperatura de reacción; la cual se evaluó respecto a una solución de dextrano patrón (simulado de jugo de caña de

azúcar) con el fin de determinar las condiciones óptimas de reacción de la enzima comercial. En la segunda etapa, una vez determinado dichas condiciones óptimas de trabajo se efectuó la hidrólisis en jugo de caña de azúcar contaminado con dextranos, realizando la determinación de concentración de dextranos previo y posterior a la hidrólisis.

Obtención del simulado de caña.

El simulado de caña de azúcar consta de solución tampón buffer acetato 0.1M a 5.5 pH, dextrano y sacarosa grado analítico. Para la obtención del simulado de jugo de caña de azúcar, se realizaron los cálculos para obtener 3 litros de simulado que contenga 500ppm de dextrano y sacarosa (15°Brix). Se pesaron los insumos; para ambos casos fue necesario diluir previamente, se colocó la sacarosa en un vaso precipitado con un poco de buffer acetato para ser diluida con ayuda de un agitador magnético, de igual manera se realizó con la dextrano. Una vez diluido se mezclaron y se aforó hasta obtener 3 litros. (Se trabajó con 3 fioles de 1 Litro, donde en 1 se realizó toda la mezcla y se aforo, luego las dos restantes solo tuvieron contenido de buffer acetato. Todo se mezcló en un vaso precipitado). Se colocó el simulado en un envase de vidrio esterilizado y se almacenó en refrigeración.



Figura 16: Simulado de jugo de caña elaborado

Hidrólisis enzimática del simulado de caña

Para efectuar la hidrólisis enzimática se montó un sistema de minireactores (capacidad de 250 ml), con un volumen de trabajo de 100 ml, en donde se mantuvo en agitación y se reguló la temperatura por medio de flujo de agua temperada proveniente de un baño maría. Se efectuó la hidrólisis manteniendo un pH de 5.5.

El procedimiento de dicha etapa constó en colocar a la temperatura a hidrolizar, una vez conseguido la temperatura se colocó la cantidad de simulado (según el diseño experimental) en los minireactores y se mantuvo en agitación por 3 minutos (para que el simulado consiga la temperatura de hidrólisis), luego se adicionó la enzima y se dejó actuar por el tiempo de estudio que correspondía, una vez completado el tiempo se inactivó la enzima colocando la muestra hidrolizada a 100°C aproximadamente (inactivación térmica) por un tiempo de 5 minutos, posterior a ello se colocó en hielo por un tiempo de 3 minutos para enfriar rápidamente. Reservamos la muestra para realizar los análisis correspondientes de medición, azúcares reductores y dextranos (como se indica en los análisis fisicoquímicos).

Este proceso se realizó efectuando toda la matriz correspondiente al diseño experimental.

- **Caracterización del simulado de jugo de caña de azúcar.**

Luego de la obtención del simulado de caña se realizó la caracterización del simulado, se efectuó analizando la viscosidad, los °Brix, azúcares reductores, pol y dextranos.

Determinación de °Brix. (NMX-F-436-SCFI-2011)

- Se calibró el refractómetro digital con agua destilada, llevándolo a 0 °Brix.
- Se tomó aproximadamente 5 ml de la muestra.
- Se tomó una gota de la muestra y se colocó en el lente del refractómetro.
- Se esperó la estabilización de la lectura y se tomó la medida de los °Brix. Se anotó la lectura observada (Esta lectura se registra directamente, ya que el refractómetro digital no necesita corrección en los resultados de °Brix). Se realizó por duplicado, y se reportó el promedio

Determinación de pol (Manual Polarímetro automático Analytical Autopol I Rudolph Research):

- Se taró un matraz de 100 ml seco y se pesó $26 \text{ g} \pm 0.1 \text{ mg}$ de la muestra, luego se aforó con agua manteniendo el contenido a $293 \pm 1 \text{ K}$ ($20 \pm 1 \text{ °C}$).
- Se filtró la muestra empleando papel filtro con ayuda de una bomba al vacío.
- Se lavó el tubo de polarización, enjuagándolo de dos a tres veces con dos tercios del volumen de la muestra filtrada.
- Se llenó el tubo con la solución azucarada estando la temperatura cercana a los 20°C , esperamos que llegue a la temperatura de los 20°C en el canal del polarímetro.

Se realizó por duplicado, y se reportó el promedio.

Determinación de azúcares reductores (Metodo DNS Miller, 1959):

- Se tomó 0.5 ml de la muestra, se colocó en tubos de ensayo y se agregaron 0.5 ml del reactivo DNS.
- Los tubos fueron calentados en ebullición durante 5 minutos.
- Posteriormente, se frenó la reacción con hielo.
- Se adicionó 5 ml de agua destilada, se dejó reposar por 15 min, procurando que a los 12 min se lleve al agitador
- Se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm, utilizando agua + reactivo DNS, como blanco.
- La concentración se obtuvo interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado. Se realizó por duplicado, y se reportó el promedio.

Determinación de dextrano (Adaptado del Método Haze - ICUMSA-GS1/2/9-15, 2011):

- Se tomó 8 ml del simulado de jugo de caña en un vaso de precipitación y se añadió 1.6 ml de ácido tricloacético (10%) y 0.8ml de Cloruro de Bario (10%).
- Se llevó a filtrar la muestra anterior
- Del filtrado anterior se tomó dos muestras de la siguiente forma:
 - 1° 2ml de filtrado + 2ml de agua destilada
 - 2° 2ml de filtrado + 2ml de etanol
- Después de 20 minutos se leyó la absorbancia a 720nm, usando como blanco la 1° muestra. Una vez tomada la medida se calculó la dextrano empleando la siguiente formula determinada por la curva de calibrado:

$$ppm \text{ dextrano} = \frac{(abs + 0.039)}{0.0019} \times \frac{130000}{^{\circ}Brix \times \rho} \times FD$$

Donde:

Abs : Absorbancia media a 720nm

°brix : Grados brix de la muestra.

ρ : Densidad de la muestra (mg/ml)

FD : Factor de dilución (si en caso se diluye la muestra).

- **Determinación de las condiciones óptimas de hidrolisis de dextrano**

Diseño experimental.

Se utilizó el Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con tres factores (variables independientes): tiempo de reacción, concentración de enzima y temperatura de reacción; y como variable dependiente la concentración de dextranos. Las variables independientes y el plan experimental se muestran en los cuadros 9 y 10 respectivamente. Teniendo un diseño con 17 experimentos, los cuales 8 corresponden a un factorial de 2^3 , 3 tratamientos a los puntos centrales y 6 tratamientos a los puntos axiales con $\alpha = \pm 1.6818$. Los rangos fueron determinados según pruebas preliminares. En toda la experimentación se midió la concentración de dextrano (ppm) la cual conlleva a obtener resultados para a la optimización.

Tabla 8: Variables independientes del estudio

VARIABLES	-α	-1	0	1	A
Concentración de enzima (ppm)	120	165	230	295	340
Tiempo de hidrolisis (min)	15	21	30	39	45
Temperatura de reacción (°C)	30	36	45	54	60

Tabla 9: Diseño experimental DCCR para el Hidrólisis de dextrano por Acción de las Enzima Comercial Dextrafree

#	Concentración de Enzima (ppm)	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	- α	0	0
10	α	0	0
11	0	- α	0
12	0	α	0
13	0	0	- α
14	0	0	α
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0

Resultados estadísticos – Optimización final

Una vez obtenido los resultados de la hidrolisis, se efectuó el tratamiento de datos que se obtuvieron usando el software STATISTICA, empleando el ANOVA para los análisis estadísticos. Donde se analizó el % de reducción máxima de dextranos. Se ubicó la región experimental donde se encuentra el óptimo a través de la

maximización de resultados, ya que se deseaba un mayor porcentaje de reducción de dextrano.

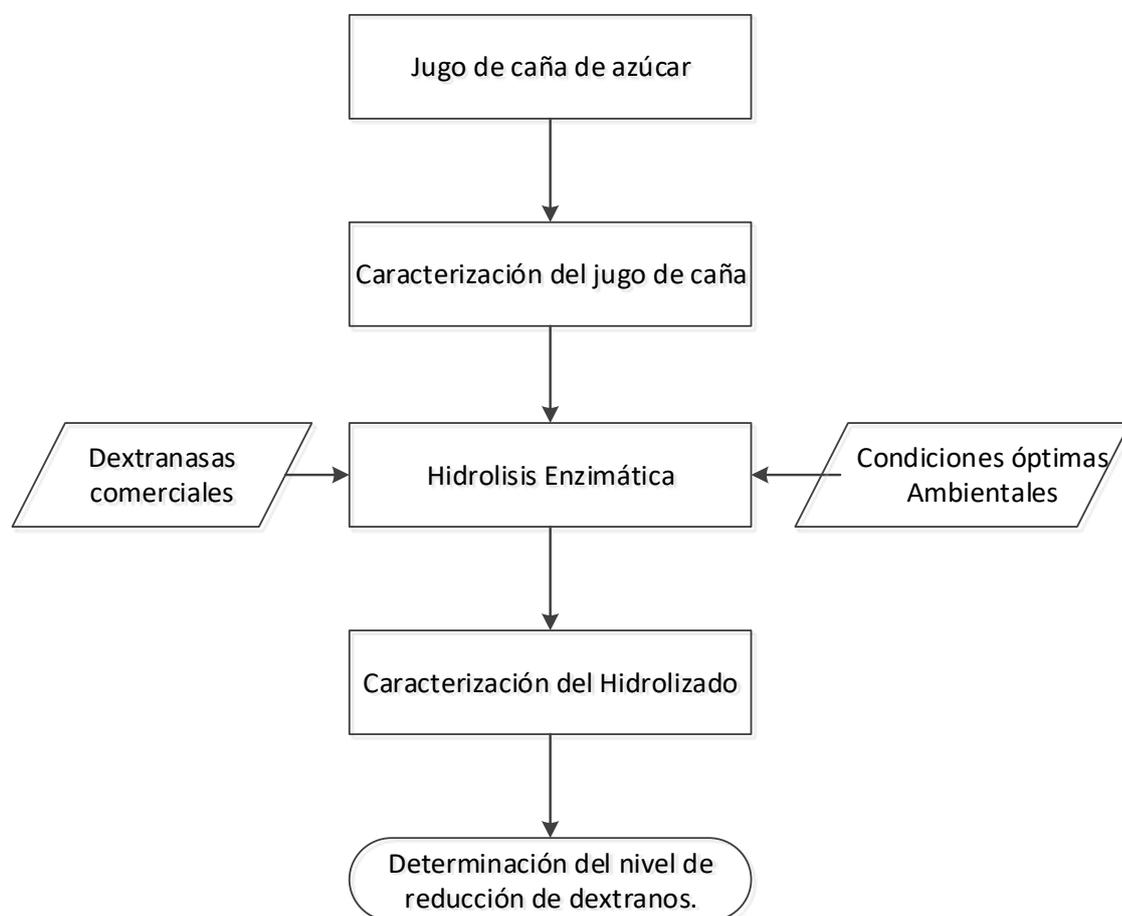


Figura 17: Segunda etapa del proceso de hidrólisis de dextrano (Hidrólisis del jugo de caña de azúcar)

Validación de resultados. Hidrólisis enzimática en jugo de caña de azúcar

- *Obtención del jugo de caña de azúcar*

El jugo de caña de azúcar fue extraída, luego de 60 horas de haber sido cosechada, por el trapiche de laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa. Fue recepcionada en un recipiente y dirigido rápidamente al laboratorio para realizar sus análisis fisicoquímicos y el hidrolizado con los parámetros ambientales óptimos.

- ***Caracterización del jugo de caña de azúcar***

Para la caracterización del jugo de caña de azúcar, se trasladó rápidamente luego de su extracción al laboratorio, se coló y se reservó por unos minutos en un vaso precipitado.

Se realizó los siguientes análisis:

Determinación de grados Brix. (NMX-F-436-SCFI-2011)

Para la determinación de grados brix del jugo de caña de azúcar, se realizó como descrito anteriormente.

Determinación de la viscosidad (Viscosímetro ostwald)

- Se tomó aproximadamente 100ml de muestra
- Se calculó la densidad del agua pura y de la muestra (se determinó a través de un picnómetro.
- Se midió la viscosidad dinámica de la muestra, contabilizando el tiempo que de demora en descender la muestra de una marca hasta la otra según muestra el capilar. (Ver la descripción en anexos). Luego de obtención del tiempo se calculó en la siguiente formula:

$$\eta = \rho \times C_{cap.} \times t$$

Donde:

η : viscosidad relativa

ρ : densidad

$C_{cap.}$: Constante de viscosímetro Cannon –Fenske (Ver anexo 4)

t: tiempo transcurrido de descenso

Se realizó por duplicado, y se reportó el promedio

Determinación de pH (acoplado del Método ICUMSA GS1/2/3/4/7/8/9-23 (2007)).

Para la determinación de pH del jugo de caña de azúcar, se realizó lo mismo que lo descrito anteriormente.

Determinación del porcentaje de pol (Manual polarímetro automático Analytical Autopol I Rudolph Research).

Para la determinación de porcentaje de pol de jugo de caña de azúcar, se realizó:

- Se extrajo el jugo de la caña y se coló, realizando la operación rápidamente para evitar el deterioro del jugo de caña.
- Se taró un matraz de 100 ml seco y se pesó $26 \text{ g} \pm 0.1 \text{ mg}$ de la muestra a analizar, luego se aforó con agua manteniendo el contenido a $293 \pm 1 \text{ K}$ ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).
- Se agregó 10 gramos de carbón activado, se agitó, se dejó reposar por 15 min y se filtró empleando papel filtro (125mm) con ayuda de una bomba al vacío.
- Se lavó el tubo de polarización, enjuagándolo de dos a tres veces con dos tercios del volumen de la muestra filtrada.
- Se llenó el tubo con la solución azucarada estando la temperatura cercana a los 20°C , esperamos que llegue a la temperatura de los 20°C en el canal del polarímetro.
- Realizamos las lecturas de polarización y su correspondiente temperatura, 2 lecturas se tomaron.

Determinación de azúcares reductores - Método de DNS

Para la determinación de azúcares reductores del jugo hidrolizado se procedió como lo descrito anteriormente.

Determinación de dextranos (Adaptado del Método Haze - ICUMSA-GS1/2/9-15, 2011)

- La muestra de jugo de caña de azúcar previamente colada, se tomó 10 ml en un vaso de precipitación y se añadió 2 ml de ácido tricloroacético (10%) y 1 ml de cloruro de bario 10%.
- Se llevó a filtrar la muestra anterior
- Del filtrado anterior se tomó dos muestras de la siguiente forma:
 - 1° 5ml de filtrado + 5ml de agua destilada
 - 2° 5ml de filtrado + 5ml de etanol
- Después de 20 minutos se leyó la absorbancia a 720nm, usando como blanco la 1° muestra. Una vez tomada la medida se calculó la dextrano empleando la formula anteriormente indicada.
- ***Hidrólisis enzimática del jugo de caña.***

Una vez analizado el jugo de caña de azúcar, se tomó 100 ml y se colocó en el minireactor a cada vaso, ya que se realizó por duplicado. Con los datos obtenidos en la optimización, se realizó la hidrolisis. Una vez culminado se dejó enfriar y se determinó la cantidad de dextranos, azúcares reductores, así como los demás análisis (°brix, pH sacarosa y viscosidad).

- ***Caracterización del jugo de caña hidrolizado.***

Se efectuó de la misma manera antes descrita.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización de la enzima.

4.1.1. Determinación de proteínas, rango de linealidad y Actividad enzimática de la enzima comercial Dextranfree.

Dentro la caracterización de la enzima Dextranfree, se determinó la concentración de proteínas con el método de Bradford, el cual se obtuvo un contenido de 89.41 mg/L.

Luego se determinó el rango de linealidad a través de la medición de velocidad inicial de reacción, tomando la pendiente de esa recta como velocidad inicial, ya que a tiempos más largos, el proceso de la reacción se aparta de la linealidad.

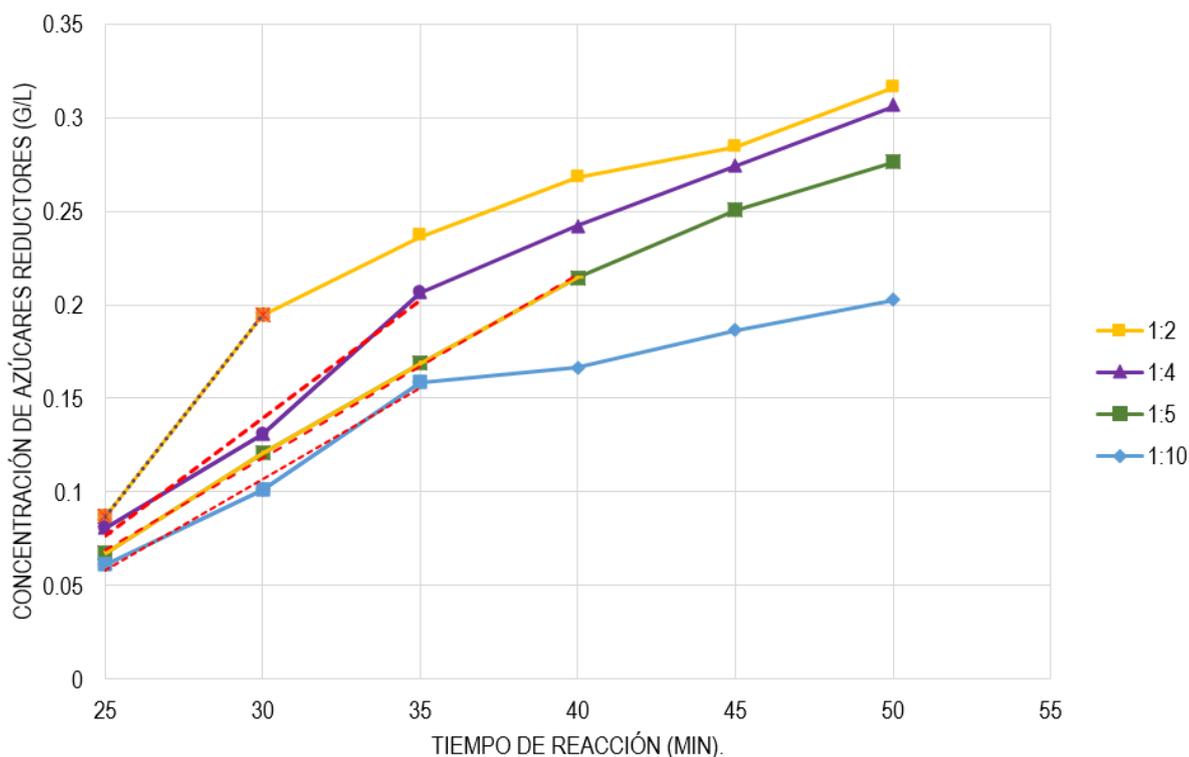


Figura 18: Perfiles de rango de linealidad (diluciones 1:2, 1:4, 1:5 y 1:10 actuando sobre la dextrano).

En la figura N°18, se puede observar que la dilución 1:5 es la que presenta una linealidad durante un tiempo de 15 minutos, en diferencia al comportamiento de las demás diluciones. Eligiendo esa dilución para la realización del trabajo y el desarrollo de la caracterización.

Es necesario destacar que en una reacción enzimática se pueden diferenciar tres fases: fase de retardo, fase lineal y fase de agotamiento de sustrato. La fase de retardo tiene lugar inmediatamente después de mezclar los reactivos con la muestra, es una fase de encuentro y acoplamiento de sustrato y enzima, en el caso de la Dextranasa además de su adaptación sufre variaciones con respecto al rompimiento de enlaces del sustrato (dextrano), esto se debe a la estructura de la dextrano, en este caso el origen es de origen del *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B512F , por tanto tiene mayor porcentaje de enlaces 1-6, 95%, y un 5% de 1-3 (Barker et al. citado en Bourne et al., 1962), como los enlaces 1-6 son más débiles, van a romperse más rápido, sin embargo los 1-3, tardan mayor tiempo, por lo que en la primera parte va sufrir esa desestabilización en la producción de azúcares reductores, hasta que encuentre un rompimiento progresivo que indica la fase lineal; la cual es la fase en la que la formación de producto permanece constante; por último, a medida que va transcurriendo la reacción, llega un momento en que el sustrato u otro reactivo se van agotando (fase de agotamiento de sustrato) y la velocidad de reacción disminuye hasta anularse. Por tal motivo, es que para el desarrollo del rango de linealidad se tomó como punto de inicio a los 25 minutos, ya que tiempo menor a esa el comportamiento es irregular y el tiempo de producción constante los siguientes 25 min.

Por otra parte, para poder obtener una determinación enzimática válida es necesario la determinación del rango de linealidad; y haberse realizado en la fase lineal donde

el único factor limitante es la concentración de la propia enzima y las condiciones de reacción son las óptimas (exceso de sustrato y otros reactivos). Si la concentración de enzima aumenta, la actividad de reacción aumenta, esto debido a que la enzima tendría un mayor poder catalítico, pues mientras más sustrato se tenga mayores sitios activos habrá través de las pendientes que presenta cada dilución, pues a mayor pendiente mayor capacidad catalítica y mayor concentración de enzima, y mientras este se vaya diluyendo la capacidad catalítica de la enzima disminuye.

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de actividad de la misma, por lo que la medida de la actividad es dependiente de las condiciones. La actividad específica enzimática calculado con 1:5 de concentración de enzima, a 45°C por un tiempo de 25 min fue de 4253.96 UD/mg y la actividad volumétrica fue de 0.38 UD/ml considerado del estudio de rango de linealidad, dicho resultado es superior a una enzima obtenida de la misma fuente, purificado por Cromatografía de intercambio de iones, 1105.8UD/mg, sin embargo esta tiene otra metodología empleada, en base a obtención de maltosa (Virgen et al., 2015). Hasta ahora es un poco complicado poder hacer comparaciones de la actividad enzimática de enzimas comerciales de su ficha técnica con las efectuadas para su caracterización, ya que no indican la metodología empleada (Eggleston & Mongeb, 2005). Además se indica que la Dextranasa mas empleada, reconocida como segura es la de *Chaetomium erraticum*. Trayendo consigo óptimos rendimientos ya aprobados por algunos estudios.

4.1.2. Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos, k_m y V_{max} , tiene como principal finalidad, caracterizar a la Dextranasa DEXTRANFREE, ya que estos parámetros expresan la constante de afinidad hacia el sustrato (k_m) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}). La experiencia de la determinación de los parámetros cinéticos se realizó con dilución de enzima 1:5, asimismo se requirió de un sustrato, dextrano, a diferentes diluciones, para propiciar la reacción enzima – sustrato, obteniéndose así 6 puntos como muestra en el figura 19, se observa que las velocidades de reacción inicial aumenta con el incremento en la concentración de sustrato, lo cual se puede explicar con el método de Michaelis-Menten y finalmente se determina los parámetros empleando la gráfica Lineweaver –Burk, como se puede observar en la figura 20.

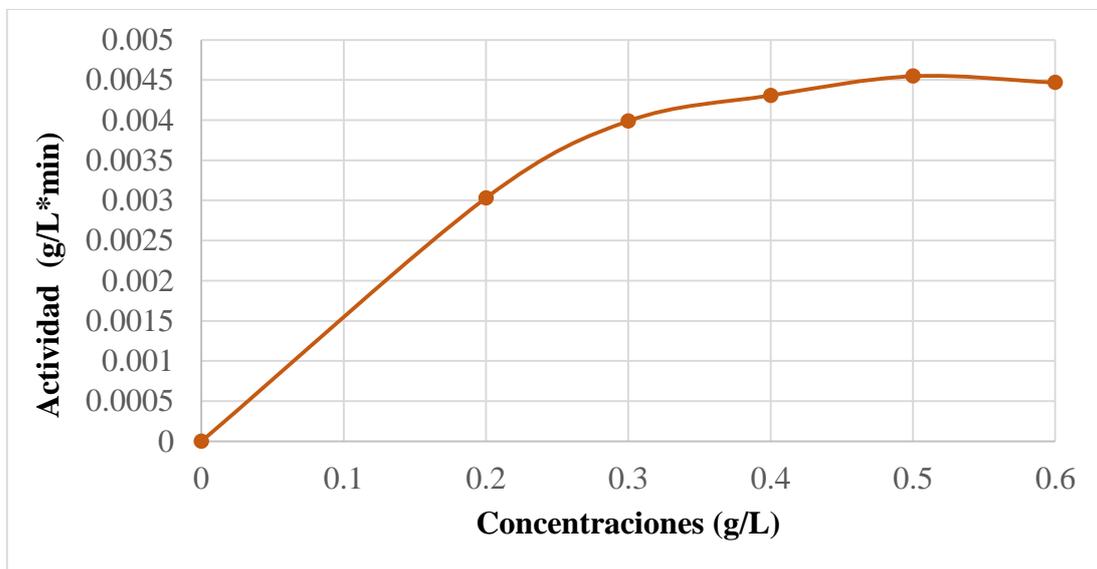


Figura 19. Efecto de concentración de sustrato (Dextrano) en la actividad enzimática

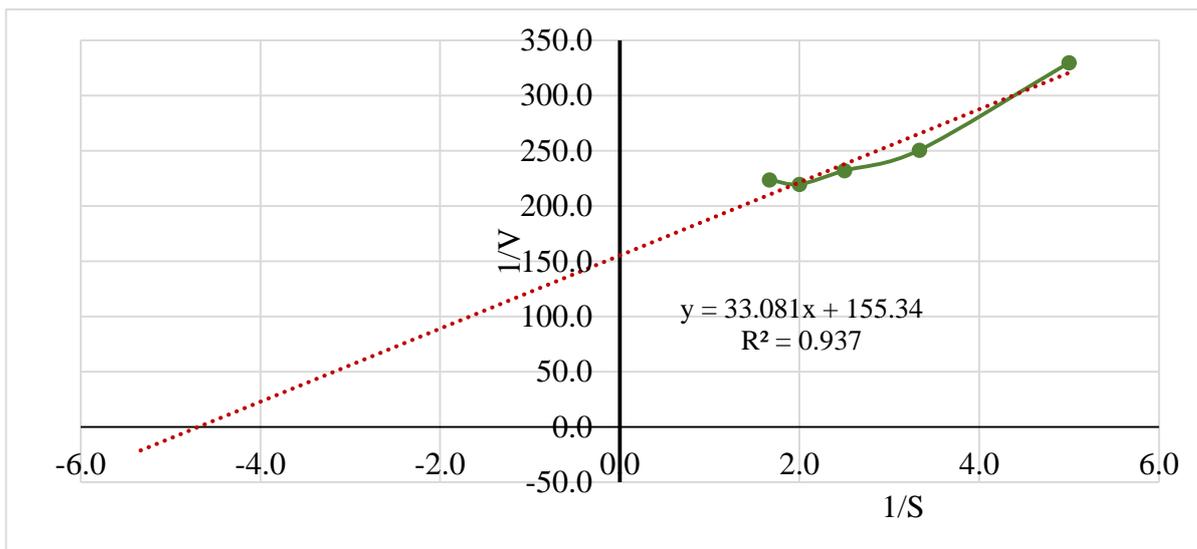


Figura 20. Gráfica de Lineweaver –Burk para determinación de parâmetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de la enzima comercial Dextranfree son Km 0.215 g/L y Vm 0.006 g/L.min. No existen muchos resultados, los cuales indiquen los parámetros cinéticos de la Dextranasa, por lo que no puede realizarse comparaciones. Existen algunas que muestran otro tipo de procedimiento y donde arrojo para una enzima purificado por Cromatografía de intercambio de iones, valores de Vmax y Kmax de $2,6 \pm 0,1\%$ (260 μ M) y $2280 \pm 9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$, respectivamente (Virgen et al., 2015).

4.2. Hidrolisis enzimática del simulado de caña

4.2.1. Obtención del simulado y su caracterización.

Se obtuvo el simulado bajo las condiciones indicadas, sin embargo, se realizó una caracterización para la evaluación antes y después de hidrolizar. En el cuadro N°10 se muestra las características del simulado.

Tabla 10: Características del simulado de jugo de caña

Característica	Resultado
°Brix	15.3 °Brix
pH	5.5 pH
Sacarosa (pol)	15 %
Azúcares reductores	0.002 g/L
Dextrano	500ppm

4.2.2. Optimización de hidrólisis enzimática de dextrano utilizando el DCCR en el medio simulado.

Optimización de las variables significativas utilizando el DCCR.

Seleccionados y definidos los valores de las tres variables significativas, mediante la aplicación del DCCR se obtuvieron 17 corridas experimentales. Los experimentos se realizaron mediante el sistema de cultivo por lote en mini biorreactores de 100 ml de capacidad, los cuales fueron analizados según el diseño factorial completa (Diseño Compuesto Rotacional – DCCR) y el análisis o metodología de superficie de respuesta (RSM). Las tres variables independientes fueron estudiadas en cinco niveles y codificadas como se muestra en el cuadro 11:

Tabla 11: Valores de variables independientes a diferentes niveles del diseño de experimentación DCCR.

Variable Independiente	Símbolo	Niveles codificados				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Concentración de Enzima (ppm)	X_1	120	165	230	295	340
Tiempo de Reacción (min)	X_2	15	21	30	39	45
Temperatura de Reacción (°C)	X_3	30	36	45	54	60

El cuadro 12 presenta la manera en que los experimentos fueron conducidos según el planeamiento DCCR de 17 corridas (8 ensayos factoriales, 6 axiales y 3 puntos centrales).

Tabla 12: Matriz del diseño compuesto central rotacional para las variables independientes en su forma codificada y natural.

N° Corrida	X1 (ppm)	X2 (min)	X3 (°C)	Reducción Dextrano (%)
1	-1 (165)	-1 (21)	-1 (36)	40
2	-1 (165)	-1 (21)	1 (54)	46
3	-1 (165)	1 (39)	-1 (36)	52
4	-1 (165)	1 (39)	1 (54)	60
5	1 (295)	-1 (21)	-1 (36)	48
6	1 (295)	-1 (21)	1 (54)	59
7	1 (295)	1 (39)	-1 (36)	68
8	1 (295)	1 (39)	1 (54)	80
9	- α (120)	0 (30)	0 (45)	42
10	α (340)	0 (30)	0 (45)	75
11	0 (230)	- α (15)	0 (45)	46
12	0 (230)	α (45)	0 (45)	77
13	0 (230)	0 (30)	- α (30)	46
14	0 (230)	0 (30)	α (60)	51
15	0 (230)	0 (30)	0 (45)	59
16	0 (230)	0 (30)	0 (45)	59
17	0 (230)	0 (30)	0 (45)	59

X_1 = **Concentración de Enzima (ppm)**

X_2 = **Tiempo de Reacción (min)**

X_3 = **Temperatura de Reacción (°C)**

Los resultados obtenidos del diseño experimental se muestran en la cuadro 13. Si bien se planteó determinar de manera directa (método espectrofotométrico) y de manera indirecta (azúcares reductores) el nivel de dextrano en el medio simulado después de la hidrólisis enzimática, cabe recalcar que el resultado principal es el porcentaje de reducción de dextrano en el medio simulado, posteriormente validado en el jugo de caña de azúcar.

Tabla 13: Porcentaje de reducción de dextrano en cada condición de la matriz experimental

	Concentración de Enzima (ppm)	Tiempo de Reacción (min)	Temperatura de Reacción (°C)	Reducción Dextrano (%)	Reducción Dextrano predictivo (%)
1	165	21	36	40	39
2	165	21	54	46	43
3	165	39	36	52	52
4	165	39	54	60	58
5	295	21	36	48	50
6	295	21	54	59	58
7	295	39	36	68	70
8	295	39	54	80	80
9	120	30	45	42	45
10	340	30	45	75	73
11	230	15	45	46	47
12	230	45	45	77	76
13	230	30	30	46	43
14	230	30	60	51	54
15	230	30	45	59	59
16	230	30	45	59	59
17	230	30	45	59	59

Como se puede apreciar en el cuadro 13 el valor más alto de porcentaje de reducción de dextrano en el medio simulado fue del 80%, que corresponde a la corrida numero 8; para alcanzar este porcentaje de reducción se hidrolizo la dextrano desde 500 ppm a 104 ppm en las siguientes condiciones, con un tiempo de 39 min, a un temperatura de reacción de 54 °C y aun concentración enzimática de 295 ppm. El 80% que se hidrolizo en esta corrida corresponde a una hidrolisis de 396 ppm de dextrano durante todo el proceso.

Si bien la corrida numero 8 muestra el mayor porcentaje de reducción de dextrano en el medio simulado, el porcentaje de reducción requerido por el presente trabajo de investigación es del 70%, lo cual se verifico en la tabla de corridas y se comprobó

que el dato requerido se encuentra más cercano de las corridas número 7, 10 y 12; la cuales muestran un porcentaje de reducción del 68%, 75% y 77% respectivamente. Haciendo una comparación con la investigación según Aguilar (2010). En su investigación titulada “Kinetic Model Of Hydrolysis Of Sugarcane Waste”. donde explica que el tratamiento del molino jugo con Dextranasa redujo el contenido de dextrano en un 78% y se usaron tiempos de reacción de 40-60 minutos a 43 ° C., donde podemos apreciar claramente que las condiciones de trabajo son parecidas tanto en concentración de enzima, tiempo y temperatura de reacción, si bien el resultado y las condiciones no son las mismas esto se debe al origen de la Dextranasa y a las condiciones de experimentación. Pero con lo ya mencionado podemos afirmar que los datos tomados como referencia para la investigación son los correctos.

Las enzimas de las mismas familias por lo general tienen condiciones ambientales parecidas es decir su rango ya sea de tiempo, temperatura o concentración siempre se encuentran cercanos. En este caso si hablamos de Dextranasas podemos afirmar que si bien la investigación citada no trabaja con la misma enzima, trabaja con una Dextranasa de la cual sus condiciones ya dadas se asemejan a la nuestra por lo que se puede afirmar que nuestro trabajo de investigación va a tener un resultado semejante al ya presentado.

EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE DEXTRANO

El gráfico de Pareto para cada factor de estudio con su respectiva respuesta con todos los efectos posibles estandarizados se ilustra en la figura 21 a un nivel de confianza del 0.05. En el esquema se puede observar que el tiempo de reacción (efecto lineal) es el factor que tuvo mayor influencia sobre la variable respuesta, seguido por la

concentración de la enzima (efecto lineal) y por último se encuentra la temperatura de reacción, las cuales tuvieron un efecto significativo.

También se pudo notar en la figura 21, que las interacciones de las variables no tuvieron ningún efecto significativo sobre el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña estudiado. Así mismo se comportaron de manera similar el tiempo de reacción (efecto cuadrático) y la temperatura de reacción (efecto cuadrático), las cuales no ejercieron un efecto significativo.

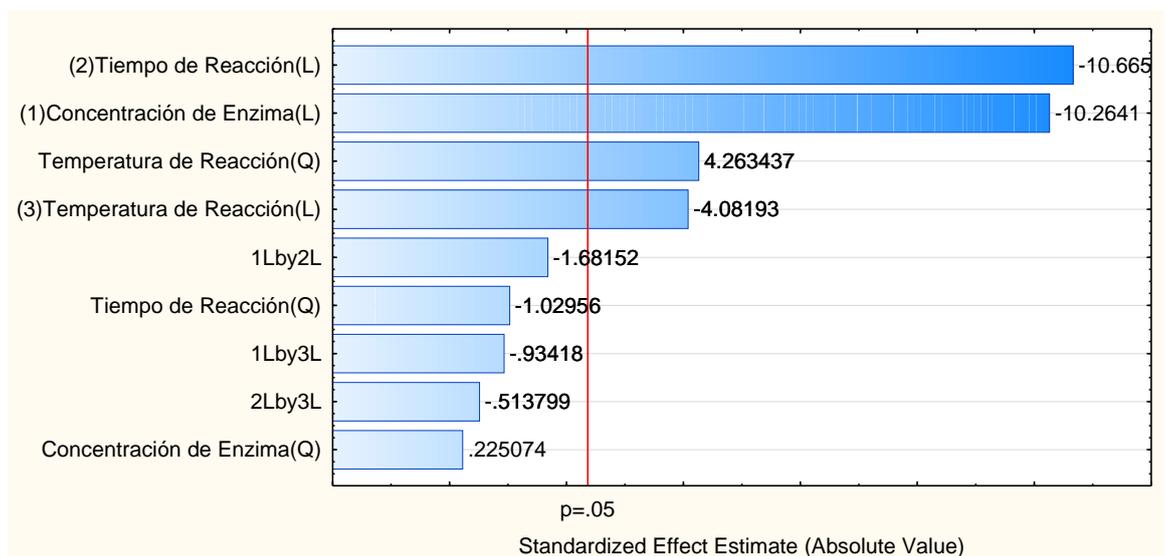


Figura 21. Gráfico de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña (%). En el hidrolizado en el cual se utilizó la enzima comercial DEXTRAN FREE. Las variables independientes fueron concentración de la Enzima (ppm), Tiempo de Reacción (min) y Temperatura de Reacción (°C).

Los resultados del análisis de la gráfica de Pareto se confirmaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), la cual se presenta en la cuadro 14. El modelo de regresión de segundo orden que se ajustó a los experimentales fue el siguiente:

Ecuación en términos de los efectos codificados:

$$Y = 59.34 + 16.52X_1 + 17.21X_2 + 6.50X_3 - 0.38X_1^2 + 1.84X_2^2 - 7.53X_3^2 + 3.60X_1X_2 + 1.99X_1X_3 + 1.06X_2X_3$$

Ecuación en términos de factores actuales o reales:

$$Y = -55.20 - 0.02X_1 - 0.74X_2 + 4.04X_3 + 0.00X_1^2 + 0.01X_2^2 - 0.05X_3^2 + 0.0031X_1X_2 + 0.0017X_1X_3 + 0.0067X_2X_3$$

Eliminando solo las interacciones X_1X_2 ; X_1X_3 y X_2X_3 pero, menos la variables X_1^2 y X_2^2 , por ser estas variables o factores principales y porque descartando hace que en la solución de la ecuación diferencial las variables puedan obtener el valor cero, haciendo de esta manera que la solución de los valores óptimos de los factores sean erróneos.

Tabla 14: Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta %Reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña; hidrolizado con la enzima comercial DEXTRAN FREE.

	SS	df	MS	F	P
(1)Concentración de Enzima(L)	931.685	1	931.685	104.3973	0.000019
Concentración de Enzima(Q)	0.415	1	0.415	0.0465	0.835452
(2)Tiempo de Reacción(L)	1011.499	1	1011.499	113.3407	0.000014
Tiempo de Reacción(Q)	9.546	1	9.546	1.0696	0.335435
(3)Temperatura de Reacción(L)	144.324	1	144.324	16.1719	0.005050
Temperatura de Reacción(Q)	159.790	1	159.790	17.9048	0.003881
1L by 2L	25.987	1	25.987	2.9119	0.131693
1L by 3L	7.945	1	7.945	0.8903	0.376816
2L by 3L	2.248	1	2.248	0.2519	0.631143
Error	62.471	7	8.924		
Total SS	2399.686	16			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (<F)

$R^2 = 0,9740$ y $R^2_{\text{ajustado}} = 0,9589$

$F_{\text{valor}} > F_{0.05(5,7)}_{\text{tabular}} = 3,972$

^aSignificativo para p-Valores $\leq 0,05$

Se pudo observar en la tabla de análisis de varianza que los factores o variables independientes tuvieron un nivel de significancia sobre el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña; también se puede observar que los efectos cuadráticos de los factores de concentración de enzima y tiempo de reacción no tuvieron un efecto significativo sobre la experiencia. De esta misma manera se puede observar el mismo comportamiento con las interacciones de los factores, es decir no tienen ningún tipo de efecto significativo sobre esta experiencia. Es decir que si bien estos factores independientemente pueden tener un efecto de significancia sobre la experiencia, esto no asegura que su interacción también tenga un efecto similar. Con esta tabla se puede comprobar que se puede lograr una reducción de dextrano manejando los factores independientemente ya que su interacción no garantiza un efecto sobre la mayor hidrólisis de dextrano en el simulado e jugo de caña.

Nuevamente, los resultados del análisis de la gráfica de Pareto (figura 22) son confirmados por los análisis de varianza (ANOVA) para el modelo reducido de segundo orden, presentados en la cuadro 15, indicándose que el efecto lineal y cuadrático de la temperatura de reacción, concentración de enzima y tiempo de reacción estos últimos solo con efecto lineal hicieron significativo la respuesta del %Reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña.

El ajuste del modelo fue verificado con la variación del coeficiente de determinación R^2 , el que fue de 0.9740 para el %Reducción de dextrano en el simulado de jugo de

caña. Que se interpreta como el 97.40% de la variabilidad de la respuesta observada que se puede explicar mediante el modelo ajustado en la forma codificada.

El análisis de la AAD arrojó un valor aceptable del 0.00% que en conjunto con el R^2 confirman que el modelo es adecuado para describir el diseño experimental.

Por otro lado el coeficiente ajustado ($\text{adj}R^2$) fue de 0.9589, el cual representa un valor cercano a 0.9740 que asegura el ajuste satisfactorio del modelo polinomial a los datos experimentales:

El análisis de la AAD arrojó un valor aceptable del 0.00% que en conjunto con el R^2 confirman que el modelo es adecuado para describir el diseño experimental.

Ecuación final en términos de los factores codificados:

$$Y = 59.34 + 16.52X_1 + 17.21X_2 + 6.50X_3 - 0.38X_1^2 + 1.84X_2^2 - 7.53X_3^2$$

Ecuación final en términos de los factores actuales o reales:

$$Y = -103.32 + 0.15X_1 + 0.27X_2 + 4.64X_3 + 0.00X_1^2 + 0.01X_2^2 - 0.05X_3^2$$

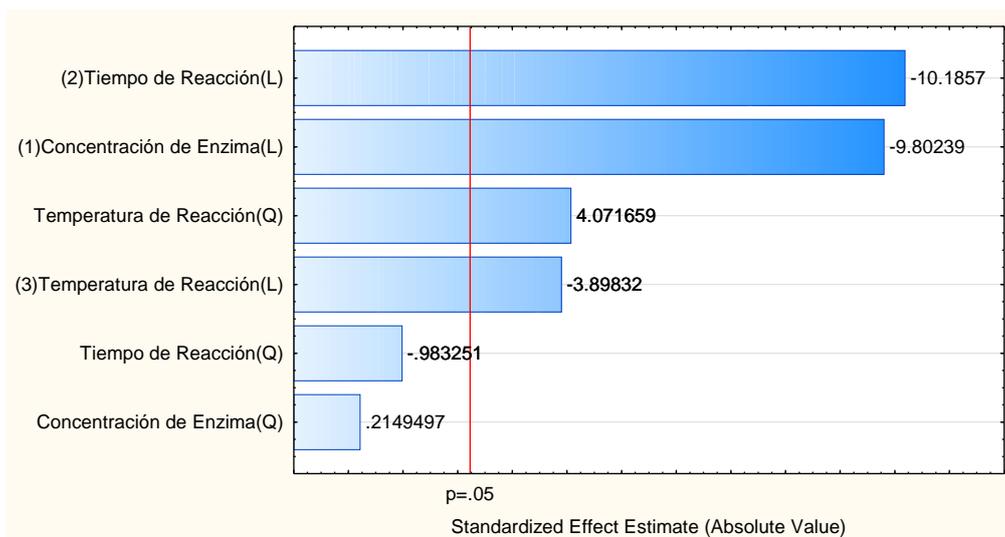


Figura 22. Gráfico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados para el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña (%); en el hidrolizado en el que se utilizó la enzima comercial DEXTRAN FREE. Las variables independientes fueron concentración de la Enzima (ppm), Tiempo de Reacción (min) y Temperatura de Reacción ($^{\circ}$ C).

Tabla 15:Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo reducido de segundo orden de la respuesta de porcentaje de reducción de dextrano en simulado de jugo de caña, utilizando la enzima comercial DEXTRAN FREE.

	SS	df	MS	F	p
(1)Concentración de Enzima(L)	24144.07	1	24144.07	96.0869	0.000002
Concentración de Enzima(Q)	11.61	1	11.61	0.0462	0.834127
(2)Tiempo de Reacción(L)	26069.29	1	26069.29	103.7488	0.000001
Tiempo de Reacción(Q)	242.93	1	242.93	0.9668	0.348674
(3)Temperatura de Reacción(L)	3818.57	1	3818.57	15.1969	0.002969
Temperatura de Reacción(Q)	4165.71	1	4165.71	16.5784	0.002244
Error	2512.73	10	251.27		
Total SS	62095.53	16			

En el cuadro de análisis de varianza corregida podemos observar que se mantienen los factores que tuvieron un efecto significativo sobre el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña, también se mantuvieron los factores de

efecto cuadrático debido a que son factores principales y es necesario mantenerlos para poder extraer los valores óptimos reales.

En el cuadro 16, muestra la significancia de cada coeficiente codificado (factor real), los que fueron determinados por la prueba t student y los valores-p. Valores-p de pequeña magnitud se asocian con valores t altos, los que implican que los coeficientes de regresión sean más altos que el error estándar.

Tabla 16: Significancia de cada coeficiente codificado (factor real)

	Efecto	Coefficiente de regresión	Error estándar	t(10)	P	-95.%	+95.%
Mean/Interc.	59.33833	-103.320	1.809838	32.78654	0.000000	55.30576	63.37090
(1)Concentración de Enzima(L)	16.51920	0.147	1.699831	9.71815	0.000002	6.36587	10.15333
Concentración de Enzima(Q)	-0.38364	0.000	1.870912	-0.20506	0.841641	-2.27615	1.89250
(2)Tiempo de Reacción(L)	17.21224	0.270	1.699831	10.12586	0.000001	6.71239	10.49985
Tiempo de Reacción(Q)	1.84037	0.012	1.870912	0.98367	0.348476	-1.16414	3.00451
(3)Temperatura de Reacción(L)	6.50166	4.643	1.699831	3.82489	0.003347	1.35710	5.14456
Temperatura de Reacción(Q)	-7.52968	-0.048	1.870912	-4.02460	0.002420	-5.84916	-1.68051

El cuadro 17 presenta los valores reales de los factores o variables independientes que dan valor más alto de la respuesta de porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña a partir del su hidrolizado con la enzima comercial DEXTRAN FREE. Estos valores se encuentran dentro el rango de los niveles estudiados, el punto estacionario del modelo cuadrático ajustado, constituye un máximo de la respuesta el cual corresponde a un valor de 70%, con una concentración de enzima de 224 ppm, 32 minutos de reacción y a 46°C de temperatura.

Tabla 17: Valores óptimos determinados a partir del modelo matemático experimental, %Reducción de dextrano, ajustado para las experiencias de validación.

Factor	Valor mínimo Observado	Valor Óptimo	Valor máximo Observado
Concentración de Enzima (ppm)	120	224	340
Tiempo de Reacción (min)	15	32	45
Temperatura de Reacción (°C)	30	46	60

Mahmoud (2014) menciona que, la Dextranasa es más activa a temperaturas entre 40-50 C y a valores de pH entre 4.8-5.4. Por lo tanto, la etapa más adecuada para su adición al proceso es jugo mezclado antes de calentar y encalar. En esta etapa, los polisacáridos no habrán interferido con el proceso.

La Dextranasa dextranfree se presentó de manera más activa a un pH de 5.5 y su rango de temperatura vario de 30 – 60 °C. si bien el pH de la enzima presentada en la investigación no son las mismas están se encuentra cercanas debido a que el jugo de la caña tiene a tener un comportamiento ácido que es lo que hace que tienda al deterioro favoreciendo a la formación de dextrano en el jugo de caña de azúcar, también podemos observar que los rangos de temperaturas de trabajo son distintos debido a que el rango en nuestro trabajo es más amplio pero esto nos permite que el estudio sea más exacto es decir que mientras más amplio sea el rango de estudio los resultados obtenidos son más confiables, esto se basa en que el valor óptimo de la temperatura es de 46 °C, entonces si bien los rangos en ambas investigaciones son distintas, el valor encontrado se encuentra dentro del rango planteado por la investigación de Mahmoud, con lo que podemos decir que nuestra respuesta es correcta.

La visualización de la ecuación del modelo predictivo puede obtenerse por el plano de superficie de respuesta y por el plano de contorno. El plano de superficie de respuesta es un plano teórico tridimensional que muestra la relación entre la respuesta y las variables independientes. La proyección o pantalla de dos dimensiones del plano de superficie se llama plano de contorno, las líneas de respuesta constante son trazadas en el plano de las variables independientes. Los planos de contorno ayudan a visualizar la forma de una superficie respuesta.

Estos planos dan información útil acerca del ajuste o arreglo del modelo pero estos no pueden representar el verdadero comportamiento del sistema.

Las respuestas para el modelo de regresión ajustado se presentaron gráficamente en las figuras 23 y 24. Los planos de superficie de respuesta y de contorno se generaron por la combinación de pares de los tres factores de estudio, mientras se mantenía el otro en sus niveles óptimos para la reducción del nivel de dextrano en el simulado de jugo de caña expresado como porcentaje de reducción.

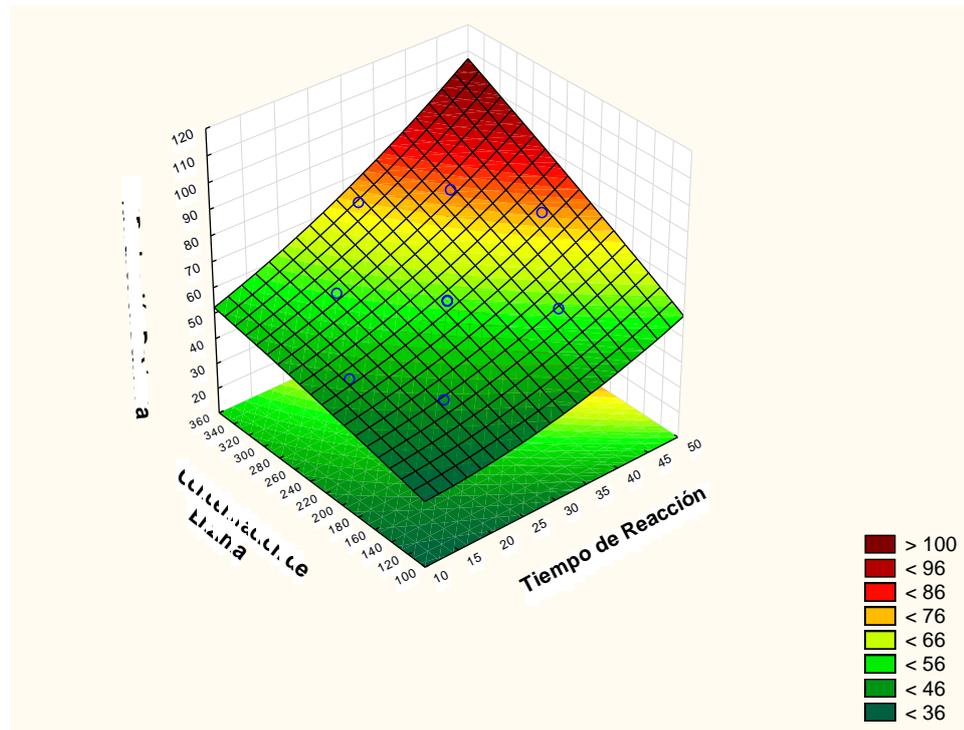


Figura 23. Planos de la superficie de respuesta y contorno para optimizar el porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrólisis enzimática realizado con la enzima comercial DEXTRAN FREE; tomando como ejes dos de sus factores, concentración de enzima (Y), tiempo de reacción (X).

La figura 23, ilustra el efecto tanto del tiempo de reacción como de la concentración de la enzima sobre el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña, con una concentración de dextrano inicial de 500 ppm, mostrando una superficie con mínimos y máximos, y un plano de contorno que representa la interacción de estos dos factores, con líneas hiperbólicas, que confirman el punto estacionario de la figura presentada. La figura muestra que manteniendo constante el tiempo de reacción en 39 min y aumentando o disminuyendo la concentración de la enzima dextran free, dentro de unos niveles máximos o mínimos, la hidrólisis se mantendrá en un nivel de reducción del 70% de dextrano.

Si bien el gráfico nos muestra un porcentaje máximo de reducción que tiene un rango cercano al 90% de hidrólisis, la condición máxima buscada y planteada es del 70%. Este porcentaje se encuentra entre los colores verde y amarillo de tonalidad clara.

En la figura 23 podemos observar que la región óptima es de color rojo, la que nos muestra el mayor porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrólisis enzimática.

La región que nos ayuda a encontrar las condiciones ambientales de concentración de enzima y tiempo de reacción óptimas, se encuentran en un rango de 200 a 300 ppm y 30 a 35 min, respectivamente. Lo que nos da como resultado un porcentaje de reducción planteado en el trabajo de investigación.

Según Aguilar (2010). En su investigación titulada “Kinetic Model Of Hydrolysis Of Sugarcane Waste”. En un tiempo de reacción de 20 minutos, el grado de eliminación de dextrano fue independiente de la concentración de enzima. A una concentración de enzima de solo 30 unidades / 100 ml de jugo, el porcentaje medio de eliminación de dextrano fue del 68%. Este resultado se compara favorablemente con los procesos comerciales de eliminación de almidón en fábricas azucareras del sur de África utilizando amilasas.

Esto confirma lo que se pudo observar en los análisis de los factores es decir que no existe interacción entre estos factores, y con lo citado anteriormente podemos avalar que lo encontrado en el análisis tiene una base teórica ya experimentada. Con esto podemos ver que si bien el tiempo es muy importante en el momento de realizar la hidrólisis, debido a que con el tiempo podemos observar si es factible poder manejar la temperatura en cierto volumen, este llega a un punto donde es independiente a la concentración de enzima, es decir que llega un punto donde la enzima por más tiempo

que se le da el resultado va a seguir siendo el mismo en la experimentación. Por ello es importante el estudio de estos factores ya que si bien estos no tienen alguna interacción esta investigación nos ayuda a conocer mejor el comportamiento de los factores lo que nos ayuda a elegir los puntos óptimos de análisis.

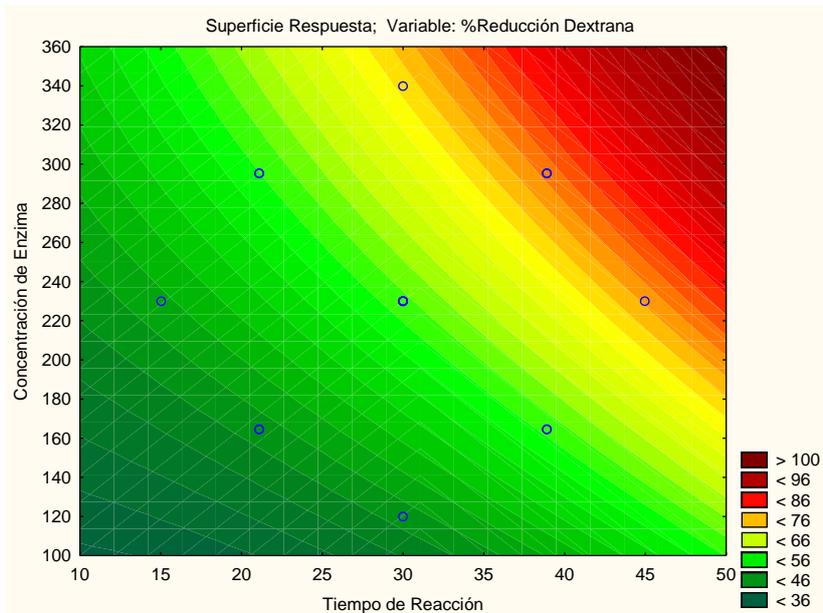


Figura 24: Contorno de superficie respuesta para el proceso de hidrólisis enzimática de la dextrano.

Lo mencionado se puede apreciar concretamente en la figura 24 en donde se puede apreciar los contornos de superficies de respuesta. La superficie de color amarillo y verde claro muestra la zona óptima de la hidrólisis enzimática realizada debido a que en esta zona encontramos el porcentaje de reducción de dextrano planteado al inicio de la investigación.

Si bien la zona de color marrón muestra el área de mayor hidrólisis de dextrano y el área de color verde oscuro muestra el menor porcentaje de hidrólisis, en la presente investigación lo que se tiene como objetivo lograr es un 70% de reducción de la dextrano después de su planteada hidrólisis; por lo tanto con lo ya mencionado antes

la zona de interés sería la zona de color naranja la que nos brinda el porcentaje requerido en la investigación.

En el gráfico de contorno da a notar claramente que la relación de las variables de tiempo y concentración de enzima se pueden relacionar de manera inversa es decir que si una de las variables aumenta la otra en cuestión tiene que reducir pero esta no afecta el resultado del porcentaje de reducción de dextrano en la hidrólisis; esto se debe en que a mayor tiempo de reacción la enzima tiene más tiempo para hidrolizar los enlaces presentes en la estructura de la dextrano, lo que puede conllevar a utilizar menor concentración de enzima en la solución a trabajar por otro lado lo mismo modo ocurre con la concentración de la enzima, si esta aumenta se necesita un menor tiempo para alcanzar el porcentaje de reducción de dextrano deseado; ya que en la solución a trabajar existe más concentración de enzima lo cual hace posible que se rompan los enlaces de la dextrano de manera más rápida.

Estos dos factores ya mencionados son muy importantes en proceso de elaboración de azúcar; por eso es muy importante saber manipularlos de tal manera que obtengamos los resultados requeridos asegurándonos que sean los más adecuados, es decir, los óptimos.

Ya conociendo el rango donde se encuentra los valores óptimos de los factores tratados y las ecuaciones que nos genera la superficie de respuesta; los valores óptimos encontrados fueron; un tiempo de reacción de 33 min y una concentración de enzima Dextranfree de 224 ppm.

La figura 25 ilustra el efecto tanto de la temperatura de reacción como del tiempo de reacción sobre el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña, utilizando la enzima dextran free y siendo expresada la variable respuesta como

%Reducción de dextrano. Mostrando una figura de silla de montan sin máximos ni mínimos y con una plano de contorno que muestra la interacción entre los factores de temperatura y tiempo de reacción.

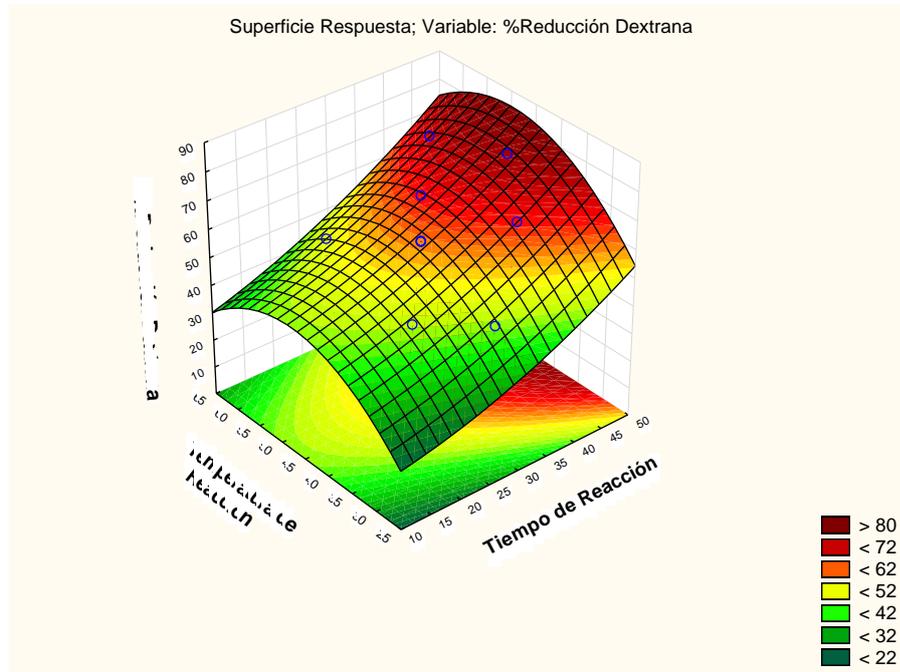


Figura 25: Planos de la superficie de respuesta y contorno para optimizar el porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrolisis enzimática realizado con la enzima comercial DEXTRAN FREE; tomando como ejes dos de sus factores, temperatura de reacción (Y), tiempo de reacción (X).

En la figura 25 podemos observar que la región óptima es de color rojo oscuro, la que nos muestra el mayor porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrolisis enzimática.

La región que nos ayuda a encontrar las condiciones ambientales de temperatura de reacción y tiempo de reacción óptimas, se encuentran en un rango de 35 a 50 °C y 30 a 45 min, respectivamente. Lo que nos da como resultado un porcentaje de reducción en el trabajo de investigación.

El gráfico nos muestra la zona donde se encuentra el punto óptimo de reducción de dextrano, por lo consiguiente nos muestra el óptimo de cada una de las variables

trabajadas en esta ocasión. Los gráficos se realizan manteniendo constante una de las variables lo que nos permite una evaluación más minuciosa de cada uno de los factores en la hidrolisis enzimática de la dextrano,

En cada uno de los gráficos de superficie respuesta se muestra un área de zona óptima distinta lo que nos permitirá hacer una evaluación a fondo y poder realizar la optimización de cada uno de los factores implicados en el trabajo de investigación.

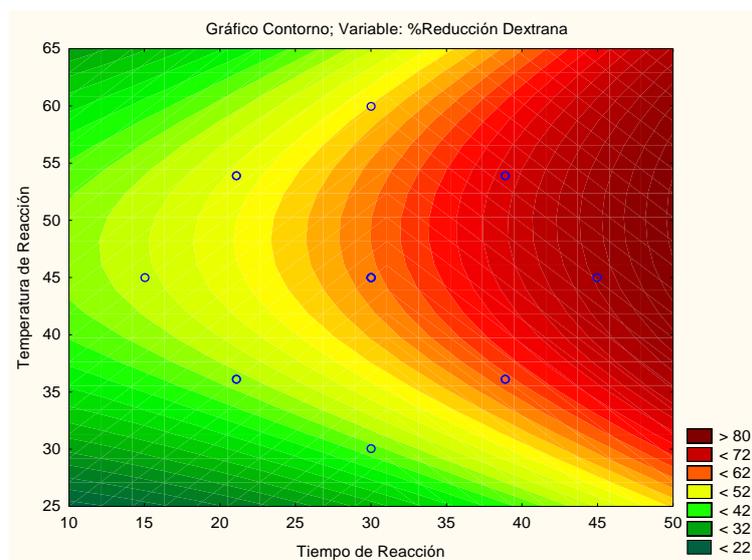


Figura 26: Contorno de superficie respuesta para el proceso de hidrolisis enzimática de la dextrano.

Bourne (1962), indica que el *P. lilacinum* dextranoses poseyó la actividad máxima en pH 4.5-5.5 y 45-50 °C, y *P. funiculosum* dextranoses en pH 4.3-5.0 y 45-50 °C.

Según Bourme et al (1962), que las Dextranasas con las que se trabajaron en su investigación denominada estudios en dextranos y Dextranasas, el rango de pH para su hidrolisis permite que el pH utilizado en nuestra investigación se encuentre dentro de este; si bien la enzima que trabajamos fue extraída de la cepa *Chaetonium erraticum*, en comparación con el trabajo de investigación anteriormente mencionado se puede notar que las condiciones de pH se encuentra dentro de rango de una y muy cercana a la otra, es decir que las diferentes enzimas provenientes de cepas distintas

pueden trabajar de manera adecuada en las mismas condiciones. Por otro lado se puede ver un comportamiento similar al analizar el factor de temperatura ya que en este caso nuestra temperatura óptima si se encuentra dentro de los rangos mencionados, lo que confirma una vez más que la investigación presentada tuvo resultados exitosos.

Lo mencionado anteriormente se puede apreciar en la figura 26, en donde se denotan los contornos de superficies de respuesta. La superficie de color rojo oscuro muestra la zona óptima de la hidrolisis enzimática realizada debido a que en esta zona encontramos el porcentaje de reducción de dextrano planteado al inicio de la investigación.

Si bien la zona de color marrón muestra el área de mayor hidrolisis de dextrano y el área de color verde oscuro muestra el menor porcentaje de hidrolisis, en la presente investigación lo que se tiene como objetivo lograr es un 70% de reducción de la dextrano después de su planteada hidrolisis; por lo tanto con lo ya mencionado antes la zona de interés sería la zona de color naranja la que nos brinda el porcentaje requerido en la investigación.

En el gráfico de contorno podemos observar con comportamiento de dos factores que son temperatura de reacción ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo de reacción (θ), manteniendo constante la concentración de enzima, la temperatura de reacción es un factor con el cual se tiene que tener mucho cuidado al trabajar la hidrolisis esto se debe a que si bien existe una temperatura óptima para realizar la hidrolisis del mismo modo si la temperatura no es la adecuada esta puede no generar producto por falta de acondicionamiento de la enzima o por inactivación de esta por exceso de temperatura; este comportamiento se puede observar en la forma de la gráfica de contorno mostrada anteriormente.

En el grafico también podemos observar que se necesita un tiempo adecuado a una temperatura dada para poder obtener un porcentaje de reducción de dextrano adecuada, es decir si bien la temperatura es la adecuada y el tiempo es demasiado corto, los resultados no serán los esperados; también se puede dar que la temperatura no es la adecuada y los tiempos son demasiados largos y termina inactivando la enzima y por último se tiene que tener en cuenta que llega un punto en la hidrolisis en que las enzimas ya no actúan entonces solo se desperdicia tiempo y energía; tal cual se puede representar en la gráfica plasmada anteriormente. Trabajando adecuadamente estos factores durante la experimentación se llegó a la figura 27, lo cual nos da como resultado óptimo de estos factores los cuales se mostraran más adelante.

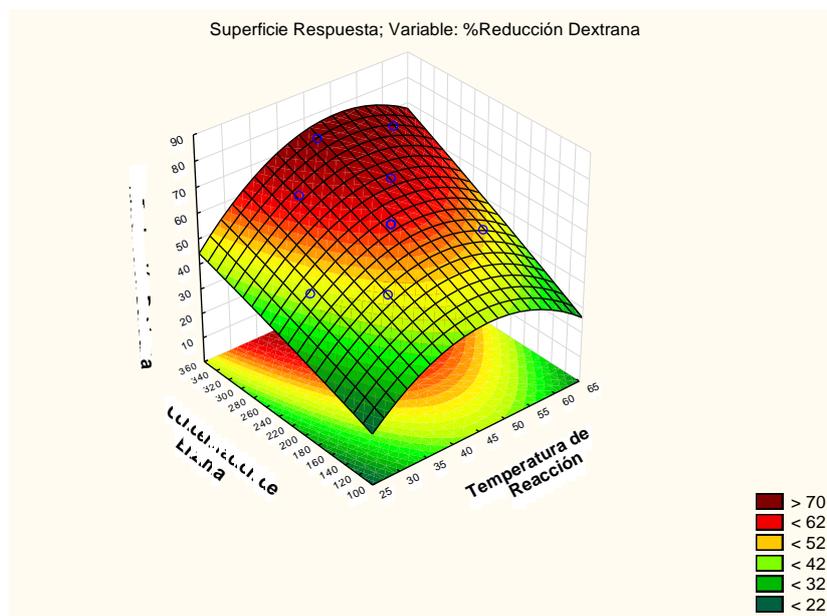


Figura 27. Superficie de respuesta para optimizar el porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrolisis enzimática; tomando como ejes dos de sus factores, Concentración de enzima (Y), tiempo de reacción (X).

En la figura 27 podemos observar que la región óptima es de color rojo oscuro, la que nos muestra el mayor porcentaje de reducción de dextrano en el proceso de hidrólisis enzimática.

La región que nos ayuda a encontrar las condiciones ambientales de temperatura de reacción y tiempo de reacción óptimas, se encuentran en un rango de 40 a 55 °C y 35 a 45 min, respectivamente. Lo que nos da como resultado un porcentaje de reducción en el trabajo de investigación.

En la superficie respuesta podemos observar que existen menos zonas de división esto se debe a que se trabaja con dos factores en el cual uno puede inactivar o dar una zona de acondicionamiento adecuado para su desarrollo, es decir un factor depende del otro. En este caso nos referimos como dependiente a la concentración de enzima y como factor de acondicionamiento a la temperatura de reacción; es decir que hay pocas zonas debido a que la enzima es activa en cierto rango de temperatura y esas zonas son bien delimitadas antes que ocurra la inactivación enzimática, en este caso no depende mucho de la concentración de enzima, sino de la naturaleza de la enzima debido a que por más enzima que le agregue a la solución si la temperatura es muy baja esto no generara ningún producto por otro lado si la temperatura es demasiado elevada esta solo ocasionara la inactivación de la enzima, sin importar la concentración de esta.

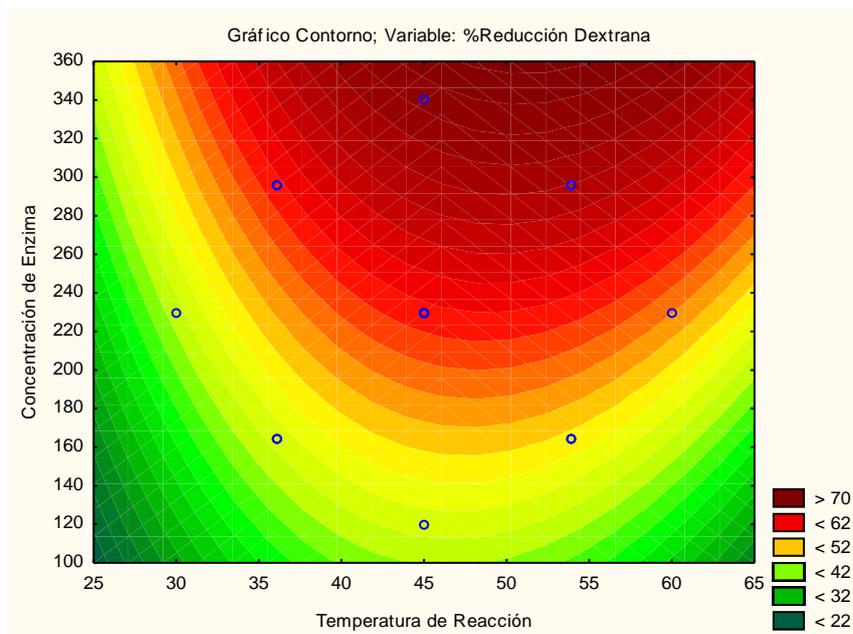


Figura 28: Contorno de superficie respuesta para el proceso de hidrolisis enzimática de la dextrano.

Lo mencionado anteriormente se puede apreciar en la figura 28, en donde se denotan los contornos de superficies de respuesta. La superficie de color rojo oscuro muestra la zona óptima de la hidrolisis enzimática realizada debido a que en esta zona encontramos el porcentaje de reducción de dextrano planteado al inicio de la investigación.

Si bien la zona de color marrón muestra el área de mayor hidrolisis de dextrano y el área de color verde oscuro muestra el menor porcentaje de hidrolisis, en la presente investigación lo que se tiene como objetivo lograr es un 70% de reducción de la dextrano después de su planteada hidrolisis; por lo tanto con lo ya mencionado antes la zona de interés sería la zona de color naranja la que nos brinda el porcentaje requerido en la investigación.

La forma de la gráfica de contorno nos muestra que la temperatura óptima de reacción se encuentra en un rango de 40 a 55 °C, lo que nos resalta lo antes mencionado del

comportamiento de la enzima frente a los niveles de temperatura, ya que antes de los 40°C existe un porcentaje de reducción de hidrólisis muy por debajo de lo requerido, mientras que si observamos por un nivel superior a los 55°C ya existe una baja en el porcentaje de reducción lo que sucede cuando la enzima se inactiva.

La cantidad de dextrano extraída fue inferior al 30%. Se pueden explicar las variaciones en el grado de hidrólisis de dextrano y la actividad débil ocasional por la alta especificidad de la Dextranasa para un 1-6 enlaces glucosídicos (Bourne et al, 1962). El jugo de caña puede contener una variedad de cepas de *L. mesenteroides*, cada una de las cuales produce dextranos característicos que difieren en su grado y tipo de reticulación (Mahmoud 2014). Es probable que cuando la eficiencia de la enzima fuera baja, las muestras contuvieran principalmente polisacáridos distintos de *L. mesenteroides* dextrano.

En este caso la dextrano extraída del *L. mesenteroides* B512F es un polisacárido de glucosa que comprende principalmente enlaces α - (1-6), pero también contiene una pequeña cantidad de enlaces α - (1-4), α - (1-3) y alguna α - (1-2). Lo cual conlleva a una hidrólisis diferida a las demás variedades de la misma cepa.

Según Bourne (1962), la composición del hidrolizado de isomaltopentaitol muestra que los dos enlaces glicosídicos no terminales se hidrolizan a velocidades similares y mucho más rápido que los enlaces terminales. Asimismo, los enlaces glicosídicos no terminales del isomaltohexaitol se hidrolizan fácilmente. Puede ser asumido que lo mismo es cierto para isomaltopentaose y isomaltohexaose.

Esto muestra que las Dextranasas no tienen preferencia por un tipo particular de extremo de cadena, un resultado que está en de acuerdo con las propiedades de las endopolisacaridasas.

Por lo tanto, parece que los requisitos esenciales para que ocurra una hidrólisis lista se realizan en el metil α -isomaltotriosido, donde el terminal el enlace glucosídico en el "extremo reductor" es simplemente un enlace α -glucosídico.

4.2.3. Concentración de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis del dextrano.

Seleccionadas y definidas las tres variables significativas mediante la aplicación del DCCR, y evaluado el porcentaje de reducción de dextrano en el simulado de jugo de caña después de este ser hidrolizado. Como prueba comparativa se procedió a verificar el nivel de azúcares reductores en simulado de jugo de caña después de la hidrólisis.

La concentración de azúcares reductores en el simulado de jugo de caña ya hidrolizado debe ser mayor a la inicial debido a que la hidrólisis de la dextrano al romper enlaces de cadena de glucosas libera las mismas haciendo que su concentración en el jugo final sea mayor.

Tabla 18: Valores de variables independientes a diferentes niveles del diseño de experimentación DCCR.

Variable Independiente	Símbolo	Niveles codificados				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Concentración de Enzima (ppm)	X_1	120	165	230	295	340
Tiempo de Reacción (min)	X_2	15	21	30	39	45
Temperatura de Reacción (°C)	X_3	30	36	45	54	60

El cuadro 18 presenta la manera en que los experimentos fueron conducidos según el planeamiento DCCR de 17 corridas (8 ensayos factoriales, 6 axiales y 3 puntos centrales). En esta tabla lo que se desea mostrar son los resultados de concentración

de azúcares reductores. El nivel de concentración de azúcares reductores que contenía el simulado de jugo después de pasar por el proceso de hidrólisis.

Tabla 19: Matriz del diseño compuesto central rotacional para las variables independientes en su forma codificada y natural. Mostrando el nivel de concentración de Azúcares reductores en el simulado de jugo de caña después de la hidrólisis.

	Concentración de Enzima (ppm)	Tiempo de Reacción (min)	Temperatura de Reacción (°C)	Azúcares Reductores (%)
1	165	21	36	7.99
2	165	21	54	20.74
3	165	39	36	30.78
4	165	39	54	44.29
5	295	21	36	24.52
6	295	21	54	42.71
7	295	39	36	57.39
8	295	39	54	63.45
9	120	30	45	13.11
10	340	30	45	56.20
11	230	15	45	21.34
12	230	45	45	58.29
13	230	30	30	20.82
14	230	30	60	29.34
15	230	30	45	43.65
16	230	30	45	43.65
17	230	30	45	43.65

Como se puede apreciar en el cuadro 19 el valor más alto para el porcentaje de concentración de azúcares reductores en el medio simulado fue del 63.45%, que corresponde a la corrida número 8; para alcanzar este porcentaje de concentración de

azúcares reductores en el resultado final se puede empezar por recalcar que la concentración de los azúcares reductores en el medio ya hidrolizado debe tener un nivel de concentración mayor a la inicial encontrada, esto se debe a que una vez ya realizada la hidrólisis enzimática, se rompen los enlaces en la cadena de azúcares reductores que es el dextrano lo que provoca la liberación de glucosa y de otros monómeros.

En el presente trabajo de reducción el nivel de dextrano y de azúcares reductores se relacionó de manera inversa, es decir que mientras menos dextrano existía en el medio simulado, existió mayor concentración de azúcares reductores, producida en el proceso de hidrólisis ya aplicado.

En este caso el mayor porcentaje de concentración de glucosa se ubicó en la corrida número 8, lo cual nos muestra indirectamente que fue el punto donde se ubicó la mayor hidrólisis de la matriz de experimentación.

Por otro lado el porcentaje que se busca reducir en el dextrano es del 70%, lo cual comparando en la tabla correspondiente equivalen a las corridas número 7, 10 y 12; las cuales si las relacionamos con la tabla de concentración de azúcares reductores nos muestra que el porcentaje de concentración de azúcares reductores en el medio después de una hidrólisis con factores óptimos fue aproximadamente del 57.39%, 56.20% y 59.29%, respectivamente.

Como vemos el comportamiento no fue homogéneo, sino variable esto se debe a que las condiciones en las 17 corridas fueron variables y las diferentes condiciones dadas a cada una de las corridas y la influencia de cada factor determinó el comportamiento final de esta concentración.

Los cuales nos permiten determinar los valores óptimos que hidrolizan la mayor cantidad de dextrano transformándolo en azúcares reductores

Ecuación final en términos de los factores codificados:

$$Y = 40.65 + 122.95X_1 + 23.74X_2 + 9.49X_3 - 10.11X_3^2$$

Factor	Valor mínimo Observado	Valor Óptimo	Valor máximo Observado
Concentración de Enzima (ppm)	120	224	340
Tiempo de Reacción (min)	15	32	45
Temperatura de Reacción (°C)	30	46	60

En la estructura del dextrano como se mencionó en el cuadro 6, esta puede tener diferentes tipos de enlaces y la enzima utilizada hidroliza los enlaces α 1-6 como primer paso, después va hidrolizando cada subproducto hasta llegar a la glucosa como se muestra en el cuadro 7.

En este caso la enzima dextranfree tiene la función principal de hidrolizar la dextrano, cuando esto sucede se rompen las cadenas principales de la dextrano que son los enlaces α 1-6, a partir de ello se liberan las isomaltodextrinas que son cadenas de menor tamaño de glucosa; una vez que las enzimas terminan con este tipo de enlaces y en el jugo solo se encuentra las isomaltodextrinas las enzimas siguen con este tipo de polisacáridos, la isomaltodextrina va rompiéndose hasta el punto de convertirse en glucosa o isomaltosa.

Como se puede observar en la tabla anterior lo que mayor se produce es la isomaltosa, en este trabajo de investigación se planteó determinar contenido de azúcares reductores porque si bien esta se presenta en menor porcentaje, este tipo de azúcar afecta la cristalización entonces no es bueno tenerlo presente en el jugo de caña.

El proceso de cristalización del azúcar (sacarosa) muchas veces se alterada por otras clases de azúcares, diferentes a la fructosa y a la glucosa, que se encuentran en los jugos. Este conjunto de carbohidratos llamados oligosacáridos, debido a que están

formados por más de dos y menos de 10 unidades de azúcares simples (monosacáridos), provocan un alargamiento en el eje “C” de la estructura del cristal, es decir, alteran el tamaño del cristal de sacarosa. Entre los oligosacáridos más reconocidos en la caña de azúcar se encuentran: theanderosa, erlosa, gentianosa, cestosa y leucrosa.

Tabla 20. Porcentaje de reducción de dextrano y porcentaje de producción de azúcares reductores.

	Concentración de Enzima (ppm)	Tiempo de Reacción (min)	Temperatura de Reacción (°C)	Reducción Dextrano (%)	Azúcares Reductores (%)
1	165	21	36	40	7.99
2	165	21	54	46	20.74
3	165	39	36	52	30.78
4	165	39	54	60	44.29
5	295	21	36	48	24.52
6	295	21	54	59	42.71
7	295	39	36	68	57.39
8	295	39	54	80	63.45
9	120	30	45	42	13.11
10	340	30	45	75	56.2
11	230	15	45	46	21.34
12	230	45	45	77	58.29
13	230	30	30	46	20.82
14	230	30	60	51	29.34
15	230	30	45	59	43.65
16	230	30	45	59	43.65
17	230	30	45	59	43.65

La función de la enzima Dextranfree, es romper los enlaces que unen a las dextranos, mediante proceso de hidrólisis del dextrano en forma gradual disminuyendo su peso molecular como se observa en las figuras N° 5 y 6 respectivamente.

Asimismo la acción de la enzima sobre el dextrano, está influenciando por el peso molecular del dextrano, como lo propone Eggleston y Monge (2006), el cual se muestra en la figura N° 7 y 8.

Así tenemos que a bajos pesos moleculares de dextrano la actividad enzimática es baja, teniendo por lo tanto poca reducción de dextrano. Por el contrario cuando el dextrano es de alto peso molecular la actividad enzimática es alta. En base al mecanismo de interacción dextrano - enzima y el peso molecular del dextrano podría explicarse las tendencias de los resultados obtenidos aplicando la Dextranfree a diferentes concentraciones.

Así tenemos que como la dextranasa que se aplica es en pequeñas concentraciones, entonces si el dextrano en el jugo es de alto peso molecular, la disminución de está va ser rápida y puede llegar a cero, en caso contrario con dextranos de bajos pesos moleculares su eliminación no es total y queda como un remanente.

Se observa que el intervalo de pH óptimo para la actividad de dextranasa es entre pH 5.0-6.0., valores que coinciden con el rango de funcionamiento típico de pH de los jugos antes de la clarificación en las fábricas de caña de azúcar y también se puede observar que este rango que se ha mantenido en el tiempo ya que coincide con los datos de diversos investigadores como son: Bourne (1962), Eggleston et al. (2005), Mahmoud (2014); entre otros.

Para verificar que el pH óptimo es 6 se realizó un barrido llevando el jugo a pH igual a 5.5.

Varios autores indican que dextranos con altos pesos moleculares se obtienen a pH igual a 6. Por lo tanto, de acuerdo al mecanismo de interacción dextrano – enzima, al tener el dextrano alto peso molecular, entonces hay una mayor interacción con la enzima y por lo tanto en su degradación, esa es la razón por la cual la actividad enzimática es alta a pH igual a 6.

El pH al cual generalmente sale el jugo del primer molino varía entre 4.5 a 5.5, implica una actividad de la enzima cuando esta es aplicada directamente, sin tener que llevar

el pH típico del jugo a pH 6, porque es un costo adicional y además es la adición de compuestos extraños que pueden alterar la calidad del producto final.

En los ensayos realizados se observa que a temperatura de 45°C – 50°C se obtiene la mayor actividad de la dextranasa siendo un punto de inflexión.

Este resultado es similar al obtenido por Verde y Quiroz (2014), quien muestra que la mayor actividad es a 55 °C y que a 65 °C se produce la inhibición de la enzima.

La tendencia de esta curva al parecer estaría relacionada con la actividad cinética de la Dextranfree con el tiempo respecto a la temperatura. Al comparar estos resultados con los obtenidos por (Eggleston & Monge, 2005)

4.3. Validación de resultados. Hidrolisis enzimática en jugo de caña de azúcar

4.3.1. Obtención del jugo de caña de azúcar y caracterización fisicoquímica proximal del jugo de caña de azúcar.

Se obtuvo el jugo de caña de azúcar con la ayuda de un trapiche de laboratorio, rápidamente se realizó una caracterización, analizando los °Brix,, viscosidad, azucares reductores, pol, dextranas, teniendo las siguientes características mostrado en el cuadro 21.

Tabla 21: Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar

Características fisicoquímicos	Resultado
Sacarosa (Pol)	16.50 %
Azucares Reductores	0.23 g/L
°Brix	20.42 °Brix
Dextrana	527 ppm
Viscosidad	0.01cP
pH	5.4 pH

Dichos resultados fueron necesarios para conocer los cambios luego de la hidrólisis que se iba a realizar.

4.3.2. Hidrólisis enzimático de dextrana del jugo de caña con la dextranasa Dextranfree, bajo condiciones ambientales óptimas.

Una vez determinado las condiciones óptimas de hidrólisis de dextrana, se dio paso a validación de dichos resultados en el medio que deseaba tratarse, el jugo de caña. Para ello la muestra fue filtrada, se tomó 100 ml y se realizó la hidrólisis a 46°C, con 224 ppm de dextranasa por 32 minutos. Una vez finalizado la hidrólisis se procedió a caracterizar el jugo de caña, obteniendo de esa manera la variable respuesta de trabajo de estudio el porcentaje de dextrana.

4.3.3. Caracterización fisicoquímica proximal del jugo de caña de azúcar luego de ser hidrolizado.

En el cuadro 22 se observa que la cantidad de dextrana es 70 ppm, que a comparado con la cantidad de dextrana antes de hidrolizar (527ppm), se redujo de manera significativa, 69%. Modificando además, ciertamente en sus demás características como el % de Pol y su viscosidad.

Tabla 22: Características fisicoquímicas del jugo de caña hidrolizado

Características fisicoquímicos	Resultado
Sacraosa (Pol)	18 %
Azucares Reductores	0.298 g/L
°Brix	20.5
Dextrana	163ppm
Viscosidad	0.009 cP
pH	5.6pH

Cabe resaltar que el porcentaje de La cantidad de azucares reductores encontrados son relativamente superior al jugo antes de la hidrólisis, muchos lo relacionan por el

comportamiento en relación a la cantidad de dextrana, sin embargo, no se puede expresar de manera proporcional, ya que la concentración de azúcares reductores no solo es producido por la hidrólisis de los dextranos, sino que ya viene dado por la inversión ácida de la sacarosa entre otros, donde también producción de glucosa y otros azúcares reductores. Como se había descrito, según el tipo de rompimiento de enlaces, la que se va producir o no glucosa. Lo que se ha experimentado que a mayor tiempo de hidrólisis se produce mayor cantidad de azúcares reductores (basado en glucosa), ya que permite el máximo rompimiento de enlaces dejándolo en azúcares simples (glucosa, maltosa, entre otros).

V. CONCLUSIONES

- La actividad enzimática de la enzima comercial Dextranfree empleada fue de 4253.96 UD/mg y sus parámetros cinéticos, V_{max} 0.006 g/L min, K_{max} 0.213 g/L.
- Las condiciones óptimas de hidrolisis de la dextrano del jugo de caña fueron: concentración de enzima de 224 ppm, un tiempo de 32 minutos y una temperatura de reacción de 46 °C. Hidrolizando el 70% de dextrano en el simulado.
- El jugo de caña, antes de hidrolizar presenta: 16.5% de Pol, pH 5.4, °Brix de 20.42, dextrana 527ppm, azúcares reductores 0.23 g/L y viscosidad 0.01 cP; las cuales son similares a las características obtenidas en la industrias azucareras.
- La hidrolisis enzimática de dextrano del jugo de caña de azúcar, con las condiciones óptimas de 224 ppm, un tiempo de 32 minutos y una temperatura de reacción de 46 °C, se efectuó, sin perjudicar de manera negativa las características del jugo de caña de azúcar.
- La características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar hidrolizado fueron: 18.0% de Pol, pH 5.4, °Brix de 20.5, dextrana 163 ppm, azúcares reductores 0.298 g/L y viscosidad 0.009 cP.
- La hidrolisis enzimática de dextrano en el simulado de jugo de caña redujo en 70% la concentración de dextrana contenida y en el jugo de caña de azúcar real un 69%.

VI. RECOMENDACIONES

- En la parte de caracterización enzimática estudiar el origen de la enzima, si tiene inhibidores y comportamientos atípicos que puedan presentar ya sea por su naturaleza o por las condiciones a la que será sometida.
- Ejecutar la validación del estudio en una unidad industrial, para realizar un estudio económico de la factibilidad de la implementación del proceso.
- Realizar la caracterización de jugo de caña de azúcar de la forma más rápido posible luego de su extracción para obtener buenos resultados que no afecten al estudio.
- Tener en cuenta que las condiciones de hidrolisis para cada corrida del DCCR, tiene que tener iguales condiciones, es decir el procedimiento debe de ser estandarizado para cada corrida a realizar.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, N. (2010). Kinetic Model Of Hydrolysis Of Sugarcane Waste. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 20(2), 5 – 18.
- Alves, S., (2013). Dextrana: Revisão Sobre Uso E Possíveis Aplicações Industriais (Tesis De Pregrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Rio Claro, Brasil.
- Bourney, E., Hutson, D. and Weigel H. (1962). The Action of mould dextranoses on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. *Biochem. J.*, 85, 158-163.
- Braga, M., Martins, S., Contiero, J. (2012). Caracterización estructural de un nuevo dextrano con un bajo grado de ramificación producido por *leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase. *Carbohydrate Polymers*. 88 (4). 1440 – 1444. doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.048
- Casarotti, R., Specian, V., Felber, A., y Alencar, J. (2012). Enzimas De Interesse Industrial: Produção Por Fungos E Aplicações. *Saúde e Biol*, 7(3), 97 – 109.
- Castellanos, D. y Peraza, I. (2015). *Evaluación de nitrógeno y carbono en la producción de una enzima con actividad dextranasa empleando Leuconostoc mesenteroides IBUN 34,1*. (Tesis de pregrado). UNIVERSIDAD DE LA SALLE. Bogotá, Colombia.
- Castillo, A. (2013). “*Optimización De Los Parámetros Cinéticos Ambientales De La Fermentación De Kluyveromyces Marxianus Nrrl-Y-7571 Para La Producción Y Cracaterización De Inulinasa*”. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú.

- Chan, W., Heredia, G. y Rodríguez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32 (3), 339 – 351.
- Chumioque, A. y Flores, K. (2016). *Determinación de la dosis óptima del biocida a base de extracto de lúpulo beta stab 10A para controlar la pérdida de azúcar por inversión de sacarosa en el jugo de caña*. (Tesis de Pregrado). Recuperado de <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/851/BC-TES-4836.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cobeña, J. y Loor, I. (2016). *Caracterización Físico-Química del Jugo de cinco variedades de caña de azúcar (Saccharum officinarum) en la hacienda el jardín*. (Tesis de Pregrado). Recuperado de <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/264/1/TAI105.pdf>.
- Eggleston, G. y Mongeb, A. (2005). Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry*, 40, 1881–1894.
- Eggleston, G., Monge, A., Montes, B., & Stewart, D. (2006). Factory trials to optimize the application of dextranase in raw sugar manufacture: Part I. *International Sugar Journal*, 108(1293), 528. 12.
- Eggleston, G., & Monge, A. (2007). Advances in the Industrial Application of Enzymes on Carbohydrate –Based Materials. *Advances in the Production of Industrial Enzymes. Practical Application of Enzymes in Industrial Processing*.4-10.
- Escartin, A. (2017). Producción de un exopolisacárido por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana. México.

- Estrada, J., Arand, E., Pichard, G. y Henao, F. (2013). Ensilaje de caña de azúcar integral enriquecido con porcinaza fresca. *ORINOQUIA*, 17 (1), 38-49.
- Figueroa, J., Carvalho, P., Sato, H. (2011). Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 31(3), 806 – 815.
- Florez, G. (2014). *Estudio de la enzima dextranasa (DS) producida por Leuconostoc mesenteroides cepa IBUN 91.2.98*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.
- Garibay, M., Quintero, R. y Munguía, A. (1993). *Biología Alimentaria*. Limusa Noriega Editores. México, D. F, pp. 152-233
- Godoy, G., & Gazón, R. (2015). *Diagnóstico del estado de la parcela de conservación de Zamorano: estudio de suelos, producción de cultivos y prácticas de conservación de suelos*. (Tesis de Pregrado). Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4589/1/CPA-2015-042.pdf>
- Herald, J. (2017). Fermentación “Feed Batch” Producción de Dextranasa. *Ciencia & Desarrollo*, 1 (200), 101-105.
- Largo, E., Cortes, M., y Ciro, H. (2013). Termodinámica de adsorción de polvo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) Obtenido mediante la tecnología de secado por aspersión. Medellín.CO. *Revista Vitae*, Vol. 21. p. 165-177.
- Lehninger, A., Nelson, D. y COX, M. (2006). *Principios de Bioquímica*. España: Ed. Omega.
- Loyola, L. y Diaz, V. (2013). *“Ruptura de enlaces $\alpha(1,6)$ de la dextrana mediante la enzima dextranasa para la obtención de moléculas de glucosa y su aprovechamiento posterior en etanol en la empresa CASAGRANDE S.A.A.”* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.

- Mahmoud, K., Gibriel, A., Amin, A., Nessrien, M., Yassien, N., and Hanna A. (2014). Microbial Production and Characterization of Dextranose. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 3(9), 1095 – 1113.
- Martínez, A., Sánchez, I., Osorio, A., López, L., Sánchez, L. y Hernández, E. (2011). Caracterización reológica de soluciones azucaradas para el proceso de evaporación-cristalización. *Nexo Revista científica*, 24 (1), 67 – 71.
- Náchter, M. (2015). Dextranos de Bacterias Lácticas Aisladas De Productos Cárnicos: Caracterización y Aplicaciones (Tesis Doctoral). Universidad De Valencia. España.
- Oliart, R., Manresa, A. y Sánchez, M. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 2(1), 79 – 90.
- Rodríguez, E. (2005). La dextrano a lo largo de la industria azucarera. *Biotecnología Aplicada*, 22, 11-19.
- Spotti, M. (2013). *Estudio De Propiedades Y Estructura De Geles Mixtos Proteína-Polisacárido. Influencia De La Reacción De Glicosilación*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Del Litoral. Argentina.
- Valero, M., Ortigón, Y., Y Uscategui, Y., (2013). Biopolímeros: Avances Y Perspectivas. *Dyna*, 80(181), 1 – 11.
- Vega, J., Sibaja, M. y Lopretti, M. (20 de Noviembre de 2012). Biosíntesis de dextranos de alto peso molecular mediante la inoculación con *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) de jugos residuales de la agroindustria de la piña: síntesis y caracterización de hierro-dextranos. *Revista Del Laboratorio Tecnológico Del Uruguay*, (7), pp. 56 – 58.

- Velásquez, J. y Robles, H. (2013). Efecto de la concentración y tiempo de fermentación en la producción de dextranos por *Leuconostoc Mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* aislados de jugo de caña de azúcar. *Pakamuros*, 1 (1). 9 – 19.
- Verde, E. y Quiroz, M. (2014). *Influencia de la dextranasa L – 650X en el jugo de caña de azúcar para minimizar la presencia de la dextrana. (Tesis de Pregrado)*. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
- Villada, W. (2010). *Determinación experimental de las condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de yuca nativa de la región amazónica en la ciudad de Leticia*. Tesis de Maestría. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/3882/1/293752.2010.pdf>
- Virgen, J. et al. (2015). Kinetics and thermodynamic of the purified dextranase from *Chaetomium erraticum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 80-86.
- Zossi, S., Cárdenas, G., Sorol, N. y Sastre M. (2010). Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina) Parte 1: caña limpia y despuntada. *Revista. Ind. Agric. Tucumán*, 87, 15-27.
- Zuker S.A (2017). *Mejoras En La Pureza De Los Jugos De Caña De Azúcar*. Recuperado de <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/7.-F%C3%81BRICA-1.pdf>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1:

Determinación de la curva de calibrado para azúcares reductores

Tabla 23: Valores de absorbancia para diferentes diluciones de glucosa

N° TUBO	Glucosa μ l	Agua destilada μ L	Concentración glucosa (g/L)	ABS (540nm)
1	500	0	2	0.998
2	400	100	1.6	0.781
3	300	200	1.2	0.575
4	200	300	0.8	0.388
5	100	400	0.4	0.168
6	50	450	0.2	0.083
7	0	500	0	0

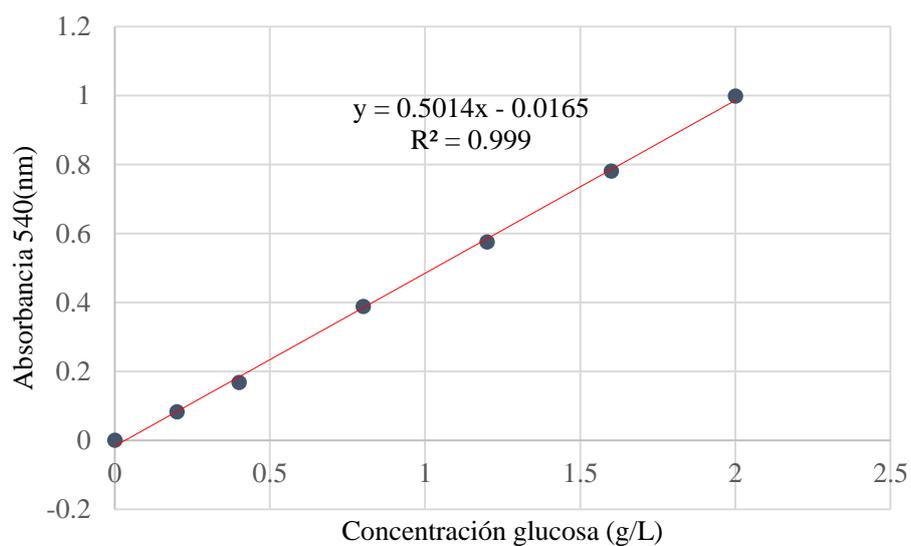


Figura 29: Curva de calibrado de glucosa

Ecuación de la curva de calibrado lineal ajustado:

$$\text{Abs} = 0.5014 * \text{Concentración glucosa} - 0.0165$$

ANEXO 2:

Determinación de la curva de calibrado para dextrana

Tabla 24: Preparación de la solución estándar de dextrana para la curva de calibración

Solución Estándar	Ácido Tricloroacético al 10% (ml)	Solución sacarosa al 50% (ml)	Sol. Estándar de dextrana (T-2000, 1mg/ml) (ml)	Agua Destilada (ml)	Vol. Total (ml)
1	0.5	4.0	0	5.5	10
2	0.5	4.0	0.5	5.0	10
3	0.5	4.0	1.0	4.5	10
4	0.5	4.0	1.5	4.0	10
5	0.5	4.0	2.0	3.5	10
6	0.5	4.0	3.0	2.5	10
7	0.5	4.0	4.0	1.5	10
8	0.5	4.0	5.0	0.5	10
9(blanco)	0.5	4.0	0	15.5	20

Fuente: Tecnicaña, 1986.

a) Procedimiento:

- Se adicionó con una bureta y gota a gota 10ml de etanol absoluto anhidro al primer patrón de dextrana. Se agitó suavemente el Erlenmeyer durante la adición de alcohol.
- Inmediatamente después de la adición de etanol se empezó a contar el tiempo con cronómetro.
- De la misma manera descrita, se adicionó etanol a cada uno de los patrones, exceptuando el blanco.

- Después de 20 minutos tomó la medida de la absorbancia de cada uno de los patrones en el espectrofotómetro a $\lambda = 720 \text{ nm}$, usando el blanco para cuadrar el acero del instrumento.
- Se estableció un gráfico o una ecuación lineal entre las lecturas de la absorbancia y la concentración de dextranas (mg/L).

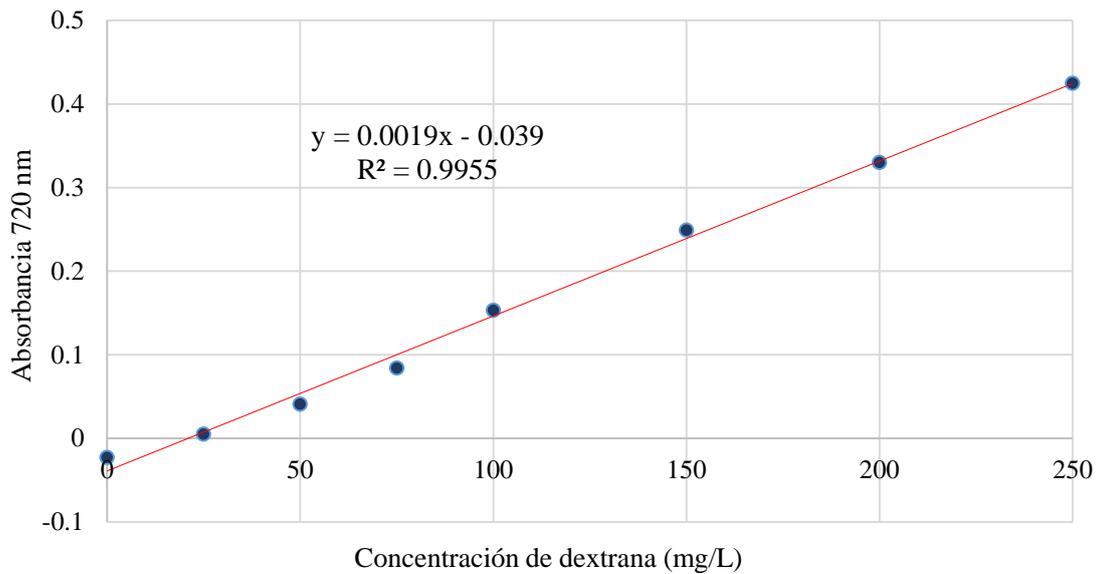


Figura 30: Curva de calibrado de dextrana

Ecuación de la curva de calibrado lineal ajustado:

$$\text{Abs} = 0.0019 * \text{Concentración glucosa} - 0.039$$

ANEXO 3:

VISCOSIMETRO CAPILAR

Tabla 25: Constante de viscosímetro Cannon- Fenske

Tamaño de capilar	Temperatura	
	40°C mm ² /s ²	100°C mm ² /s ²
Nro. 25	0.002097	0.002091
Nro. 75	0.009083	0.009038
Nro. 100	0.01656	0.016448
Nro. 200	0.1058	0.1053

La temperatura de trabajo fue 21.5°C, por lo que fue necesario interpolar dando resultado de la constante de capilaridad de 0.1059

ANEXO 4:



BOLETÍN TÉCNICO

DEXTRANFREE XE

DEXTRANASA FUNGAL PARA LA ELIMINACION DE DEXTRANA

DESCRIPCIÓN

La dextrana o dextrano contiene principalmente unidades de alfa-glucopiranosas unidas por enlaces alfa-(1,6) y en menor cantidad enlaces alfa-(1,3) y alfa-(1,4).

DEXTRANFREE XE es una enzima endodextranasa que cataliza al azar la hidrólisis de los enlaces alfa-1,6, glucosídicos de la dextrana y de sus productos de degradación. Su actividad rápidamente reduce la viscosidad de soluciones de dextrana. Los productos iniciales de la hidrólisis con **DEXTRANFREE XE** son polisacáridos solubles y oligosacáridos de variada longitud. La hidrólisis prolongada resulta en la formación de isomaltosa e isomaltotriosa. **DEXTRANFREE XE** tiene un alto grado de especificidad por los enlaces interiores de los polímeros de dextrana.

PROPIEDADES

Forma	:	Líquido no viscoso
Color	:	Ambar o ligeramente amarillo
Solubilidad	:	100% soluble en agua
Actividad	:	25,000 UD/g

SOLUBILIDAD

DEXTRANFREE XE es un líquido completamente miscible con el agua. La enzima puede adicionarse directamente a los jugos, meladuras, templeas y mieles manualmente, o bien por medio de un dosificador apropiado. Para aplicarla eficientemente, puede hacerse una dilución de 1:5 con agua potable fresca, libre de cloro, la dilución es suficientemente estable durante 24 horas a una temperatura de 25 °C.

APLICACION

DEXTRANFREE XE puede usarse para hidrolizar dextrana en caña de azúcar, remolacha y otras dextranas microbianas o sintéticas.



El nivel de aplicación de **DEXTRANFREE XE** varía con el contenido de dextrana en el jugo, tiempo de retención y condiciones de proceso. Para optimizar la aplicación recomendamos analizar el jugo en su contenido de dextrana y hacer una serie de pruebas iniciales antes de establecer la rutina de uso. Esto asegura una óptima utilización de la enzima y una calidad uniforme en el producto.

NIVELES DE USO DE DEXTRANFREE XE EN JUGO SIMPLE DE CAÑA
(Gramos de enzima a usar por tonelada métrica de jugo)

Condiciones : pH 5.0 - 5.5
 Temperatura 55 - 60 ºC
 γ Brix 10 - 20

Tiempo de Tratamiento (minutos)	Concentración de Dextrana (ppm en base seca)			
	2,000	5,000	10,000	15,000
15	40	60	80	120
30	20	30	40	60
60	10	15	20	30

El nivel de uso de **DEXTRANFREE XE** varía según el contenido de dextrana en las meladuras, mieles o templeas; también varía con respecto al tiempo de retención y condiciones de proceso.

NIVEL DE USO DE DEXTRANFREE XE EN LA MELADURA A 65-85 ºC
(Gramos de enzima a usar por tonelada métrica de meladura)

Condiciones : pH 7.0
 Temperatura 65.0 - 85.0 ºC
 γ Brix 60 - 65

Tiempo de Tratamiento (minutos)	Concentración de Dextrana (ppm en base seca)			
	2,000	5,000	10,000	15,000
30	400	600	800	1,200
60	200	300	400	600
120	100	150	200	300



ALMACENAMIENTO

Almacenar a 25 °C o en lugar fresco y seco. Mantener el producto en refrigeración (5 °C) mejora su estabilidad.

SERVICIO TÉCNICO

ENMEX, S.A. DE C.V. cuenta con un grupo técnico y un laboratorio especializado a fin de asistirlos en el uso de nuestros productos.

Río Lerma No. 228
Fracc. Industrial San Nicolás
Tlalnepantla, Edo. de México
54030 MEXICO
www.enmex.com.mx
Tel. (52) 55 5565 5999 Conmutador
(52) 55 5565 9223 Directo
Fax (52) 55 5390 4826
Email ventas@enmex.com.mx

ADVERTENCIA

Los datos y sugerencias que se citan en este boletín son ofrecidos de buena fe, basados en información confiable sin garantía expresa o implícita por nuestra parte, debido a que el manejo de nuestros productos y el modo de uso en diversas aplicaciones están fuera de nuestro control.

ANEXO 5:

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



Figura 31: Caracterización enzimática de la enzima comercial



Figura 32: Hidrólisis enzimática del simulado de caña



Figura 33: Determinación de azúcares reductores



Figura 34: Medición de °Pol del jugo de cala de azúcar



Figura 35: Medición de °Brix



Figura 36: Filtrado al vacío del jugo de caña de azúcar

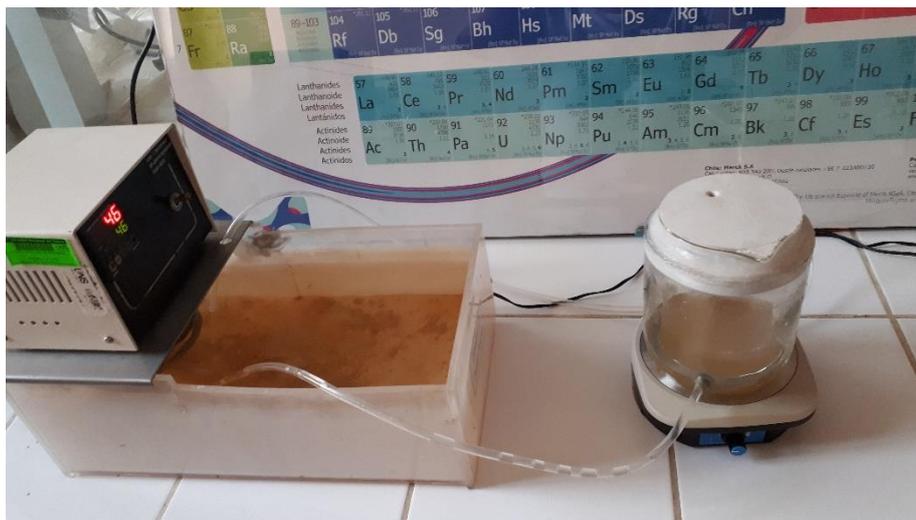


Figura 37: Hidrolisis enzimática del jugo de caña de azúcar



Figura 38: Agregado de etanol absoluto para la determinación de dextrana



Figura 39: Medición de dextrana en el espectrofotómetro