

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES
OPTIMAS PARA LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON EN
EL JUGO DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)”**

PRESENTADO POR:

Bach. MORALES ZÚÑIGA Mélangy Krystel

Bach. YANAMANGO CHAVEZ Veronica Mishell

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 DE AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES OPTIMAS PARA LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON EN EL JUGO DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)”**, para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por los bachilleres, **MORALES ZUÑIGA MELANY KRYSTEL** y **YANAMANGO CHAVEZ VERONICA MISHHELL**, que tiene como asesor al **DR. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN** designado por resolución N° 429 – 2017 – UNS – FI. Ha sido revisado y aprobado el día 23 de diciembre del 2019, por el siguiente jurado evaluador designado mediante resolución N°543-2019-UNS-CFI.

Dr. Cesar Moreno Rojo
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Mg. Williams Castillo Martínez
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
E.P. DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12:00 p.m., del 23 de Diciembre del 2019 se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 543-2019-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Cesar Moreno Rojo** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Mg. Williams Castillo Martínez** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES OPTIMAS PARA LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON EN EL JUGO DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)” elaborada por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **Morales Zúñiga Mélangy Krystel**
- **Yanamango Chavez Veronica Mishell**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, los Tesistas respondieron 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 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
MORALES ZUÑIGA MELANY KRYSTEL	19	SOBRESALIENTE

Siendo las 13:00 p.m. del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 23 de Diciembre del 2019.

Dr. Cesar Moreno Rojo
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Mg. Williams Castillo Martínez
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
E.P. DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12:00 p.m., del 23 de Diciembre del 2019 se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 543-2019-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Cesar Moreno Rojo** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Mg. Williams Castillo Martínez** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES OPTIMAS PARA LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON EN EL JUGO DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)” elaborada por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **Morales Zúñiga Mélaney Krystel**
- **Yanamango Chavez Veronica Mishell**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, los Tesistas respondieron 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 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
YANAMANGO CHAVEZ VERONICA MISHELL	19	SOBRESALIENTE

Siendo las 13:00 p.m. del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 23 de Diciembre del 2019.

Dr. Cesar Moreno Rojo
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Mg. Williams Castillo Martínez
Integrante

DEDICATORIA

A mis abuelos, Asunción Zuñiga y Rosario Rodriguez, que siempre estuvieron conmigo en todo momento de mis estudios, apoyándome en todo sentido, sin dejar que me rindiera. A mis padres Gilmer y Yesenia, por brindarme todas las facilidades para que pueda dedicarme de lleno a mi carrera profesional, sin ellos, no hubiera podido llegar a donde estoy ahora. A todos mis seres queridos, que participaron indirectamente en este logro: Amada Zuñiga, Nancy Morales. A mi compañera Verónica Yanamango, por su paciencia y dedicación en este proyecto para que pueda ser un éxito.

Mélany

A Dios por su amor, que me hizo quien soy y me da la certeza de creer que todo es posible.
A mi papá por su apoyo en cada uno de mis pasos, sobre todo los más difíciles, donde su amor me motivo a continuar. A mi mamá por su compañía incondicional en cada etapa, por cada ánimo, consejo, llamada, preocupación que cuidó esta meta.
A mis hermanos, Erika, quien me inspiró con su ejemplo y Yandir, quien me dio ánimos de una manera singular.
A mis grandes amigos y compañeros con los que recorrimos esta aventura, Kimy (Bate), Mélany (Memo), Jeimison (Jeimo), Mabel (Pinky) y a todos mis amigos que se preocuparon y apoyaron este proyecto.

Verito

AGRADECIMIENTO

A Dios por su presencia en nuestras vidas y entregarnos todo aquello que hoy las hace mejor, por acompañar silenciosamente nuestros pasos este camino y disponer todo para el cumplimiento de nuestras metas.

A todas las personas que contribuyeron en este trabajo de manera directa o indirectamente, como nuestras familias, docentes y amigos, que sin cada uno de sus enseñanzas, aportes, consejos, ánimos o “presiones” no hubiera sido posible la culminación de este proyecto.

Al Dr. Augusto Castillo por su acompañamiento en esta tesis, por asesorarnos, por sus enseñanzas, ideas, preocupación y tiempo.

A los docentes que influyeron en nuestra realización profesional y personal, que permitieron que nuestra estadía en esta casa de estudios sea enriquecedora.

A los ingenieros Lenin Palacios, John Gonzales y Berenice Córdova que contribuyeron en este trabajo, por su disposición, consejo, apoyo, paciencia y tiempo. Así como a la Srta. Silvia que nos brindó lo necesario en la biblioteca.

Mélany y Veronica

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	17
II. MARCO TEORICO	20
2.1. Caña de azúcar	20
2.1.1. Definición	20
2.1.2. Variedades de caña de azúcar	21
2.1.3. Composición de la caña de azúcar	21
2.1.4. Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar	23
2.1.5. Problemática de la caña de azúcar en la industria azucarera	25
2.2. Almidón	26
2.2.1. Definición	26
2.2.2. Presencia de almidón en la caña de azúcar	26
2.2.3. Problema del almidón en la industria azucarera	28
2.2.4. Tecnologías de control en el proceso de elaboración azúcar	32
2.3. Hidrolisis enzimática del almidón	34
2.3.1. Clasificación	35
2.3.2. Actividad enzimática	36
2.3.3. Condiciones ambientales	38
2.3.4. Cinética enzimática	41
2.3.5. α - Amilasas	43
III. MATERIALES Y METODOS	46
3.1. Lugar de ejecución	46
3.2. Materiales	46
3.2.1. Materia prima	46
3.2.2. Enzima	46
3.2.3. Almidón	47
3.2.4. Reactivos	48

3.2.5.	Materiales de vidrios u otros	48
3.2.6.	Equipos e instrumentos	49
3.2.7.	Equipos y software para procedimiento de datos	50
3.3.	Metodología y procedimiento experimental para determinar las condiciones ambientales óptimas para la hidrólisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar.	50
3.3.1.	Descripción de la primera etapa del diagrama de flujo	51
3.3.2.	Hidrolisis enzimática	55
3.3.3.	Validación de los valores óptimos en jugo de caña de azúcar	61
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	65
4.1.	Caracterización de la enzima alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	65
4.1.1.	Pruebas preliminares: determinación de temperatura y pH optimo	65
4.1.2.	Determinación del rango de linealidad	66
4.1.3.	Determinación de la actividad enzimática	68
4.1.4.	Determinación de parámetros cinéticos	69
4.2.	Hidrolisis enzimática del almidón	71
4.2.1.	Medio sintético de jugo de caña	71
4.2.2.	Optimización de las condiciones ambientales de la hidrolisis del medio sintético 71	
4.3.	Validación de las condiciones ambientales optimas utilizando el jugo de caña de azúcar	91
4.3.1.	Obtención del jugo de caña encalado	91
V.	CONCLUSIONES	95
VI.	RECOMENDACIONES	96
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la caña de azúcar.....	20
Tabla 2. Composición de la caña de azúcar.....	22
Tabla 3. Componentes del jugo en la caña de azúcar.....	23
Tabla 4: Características de las enzimas por grupo en la hidrólisis del almidón.....	36
Tabla 5. Variables independientes del estudio.....	57
Tabla 6. Diseño experimental DCCR para la hidrólisis de almidón por acción de la enzima α -amilasa.....	58
Tabla 7. Actividades de alfa-amilasas reportadas por diferentes investigaciones.....	68
Tabla 8. Condiciones del medio sintético para la hidrolisis.....	71
Tabla 9. Resultados experimentales de concentración de maltosa, hidrolisis y productividad.....	72
Tabla 10. Análisis de varianza para concentración de maltosa en la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa.....	74
Tabla 11. Valores de los niveles de los factores con respecto a la concentración de maltosa.....	76
Tabla 12. Análisis de varianza para porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa.....	78
Tabla 13. Valores de los niveles de los factores con respecto al porcentaje de hidrolisis.....	80
Tabla 14. Análisis de varianza para la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa.....	83
Tabla 15. Valores de los niveles de los factores con respecto a la productividad de la hidrolisis.....	86

Tabla 16. Deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrolisis.....	89
Tabla 17. Valores de los niveles de los factores con respecto a la deseabilidad	89
Tabla 18. Valores óptimos predichos de las variables de respuestas.....	90
Tabla 19. Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar encalado	91
Tabla 20. Características fisicoquímicas del jugo de caña hidrolizado	92
Tabla 21. Variables de respuesta de la hidrolisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar con los valores óptimos.	92
Tabla 22: Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de maltosa	108
Tabla 23: Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de almidón.....	109
Tabla 24: Valores de actividad enzimática en función a la temperatura	110
Tabla 25: Valores de actividad enzimática en función al pH	110
Tabla 26: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:500	111
Tabla 27: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:200	111
Tabla 28: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:100	111
Tabla 29: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:50	112
Tabla 30: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:25	112
Tabla 31: Producción de maltosa en función a las de las diferentes concentraciones de sustrato	113
Tabla 32: Velocidad de reaccion en función de la concentración de sustrato para el diagrama de Lineweaver- Burk.....	113
Tabla 33: Análisis de desviación promedio absoluta de concentración de maltosa	115
Tabla 34: Análisis de desviación promedio absoluta de porcentaje de hidrolisis.....	115
Tabla 35: Análisis de desviación promedio absoluta de productividad.....	116

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gránulos de almidón de caña de azúcar (aumento 10.000x).....	27
Figura 2. Estructura de amilosa	27
Figura 3. Estructura de amilopectina	28
Figura 4. Solubilización y gelatinización del almidón de caña en los ingenios	33
Figura 5. Acción de la α -amilasa en una solución gelatinizada y viscosa de almidón en una fábrica de caña de azúcar	34
Figura 6. Diferentes enzimas involucradas en la degradación de almidón.....	35
Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	39
Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	39
Figura 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.....	40
Figura 10. Curva de progreso de la reacción enzimática	42
Figura 11. Diagrama de Michaelis-Menten	42
Figura 12. Diagrama de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.....	43
Figura 13. Enzima alfa-amilasa <i>Bacillus licheniformis</i>	47
Figura 14. Almidón de maíz	47
Figura 15. Primera etapa del proceso de hidrólisis enzimática al medio sintético de jugo de caña	51
Figura 16. Minireactor con agitador acoplado a baño María para hidrólisis de almidón.	56
Figura 17. Segunda etapa del proceso de la hidrólisis de almidón, realizado en el jugo de caña de azúcar.	61
Figura 18. Determinación de azúcares reductores por DNS.....	63
Figura 19. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima alfa-amilasa de <i>B.</i> <i>Licheniformis</i>	65

Figura 20. Efecto del pH en la actividad de la enzima alfa-amilasa de <i>B. Licheniformis</i>	66
Figura 21. Perfil del rango de linealidad de la hidrolisis enzimática del almidón.....	67
Figura 22. Velocidad de reacción en función de concentración del sustrato (almidón)	69
Figura 23. Representación de Lineweaver-Burk para determinar parámetros cinéticos experimentales	70
Figura 24. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la concentración de maltosa en el medio sintético de jugo de caña	75
Figura 25. Superficie de respuesta para la optimización de concentración de maltosa en la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.	76
Figura 26. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización de concentración de maltosa en la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.	77
Figura 27. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para el porcentaje de hidrolisis en el medio sintético de jugo de caña	79
Figura 28. Superficie de respuesta para la optimización del porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.....	81
Figura 29. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización del porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.	82
Figura 30. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la productividad de la hidrolisis en el medio sintético de jugo de caña.....	84
Figura 31. Grafica de efectos principales para la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña	85
Figura 32. Grafica de interacción de los efectos principales para la productividad de la hidrolisis del sintético de jugo de caña	85
Figura 33. Superficie de respuesta para la optimización de la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.	87

Figura 34. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización de la productividad de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.	87
Figura 35. Superficie de respuesta para la optimización de la deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa. ..	90
Figura 36. Contorno de la superficie de respuesta para la optimización de la deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción de la alfa-amilasa.	91
Figura 37. Características fisicoquímicas antes y después de la hidrólisis del almidón en el jugo de caña.	92
Figura 38. Variables dependientes obtenidas por el software y en la validación con jugo de caña de azúcar	93
Figura 39: Hidrólisis enzimática del medio sintético de jugo de caña.	117
Figura 40: Ensayo para la curva de calibrado de DNS	117
Figura 41: Extracción de jugo de caña de azúcar mediante trapiche	118
Figura 42: Análisis de °Brix al jugo de caña de azúcar	118
Figura 43: Análisis de pH al jugo de caña de azúcar	118
Figura 44: Sonificación del jugo de caña de azúcar	118
Figura 45: Encalado del jugo de caña de azúcar	118
Figura 46: Medición por espectrofotómetro.....	118

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Ficha técnica de enzima alfa amilasa de <i>Bacillus Licheniformis</i>	107
ANEXO 2: Determinación de curva de calibrado de maltosa por DNS.....	108
ANEXO 3: Curva de calibrado de almidón (USDA Starch Research method).....	109
ANEXO 4: Pruebas preliminares de la enzima alfa amilasa de <i>Bacillus Licheniformis</i>	110
ANEXO 5: Determinación del rango de linealidad de la enzima alfa amilasa de <i>Bacillus Licheniformis</i>	111
ANEXO 6: Determinación de parámetros cinéticos de la enzima alfa amilasa de <i>Bacillus Licheniformis</i>	113
ANEXO 7: Desarrollo matemático de las ecuaciones obtenidas en la optimización de las condiciones ambientales de hidrolisis enzimática del almidón en el medio sintético del jugo de caña.	114
ANEXO 8: Análisis de desviación promedio absoluta.....	114
ANEXO 9: Desarrollo del trabajo de investigación	117

RESUMEN

Uno de los problemas en la industria azucarera, es la presencia natural del almidón en el jugo de la caña de azúcar, que ocasiona pérdidas y dificultades operacionales durante el proceso de producción de azúcar. El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones ambientales óptimas (concentración de enzima alfa amilasa y tiempo de reacción) de la hidrolisis por lotes del almidón en jugo de caña con respecto a la maximización de la concentración de maltosa, porcentaje de hidrolisis y productividad, las cuales fueron analizadas independientemente y conjuntamente por medio de un Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) y por el Método de Superficie de Respuesta (RSM).

Por la evaluación cinética de la enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*, se obtuvo valores óptimos de temperatura de 90°C y pH 7, un rango de linealidad para la dilución enzimática 1:100 de 20 minutos, una actividad volumétrica de 26.48 U/ml y los valores de las constantes cinéticas de K_m 5.82 g/L y V_{max} 0.30 g/L*min.

Finalmente, con las experiencias del medio sintético de jugo de caña de azúcar se obtuvo las condiciones ambientales óptimas de 817 ppm de concentración de enzima alfa-amilasa y 17 minutos de tiempo de reacción a una temperatura de 90°C, valores que se utilizaron para la validación en jugo de caña encalado resultando una concentración de maltosa de 0.380 g/L y una productividad de 0.760 g/L*h.

Se concluyó que con los valores de las condiciones ambientales óptimas de la hidrolisis enzimática encontrados se alcanzó una disminución significativa del contenido de almidón en el jugo de caña encalada del orden del 73%

Palabras claves: Alfa amilasa, almidón en jugo de caña, hidrolisis enzimática por lote

ABSTRACT

One of the problems in the sugar industry is the natural presence of starch in sugarcane juice, which causes losses and operational difficulties during the sugar production process. The objective of this work was to determine the optimal environmental conditions (alpha amylase enzyme concentration and reaction time) of the batch hydrolysis of starch in cane juice with respect to maximizing maltose concentration, percentage of hydrolysis and productivity, which were specifically and specifically analyzed by means of a Rotational Composite Central Design (DCCR) and by the Response Surface Method (RSM).

By the kinetic evaluation of the alpha amylase enzyme of *Bacillus licheniformis*, optimal temperature values of 90 ° C and pH 7 were obtained, a linearity range for the 1: 100 enzymatic dilution of 20 minutes, a volumetric activity of 26.48 U / ml and the values of the kinetic constants of Km 5.82 g / L and Vmax 0.30 g / L * min.

Finally, with the experiences of the synthetic medium of sugarcane juice, the optimal environmental conditions of 817 ppm of alpha-amylase enzyme concentration and 17 minutes of reaction time at a temperature of 90 ° C were obtained, values that were used for the validation in whitewash juice resulting in a maltose concentration of 0.380 g / L and a productivity of 0.760 g / L * h.

It was concluded that with the values of the optimal environmental conditions of the enzymatic hydrolysis found a significant decrease in the content of starch in whitewashed cane juice was reached in the order of 73%

Keywords: Alpha amylase, starch in cane juice, enzymatic hydrolysis by batch

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de azúcar tiene una gran demanda a nivel mundial, produciendo en la campaña 2018/2019 185,6 millones de toneladas, aportando Perú con 1350 toneladas de azúcar. Esta gran demanda da lugar a que 492 000 personas dependan directa o indirectamente de la industria azucarera en Perú (Ministerio de Agricultura y Riego, 2019)

Uno de los grandes problemas de la industria azucarera, es lidiar con los componentes naturales de la caña de azúcar que causan pérdidas durante el proceso de producción de azúcar, en este caso, con el almidón. El almidón es parte natural de la caña de azúcar, y su contenido en ella, varía de acuerdo a distintos factores que se dan durante la cosecha, como, por ejemplo: la variedad de la caña, nutrición de suelo, edad de corte, estado de madurez, grado de quema, altura de corte y tipo de corte. Estos factores hacen que el contenido de almidón en la caña de azúcar varíe de 275 ppm a 1500 ppm. (Castro, 2015), siendo la cantidad que no causa inconvenientes < 200 ppm (Jiménez, Orozco, Lugo, Martínez, Ramírez y Gómez, 2016); provocando así, un aumento de viscosidad por efecto de la gelatinización de los gránulos, reducción de la velocidad de clarificación, dificultades en el proceso de filtración, decantación, evaporación y cristalización, además de incremento de la pureza de las melazas. Debido a este gran problema, las industrias buscan alternativas de solución para evitar pérdidas durante el proceso de producción.

La enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* es una de las soluciones más eficientes para la hidrólisis de almidón, pues trabaja en un alto rango de temperatura y es dependiente del calcio, lo cual es conveniente ya que se trabajará en la etapa

de encalado en el proceso de producción (Zhou, et al., 2008). Esta enzima actúa atacando solo los enlaces glucosídicos α -1,4 encontrados en las cadenas de amilosa y amilopectina que componen el almidón, hidrolizándolas al azar, dando como producto glucosa y maltosa (Martinez, 2005) y eliminando así los problemas en producción mencionados anteriormente.

Hasta la fecha, en el Perú no existen muchos estudios sobre la hidrólisis del almidón en la producción de azúcar, esto podría deberse a que asumen los problemas encontrados durante el proceso, a la dextrana; sin embargo, existen estudios internacionales que analizan el contenido de almidón en jugo de caña de azúcar, previo análisis del contenido de dextranas para así evitar cualquier error. También nos indican que, durante el proceso de producción, existe mayor cantidad de almidón en la etapa de filtración de los jugos, el cual disminuye en la etapa de clarificación, debido al floculante que hace que las partículas se sedimenten, eliminando así parte de almidón, pero, este jugo eliminado vuelve a incorporarse debido al reproceso. Es por ello que el uso de la enzima alfa-amilasa es una solución (Jimenez, 2017).

Debido a estos problemas encontrados en la industria azucarera, el presente informe tiene como objetivo general: determinar las condiciones ambientales óptimas para la hidrólisis del almidón en el jugo de caña de azúcar mediante la enzima alfa-amilasa; para ello, se realizarán los siguientes objetivos específicos en tal orden: determinar la actividad enzimática y los parámetros cinéticos de la enzima alfa-amilasa *Bacillus licheniformis*, determinar los valores óptimos de las condiciones ambientales de la hidrolisis enzimática en un medio sintético de jugo de caña de azúcar mediante el diseño experimental DCCR, determinar la composición físico-

química del jugo de caña de azúcar (contenido de almidón, pol, azúcares reductores, °Brix y pH), realizar el pre-tratamiento de clarificación al jugo de caña de azúcar, realizar la hidrólisis enzimática al jugo de caña de azúcar de acuerdo a las condiciones ambientales óptimas (Tiempo de reacción y concentración de enzima), y por último, analizar característica físico-química del jugo de caña de azúcar antes y después del hidrolizado (pol, azúcares reductores, °Brix y pH)

II. MARCO TEORICO

2.1. Caña de azúcar

2.1.1. Definición

La caña de azúcar es una gramínea que se cultiva en climas tropicales y subtropicales; es uno de los cultivos de mayor abundancia ya que para las industrias esta materia prima tiene diferentes usos, siendo el más importante el azúcar de mesa (Aguirre, 2010).

Tabla 1. Taxonomía de la caña de azúcar.

Taxonomía de la caña de azúcar	
Reino	Eukaryota
División	Magnoliophuta
Clase	Liliatas
Orden	Poales
Familia	Poáceas
Genero	Saccharum
Especie	Officinarum Sinense Roxb Barberi Jeswiet

Fuente: Perez et, al. Citado por Fiallos (2008).

De acuerdo con Godoy y Garzón 2015, la caña tiene vida útil de 8 a 12 años y sus flores son en panícula, con inflorescencia y son hermafroditas, presenta una raíz fasciculada hasta 80 cm de profundidad, los tallos son rectos con nudos y entrenudos, la altura, depende de la longitud de los entrenudos, funcionando como protección a las yemas.

Según estudios de Largo, Cortes y Ciro (2013), la caña de azúcar es uno de los cultivos más grande del mundo. Crece en las regiones tropicales y subtropicales, y su cosecha proporciona el 80% del azúcar del mundo.

Bastidas, Rea, De Sousa-Vieira, Hernandez y Briceño (2012) nos dicen que, la razón por la que la caña de azúcar es uno de los cultivos que más se produce es debido a que es adaptable casi a cualquier tipo de suelo, resistente a plagas, necesita poca cantidad de insumos de origen fósil y no provoca erosión.

2.1.2. Variedades de caña de azúcar

Según Mujica, Guerra y Soto (2008), la variedad es uno de los factores más influyentes, siendo necesario evaluar aquellas utilizadas en las zonas productoras. Las variedades que se escojan para cultivar en un determinado lugar deben ser: adaptables al clima y suelo, alto contenido de sacarosa y rendimientos similares en diferentes cortes.

Las principales variedades de azúcar que se cultivan en el Perú son 18, estas variedades difieren en características como brotamiento, formación de macollo, crecimiento, acamamiento, riqueza en pol y capacidad soquera. Las variedades de brote más rápido son la H44-3098, H50-7209, H52-4610, H55-8248. Las variedades más cultivadas son la H32-8560, H37-1933 y la P12-745 (Azul de Casagrande) (Minagri, 2019).

2.1.3. Composición de la caña de azúcar

Según estudios previos, encontramos que: “La composición de la caña de azúcar depende de un gran número de factores, incluyendo edad, tolerancia a enfermedades, condiciones de cultivo y el uso de madurantes” (Zossi, Cárdenas, Sorol y Sastre, 2010).

En términos globales, la caña está constituida principalmente por jugo y fibra, siendo la fibra, la parte insoluble en agua formada por celulosa, la que a su vez se compone de azúcares simples como la glucosa. A los sólidos solubles en agua expresados como porcentaje y representados por la sacarosa (Larrahondo, 1995 citado por Aguirre M. 2010).

Tabla 2. Composición de la caña de azúcar

Caña de azúcar	Porcentaje (%)
Agua	73-76
Sólidos	24-37
Sólidos solubles	10-16
Fibra (Seca)	11-16

Fuente: Chen, J. (1991) Citado por Campués y Tarupí (2011).

El jugo de caña está compuesto por azúcares, sustancias solubles llamadas no azúcares y agua. Entre los primeros, la sacarosa es el principal constituyente, siguiéndole en concentraciones decrecientes, la glucosa, fructosa y los oligosacáridos. Los no azúcares son sales de ácidos orgánicos e inorgánicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas, polisacáridos solubles, almidón, ceras, grasa y otros compuestos minoritarios, tales como flavonoides, polifenoles entre otros (Zossi et al., 2010).

Según nos comenta Sarria, Solano y Preston (s.f.): “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.

Tabla 3. Componentes del jugo en la caña de azúcar

Componentes del jugo de caña	Sólidos solubles (%)
Azúcares	75 – 92
- Sacarosa	70 - 88
- Glucosa	2 - 4
- Fructosa	2 – 4
Sales	3.0 - 4.5
- Ácidos inorgánicos	1.5 - 4.5
- Ácidos orgánicos	1.0 - 3.0
Otros no azúcares orgánicos	
- Proteínas	0.5 – 0.6
- Almidon	0.001- 0.050
- Gomas	0.30 – 0.60
- Ceras, grasa, fosfátidos	0.05 -0.15
Otros	3.0 – 5.0

Fuente: Chen, citado por Hamerski (2009).

2.1.4. Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar

En investigaciones iniciales se emplean como indicadores de calidad del jugo, la concentración de sólidos disueltos (°Brix), la concentración de sacarosa en jugo (%pol) y la pureza. Luego, en otros estudios se establece que la calidad se reconoce en la molienda por la cantidad de azúcar recuperable que se obtiene por tonelada de caña molida, lo cual depende de características como: alto contenido de sacarosa, bajo contenido de materiales extraños, bajo contenido de sólidos solubles diferentes a la sacarosa, y bajos niveles de fibra (Zhou et al., 2008).

○ **Acidez y pH**

La caña de azúcar en su estado natural, tiene un pH neutro por lo general, pero una vez extraído, no siempre conserva esa neutralidad. En el jugo de caña madura, su pH varía entre 4.73 y 5.63. Por lo general, el jugo de caña posee valor muy bajo de pH. (Cobeña y Loor, 2016)

- **Brix**

Según Benitez y Gualango (2011), “los °Brix constituyen el porcentaje de sacarosa en peso que contiene una solución de azúcar puro, es el porcentaje de los sólidos totales disueltos en solución o el porcentaje de sólidos solubles”.

De este parámetro varía la cantidad de panela extraída, ya que a mayor cantidad de °Brix, mayor cantidad de panela por tonelada de caña. En los molinos paneleros, la extracción fluctúa normalmente entre 40-65% y la concentración de sólidos solubles en jugo crudo entre 16-22°Brix (FAO, s.f.).

- **Pol**

Es la medición de la sacarosa contenida en el jugo de caña, se realiza mediante el polarímetro; además, mediante el haz de luz respecto a la rotación se puede definir el azúcar medido (Cobeña y Loor, 2016).

- **Azúcares reductores**

Nos permite medir otros azúcares contenidos en el jugo de caña (glucosa, fructosa). Existe un mayor contenido de sacarosa cuando se tenga un nivel bajo en azúcares reductores. El jugo de caña de azúcar contiene un 75% de azúcares reductores (expresados como sacarosa), así como un nivel máximo de 10% para azúcares reductores, ya que reduce los cambios reológicos y favorece la granulometría (Cobeña y Loor, 2016).

2.1.5. Problemática de la caña de azúcar en la industria azucarera

La calidad del jugo de caña de azúcar afecta al procesamiento y a la recuperación de sacarosa; por tal motivo, diversos estudios nos indican que la presencia de algunos polisacáridos como los almidones y dextranas, reducen y dificultan la filtración, decantación, evaporación y cristalización, reduce la velocidad de clarificación, incrementa la pureza de melazas, aumenta la viscosidad y por lo tanto causa pérdidas financieras (Cuddihy et al., 2001).

El almidón se acumula durante la cosecha de la caña debido a distintas causas: La variedad de la caña, proceso de maduración, prácticas culturales. En el proceso de maduración, es donde se acumula la sacarosa en el tallo, para esto, se debe presentar poca celeridad en el crecimiento. Se ha encontrado que existe mayor cantidad de almidón en la caña no madura, esta puede variar de 275 a 1500 ppm, con un promedio de 700 ppm aproximadamente (Castro, 2015).

Los principales factores que afectan la calidad del jugo de caña después del corte son: grado de quema y altura del corte. El grado de quema influye en los azúcares reductores, los cuales aumentan con el deterioro de la caña de azúcar e incrementan el color del cristal de azúcar. Mientras que, con la introducción mecanizada del corte, aumenta la cantidad de materia extraña generalmente formada por cogollo y hojas. El cogollo tiene una alta incidencia en los niveles de color e impurezas como polisacáridos solubles y representa la principal fuente de entrada de almidón al proceso (Larrahondo, 1995).

2.2. Almidón

2.2.1. Definición

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia que predomina en las plantas, proporciona un 70-80% de las calorías que consumimos. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del mismo, constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles en la dieta habitual (Melendez, 2004).

Se diferencia de los demás carbohidratos pues se presenta en la naturaleza como gránulos, estos son insolubles en agua fría, pero pueden hincharse con esta y volver a su tamaño original sin secarse; sin embargo, cuando se somete a altas temperaturas, se gelatinizan, logrando así dificultades en las diversas etapas del proceso de caña de azúcar (Melendez, 2004).

El almidón está formado por amilosa que es soluble en agua y amilopectina, que es insoluble con un alto peso molecular (Navarro y Sossa, 2003).

2.2.2. Presencia de almidón en la caña de azúcar

Es necesario conocer las propiedades y características del almidón, para así saber de qué manera influye en el proceso de azúcar de acuerdo a las condiciones ambientales que se utilicen.

El almidón puede ser encontrado en las partes extremas del tallo, así como también en las hojas de la caña de azúcar; teniendo en cuenta que algunos estudios señalan que la cantidad de almidón incrementa notablemente de acuerdo a la forma de cosecha, mala formación en el crecimiento, la variedad, grado de madurez, clima y fertilización (Eggleston et al., 2007).

El almidón se encuentra presente en el jugo de caña de azúcar, así como en el tejido en forma de gránulos semicristalinos de 1 a 10 μm . Además de la amilosa y amilopectina, estos gránulos de almidón están formados por 2 polímeros derivados de la α -D-glucosa, los cuales están mezclados en proporciones variables (Chen et al., 2016).

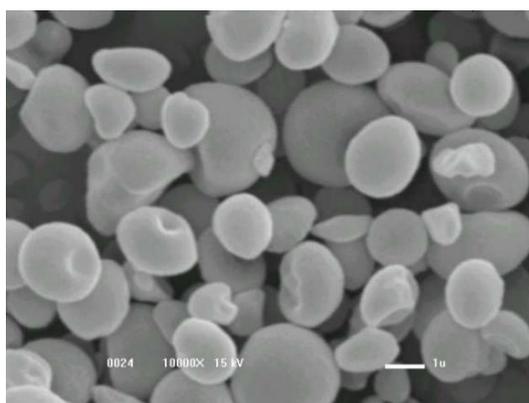


Figura 1. Gránulos de almidón de caña de azúcar (aumento 10.000x).

La amilosa ocupa la parte inferior del granulo y no forma engrudo pues es un polímero lineal puesto en forma de espiral, cada vuelta completa de espiral abarca 6 unidades de glucosa. Esta amilosa está constituida por moléculas de glucosa donde el enlace fundamental entre estas unidades es α - (1-4), apareciendo la glucosa en forma piranosa (Chen et al., 2016).

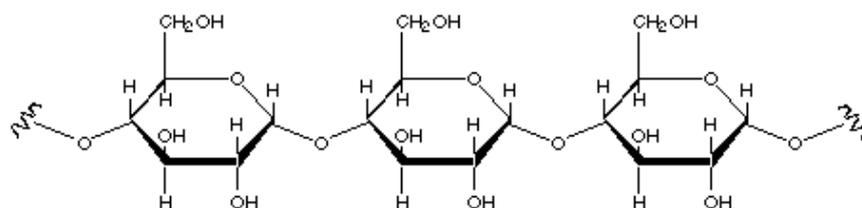


Figura 2. Estructura de amilosa

Fuente: Brumovsky (2014)

La amilopectina forma la cubierta o envoltura del gránulo, y es la que al gelificar forma engrudo, constituye un polímero altamente ramificado, compuesto por muchas ramas cortas de 20 a 30 unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha - (1-4)$ y $\alpha - (1-6)$ (Chen et al., 2016).

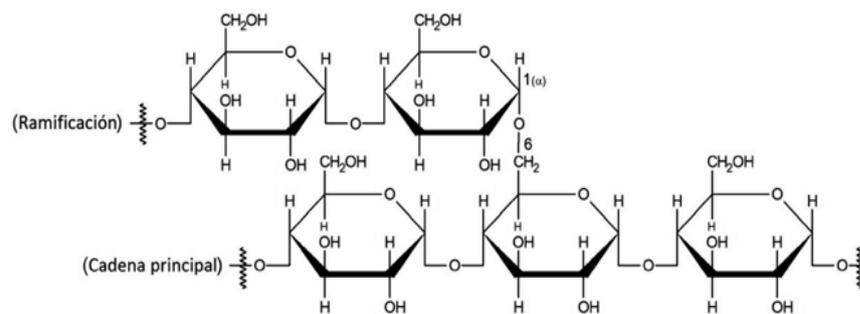


Figura 3. Estructura de amilopectina

Fuente: Brumovsky (2014)

Según estudios el almidón de la caña de azúcar se encuentra mejor representado por el almidón de maíz, que por el de la papa que es reactivo más utilizado, debido a que el almidón de papa se solubiliza fácilmente a temperaturas altas; mientras que el almidón de maíz es considerablemente más similar a la caña de azúcar por su insolubilidad, lo cual es probable debido a que la caña de azúcar y el almidón de maíz son hierbas (Cole, Eggleston, Gilbert y Chung, 2014).

2.2.3. Problema del almidón en la industria azucarera

El almidón está constituido por gránulos y tiene forma de polvo blanco, a temperaturas bajas no se solubilizan, pero cuando alcanza temperaturas de 60°C , empieza la gelatinización (Penados, 2014).

Cuando los gránulos de almidón se calientan entre 60°C y 70°C, empiezan a absorber agua a medida que sube la temperatura y se empiezan a hinchar aumentando su volumen. Este proceso de gelatinización es propio del almidón. Además, si se continúa incrementando calor a los gránulos, estos pueden llegar a romperse y dispersar amilosa y amilopectina formando un gel (Peña, 2019).

El cambio en el orden molecular del gránulo de almidón se produce dentro de un pequeño margen de temperatura, gelatinizando los gránulos grandes y luego los pequeños, esto ocasiona hinchamiento irreversible, pérdida de estructura cristalina y pérdida de birrefringencia (Brumovsky, 2014).

Además de la gelatinización, Brumovsky 2014, nos comenta sobre la retrogradación, otra propiedad del almidón. Involucra a la amilosa y amilopectina, siendo la retrogradación de la primera, la más rápida. En solución diluida, las moléculas de almidón se precipitan y este material insoluble es difícil solubilizarlo por calentamiento. Es decir, si una solución de almidón concentrada se enfría, en ausencia de agitación, se forma un gel rígido, este retorno al estado insoluble se llama retrogradación. Los efectos de esta propiedad del almidón es el incremento de viscosidad, desarrollo de turbidez, precipitación de partículas insolubles y formación de geles.

Según nos comenta Eggleston (2006), el almidón constituye una impureza en el jugo de caña de azúcar y conlleva efectos adversos en los procesos de producción y refinación del azúcar crudo. Por tal motivo, afecta la cantidad y calidad del azúcar producido.

El contenido de almidón se considera un parámetro muy importante en el proceso de elaboración de azúcar crudo y refinado. Su presencia aumenta la viscosidad en los jugos y licores, esto dificulta una clarificación y filtración eficaz, disminuye la velocidad de cristalización además de incrementar la pureza de las melazas (Zossi et al 2008).

El almidón afecta la calidad del jugo y azúcar crudo de distintas maneras a lo largo de su proceso de elaboración, pues produce un aumento de viscosidad, demora o inhibe la cristalización y aumenta las pérdidas de azúcar en la miel final. Nos comenta que debido a su naturaleza de ser carbohidrato y solubilizarse, no es tan fácil removerlo en el proceso, así que termina incrustado en el cristal de azúcar crudo. El almidón produce una pérdida en la industria azucarera pues debido a su viscosidad excesiva y pérdida de sacarosa, retrasa este proceso (Penados, 2004).

El contenido de almidón va a estar sujeto al tipo de variedad de caña de azúcar, estando en el rango de 200 y 1200 mg/kg^oBx sobre base sólida (Zossi et al., 2008).

El contenido de almidón varía de acuerdo a las variedades de caña existentes, además de la madurez de la caña, es decir, si la caña está inmadura, tendrá más contenido de almidón que una madura, ya que a medida que va madurando, el contenido de almidón disminuye (Alencar et al., 2011).

El almidón insoluble existente en la caña de azúcar, al pasar por el proceso de molienda siendo sometido a calor, se vuelve soluble en los jugos. Este jugo continúa en el proceso de clarificación en la cual se elimina una parte, mientras que la otra

parte sigue en el proceso y entre 30% y 40% de almidón termina en el cristal de azúcar crudo durante la cristalización (Rein, 2007).

Si la cantidad de almidón que pasó a la meladura, luego de la clarificación, es mayor a 150 ppm, afectará el proceso, ya que esta coagulación de almidón formará partículas de gran tamaño, mayor densidad y mayor viscosidad de la meladura, lo cual tiene impacto negativo en la velocidad de cristalización en los tachos, no deja que las mieles se agoten y dificultan la purga en las centrifugas (Penados, 2004).

Muchos estudios nos dicen que el almidón reduce la filtración y afinación del azúcar crudo, además es un impedimento para el proceso de decoloración en la refinación (Eggleston et. al, 2006).

El almidón existente en el azúcar crudo, se transfiere a la refinería causando problemas en las diferentes etapas involucradas del proceso. En la clarificación por fosfatación, no permite la precipitación y coagulación del fosfato de calcio, por tal motivo, se obtienen niveles altos de fosfato en el licor claro. Por otro lado, la fracción de amilopeptina estabiliza los cristales de fosfato de calcio en suspensión formando coágulos densos y grandes difíciles de eliminar mediante flotación (Rein, 2007).

Rein (2007) nos dice que, si se suele utilizar carbonatación para el proceso de azúcar refinado, la fracción de amilosa actúa como coloide protector de la superficie de los cristales de calcio e impide la precipitación ocasionando problemas de filtración. Otros autores explican que en la filtración de lodos se interrumpe cuando en la etapa de carbonatación existe un contenido mayor de 250 ppm/°Brix (Zhou et al, 2008).

2.2.4. Tecnologías de control en el proceso de elaboración azúcar

Debido a los problemas que causa el almidón presente en la caña de azúcar durante las etapas de su proceso, Zossi et al., (2008) explica que surgen distintas técnicas para evaluar el contenido de almidón en los jugos durante el proceso, así como también en el producto final.

Zossi et al., (2008) valida una metodología basada en detección colorimétrica del complejo almidón-yoduro, para la determinación de almidón en azúcar. Además que una solución a obtener menos contenido de almidón antes de iniciar el proceso es realizar una buena selección en la variedad de caña de azúcar.

En la industria azucarera, el uso de la enzima alfa-amilasa es la solución más eficiente para hidrolizar el almidón, pues ayuda a: eliminar problemas de viscosidad, cristalización, reduce pérdidas de sacarosa, mejora la clarificación y calidad de azúcar refinado (Popper et al 2006).

Se han demostrado muchos métodos para la modificación física y química del almidón, sin embargo, actualmente se utilizan enzimas hidrolasas (amilasas) para modificar el almidón (Chiu y Solarek, 2009).

En una fábrica de Estados Unidos, el jugo filtrado proveniente del clarificador, se almacena en un tanque de incubación de amilasas para reducir la acidez del jugo de caña, y a la vez la amilasa natural hidroliza el contenido de almidón (Eggleston et al., 2003).

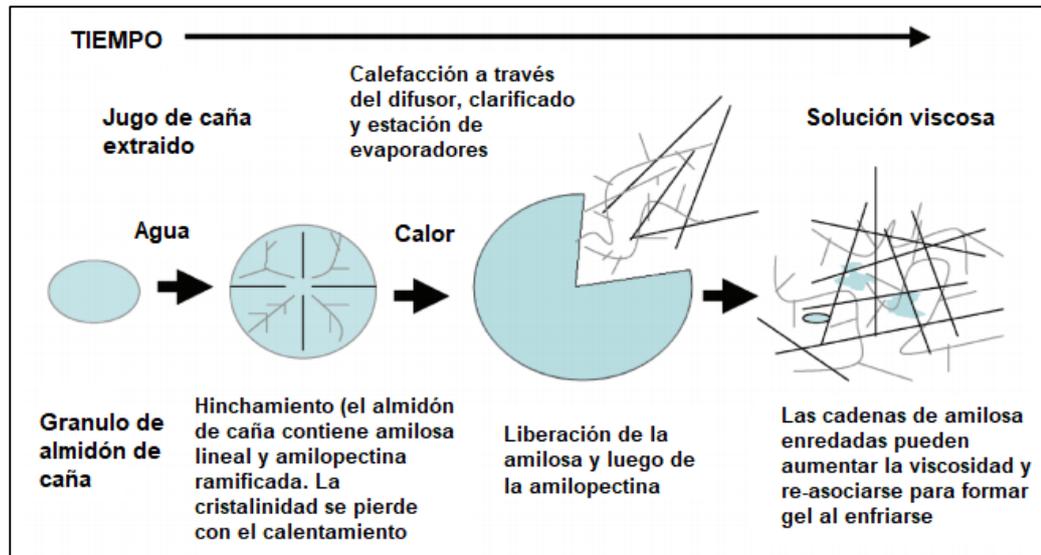


Figura 4. Solubilización y gelatinización del almidón de caña en los ingenios
Fuente: Eggleston, Monge, Montes, & Guidry, 2008

Cuando los gránulos de almidón están solubilizados y gelatinizados por efecto de la temperatura, la hidrólisis es más eficaz. Además, la degradación del almidón se produce en bajas concentraciones de amilasas, por esto hay un incremento en el tiempo de retención, y este incremento provocó a su vez una degradación ácida de sacarosa no deseada (Zhou et al., 2008).

En tiempos de retención de 12 minutos, ocurre la degradación de almidón en un rango de 10 a 20% mediante la enzima alfa -amilasa (Eggleston et al, 2003).

Si en la etapa de clarificación, se realiza la alcalinización en caliente, parte del almidón es removido y precipitado debido al precalentamiento del jugo; sin

embargo, si es alcalinización fría, escasamente se precipita contenido de almidón durante la clarificación (Eggleston et al., 2003).

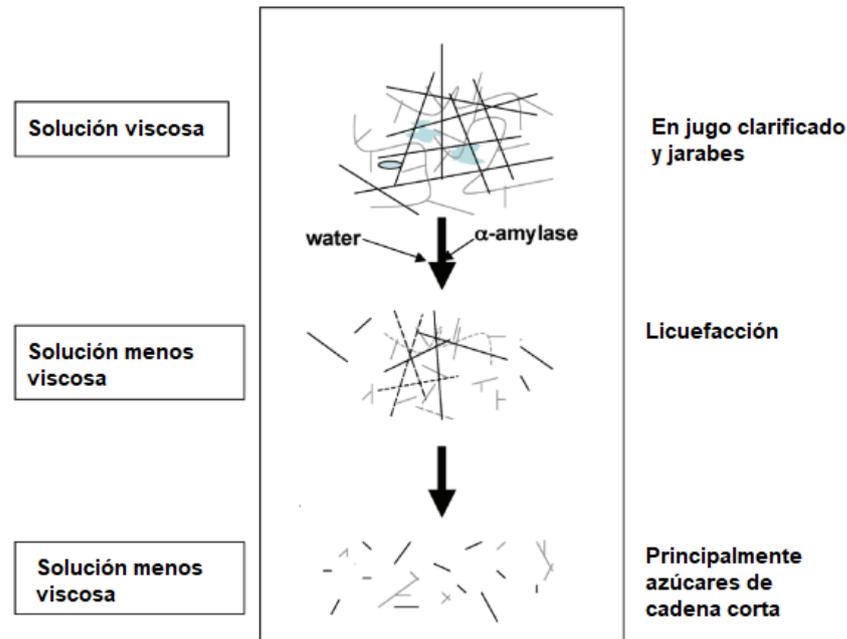


Figura 5. Acción de la α -amilasa en una solución gelatinizada y viscosa de almidón en una fábrica de caña de azúcar
Fuente: Eggleston et al., 2008

2.3. Hidrolisis enzimática del almidón

Las enzimas que dan lugar a la hidrolisis del almidón son conocidas como Glucosil Hidrolasas, las cuales actúan en los enlaces de las cadenas de almidón para así desglosarlas en carbohidratos más pequeños, como glucosa, maltosa o dextrinas.

Cabe resaltar que Martínez (2005) exponía que lograr una ecuación cinética que represente los cambios en función del tiempo y las condiciones experimentales de la hidrolisis es complicado, a causa de que el almidón tiene una estructura compleja, y la mezcla de este y sus productos de reacción cambia en función al tiempo y estos tienen diferentes pesos moleculares.

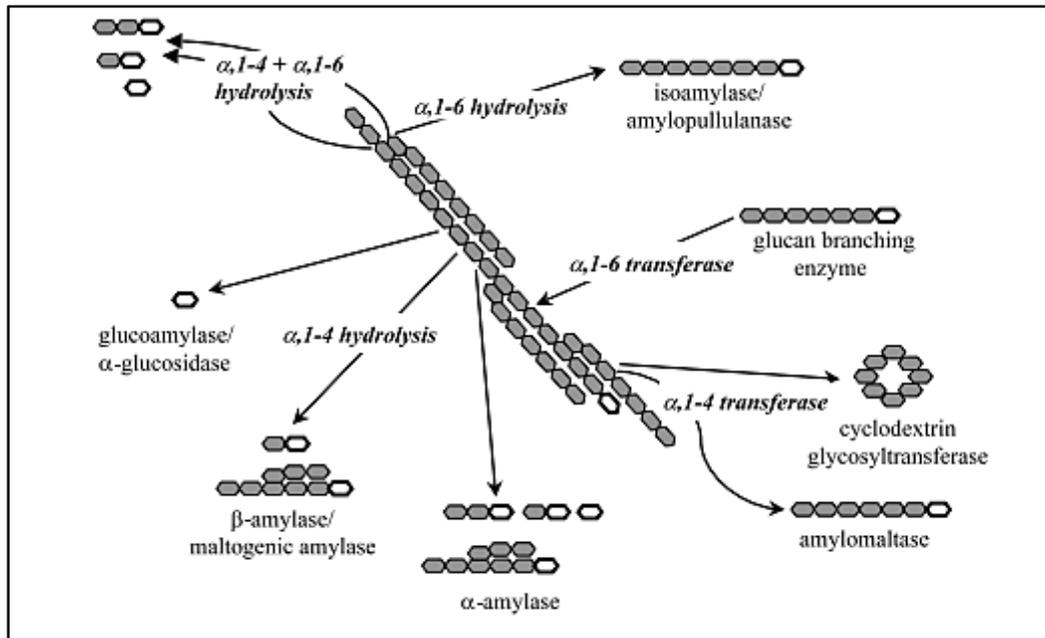


Figura 6. Diferentes enzimas involucradas en la degradación de almidón
Fuente: van der Maarel et al., 2002

2.3.1. Clasificación

Diversos autores clasifican o agrupan las enzimas que degradan el almidón según diversas características: Por ejemplo, van der Maarel, van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis y Dijkhuizen (2002) nos describen que se pueden formar 4 grupos según el lugar de acción de la enzima: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificadoras y transferasas.

Tabla 4: Características de las enzimas por grupo en la hidrólisis del almidón

Enzima	Fuente	Tipo de enlace	pH	Temp. optima (°C)	Producto terminales	
					Amilosa	amilopectina
Endoamilasas						
α -amilasa bacterial	B. Subtilis	α - 1,4	6.0	65 – 70		
	B. licheniformes	α - 1,4	5 - 7	90	Glucosa Maltosa	Dextrinas
α -amilasa fúngica	A. Orizae	α - 1,4	6.0	50 – 60		
Exoamilasas						
Amiloglucosidasa	<i>A. Niger</i>	α - 1,4 α - 1,6	4 - 5	60	Glucosa	Glucosa
B- amilasa	Bacillus spp.	α - 1,4	5	55 - 60	Maltosa Glucosa	Maltosa Dextrinas
Enzimas desramificadoras						
Pululanasa	K. aerogenes	α - 1,6	5.0	60	Ninguno	Cadenas lineales
Isoamilasa	Pseudomonas spp.	α - 1,6	4.0	50-55	Ninguno	Cadenas lineales
Tranferasas						
ciclodextrinasa	B. Macerans	α - 1,4	5.0	50	-	-

Fuente: Nouri, 1993; Tejada et al., (2011)

2.3.2. Actividad enzimática

Uno de las medidas que caracteriza a una enzima viene a ser su actividad, como lo dice propiamente su nombre se refiere a la acción de una enzima en sus condiciones óptimas (Temperatura y pH). Según estudios existen diversas formas de expresarla, por ello la Unión internacional de bioquímica determino la medida en Unidades Internacionales (UI), la cual se define como la cantidad de enzima que forma 1 μ mol de producto por minuto, las cuales también pueden expresarse por unidad por volumen como UI/ml (Merino y Noriega, 2011).

Expresándolo en forma de actividad amiolítica viene a ser la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un μmol de glucosa o maltosa (según sea el caso acorde a la enzima) por minuto en condiciones constantes (Sarmiento, Vargas, Pedroza, Matiz y Poutou 2003).

Así mismo se cuenta con otra unidad de medida, la actividad específica, que, aunque no es unidad de medida directa se usa para medir la pureza de una preparación enzimática, esta se define como el número de unidades de actividad enzimática que hay por miligramo de proteína (UI/ mg de proteína) (Merino et al, 2011).

2.3.2.1. Métodos de medida para la actividad amiolítica

Actualmente se cuenta con diversos procedimientos para medir la actividad de las amilasas, estos se eligen de acuerdo a la necesidad del caso en que se aplique, los cuales encontraremos en clasificados en tres grupos: sacarogénicos, cromogénicos y amiloclásticos.

Los métodos sacarogénicos manifiestan una medida directa de la hidrólisis por la cuantificación del número de extremos reductores generados en esta, los métodos cromogénicos se fundamentan en el uso de sustratos coloreados y finalmente los métodos amiloclásticos miden la hidrólisis del almidón por viscosimetría, turbidimetría, yodometría y nefelometría (Martínez, 2005).

De acuerdo a esta investigación sería elegible dos métodos, el DNS (Miller, 1959) que un método sacarogénico en donde usualmente se toma de referencia a la maltosa en estas reacciones, y un método yodometrico, que es uno de los más utilizados de

los métodos amiloclásticos, el cual se fundamenta en la coloración azul que forma el complejo yodo-almidón. Sin embargo, para este último encontramos ciertas limitantes, la primera sería que no se produce coloración cuando el grado de polimerización es inferior a 20 unidades de glucosa debido a que la longitud de onda a la cual se mide el complejo disminuye conforme lo hace el grado de polimerización (Martínez, 2005). La segunda limitante un estudio observo que el uso de α -amilasa como de *Bacillus licheniformis* que disminuyen el poder de tinción de almidón y derivados con reactivo de yodo (Figueira, 2009).

2.3.3. Condiciones ambientales

Las enzimas son proteínas que trabajan en un medio determinado, por lo tanto si las variables ambientales de estas cambian pueden afectar su actividad y su función, a estos factores se le conoce condiciones ambientales, entre los cuales tenemos los siguientes:

2.3.3.1. Temperatura

Conforme sube la temperatura la velocidad de reacción de la hidrolisis crecerá debido al aumento de la energía cinética, hasta llegar al punto más alto de la curva donde la actividad enzimática será la máxima, determinado así la temperatura óptima. Sin embargo, pasada esta temperatura la enzima como toda proteína, se desnaturizará y la velocidad de reacción empezará a decrecer. (Briseño, s.f.)

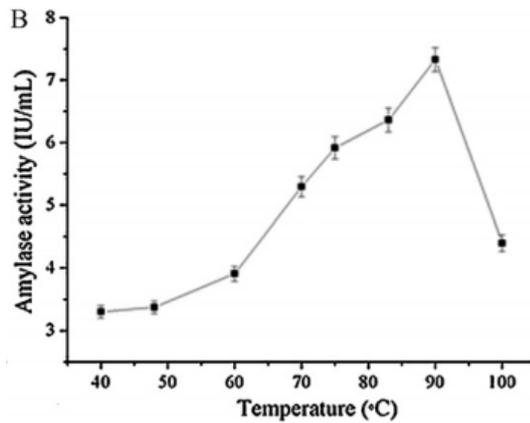


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática
Fuente: Bozic, Ruiz, Lopez y Vujcic (2011)

2.3.3.2. pH

El pH del medio en donde trabajan las enzimas es crucial para su actividad, dado que este contiene cargas que logran una mayor estabilidad para la estructura, por ello cuando el pH sufre variaciones extremas puede llegar a desnaturalizarla. En un valor específico de pH la enzima encuentra en su medio la conformación más correcta de su centro activo, alcanzando así su actividad máxima, volviéndose este su pH óptimo (Merino et al, 2011).

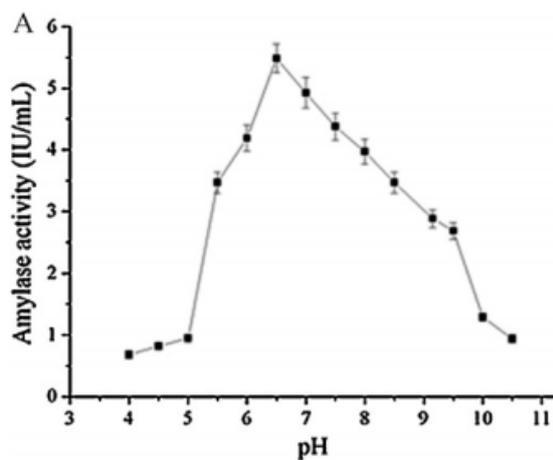


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad enzimática
Fuente: Bozic et al. (2011)

2.3.3.3. Concentración de enzima

Según Briceño la velocidad de reacción crece de forma proporcional conforme aumenta la concentración de enzima, pero esto sucede solo hasta cierto punto en el que la velocidad se vuelve constante

2.3.3.4. Concentración de sustrato

Tena y Jorrín (2008) explican el efecto de la concentración de sustrato mediante la Figura 9 en la cual se observa que conforme aumenta la concentración de sustrato la velocidad aumenta formando así una curva hiperbólica, hasta cierto punto en que la enzima se encuentra saturada por el sustrato y la velocidad se hace constante.

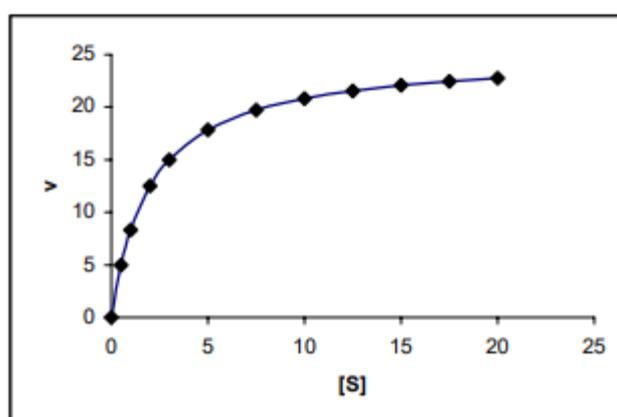


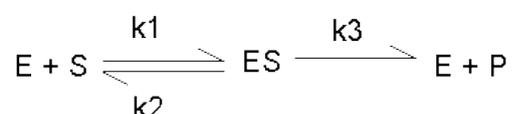
Figura 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.
Fuente: Tena et al., 2008

2.3.3.5. Cofactores

Algunas enzimas necesitan para su mejor funcionamiento algunos iones inorgánicos como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Na^{+} , K^{+} , etc. (Gonzales, sf). Para el caso de las alfa amilasas, algunos estudios confirman que la presencia de calcio ayuda a estabilizarlas (Penados, 2004).

2.3.4. Cinética enzimática

La cinética estudia la variación de las velocidades de las reacciones catalizadas por las enzimas, además cuantifican la afinidad que tienen estas por el sustrato, así como su mecanismo de acción. Michaelis yMenten propusieron uno de los modelos más convenientes para la velocidades enzimáticas, el cual se basaba en que cuando el sustrato se une a la enzima se forma un complejo enzima-sustrato, donde este último llega a convertirse en producto dejando así la enzima libre, resumido de la siguiente manera:



Introduciendo así otras ecuaciones y la constante K_m (también conocida como constante Michaelis) (Mckee y Mckee, 2003).

2.3.4.1.Rango de linealidad

El rango de linealidad o también conocida como curva de progreso de la reacción se realiza mezclando una enzima y su sustrato y midiendo el producto posterior que se genera durante un período de tiempo. La región de velocidad inicial de la reacción enzimática debe determinarse y los experimentos posteriores deben realizarse en este rango lineal. Si se observa que la reacción no se encuentra en la porción lineal, la concentración de la enzima se puede modificar para retener la linealidad durante el curso de los experimentos. Ambos pasos (modificar la enzima y analizar la linealidad de la reacción) se pueden realizar en el mismo experimento (Brooks et al. 2012).

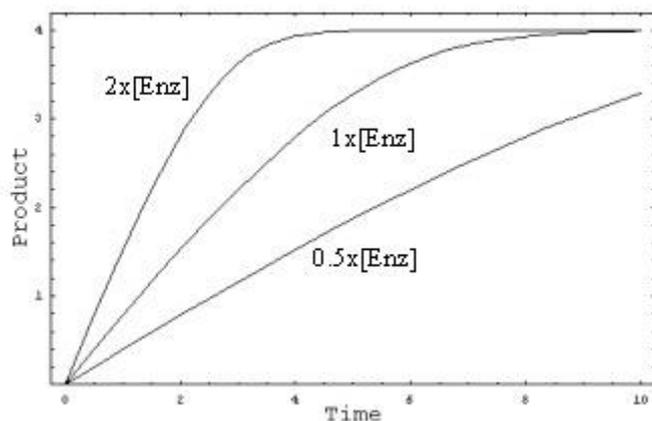


Figura 10. Curva de progreso de la reacción enzimática

Fuente: Brooks et al., 2012

2.3.4.2. Parámetros cinéticos

La ecuación de Michaelis-Menten se representa gráficamente por una hipérbola como muestra la figura 11 donde la V_{max} es el valor máximo donde tiende la curva experimental y K_m es la concentración de sustrato donde la velocidad es la mitad de V_{max} , la cual también es considerada como constante de afinidad del sustrato. (Gonzales, sf)

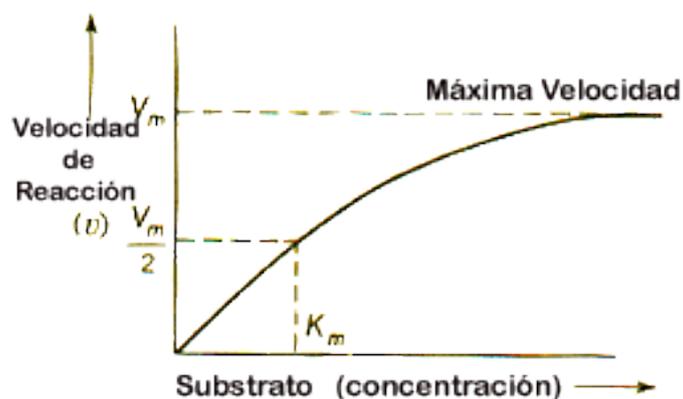


Figura 11. Diagrama de Michaelis-Menten

Fuente: Gonzales, sf.

Uno de los métodos más sencillos a utilizar para determinar las constantes cinéticas es la de Lineweaver-Burk, el cual consiste en la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$) debido a que es una recta, en la cual la pendiente viene a ser K_m/V_{max} y la ordenada en el origen es $1/V_{max}$. (Gonzales, sf)

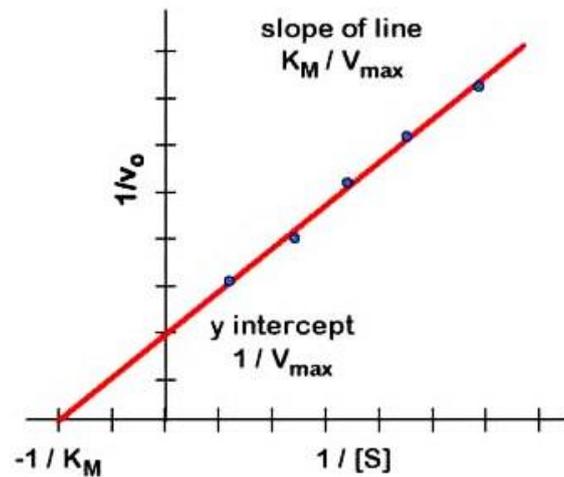


Figura 12. Diagrama de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.
Fuente: Gonzales, sf.

2.3.5. α - Amilasas

Son enzimas conocidas también como α -1,4-D- glucanohidrolasa o por su código EC 3.2.1.1. (dado por la comisión de enzimas). Estas se clasifican como endoenzimas debido estas atacan solo los enlaces glucosídicos α -1,4 que se hallan en las cadenas de amilosa y amilopectina que componen el almidón, lo hidrolizan al alzar y no por los extremos. (Martínez, 2005)

Esta hidrolisis nos da como producto glucosa y maltosa además de una serie de α -dextrinas lo cual produce la licuefacción del almidón, estas últimas incluyen los enlaces glucosídicos α -1,6 de la configuración inicial. (Vargas, 2002)

La característica y el modo de acción de estas enzimas dependen de la fuente, las cuales suelen ser microbianas (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

amiloliquefaciens,...) o fúngicas (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*,...). (Matínez, 2005).

El origen de la enzima también influirá en el grado de hidrolisis del almidón y en la estabilidad térmica de la misma, por ejemplo, la alfa-amilasa bacteriana tiene un rango más alto de temperatura (65 a 90°C) que la fúngica. (Ochoa, 1994).

Características

Pérez (2002) nos expone que por lo general las alfa-amilasas trabajan en un rango de pH de 5.5 a 8, pero el valor óptimo de actividad de cada enzima dependerá del tipo que se use, no solo por la naturaleza de la misma, sino porque algunas de ellas pueden ser complementadas por el uso de un cofactor, por ejemplo, el calcio, que mejora su actividad. Así mismo con respecto a la temperatura las amilasas se subdividen en dos grupos: termoestables y termolábiles, las primeras son las que tienen acción en un rango de 60 a 110°C sin inhibirse por las altas temperaturas, las segundas tienen un rango de 20 a 55°C, sin embargo, algunas de ellas pueden retardar su inactivación con la presencia de iones de calcio.

Uso en la industria

Kirk, Borchert y Fuglsang (2002) resaltan la importancia que tienen las enzimas industrialmente, y como estas se han ido desarrollado en este medio, así como enzimas de acción hidrolítica son actualmente la de mayor uso, siendo las amilasas el segundo grupo más grande usadas en la industria de almidón, textil, detergentes y panadería.

Sin embargo, hoy encontramos nuevos estudios en la industria azucarera para la eliminación del almidón como señalan Penados (2004), Zhou et al (2008) y Jiménez (2017) en los cuales se expone que uno de los tratamientos más eficaces para eliminar o desglosar el almidón es la hidrólisis enzimática por el uso de amilasas.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

Este trabajo de investigación se realizó en los siguientes laboratorios de práctica de la Universidad Nacional del Santa:

- Química orgánica y Bioprocesos.
- Composición de Alimentos Agroindustriales.
- Operaciones Unitarias y automatización
- Control de Calidad del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial

3.2. Materiales

3.2.1. Materia prima

La materia prima que se utilizó fue el jugo de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum*), variedad México – 73, proveniente de Caylan, Valle de Nepeña, Santa, Ancash.

3.2.2. Enzima

Alfa amilasa (Sigma-Aldrich)

Es una preparación de alfa amilasa producida por una cepa de *Bacillus licheniformis*, comercializada por Merck Peruana S.A.

Esta enzima reporta contener de 10-50 mg / ml de proteína (Biuret) y un rango de pH para actividad de 5-9 con el rango de pH óptimo de 7-9. (**Anexo 1**)



Figura 13. Enzima alfa-amilasa *Bacillus licheniformis*

3.2.3. Almidón

El almidón de maíz GRM198 fue adquirido de BioGenicsLab. Su presentación es en polvo de color blanco amarillento.



Figura 14. Almidón de maíz

3.2.4. Reactivos

- Ácido 3.5 dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)
- Ácido clorhídrico (37.5%)
- Fosfato de potasio monobásico (0.1 M)
- Fosfato de potasio dibásico (0.1 M)
- Tartrato de sodio y Potasio (Merck)
- D(+)-Glucosa (Merck, 97.2% Pureza)
- Yodato de potasio
- Sacarosa pura (Bioxtra $\geq 99.5\%$ GC)
- Agua destilada
- Almidón de maíz GRM198
- Azul Brillante de Coomassie G-250
- Buffer fosfato (0.05 M)
- Hidróxido de sodio NaOH (0.25 M)
- Hipoyodito de potasio
- Óxido de calcio
- Potasio tetrahidratado
- Reactivo Bradford
- Sacarosa (99.5%)
- Yoduro de potasio

3.2.5. Materiales de vidrios u otros

- Embudo de vidrio
- Fiolas de 50 ml, 100ml, 125ml, 500ml, 1000ml
- Tubos de ensayo

- Gradillas de metal
- Vasos de precipitado de 50ml, 250ml, 500ml
- Espátulas
- Balones de fondo plano
- Pipetas graduadas 1ml, 2ml, 5ml, 10ml
- Puntas de plástico para pipetas de 50uL, 1000uL, 5000uL
- Papel aluminio
- Papel filtro Whatman 125mm
- Celdas de plástico para espectrofotómetro
- Pera de succión
- Probetas
- Tubos con tapa de 10ml, 25ml
- Pinzas para tubos
- Soporte universal

3.2.6. Equipos e instrumentos

- Trapiche para caña de azúcar (2015)
- Espectrofotómetro UV/VIS: Genesys 20 Thermo Scientific (2014)
- Horno de microondas Electrolux (2015)
- Balanza analítica (Prease Gravimetrics AG 221LX) (2012)
- Balanza digital (Precisa XB-320M) (2012)
- Bomba de Vacío (GE Motors 5KH 33 DN1 + 6GX) (2000)
- Baño María (Electronic Thermo Stat BRT - 65) (2017)
- pH - metro (Orion Star A211 Thermo Scientific) (2017)
- Polarímetro automático: Analytical Autopol I Rudolph Reserch
- Refractometro digital (Rudolph Research J157) (2012)

- Estufa eléctrica (P-selecta 209) (1985)
- Agitador magnético (Thermolyne Corporation Nuova II. N°S18520-26) (1985)
- Mechero Bunsen
- Refrigerador (2013)

3.2.7. Equipos y software para procedimiento de datos

- Computadora Assus core i7
- Microsoft Word versión 2016
- Microsoft Excel version 2016
- Software Statgraphics versión Centurion (XV)

3.3. Metodología y procedimiento experimental para determinar las condiciones ambientales óptimas para la hidrólisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar.

Para realizar la presente investigación se dividió en dos etapas, la primera para determinar las condiciones ambientales óptimas y la segunda para validar estos parámetros en el jugo de caña de azúcar. Para la primera parte se utilizó un medio sintético (medio que contienen una composición química definida) de jugo de caña para evitar las interferencias que pueda tener el jugo de caña natural, para que así al determinar los valores óptimos, solo sean determinados por los componentes de interés (almidón y sacarosa). Este medio sintético fue elaborado a base de un patrón estándar de almidón de maíz GRM198, el cual se usó como medio para la hidrólisis, en el caso de la segunda parte se sustituyó este medio sintético con jugo de caña de azúcar encalado que también contenía almidón como uno de sus constituyentes naturales.

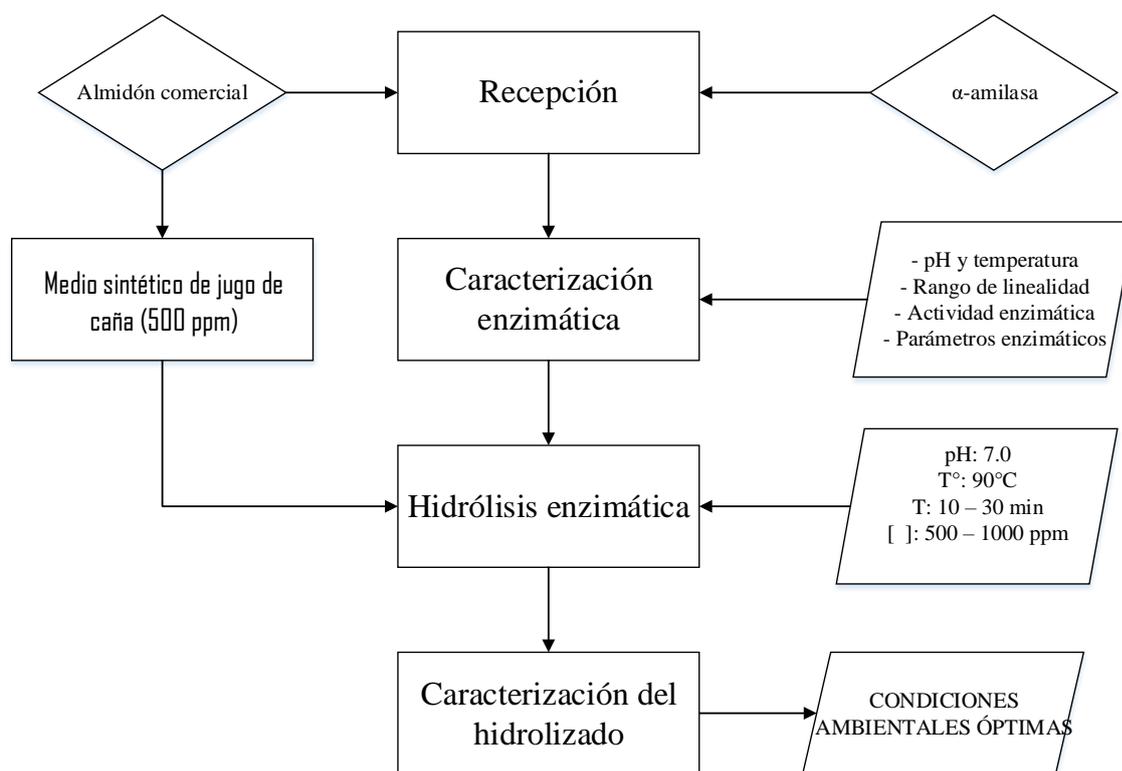


Figura 15. Primera etapa del proceso de hidrólisis enzimática al medio sintético de jugo de caña

3.3.1. Descripción de la primera etapa del diagrama de flujo

3.3.1.1.Recepción de materia prima

Se recibió la enzima alfa-amilasa de bacillus licheniformis, el Almidón de maíz GRM198, Sacarosa pura $\geq 99.5\%$ grado analítico de la empresa Bioextra y buffer fosfato potásico pH 7 (elaborado en el laboratorio de Química orgánica).

3.3.1.2.Caracterización enzimática

- Preparación de muestras y reactivos para caracterización enzimática

En primer lugar, se preparó el reactivo buffer fosfato potásico 0.05M a un pH 7; para esto, se mezcló 210 ml de solución de fosfato de potasio monobásico 0.1M y 290 ml de solución de fosfato de potasio dibásico 0.1M en vaso de precipitado de 500ml y se procedió a controlar el pH hasta llegar a 7. Posteriormente se aforó el

contenido con agua destilada en una fiola de 1L de volumen; con esta solución se preparó una solución de almidón de maiz a 500 ppm (0.250 gramos de almidón en 500ml de buffer fosfato 0.05M)) para realizar la caracterización de la enzima.

Además, se preparó una solución de HCl a 0.25M para la inactivación de la enzima, dado que es una enzima termoestable, esta no se inactiva con calor como usualmente se logra con otras enzimas, pero si en un pH bajo (como reporta la ficha técnica de la misma enzima, pero la versión comercial Termamyl 120L de Novozymes).

- **Pruebas preliminares: Determinación de temperatura y pH óptimo**

Para la determinación de estos valores, se tomó los rangos descritos en la ficha técnica de la enzima α – amilasa de *Bacillus Licheniformis*.

- Para la evaluación del efecto de la temperatura, se consideró un rango de temperatura de 60, 70, 80, 90 y 100°C; se preparó una solución de 500 ppm de almidón luego en un tubo de ensayo se colocó 2,7ml de esta solución se calentó a cada temperatura por 3 minutos y se adiciono 0.3 ml de enzima se realizó la reacción por 20 minutos. Finalmente, se procedió a leer la concentración de maltosa mediante azúcares reductores y se determinaron las actividades.
- Con respecto al pH, se tomó el rango de 6 a 7.5, para este análisis, se preparó soluciones de almidón a 500ppm utilizando buffer a distintos pH (6, 6.5, 7 y 7.5), siguiendo el mismo procedimiento anterior, se colocó en tubos de precipitado por 20 minutos y se sometió a baño María a la temperatura con mayor actividad obtenida.

- **Determinación del rango de linealidad**

Se prepararon diluciones enzimáticas de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500; utilizando como solución el buffer fosfato potásico y la enzima alfa-amilasa como soluto; y se graficó Tiempo de reacción vs. Producto.

- En 6 tubos de ensayo, se agregó a cada uno de ellos 2,7 ml de solución de almidón (500 ppm, pH 7) y se colocó en baño maría a 90°C durante 3 minutos.
- Se adicionó a cada uno de los tubos, 0.3 ml de concentrado enzimático de alfa-amilasa y se dejó reaccionar por 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos respectivamente.
- La reacción fue detenida mediante inactivación ácida, adicionando HCl 0.25M, y luego colocada en hielo.
- A la misma vez, se prepararon 2 tubos, uno para el blanco sustrato (2,7ml sustrato + 0,3ml tampón por 10min) y otro para el blanco enzima (0,3ml enzima + 2,7ml de tampón por 5min).
- Finalmente se realizó la determinación de azúcares reductores.

- **Determinación de proteínas (Método Bradford 1976)**

Para determinar el contenido de proteínas contenido en la enzima alfa-amilasa se utilizó el método Bradford, con el siguiente procedimiento:

- Agregar 500ul de muestra diluida (enzima α – amilasa *Bacillus Licheniformis*) en un tubo de ensayo (realizar la muestra por triplicado). Preparar un blanco con agua destilada.
- Añadir 5ul de reactivo Bradford a cada muestra y dejar reaccionar por 5 min.

- Finalmente, tomar lectura de la absorbancia con una longitud de onda de 595nm. Obtendremos la concentración interceptando esta medida en la curva de calibrado.

- **Determinación de actividad enzimática**

Para determinar la actividad de la enzima-alfa amilasa se tomó de referencia la dilución y tiempo obtenido en el rango de linealidad, para luego con la concentración de maltosa producida por la hidrólisis se calcule la actividad volumétrica (U/mL) y actividad específica (U/mg), donde se dividirá la actividad volumétrica sobre la concentración de proteínas.

- **Determinación de parámetros cinéticos**

Para la determinación de parámetros cinéticos, se midió el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, eligiendo la dilución que haya obtenido un comportamiento lineal por más tiempo; a su vez, se necesita de un sustrato a diferentes concentraciones para lograr la saturación de la enzima. En este caso, se prepararon soluciones de almidón de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm, se hidrolizaron con la enzima alfa amilasa diluida (1:100) por un tiempo obtenido del rango linealidad (20 minutos) a la temperatura óptima (90°C). Luego, se procedió a determinar azúcares reductores (Maltosa) para luego calcular la velocidad (g/L*min), y aplicar el método de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros cinéticos V_{max} y K_m analizando gráficamente $1/V_0$ en función de $1/S_0$. Donde se reemplazaron los datos de la recta obtenida en la ecuación de Michelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

Donde:

- La pendiente es K_M/V_{max}
- La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$
- La ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

3.3.2. Hidrolisis enzimática

Para determinar las condiciones ambientales óptimas se usó el diseño central compuesto rotacional (DCCR) haciendo uso de un medio sintético de jugo de caña.

- **Obtención del medio sintético de jugo de caña**

El medio sintético de caña de azúcar se preparó con 500 ml de una solución de tampón buffer fosfato potásico 0.05M a pH 7, agregando sacarosa a 16°Brix (pesando 80 gramos de sacarosa) y añadiendo 500 ppm de almidón (0.250 gramos de almidón) al matraz. Se colocó en un vaso de precipitado la sacarosa y se diluyó con el buffer con ayuda del agitador magnético, luego se incorporó el almidón a la solución. Diluida la solución, se aforó en una fiola de 1L y se almacenó en refrigeración hasta que se realizaron los análisis.

- **Hidrólisis enzimática del medio sintético de caña**

Para la hidrólisis se utilizó minireactores modificados acoplados a un sistema de calentamiento proveniente del baño maría, con una capacidad de trabajo de 100ml, el que se mantuvo en agitación por el uso de un agitador magnético.

Se trabajó con un volumen de medio sintético de 30 ml en los minireactores a una temperatura de 90°C (determinada anteriormente como temperatura optima) y se mantuvo en agitación, luego de 3 minutos se adicionó la enzima dejándola actuar por el tiempo correspondiente (según diseño experimental); una vez cumplido el tiempo, se procedió a detener la hidrólisis mediante inactivación ácida utilizando HCl 0.25M, luego colocarla en hielo por 3 min. Después de estos pasos, la muestra se reservó en las gradillas para su medición de maltosa por DNS.



Figura 16. Minireactor con agitador acoplado a baño María para hidrólisis de almidón.

- **Determinación de azúcares reductores (DNS - Miller, 1959)**

- Se tomó 0.5ml de muestra, se colocó en tubos de ensayo y se añadió 0.5ml de reactivo DNS.
- Se llevó a ebullición los tubos por 5min. y posteriormente se colocó en hielo por 3 min.

- Se añadió 5ml de agua destilada, se dejó reposar por 12 minutos.
 - Se agitó cada muestra y se procedió a tomar lectura de absorbancia a 540nm (Agua + DNS, como blanco).
 - El resultado de la concentración se obtuvo interceptando la medida de la absorbancia en la curva de calibrado (Este paso se realizó por triplicado, reportando el promedio), (**Ver curva de calibrado en Anexo 2**).
- **Determinación de las condiciones ambientales óptimas de hidrólisis de almidón**

Diseño experimental

Se utilizó el Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con dos factores (variables independientes): concentración de enzima (ppm) y tiempo de reacción (min); y como variables dependientes, la concentración de maltosa (medida indirecta de la reducción de almidón en la hidrólisis, por su producto), hidrólisis (%) y productividad (g/L*min). Las variables independientes y el plan experimental se muestran en las tablas 5 y 6 . Teniendo un diseño con 11 experimentos, los cuales 4 corresponden a un factorial de 2^2 , 3 tratamientos a los puntos centrales, 4 tratamientos a los puntos axiales con un $\alpha = 1.41421$. Estos rangos fueron determinados según las pruebas preliminares realizadas.

Tabla 5. Variables independientes del estudio

VARIABLES	NIVELES				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Concentración de enzima (ppm)	500	573	750	927	1000
Tiempo de reacción (minutos)	10	13	20	27	30

$\alpha = 1.41421$

Tabla 6. Diseño experimental DCCR para la hidrólisis de almidón por acción de la enzima α -amilasa

Variables independientes				
N°	Real		Codificado	
	Concentración de enzima (ppm)	Tiempo de reacción (minutos)	Concentración de enzima (ppm)	Tiempo de reacción (minutos)
1	573	13	-1.0	-1.0
2	573	27	-1.0	1.0
3	927	13	1.0	-1.0
4	927	27	1.0	1.0
5	500	20	-1.41421	0.0
6	1000	20	1.41421	0.0
7	750	10	0.0	-1.41421
8	750	30	0.0	1.41421
9 (C)	750	20	0.0	0.0
10 (C)	750	20	0.0	0.0
11 (C)	750	20	0.0	0.0

- **Determinación de concentración de maltosa**

La concentración de maltosa se determinó por el método DNS:

- Se tomó 0.5ml de muestra, se colocó en tubos de ensayo y se añadió 0.5ml de reactivo DNS.
- Se llevó a ebullición los tubos por 5min. y posteriormente se colocó en hielo por 3 min.
- Se añadió 5ml de agua destilada, se dejó reposar por 12 minutos.
- Se agitó cada muestra y se procedió a tomar lectura de absorbancia a 540nm (Agua + DNS, como blanco).

- El resultado de la concentración se obtuvo interceptando la medida de la absorbancia en la curva de calibrado (Este paso se realizó por triplicado, reportando el promedio),

- **Determinación de porcentaje de hidrolisis**

Teniendo en cuenta que el medio a trabajar era de 500ppm de almidón y el volumen que se trabajo fue de 0.03L, tendríamos 15 mg de almidón por cada lote. A demás teniendo la concentración de maltosa producida en la hidrolisis en g/L y luego convirtiéndola a mg/L para multiplicarla por el volumen de trabajo (0.03L) obtenemos la concentración de maltosa en mg pudiendo así remplazar en la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de hidrolisis:

$$\text{Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Concentración de maltosa producida (mg)}}{\text{Concentración de almidon inicial(mg)}} * 100$$

- **Determinación de productividad**

Para obtener la productividad (g/L*h) aplicamos la siguiente formula:

$$\text{Productividad} \left(\frac{g}{L * h} \right) = \frac{\text{Concentración de maltosa producida (g/L)}}{\text{Tiempo de reacción (h)}}$$

- **Resultados estadísticos – Optimización**

Habiendo obtenido los resultados de la hidrólisis, se realizó el tratamiento de los datos que se obtuvieron usando el software Statgraphics centurión (XV), empleando el ANOVA para los análisis estadísticos. Aquí se analizó las variables de respuestas independientemente y simultáneamente como múltiples respuestas, para así

maximizarlo en función de deseabilidad, dándonos como resultados los valores óptimos de concentración de enzima y tiempo de reacción los cuales seguidamente fueron validados en jugo de caña de azúcar.

- **Análisis de desviación promedio absoluta (Bas, D. y Boyacı, I., 2007)**

El análisis de desviación promedio absoluta o AAD por sus siglas en inglés (absolute average deviation) es un método directo para describir las desviaciones.

El AAD se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AAD = \left\{ \left[\sum_{i=1}^p \left(\frac{|y_{i\text{exp}} - y_{i\text{cal}}|}{y_{i\text{exp}}} \right) \right] / p \right\} * 100$$

Donde $y_{i\text{exp}}$ y $y_{i\text{cal}}$ son respuestas experimentales y calculadas, respectivamente, y p es el número de corridas experimentales.

3.3.3. Validación de los valores óptimos en jugo de caña de azúcar

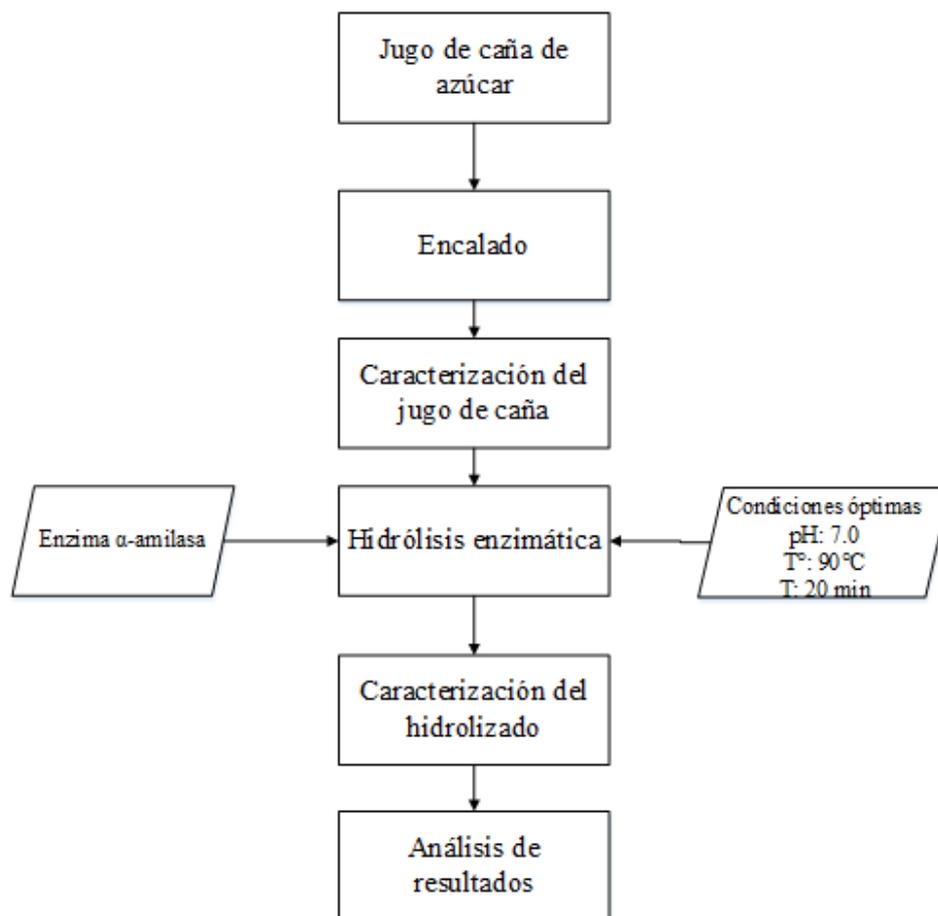


Figura 17. Segunda etapa del proceso de la hidrólisis de almidón, realizado en el jugo de caña de azúcar.

- Obtención del jugo de caña

La extracción del jugo de caña fue con ayuda de un trapiche y colocada en un recipiente en el laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa. Después, este jugo de caña de azúcar fue llevado al laboratorio de Química Orgánica para su análisis correspondiente.

- **Encalado del jugo**

El jugo de caña obtenido se sometió a un encalado con doble calentamiento. Al jugo frío se le agregó una solución de cal al 25% hasta llegar a un pH de 6.3, para luego ser sometido al primer calentamiento donde las partículas del jugo se colocaron en la parte superior y fueron retiradas. Luego, se volvió a encalarlo hasta llegar a pH 7; finalmente, se calentó hasta llegar a ebullición nuevamente, aquí las partículas en el jugo se sedimentan y también fueron retiradas de este, por filtración con una bomba de vacío, quedándonos así un jugo filtrado y clarificado.

- **Caracterización del jugo de caña encalado**

Se realizaron los siguientes análisis para la caracterización del jugo de caña de azúcar:

Determinación de °Brix

- Se calibró el refractómetro digital con agua destilada.
- Se tomó 1 gota de la muestra y se colocó en el lente del refractómetro.
- Se tomó lectura del ° Brix obtenidos en el refractómetro digital.

Determinación del porcentaje de pol

Para tomar esta medición, se realizaron los siguientes pasos:

- Se enjuagó el tubo de polarización de 2 a 3 veces, con el jugo filtrado.
- Se llenó el tubo con el jugo filtrado a una temperatura cercana a los 20°C, habiendo llegado a esa temperatura, se tomó lectura.

Determinación de azúcares reductores (DNS - Miller, 1959)

- Se tomó 0.5ml de muestra, se colocó en tubos de ensayo y se añadió 0.5ml de reactivo DNS.

- Se llevó a ebullición los tubos por 5min. y posteriormente se colocó en hielo por 3 min.
- Se añadió 5ml de agua destilada, se dejó reposar por 12 minutos.
- Se agitó cada muestra y se procedió a tomar lectura de absorbancia a 540nm (Agua + DNS, como blanco).
- El resultado de la concentración se obtuvo interceptando la medida de la absorbancia en la curva de calibrado (Este paso se realizó por triplicado, reportando el promedio),



Figura 18. Determinación de azúcares reductores por DNS

Determinación de almidón (Método USDA Starch Research method – Cole et al. , 2016)

Este método es utilizado para determinar almidón en jugo de caña, pero no es aplicable al jugo hidrolizado debido a que la enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* disminuye el poder de tinción de almidón y derivados con reactivo de yodo (Figueira, 2009), por lo tanto solo se midió el jugo de caña para conocer con cuanto se trabajó inicialmente.

Para realizar esta medición, se procede con los siguientes pasos:

- Se prepararon soluciones de HCl 0,25M, KIO_3 y KI
- Se colocó 250ml de jugo de caña en un matraz y se pesó.
- Se calentó en horno microondas durante 1:30 minutos, colocándole un cristal de reloj para evitar pérdidas por evaporamiento; seguidamente se colocó en hielo por 1 minuto.
- Se volvió a pesar para conocer cuánto se había evaporado, si esto ocurrió, se agrega agua destilada para corregir.
- La solución se colocó en un vaso de precipitado y se sometió a 30 minutos de sonificación.
- Se colocó 620ul de la solución sonificada en una celda, se agregó a la misma 400ul de HCl 0.25M, y 2ml de reactivos yodométricos (KIO_3 y KI).
- Finalmente se agitó la celda y se midió a 600nm en espectrofotómetro. (**Ver curva de calibrado en anexo 3**)

Hidrólisis enzimática del jugo de caña

Para este análisis, se trabajó con un volumen total de 30 ml entre el jugo de caña y enzima, este se colocó en el minireactor con los parámetros óptimos hallados previamente; terminada la hidrólisis se inactivo y se dejó enfriar para hacer los análisis correspondientes.

- Caracterización del jugo de caña hidrolizado

Una vez culminada la hidrólisis se procede a analizar el contenido de almidón en el jugo de caña (en función a la producción de maltosa por DNS), °Brix y pol como ya se explicó el procedimiento anteriormente. Y seguidamente se calculó el % de hidrolisis y la productividad para su posterior análisis de los resultados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*

Antes de realizar las corridas experimentales, se tuvo que realizar la caracterización de la enzima que consistió en la determinación de temperatura y pH, el rango de linealidad, actividad enzimática y constantes cinéticas.

La enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* se caracteriza por ser termoestable y tener un intervalo amplio pH, por esa razón estas han sido rápidamente introducidas en los procesos industriales por ser más activas en esas condiciones, además muestra una estabilidad térmica menos dependiente de los iones calcio (Ca^{2+}) que las del *Bacillus amiloliquefaciens* (Martínez, 2005).

4.1.1. Pruebas preliminares: determinación de temperatura y pH óptimo

- Temperatura

Uno de los factores determinantes para la actividad de una enzima es la temperatura, por ello se trabajó un rango de 60 a 100°C para determinar la temperatura óptima.

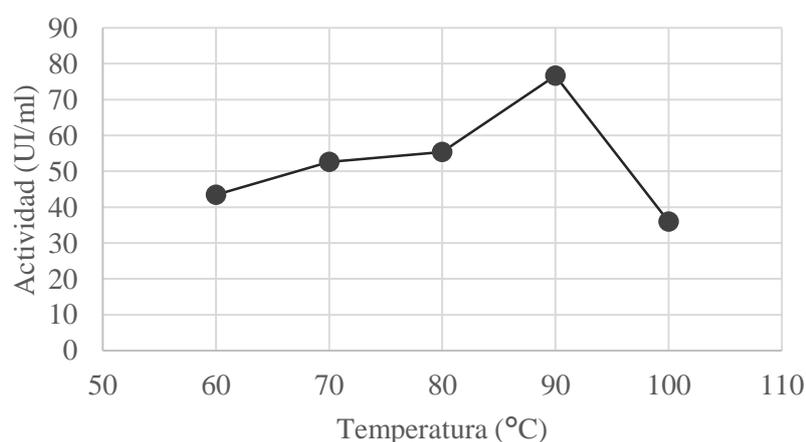


Figura 19. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima alfa-amilasa de *B. Licheniformis*

En la figura 19 encontramos una marcada diferencia entre las temperaturas y la que reporta una mayor actividad es la de 90°C, el cual coincide con el valor reportado Bozic et al. (2011), sin embargo difiere de lo reportado por Ferrer (2014) que

obtiene una temperatura optima de 58°C, lo cual podría deberse que ambas enzimas son de diferentes cepas y producidas experimentalmente por los mismo autores.

- pH

Otro factor determinante para la actividad enzimática es el pH, por lo cual se evaluó su actividad en un intervalo de 6 a 7.5 para obtener el pH óptimo.

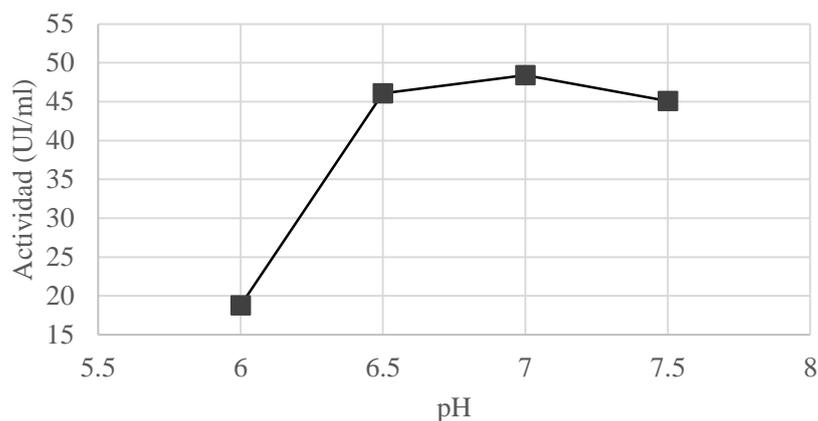


Figura 20. Efecto del pH en la actividad de la enzima alfa-amilasa de *B. Licheniformis*

En la figura 20 podemos observar que la diferencia entre el pH de 6.5 a 7.5 no es tan marcada, lo cual reafirma lo anterior descrito por Martínez (2005) que la enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* trabaja en un amplio rango de pH; pero también se tendría que recalcar que la enzima decrece notablemente su actividad a pH más bajos. Para esta investigación tomaremos el pH de 7 como optimo, que fue el que mayor actividad reporto.

4.1.2. Determinación del rango de linealidad

En el siguiente conjunto de datos, el producto se mide en varios momentos (5, 10, 15, 20 y 30 minutos) para cinco concentraciones diferentes de enzima (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:500) y una concentración de sustrato (500ppm).

Estas curvas se utilizan para definir la cantidad de enzima, que se puede utilizar para mantener las condiciones de velocidad inicial (porción lineal inicial de la

reacción enzimática) durante un período de tiempo determinado, el cual se usa para experimentos posteriores (Brooks, 2012).

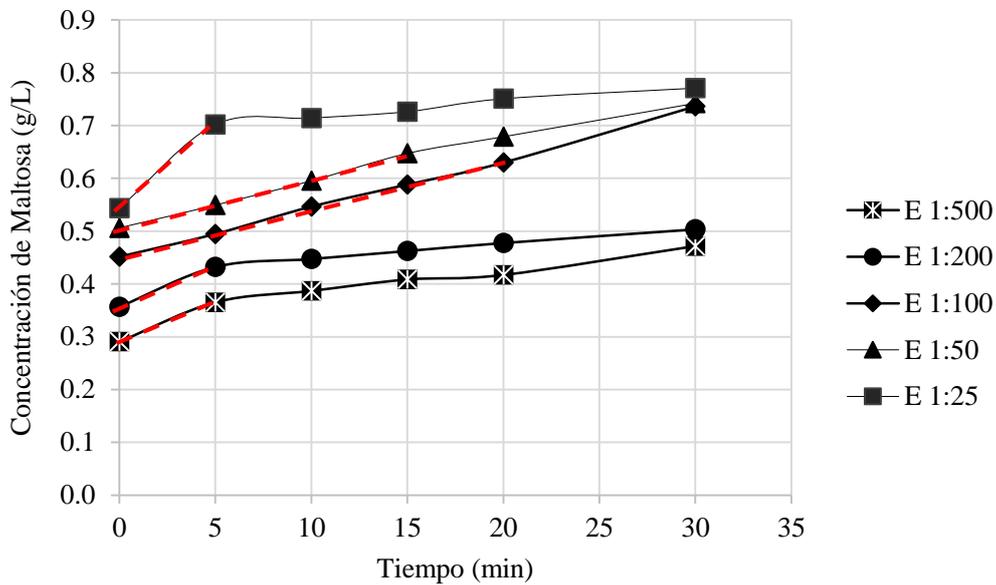


Figura 21. Perfil del rango de linealidad de la hidrolisis enzimática del almidón

En la figura 21 encontramos las curvas para las diferentes diluciones de enzima, la dilución 1:25 alcanza una meseta temprana, debido al agotamiento del sustrato (Brooks, 2012).

Para extender el tiempo en que la reacción mantiene una cinética lineal, el nivel de enzima se diluyó, como se muestra para la curva de la dilución (1:50, 1:100, 1:200 y 1:500) encontrando que la curva de 1:100 mantiene un mayor tiempo lineal, siendo este de 20 minutos, el cual se tomó para determinar la actividad enzimática y las constantes cinéticas.

También observamos en la figura 21 que tres curvas (1:25, 1:50 y 1:100) se acercan a un valor de meseta máximo similar de formación de producto, lo cual indica que la enzima permanece estable en las condiciones probadas. Sin embargo, en las diluciones (1:200 y 1:500) el valor de meseta máximo del producto formado no

alcanza el mismo que los anteriores, probablemente debido a la inestabilidad de esta dilución con el tiempo (Brooks, 2012).

4.1.3. Determinación de la actividad enzimática

Anterior a la determinación de la actividad enzimática se determinó la concentración de proteínas reportando como resultado 0.934 mg/mL

La enzima alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* precisa una actividad específica de 0.284 U/mg, siendo U la cantidad de alfa-amilasa que forma 1 μ mol de maltosa por minuto a pH 7 y 90°C por un tiempo de 20 minutos y una actividad enzimática volumétrica de 26,48 U/mL bajo las mismas condiciones.

Comparar las actividades de las alfa amilasas en otras investigaciones puede ser complicado, debido a que están son halladas en diferentes condiciones, son producidas por diferentes cepas o reportadas por diferentes métodos. Sin embargo, se pudo recaudar las siguientes actividades de alfa-amilasas:

Tabla 7. Actividades de alfa-amilasas reportadas por diferentes investigaciones

Autor	Cepa	Condiciones	Actividad	Método	Observación
Bozic et al (2011)	Bacillus Licheniformis ATCC-9945a	T°=75°C/ pH=6.5	5.2 U/mL	Azucares reductores	Fue determinado por 15 min.
		T°=90°C	7.4 U/mL		Ensayos independientes para nm nmjnmnm determinar T° y pH optimo
		pH= 7	4.7 U/mL		
Ferrer (2014)	Bacillus Licheniformis BTA-03	T°=90°C	4.3 U/mL	Almidón	Ensayos independientes para determinar T° y pH optimo
		pH= 7	6.1 U/mL		Condiciones no específicas
		Enzima purificada	18.8U/mg		

Como podemos observar en la tabla 7 las actividades volumétricas (U/mL) son menores en comparación a las que se reportó en esta investigación, sin embargo se debe resaltar que no se realizaron bajo las mismas condiciones, y con respecto a la

actividad específica (U/mg) encontramos la descrita por Ferrer (2014) que es más elevada, no obstante esta se determinó en función de almidón y según Xiao, Storms y Tsang (2006) donde compara los métodos para determinar las actividades en alfa-amilasas, estas son mayores cuando se hacen en función del sustrato (almidón) en vez del producto (azúcares reductores) lo cual nos puede llevar a una sobreestimación de este valor.

4.1.4. Determinación de parámetros cinéticos

Una vez que se establecieron las condiciones de velocidad inicial, la concentración del sustrato se varió para generar una curva de saturación y así determinar los valores de K_m y V_{max} .

En la figura 22 encontramos la representación del aumento de la velocidad conforme aumenta las concentraciones de sustrato (almidón) que se trabajó en un rango de 0.1g/L a 1g/L, a pH 7 en 90°C con la dilución de enzima alfa-amilasa 1:100 en un tiempo de 20 minutos.

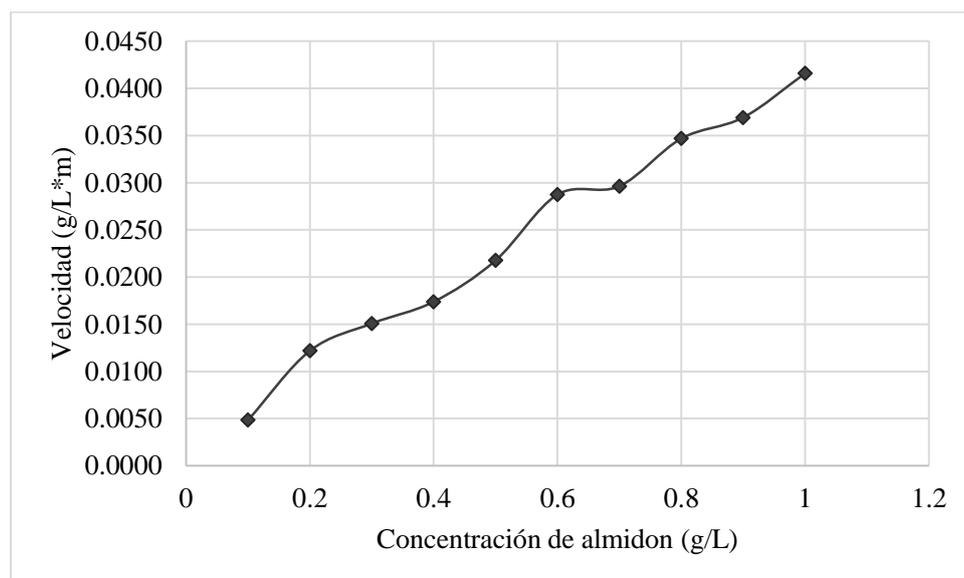


Figura 22. Velocidad de reacción en función de concentración del sustrato (almidón)

La figura 23 es la representación de Lineweaver-Burk como herramienta grafica que se utilizó para calcular los parámetros cinéticos de la enzima alfa-amilasa. Los parámetros cinéticos obtenidos son: la constante de Michaelis-Menten (K_m) de 5.82 g/L y la velocidad máxima (V_{max}) de 0.30 g/L*min

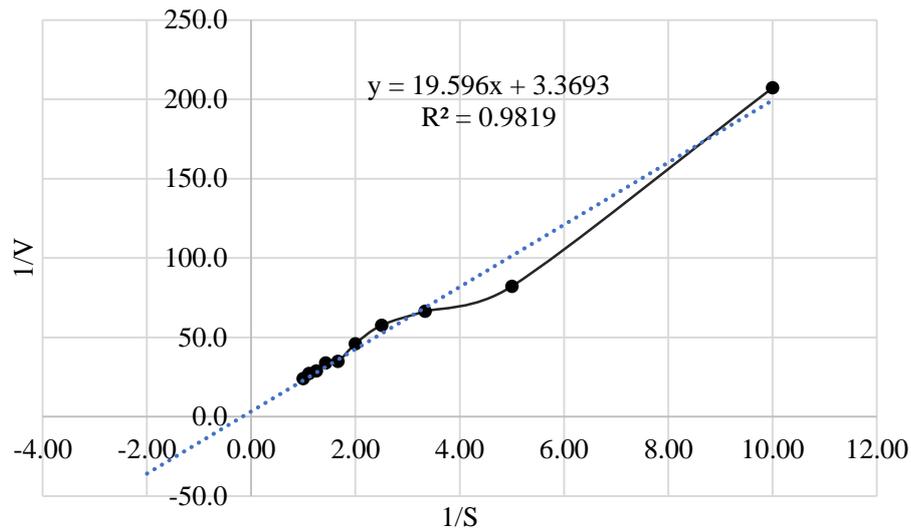


Figura 23. Representación de Lineweaver-Burk para determinar parámetros cinéticos experimentales

Al evaluar los datos emitidos por otras investigaciones encontramos que los valores de K_m son similares al que reportamos, con la diferencia estos son reportados en mg/ml, por lo que realizamos una conversión a g/L para poder compararlos.

Por ejemplo, Sapadip et al. (2014) y Ferrer (2014) reportan un K_m de 6.2g/L y 8,7g/L respectivamente (de alfa-amilasas de *B. Licheniformis*) y de otras cepas encontramos a Hoissain (2006) con de 4.8 g/L (*B. stearothermophilus*) y a Peña (2009) con 6.7 g/L (*A. Niger*). Según lo descrito por Gonzales (sf.) el valor de K_m nos indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato y que mientras este valor sea menor tiene mayor afinidad, por lo cual el valor de $K_m=5.83$ g/L de nuestra enzima tendría más afinidad con respecto a las otras, exceptuando a la de *B.*

stearotherophilus. Por otro notamos que el K_m obtenido es mucho mayor a la concentración de almidón que usamos en esta investigación (500ppm o 0.5 g/L), lo cual indica que la velocidad es muy sensible a los cambios en las concentraciones de sustrato (Brooks, 2012).

Para el caso del valor de V_{max} era difícil una comparación debido a que los autores reportaban diferentes unidades como Saptadip et al. y Ferrer con 1.04 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$ y 229.537 $\mu\text{g/min}$ respectivamente (de B. Licheniformis),. Sin embargo, se pudo contrastar con Hoissain reporto un valor 6.67 $\text{g/L}\cdot\text{min}$ (por conversión de unidades) el cual es superior al nuestro, pero cabe resaltar que este fue de la cepa de B. stearotherophilus.

4.2. Hidrolisis enzimática del almidón

4.2.1. Medio sintético de jugo de caña

Se realizó la hidrolisis usando un medio sintético de jugo de caña de azúcar, bajo las condiciones presentadas en la siguiente tabla:

Tabla 8. Condiciones del medio sintético para la hidrolisis

pH	7
Brix	16° Brix
Sacarosa (pol)	16%
Almidón	0.5 g/L
Azucares reductores	0.3 g/L
Temperatura	90°C

4.2.2. Optimización de las condiciones ambientales de la hidrolisis del medio sintético

Para esta investigación se aplicó el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) por el Método de Superficie de Respuesta (RSM), el cual conto con 2 factores

experimentales y 3 de respuesta con el que se obtuvieron 11 corridas incluyendo 3 puntos centrales (especificados anteriormente en la metodología, tabla 6).

En la tabla 9 encontramos los resultados de las corridas experimentales, que se realizaron en un mini-reactor de 100 ml de capacidad, trabajado en un sistema por lotes, para luego determinar los resultados de manera indirecta como concentración de maltosa por el método de DNS como concentración de maltosa, y así hacer el cálculo de la hidrólisis y la productividad consideradas como variables de respuesta, las cuales fueron procesadas por el software Statgraphic Centurion XV individualmente y conjuntamente en función de deseabilidad.

Tabla 9. Resultados experimentales de concentración de maltosa, hidrólisis y productividad

	Concentración de Enzima (ppm)	Tiempo de Reacción (min)	Concentración de Maltosa (g/L)	Hidrólisis (%)	Productividad (g/l*h)
1	573	13	0.175	35	0.808
2	573	27	0.196	39	0.435
3	927	13	0.333	67	1.537
4	927	27	0.251	50	0.557
5	500	20	0.197	39	0.590
6	1000	20	0.200	40	0.599
7	750	10	0.186	37	1.115
8	750	30	0.223	45	0.446
9	750	20	0.334	67	1.002
10	750	20	0.264	53	0.793
11	750	20	0.391	78	1.173

En la tabla 9 encontramos que los valores para concentración de maltosa variaron de 0.175 a 0.391 g/L, para hidrólisis de 35 a 78% y para productividad de 0.435 a

1.537 g/L*h, siendo la corrida número 11 que corresponde a uno de las 3 punto centrales obtiene los valores más altos con respecto a la concentración de enzima e hidrolisis, sin embargo la corrida número 3 es la que tiene mayor productividad por tener un menor tiempo en comparación con la corrida 11 que es la que le sigue en productividad.

Al observar los tres puntos centrales encontramos que los puntos los valores no son tan cercanos, lo cual puede deberse a lo que mencionaba Martínez (2005), que indicaba que el almidón es una mezcla de amilopectina y amilosa por ello conlleva a una estructura compleja, por lo tanto al momento de hidrolizar sus productos de reacción también varían y esto repercute en la obtención de resultados.

En la presente investigación se esperaba que el almidón se redujera en un 60%, por lo que si evaluamos el porcentaje de hidrolisis encontramos que tres corridas que superan a lo esperado, que son la corrida 3 (67%), la corrida 9 (67%) y la corrida 11 (78%).

4.2.2.1. Análisis de la concentración de maltosa

En la siguiente sección se evaluó independientemente como variable de respuesta la concentración de maltosa con respecto a la concentración de enzima y tiempo de reacción de los datos obtenidos de las 11 corridas experimentales.

En la tabla 10 observamos el análisis de varianza (ANOVA) donde se particiona la variabilidad de la variable de respuesta (Concentración de maltosa) en piezas separadas para cada uno de los efectos y así probar la significancia estadística de

cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

En este caso, ningún efecto tiene un valor-P menor que 0.05, indicando que no existe significancia (con un nivel de confianza del 95.0%) en las variables independientes ni entre las interacciones de los factores sobre la concentración de maltosa de la hidrolisis de la enzima alfa – amilasa de *B. Licheniformis* a 90°C.

Tabla 10. Análisis de varianza para concentración de maltosa en la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración de enzima	0.0058995	1	0.0058995	1.65	0.2557
B:Tiempo de reacción	0.00000940493	1	0.00000940493	0.00	0.9611
AA	0.0178814	1	0.0178814	4.99	0.0758
AB	0.00265225	1	0.00265225	0.74	0.4290
BB	0.0160253	1	0.0160253	4.47	0.0881
Error total	0.0179202	5	0.00358405		
Total (corr.)	0.052698	10			

Para este análisis obtenemos un R^2 de 0.659945 que expresa el modelo, así ajustado, explica 65.9945% de la variabilidad en concentración de maltosa con respecto a la hidrolisis de almidón en el medio sintético de jugo de caña.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos.

En la figura 24 se muestra el diagrama de Pareto donde se grafica las estimaciones en orden decreciente para cada uno de los efectos estimados y las interacciones con

respecto a la concentración de maltosa de la hidrolisis, en el cual evidenciamos lo antes mencionado, que ninguno de los efectos ni sus interacciones son significantes. En la figura 24 observamos que el efecto que influyo más sobre la concentración de maltosa fue la concentración de enzima (efecto cuadrático) y el de la menos influencia fue tiempo de reacción (efecto lineal), pero ambas no significantes.

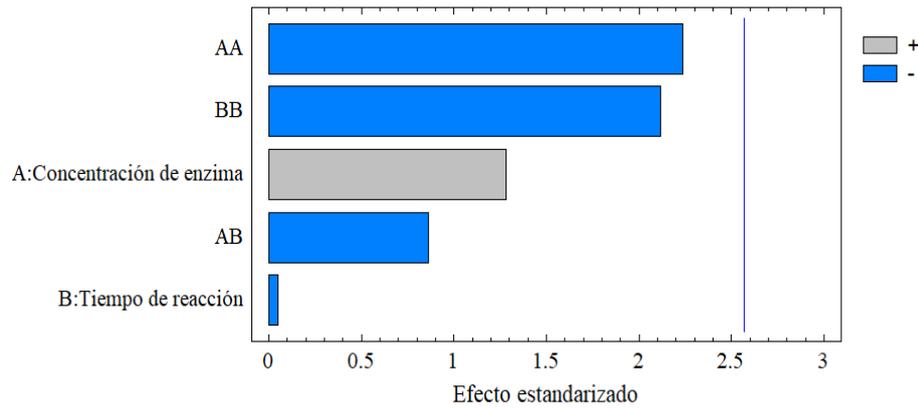


Figura 24. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la concentración de maltosa en el medio sintético de jugo de caña

Por lo tanto, la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos para la respuesta concentración de maltosa para la hidrolisis de almidón por alfa-amilasa en el medio sintético de jugo de caña es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Concentración de maltosa} = & -1.53923 + 0.00326327 * \text{Concentración de enzima} \\ & + 0.058919 * \text{Tiempo de reacción} - 0.00000179613 * \text{Concentración de enzima}^2 - \\ & 0.0000207829 * \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - \\ & 0.00108717 * \text{Tiempo de reacción}^2 \end{aligned}$$

En donde cada una de las variables mantiene sus unidades originales que sería g/L para concentración de maltosa, ppm para concentración de enzima y minutos para el tiempo de reacción.

En la tabla 11 muestra la combinación de los niveles (bajo, alto y óptimo) de los factores (concentración de enzima y tiempo de reacción) la cual maximiza la concentración de maltosa obteniendo como valor óptimo calculado 0.333208 g/L.

Tabla 11. Valores de los niveles de los factores con respecto a la concentración de maltosa

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración de enzima (ppm)	499.684	1000.32	795.629
Tiempo de reacción (min)	10.1005	29.8995	19.4937

En las figuras 25 y 26 visualizamos gráficamente las respuestas ajustadas al modelo de regresión propuestas para la concentración de maltosa entre las interacciones de las variables independientes (concentración enzima y tiempo de reacción) para la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por la enzima alfa-amilasa de *B. Licheniformis*.

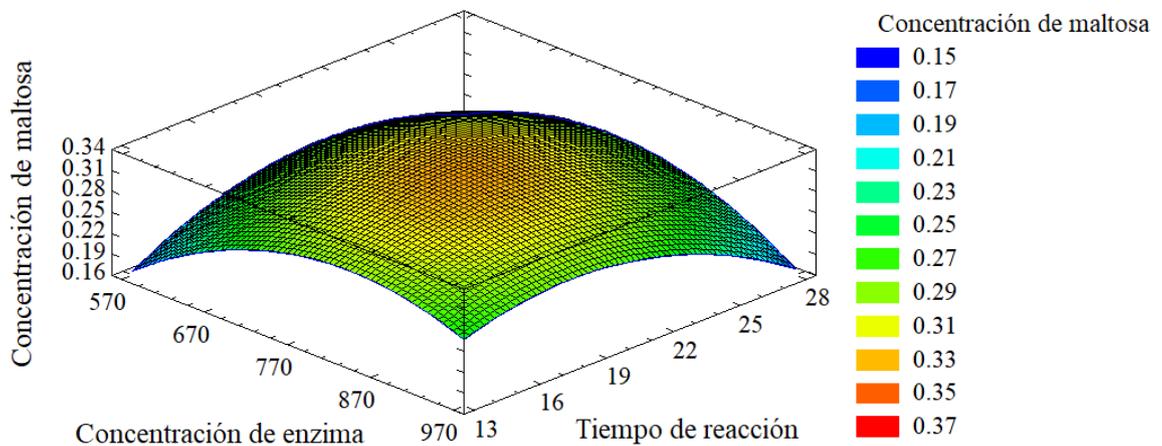


Figura 25. Superficie de respuesta para la optimización de concentración de maltosa en la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

En la figura 25 observamos la superficie de respuesta que muestra como se relaciona la concentración de maltosa con las dos variables según la ecuación del

modelo, encontrando así una malla que tiene obtiene su punto más alto (región anaranjada) aproximadamente en los puntos medios de las variables, el cual se visualiza más claro en la figura 26 donde la región anaranjada que representa la concentración de maltosa mayor se encuentra determinada en un punto medio del tiempo de reacción y la una concentraciónde enzima superior al punto central.

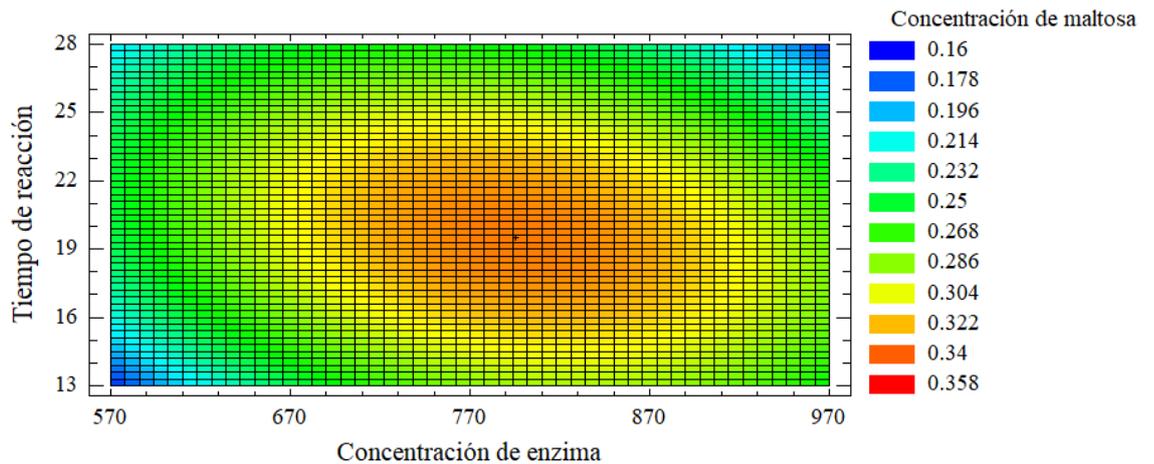


Figura 26. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización de concentración de maltosa en la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

Por último, se realizó el análisis de desviación promedio absoluta (AAD) que se utilizó para una mejor evaluación del modelo propuesto, obteniendo un AAD de 13.185% con respecto a la concentración de maltosa (**Anexo 8**).

Según Bass y Boyaci (2007) la evaluación de los valores de R^2 y AAD juntos es una mejor manera de comprobar la precisión del modelo. R^2 debe ser cerca de 1.0 y el AAD entre los datos pronosticados y observados debe ser lo más pequeño posible. Los valores de los valores R^2 y AAD significan que la ecuación del modelo define el verdadero comportamiento del sistema y puede ser utilizado para la interpolación en el dominio experimental.

Teniendo en cuenta que obtuvimos un R^2 de 0.659945 y un AAD de 13.19% podemos concluir que es posible determinar el punto estacionario usando RSM pero

no significa que todos los puntos estacionarios sean óptimos para la reacción enzimática (Bass y Boyaci, 2007).

4.2.2.2. Análisis de porcentaje de hidrolisis

En la siguiente sección se evaluó independientemente como variable de respuesta la hidrolisis en porcentaje con respecto a la concentración de enzima y tiempo de reacción.

En la tabla 12 encontramos el análisis de varianza (ANOVA) donde se particiona la variabilidad de la variable de respuesta (porcentaje de hidrolisis) en piezas separadas para cada uno de los efectos y así probar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

En este caso, ningún efecto tiene un valor-P menor que 0.05, indicando que no existe significancia (con un nivel de confianza del 95.0%) en las variables independientes ni entre las interacciones de los factores sobre el porcentaje de la hidrolisis de la enzima alfa – amilasa de *B. Licheniformis* a 90°C.

Tabla 12. Análisis de varianza para porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración de enzima	246.586	1	246.586	1.72	0.2466
B:Tiempo de reacción	0.355445	1	0.355445	0.00	0.9622
AA	730.697	1	730.697	5.10	0.0735
AB	110.25	1	110.25	0.77	0.4206
BB	637.508	1	637.508	4.45	0.0887
Error total	716.553	5	143.311		
Total (corr.)	2132.0	10			

Para este análisis obtenemos un R^2 de 0.663906 que expresa el modelo ajustado, esto explica que el 66.3906% de la variabilidad en porcentaje de hidrolisis del almidón en el medio sintético de jugo de caña.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos.

En la figura 27 se muestra el diagrama de Pareto donde se grafica las estimaciones en orden decreciente para cada uno de los efectos estimados y las interacciones con respecto al porcentaje de hidrolisis, en el cual evidenciamos lo antes mencionado, que ninguno de los efectos ni sus interacciones fueron significantes.

En la figura 27 observamos que el efecto que influyo más sobre el porcentaje de hidrolisis fue la concentración de enzima (efecto cuadrático) y el de la menos influencia fue tiempo de reacción (efecto lineal), pero ambas no significantes.

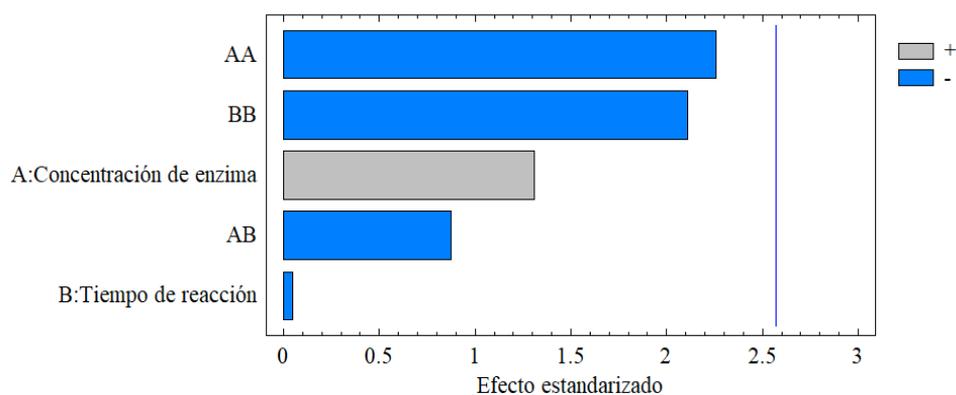


Figura 27. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para el porcentaje de hidrolisis en el medio sintético de jugo de caña

Por lo tanto, la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos para la respuesta porcentaje de hidrolisis de almidón por alfa-amilasa en el medio sintético de jugo de caña es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{\% de Hidrolisis} = & -311.451 + 0.660736 * \text{Concentración de enzima} + \\ & 11.8214 * \text{Tiempo de reacción} - 0.000363082 * \text{Concentración de enzima}^2 - \\ & 0.00423729 * \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - \\ & 0.216838 * \text{Tiempo de reacción}^2 \end{aligned}$$

En donde cada una de las variables mantiene sus unidades originales que sería % para la hidrolisis, ppm para concentración de enzima y minutos para el tiempo de reacción.

En la tabla 13 muestra la combinación de los niveles (bajo, alto y óptimo) de los factores (concentración de enzima y tiempo de reacción) la cual maximiza el porcentaje de hidrolisis obteniendo como valor óptimo calculado 66.7331%.

Tabla 13. Valores de los niveles de los factores con respecto al porcentaje de hidrolisis

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración de enzima	499.684	1000.32	796.222
Tiempo de reacción	10.1005	29.8995	19.4804

En las figuras 28 y 29 visualizamos gráficamente las respuestas ajustadas al modelo de regresión propuestas para el porcentaje de hidrolisis entre las interacciones de las variables independientes (concentración enzima y tiempo de reacción) para la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por la enzima alfa-amilasa de *B. licheniformis*.

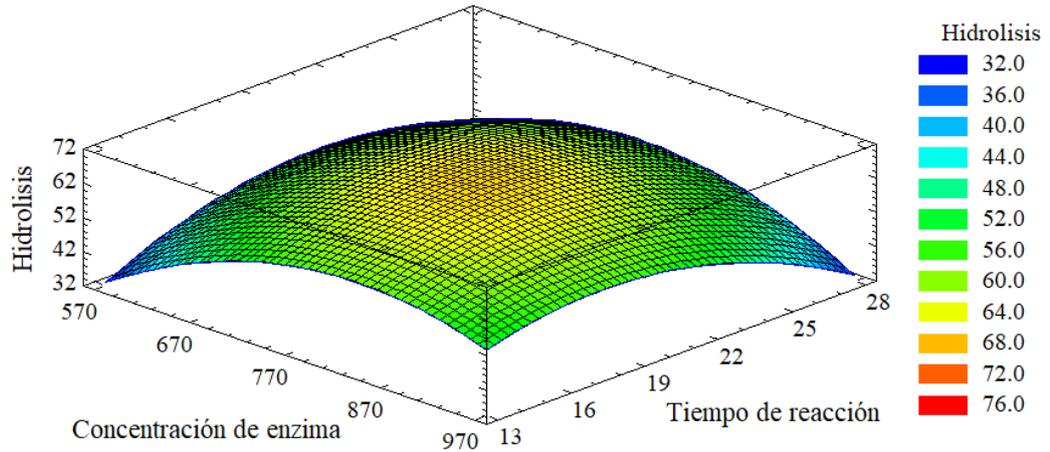


Figura 28. Superficie de respuesta para la optimización del porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

En la figura 28 observamos la superficie de respuesta que muestra como influencia en el porcentaje de hidrolisis la variación de la concentración de enzima y tiempo de redacción según la ecuación del modelo, obteniendo una superficie que tiene su punto más alto (región anaranjada) aproximadamente en los puntos medios de las variables, el cual se visualiza más claro en la figura 29 donde la región anaranjada representa el porcentaje de hidrolisis mayor. Sin embargo lo planteado en esta investigación fue lograr la hidrolisis del almidón en un 60%, determinando como zona óptima la región verde claro, obteniendo así un rango más amplio los puntos óptimos (dados en la tabla 13), siendo 14 a 25 minutos para el tiempo de reacción y de 670 a 920 ppm para la concentración de enzima aproximadamente.

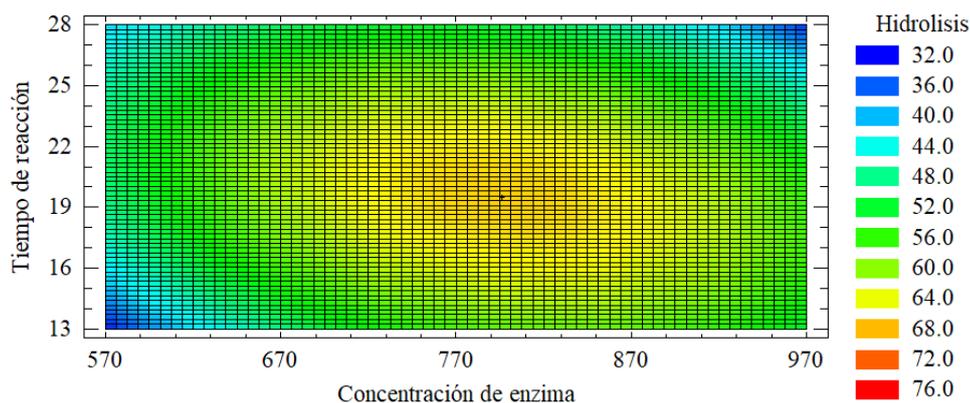


Figura 29. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización del porcentaje de hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

Por último, se realizó el análisis de AAD que se utilizó para una mejor evaluación del modelo propuesto, obteniendo un AAD de 13.375% con respecto al porcentaje de hidrolisis (**Anexo 8**).

Teniendo en cuenta que obtuvimos un R^2 de 0.663906 y un DAA de 13.375% podemos concluir que es posible determinar el punto estacionario usando RSM pero no significa que todos los puntos estacionarios sean óptimos para la reacción enzimática (Bass y Boyaci, 2007).

4.2.2.3. Análisis de productividad

Para finalizar los análisis independientes se evaluó como variable de respuesta la productividad con respecto a la concentración de enzima y tiempo de reacción.

En la tabla 14 encontramos el análisis de varianza (ANOVA) donde se particiona la variabilidad de la variable de respuesta (productividad) en piezas separadas para cada uno de los efectos y así probar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

En este caso, el tiempo de reacción (resaltado en negrita) tiene un valor-P menor que 0.05, indicando que existe significancia (con un nivel de confianza del 95.0%) en al menos una de las variables independientes pero no entre las interacciones de los factores sobre productividad de la hidrolisis de la enzima alfa – amilasa de *B. Licheniformis* a 90°C.

Tabla 14. Análisis de varianza para la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por alfa amilasa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración de enzima	0.0932552	1	0.0932552	2.08	0.2087
B:Tiempo de reacción	0.660738	1	0.660738	14.75	0.0121
AA	0.145891	1	0.145891	3.26	0.1310
AB	0.0921122	1	0.0921122	2.06	0.2111
BB	0.0259054	1	0.0259054	0.58	0.4813
Error total	0.224041	5	0.0448082		
Total (corr.)	1.21862	10			

Para este análisis obtenemos un R^2 de 0.816152 que expresa el modelo ajustado, esto explica que el 81.6152 % de la variabilidad en productividad de la hidrolisis del almidón en el medio sintético de jugo de caña.

El diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. Los efectos estandarizados son estadísticos t que prueban la hipótesis nula de que el efecto es 0. El diagrama también muestra una línea de referencia para indicar cuáles efectos son estadísticamente significativos.

En la figura 30 se muestra el diagrama de Pareto donde se grafica las estimaciones en orden decreciente para cada uno de los efectos estimados y las interacciones con

respecto a la productividad de la hidrólisis, en el cual evidenciamos lo antes mencionado, que el tiempo de reacción es significativo

En la figura 30 observamos que el efecto que influyo más sobre la productividad fue el tiempo de reacción (efecto lineal) y el de la menos influencia fue tiempo de reacción (efecto cuadrático).

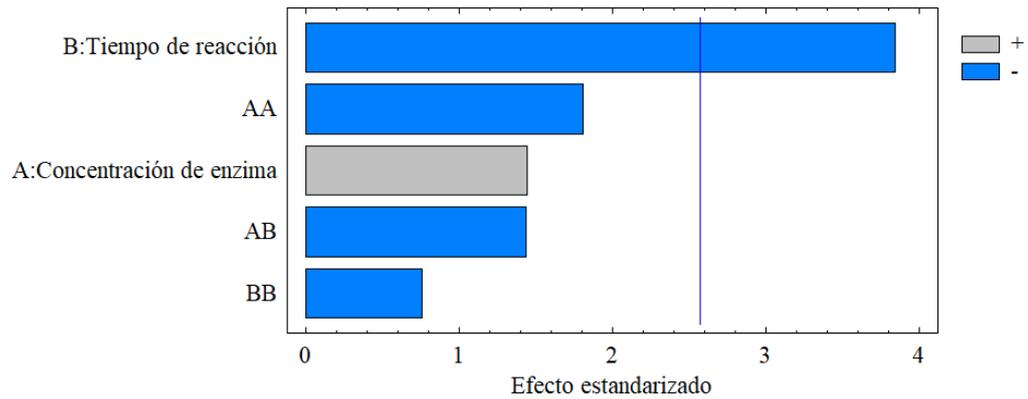


Figura 30. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la productividad de la hidrólisis en el medio sintético de jugo de caña

En la figura 31 observamos cómo influyen en la productividad cada factor (concentración de enzima y tiempo de reacción) independientemente, donde se visualiza como a medida que incrementa la concentración de enzima aumenta la productividad hasta cierto punto y luego comienza a decrecer, y para el caso del tiempo de reacción la productividad decrece marcadamente conforme aumenta el tiempo de redacción.

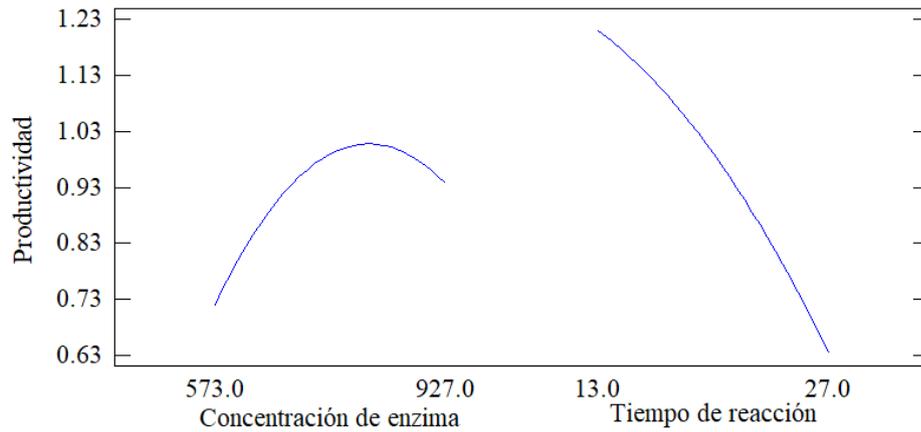


Figura 31. Grafica de efectos principales para la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña

En la figura 32 encontramos cómo se comporta la productividad conforme a la interacción de los factores, donde vemos que para el mayor tiempo de reacción la productividad no muestra una gran diferencia para la variación de concentración de enzima, sin embargo, para el tiempo más corto si es notable la influencia al aumentar la concentración de enzima.

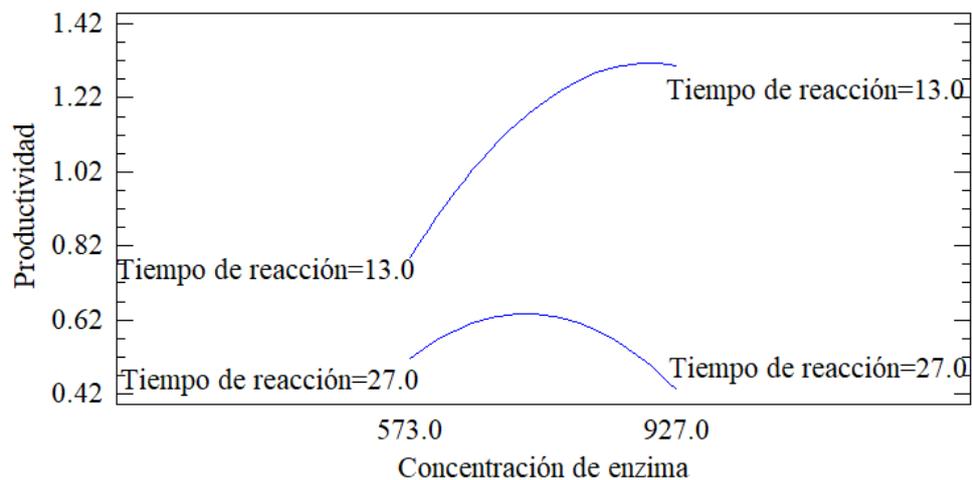


Figura 32. Grafica de interacción de los efectos principales para la productividad de la hidrolisis del sintético de jugo de caña

Por lo tanto, la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos para la respuesta productividad de la hidrolisis de almidón por alfa-amilasa en el medio sintético de jugo de caña es la siguiente:

$$\text{Productividad} = -3.92296 + 0.0107551 * \text{Concentración de enzima} + 0.106093 * \text{Tiempo de reacción} - 0.00000513039 * \text{Concentración de enzima}^2 - 0.000122478 * \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - 0.00138225 * \text{Tiempo de reacción}^2$$

En donde cada una de las variables mantiene sus unidades originales que sería g/L*h para la productividad, ppm para concentración de enzima y minutos para el tiempo de reacción.

En la tabla 15 muestra la combinación de los niveles (bajo, alto y óptimo) de los factores (concentración de enzima y tiempo de reacción) la cual maximiza la productividad obteniendo como valor óptimo 1.42215 g/L*h

Tabla 15. Valores de los niveles de los factores con respecto a la productividad de la hidrolisis

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración de enzima	499.684	1000.32	927.6
Tiempo de reacción	10.1005	29.8995	10.1005

En las figuras 33 y 34 visualizamos gráficamente las respuestas ajustadas al modelo de regresión propuestas para la productividad entre las interacciones de las variables independientes (concentración enzima y tiempo de reacción) para la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por la enzima alfa-amilasa de *B. Licheniformis* a 90°C.

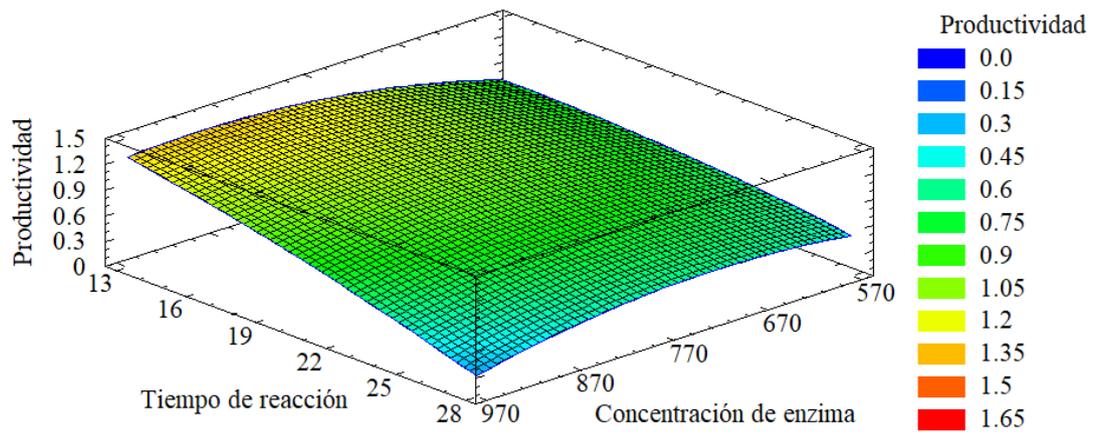


Figura 33. Superficie de respuesta para la optimización de la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

En la figura 33 observamos en la superficie de respuesta la influencia en la productividad de la hidrolisis con respecto a la variación de la concentración de enzima y tiempo de reacción según la ecuación del modelo, obteniendo que a medida que el tiempo es menor y la concentración de enzima mayor se produce una productividad más elevada (región anaranjada).

En la superficie de contornos graficado en figura 34 se visualiza como la area optima para la productividad se encuentra en la parte inferior de color anaranjado, por el menor tiempo de reacción el cual resultado significativo para este analisis.

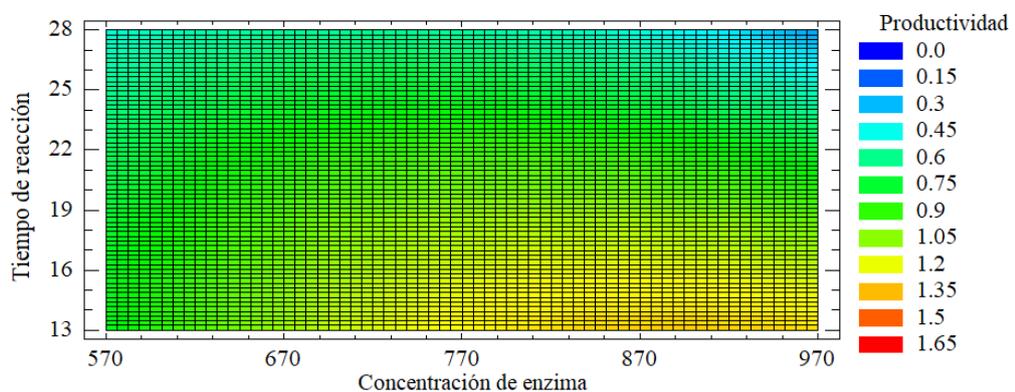


Figura 34. Contornos de la superficie de respuesta para la optimización de la productividad de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

Por último, se realizó el análisis de AAD que se utilizó para una mejor evaluación del modelo propuesto, obteniendo un AAD de 14.889% con respecto a la productividad (**Anexo 8**).

Teniendo en cuenta que obtuvimos un R^2 de 0.816152 y un AAD de 14.889% podemos concluir que es posible determinar el punto estacionario usando RSM pero no significa que todos los puntos estacionarios sean óptimos para la reacción enzimática (Bass y Boyaci, 2007).

4.2.2.4. Análisis de múltiples respuestas de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña

Una vez que se realizó los análisis independientes para cada variable de respuesta (concentración de enzima, porcentaje de hidrolisis y productividad) para evaluar la influencia de las variables independientes (concentración de enzima y tiempo de reacción) sobre estas, se procedió a hacer un análisis de múltiples respuestas, donde se evaluaron las tres al mismo tiempo.

Este procedimiento ayudó a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Esto se hizo maximizando la función de ‘deseabilidad’, teniendo esta un rango de cero a uno, donde uno representa la situación ideal y cero indica que una o más respuestas están fuera de los límites aceptables.

La Función de Deseabilidad para la optimización de múltiples respuestas tiene como objetivo encontrar condiciones operativas donde se garantice que todas las respuestas cumplan con los criterios “deseables” establecidos por el investigador y que proporcione un óptimo multi-respuesta que se aleje lo menos posible de las respuestas individuales (Meyers y Montgomery, 1995)

Las metas de cada una de las respuestas actualmente están establecidas en la tabla 16.

Tabla 16. Deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrolisis

Respuesta	Deseabilidad		Meta
	Baja	Alta	
Concentración de maltosa (g/L)	0.175	0.391	Maximizar
Hidrolisis (%)	35.0	78.0	Maximizar
Productividad (g/L*h)	0.435	1.537	Maximizar

Optimizar Deseabilidad

Después de transformar cada variable respuesta a unas funciones de deseabilidad según el criterio de optimización establecido en el diseño, se combinan en una función única (Derringer et. al, 1980) llamada Deseabilidad Global, la cual corresponde a una media geométrica de las funciones de deseabilidad individuales.

Se halló la combinación de factores que alcanza la ‘deseabilidad’ global óptima, obteniendo un valor óptimo de 0.68381.

En la tabla 17 encontramos los valores de los niveles (bajo, alto y óptimo) de las variables de respuestas evaluadas conjuntamente, dándonos como valor óptimo final una concentración de enzima de 817 ppm y 17 minutos de tiempo de reacción, los cuales fueron aplicados en jugo de caña de azúcar para su validación.

Tabla 17. Valores de los niveles de los factores con respecto a la deseabilidad

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración de enzima	499.684	1000.32	817.244
Tiempo de reacción	10.1005	29.8995	17.1915

En la tabla 18 visualizamos los valores predichos para las variables de respuestas, de acuerdo a los valores óptimos de las variables independientes, los cuales serán comparados posteriormente con los resultados obtenidos de la validación.

Tabla 18. Valores óptimos predichos de las variables de respuestas

Respuesta	Óptimo
Concentración de maltosa (g/L)	0.327647
Hidrolisis (%)	65.642
Productividad (g/L*h)	1.13469

En las figuras 35 y 36 observamos las respuestas ajustadas al modelo de regresión propuestas para la deseabilidad (de la maximización de las variables dependientes) dadas por las interacciones de las variables independientes (concentración enzima y tiempo de reacción) para la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por la enzima alfa-amilasa de *B. Licheniformis* a 90°C.

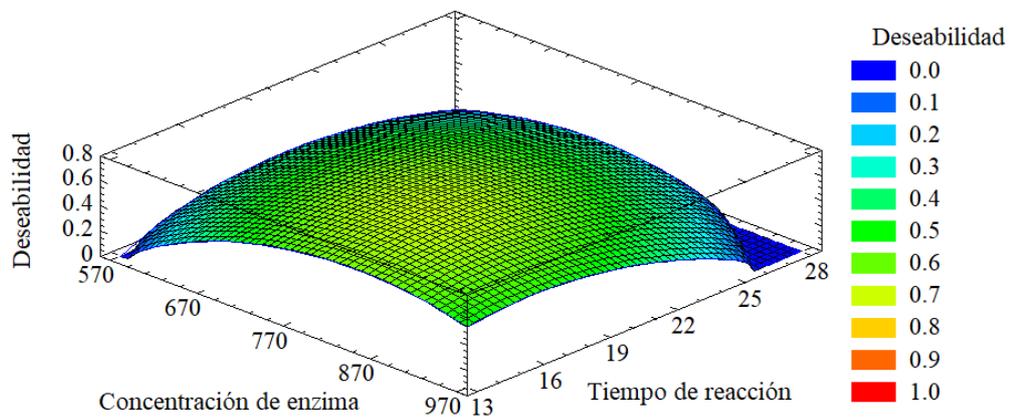


Figura 35. Superficie de respuesta para la optimización de la deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrolisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.

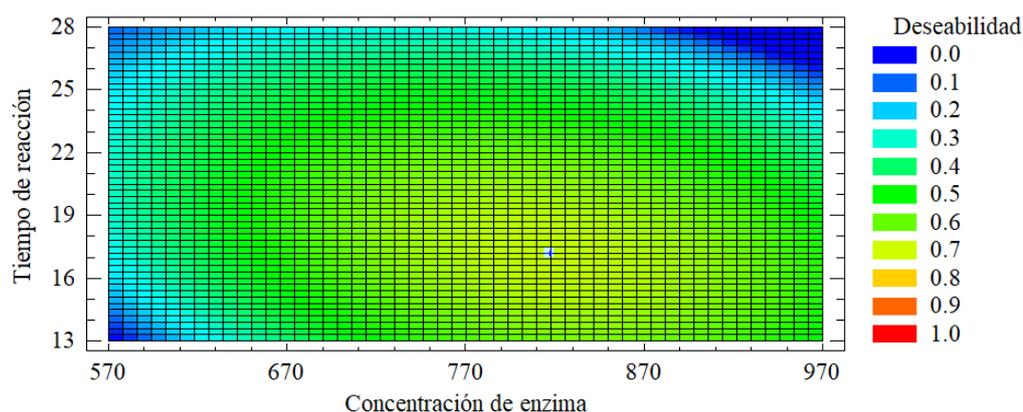


Figura 36. Contorno de la superficie de respuesta para la optimización de la deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción de la alfa-amilasa.

4.3. Validación de las condiciones ambientales óptimas utilizando el jugo de caña de azúcar

4.3.1. Obtención del jugo de caña encalado

Después de extraer el jugo de caña de azúcar se procedió al encalado para eliminar las impurezas y obtener el pH adecuado para la reacción (cabe mencionar que se encuentra en el rango del proceso que usualmente se utiliza en la industria), finalmente se analizó las características fisicoquímicas expresadas en la tabla

Tabla 19. Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar encalado

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
pH	7
brix	18° Brix
Sacarosa (pol)	17.2%
Almidón	0.6 g/L
Azúcares reductores	8.5 g/L

4.3.2. Hidrólisis enzimática con los parámetros óptimos en jugo de caña

Después de haber obtenido las condiciones ambientales óptimas se realizó la hidrólisis en el jugo de caña con una concentración de enzima alfa-amilasa de 817ppm por 17 minutos a una temperatura de 90°C. Todo esto se realizó en un mini-

reactor con un volumen de medio de 30mL, donde se analizaron las características fisicoquímicas del hidrolizado y las variables de respuesta estudiadas obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 20. Características fisicoquímicas del jugo de caña hidrolizado

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
pH	7.2
brix	20° Brix
Sacarosa (pol)	22.7%
Azucares reductores	8.8 g/L

Tabla 21. Variables de respuesta de la hidrolisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar con los valores óptimos.

VARIABLE DEPENDIENTE	RESULTADO
Concentración de maltosa (g/L)	0.380
Hidrolisis (%)	73.09
Productividad (g/L*h)	1.341

En la figura 37 visualizamos la comparativa de las características fisicoquímicas del jugo de caña antes y después de la hidrolisis, en donde resalta el aumento de sacarosa y °Brix, y el aumento de azucares reductores en menor cantidad lo cual puede causarse por la hidrolisis u otros factores que producen azucares reductores como la hidrolisis de dextranos que es un problema usual con la caña de azúcar.

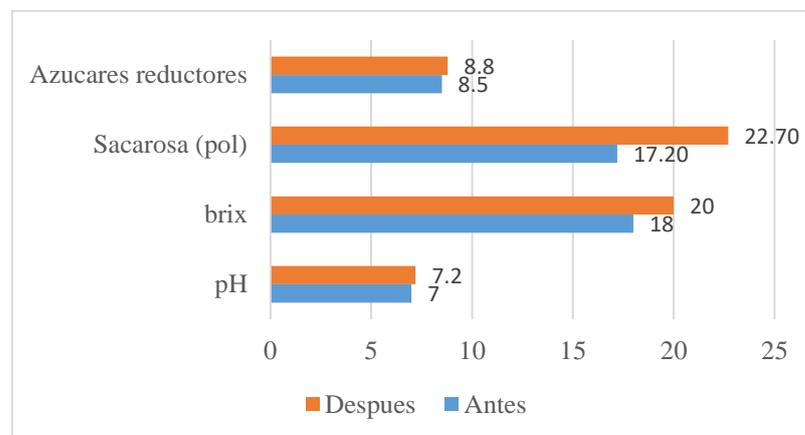


Figura 37. Características fisicoquímicas antes y después de la hidrolisis del almidón en el jugo de caña.

Una vez habiéndose validado en el jugo de caña encalado los valores óptimos obtenidos a partir del análisis del DCCR en el medio sintético de jugo de caña, se lograron los resultados mostrados en la tabla 21, en donde podemos observar la comparativa en la figura 38 que la concentración de maltosa, el porcentaje de hidrolisis y productividad fueron superiores en comparación a los valores predichos por el software en la tabla 19, donde se obtuvo 0.328 g/L, 65.64% y 1.341 g/L*h respectivamente.

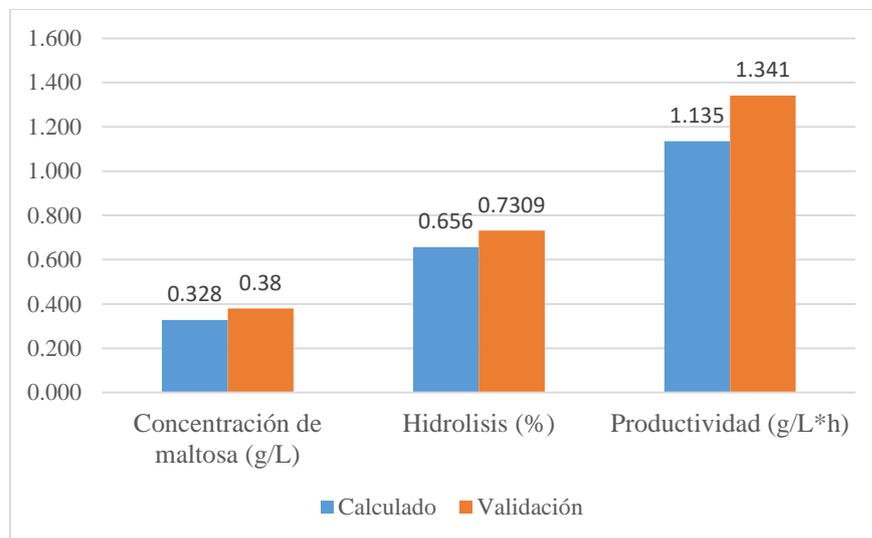


Figura 38. Variables dependientes obtenidas por el software y en la validación con jugo de caña de azúcar

Otras investigaciones reportan un porcentaje de hidrolisis del almidón por acción de alfa amilasa en jugo de caña como: 65% (Namer, Perez, Davila y Rivas, 1988), 74% (Eggleston y Montes, 2009), y 78% (Eggleston, Montes, Antoine y Stewart, 2010) y 85% (Jiménez, 2017), por lo que nos indica lo obtenido en este trabajo se encuentra entre valores similares.

Finalmente, en esta investigación se logró hidrolizar el almidón del jugo de caña en un 73.09%, donde se inició con una concentración de almidón de 520.55 ppm alcanzando a reducirlo hasta 140.45 ppm, el cual se encuentra por debajo del límite (<200ppm) de concentración de almidón donde se reportan problemas en el proceso (Jiménez et al., 2016). Siendo así el porcentaje de la hidrolisis superior a lo planteado en la investigación, el cual fue de un 60%.

V. CONCLUSIONES

Los valores de la actividad del preparado enzimático de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* fue de 26.48 U/ml y de sus parámetros cinéticos $K_m = 5.82 \text{ g/L}$ y $V_m = 0.30 \text{ g/L*min}$.

Los valores de las condiciones ambientales óptimas para la hidrólisis de almidón del medio sintético de jugo de caña de azúcar fueron: concentración de enzima de 817 ppm y tiempo de reacción de 17 minutos a una temperatura de 90°C.

Las características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar encalado fueron pH 7, 18°Brix, 17.2% de sacarosa, 600 ppm de almidón y 8.5g/L de azúcares reductores.

El tratamiento a las condiciones ambientales optimas del jugo de gaña encalado resulto con una hidrolisis del 73% de almidón contenido en el jugo de caña de azúcar, obteniendo una concentración de maltosa de 0.380 g/L y una productividad de 1.341 g/L*h

Las características fisicoquímicas del jugo hidrolizado de caña de azúcar tratado presentaron pH 7.2, 20°Brix, 22.7% de sacarosa y 8.8 g/L de azúcares reductores.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar los análisis fisicoquímicos al jugo de caña recién extraído lo más rápido posible, para evitar que se altere la calidad del jugo.

Mantener el medio en el biorreactor en constante agitación para evitar errores al tomar muestras.

Realizar un escalamiento del presente estudio, para analizar si es factible su implementación en el proceso.

Realizar otros estudios del porqué la enzima alfa-amilasa *Bacillus Licheniformis* no responde al método USDA Research Method, siendo este el más apropiado para la determinación de almidón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adrián, J. (2005). *Proceso de elaboración de azúcar*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Santa, Ancash, Perú.
- Aguirre, M. (2010). *Jugo de caña de azúcar envasado en vidrio*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
<https://www.dspace.espol.edu.ec/>
- Bas, D. y Boyacı, I. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024
- Bastidas, L., Rea, R., De Sousa-Vieira, O., Hernández, E. y Briceño, R. (2012). Análisis de variables agronómicas en cultivares de caña de azúcar con fines azucareros, paneleros y forrajeros. *Revista Bioagro*. 24, 135-142. Recuperado de: <https://biblat.unam.mx/es/revista/bioagro/articulo/analisis-de-variables-agronicas-en-cultivares-de-cana-de-azucar-con-fines-azucareros-paneleros-y-forrajeros>
- Benites J. y Gualango R. (2011). *Evaluación de dos biocidas e implicaciones económicas del procedimiento de sanitización de jugos de caña en el área de molinos del IANCEM*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Bozic, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J. y Vujčić, Z. (2011). Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 203-209. doi: 10.1016/j.bej.2010.10.014.

- Briceño K. (s.f.). *Ocho factores que afectan la actividad enzimática*. Lifeder.com.
Recuperado de <https://www.lifeder.com/factores-actividad-enzimatica/>
- Brooks, H., Geeganage, S., Kahl, S.,..., Weidner, J. (2012). Basics of Enzymatic Assays for HTS. En Sittampalam, G., Grossman, A., Brimacombe K, et al., (Ed.). *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Recuperado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92007/>
- Brumovsky, L. (2014). Química del almidón. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Castro, P. (2015). *Determinación de la concentración de almidón por caracterización espectrofotométrica en el jugo de caña de azúcar de las variedades: CP72-2086, CP88-1165 y CP73-1547 utilizadas en el ingenio trinidad Guatemala*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Chen, G., Zhou, J., Liu, Y., Lu, X., Han, C., Zhang, W., Xu, Y. y Yan, Y. (2016). Biosynthesis and Regulation of Wheat Amylose and Amylopectin from Proteomic and Phosphoproteomic Characterization of Granulebinding Proteins. *Scientific Reports*. Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/srep33111>
- Chiu, C. y Solarek, D. (2009). Starch: Chemistry and Technology. Third Edition. Recuperado de: <https://www.elsevier.com/books/starch/bemiller/978-0-12-746275-2>
- 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). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Felix

Lopez, Calceta, Ecuador. Recuperado de:
<http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/264/1/TAI105.pdf>.

Cole, M., Eggleston, G., Gilbert, A., & Chung, Y. J. (2016). Development of an analytical method to measure insoluble and soluble starch in sugarcane and sweet sorghum products. *Food Chemistry*, 190(1), 50–59.

Derringer, G. y Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variable. *Joul of Quality Technology*, 12 (4).

Eggleston, G. y Montes, B. (2009). Optimization of amylase applications in raw sugar manufacture that directly concern refiners. *Proceedings of the 2009 Sugar Industry Technologists Meeting, U.S.A*, 63 (973), 243-252.

Eggleston, G., Montes, B., Antoine, A. y Stewart, D. (2010). Variaciones estacionales en las aplicaciones optimizadas de la α -amilasa, estable a temperaturas intermedias, en la manufactura de azúcar crudo. *International sugar journal*, 112 (1340), 472-480.

Eggleston, G., Montes, B., Mongue, A. y Guidry, D. (2006). Optimization of alfa-amylase application in raw sugar manufacture. *International Sugar Journal*. 319-340.

Eggleston, G., Montes, B. Monge, A. y Guidry, D. (2008). Optimization of α -amylase application in raw sugar manufacture Part I: Characterization of commercial α -amylases, 110, 97-111.

Eggleston, G., Viator, R. y Grisham, M. (2007). Glyphosphate ripener effects on the processing quality of different sugarcane tissues. *International Sugar Journal*. 26, 1460-1467.

FAO, s.f. Extracción de jugos. Recuperado de: <ftp://ftp.fao.org>

- Ferrer, C. (2014). *Caracterización enzimática de la α -amilasa de la cepa termófila Bacillus Licheniformis bta-03 aislada de los geiseres de Calientes, candarave-Tacna, 2013* (Tesis pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú.
- Fiallos F. (2008). *Reacción de 100 variedades de Caña de Azúcar (Saccharum officinarum) del Banco de Germoplasma del CINCAE, al Carbón (Ustilago scitaminea Sydow), Roya (Puccinia melanocephala Sydow) y Mosaico (Sugarcane Mosaic Virus) en la zona del Cantón El Triunfo.* (Tesis de pregrado). ESPOL. Ecuador.
- Figueira, J. (2009). *Determinação e caracterização de amido de cana-de-açúcar e adequação de metodologia para determinação de alfa-amilase em açúcar bruto* (Tesis de maestría). Recuperado de <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254333>.
- Figueira, J., Hoffmann, P. y Harumi, H. (2011). *Sugarcane starch; quantitative determination and characterization. Food Science and Technology.*, 31(3), 806-815. doi: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000300040
- Godoy y Garzón, R. y Munguía, A. (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). Honduras. Recuperado de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4589/1/CPA-2015-042.pdf>
- Gonzales, M. (s.f.). *Curso de biomoléculas* [Material de aula virtual]. Universidad del País Vasco, España.

- Hossain, S., Haki, G. y Rakshit, S. (2006). Optimum Production and Characterization of Thermostable Amylolytic Enzymes from *B. stearothermophilus* GRE1. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 84, 368 - 374. doi: 10.1002/cjce.5450840313.
- Jimenez, A. (2017). *Evaluación del comportamiento del contenido de almidón y su desdoblamiento con alfa-amilasa en el proceso de producción de azúcar crudo*. (Tesis de maestría). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Jimenez, A., Orozco, J., Lugo, R., Martínez, Ramírez, H., Gómez, L. (2016). *Influencia del almidón y tecnologías de control en el proceso de producción de azúcar crudo y refino*. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Kirk, O., Borchert, T. & Fuglsang, C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol. Current opinion in biotechnology*, 13, 345-351. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00328-2.
- 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. *Revista Vitae*, 21, 165-177. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v21n3/v21n3a02.pdf>
- Larrahondo, J. y Villegas, F. (1995). Control y características de maduración. En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, CENICAÑA, p 297-313.
- Martinez, J. (2005). *Utilización de α -amilasas en la formulación de detergentes industriales* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada.

- McKee, T. & Mckee, J. (2003). *Bioquímica: La base molecular de la vida*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Melendez, M. (2004). *Producción, extracción, purificación, usos y aplicaciones de la enzima amilasa en la industria de los alimentos*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México
- Merino, J. & Noriega, M. (2011). *Fisiología general: Enzimas* [Material de aula virtual]. Universidad de Cantabria, España.
- Myers, R. y Montgomery, D. (1995). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, New York
- Miller, G. (1959). Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2019). *Observatorio de Commodities: Azúcar*. Perú. Ministerio de Agricultura y Riego. Recuperado de: <https://www.minagri.gob.pe/portal/29-sector-agrario/azucar/241-azucar?limitstart=0>
- Mujica, M., Guerra, M., y Soto, N. (2008). Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperaturas de punteo sobre la calidad de la panela granulada. *Revista Interciencia*, 8, 568-603.
- Namer, I., Perez, J., Davila, H. y Rivas, E. (1988). *Caracterización de la producción y aplicación de enzimas en la industria azucarera cubana (Ira. Parte)*. ATAC, (6) 48-51 Recuperado de: http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentaci%

C3%B3n/Parte%20VIII/Bibliograf%C3%ADa/Economia%20y%20mercado/120.pdf

Navarro, M. y Sossa, D. (2003). *Obtención de etanol, a partir del almidón de papa proveniente del sector agrícola*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Nouri, M. (1993). *Hidrólisis enzimática de harina de trigo* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.

Ochoa, M. (1994). *Producción de alfa-amilasa por una cepa nativa de bacillus y su aplicación al tratamiento del almidón residual en granos de malta agotados* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Penados, M. (2004). *Evaluación del impacto de adicionar la enzima alfa amilasa durante el proceso de evaporación en los niveles de almidón de azúcar crudo producido en un ingenio azucarero*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Peña, A. (2009). *Hidrolisis del almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa*. (Tesis de pregrado). Universidad industrial de Santander. Colombia.

Peña, A., Molina, D. y Torres, R. (2009). Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (*Aspergillus niger*). Recuperado de:
<http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia20130415/siquia2009pos4.pdf>

- Pérez, C. (2015) *Efecto de latemperatura y pH en la producción de amilasa por Bacillus licheniformis FGM-A15 en un biorreactor agitado* (Tesis de pregrado).
Universidad Nacional de Trujillo, Peru.
- Popper, L., Schäfer, W. y Freund, W. (2006). Sugazym- dextranase and amylase in the sugar industry. *Agrimedia*. Recuperado de: <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/11.-F%C3%81BRICA-I.pdf>
- Rein, P. (2007). *Cane Sugar Engineering*. Berlin, Germany: Bartens.
- Sarmiento, V., Vargas, D., Pedroza, A., Matiz, A., & Poutou, R. (2003). Producción de α -Amilasa con células libres e inmovilizadas de *Thermus sp.* *Revista MVZ*, 8, 310-317.
- Sarria, P., Solano, A. y Preston, T. (1990). Utilización de jugo de caña y cachaza panelera en la alimentación de cerdos. *Livestock Research for Rural Development*. Recuperado de: <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd2/2/sarria.htm>
- Saptadip, S., Arpan, D., Suman, K., Arijit, J., Sanjay, K., Pradeep, K., Bikash, R., Keshab, C. (2014). Thermodynamic and kinetic characteristics of an α -amylase from *Bacillus licheniformis* SKB4. *Acta Biologica Szegediensis*, 58, 147-156.
- Tejeda, B., L., Rivera, A., Rosales, J., Tejeda, L. & Tordecilla, E. (2011) Hidrolisis del almidón de yuca (*Manihot sculenta*) y ñame (*Dioscorea rotundata*) para producir jarabes glucosados. *Revista RECITEIA*, 11, 130 – 137. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?id=EsmxDl3uCbYC&printsec=copyright&hl=es&source=gbs_pub_info_r#v=onepage&q&f=false
- Tena, M. y Jorrín, J. (2008). *Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería* [Trabajo de curso]. Universidad de Córdoba, España. Recuperado de:

<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CINETICA.pdf>

van der Maarel, M., van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L.

(2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94. 137-155. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2.

Vargas, S. (2002). *Selección y evaluación de bacterias del género Bacillus productoras de amilasa en cultivo sumergido* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Xiao, Z., Storms, R. y Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical biochemistry*, 351. 146-148. doi: 10.1016/j.ab.2006.01.036.

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 Industrial Agrícola de Tucumán*, 87, 15-27. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-30182010000100003&script=sci_arttext

Zossi, B., Navarro, M., Sorol, N., Sastre, M. y Ruiz, R. (2008). Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 85, 1851-3018. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182008000200001

Zhou, M., Kimbeng, C., Eggleston, G., Viator, R., Hale, A., y Gravois K. (2008). Issues of starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content

in sugarcane. *Sugarcane International*, 26, 3-13. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/publication/284500025_Issues_of_starch_in_sugarcane_processing_and_prospects_of_breeding_for_low_starch_content_in_sugarcane

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Ficha técnica de enzima alfa amilasa de *Bacillus Licheniformis*



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

α -Amylase from *Bacillus globigii* (*Bacillus licheniformis*)

Product Number **A 3403**
Storage Temperature 2-8 °C

Product Description
Enzyme Commission (EC) Number: 3.2.1.1
CAS Number: 9000-85-5
Molecular Weight: 62 kDa (SDS-PAGE).¹

This product has a pH range for activity of 5-9 with the optimal pH range of 7-9. It is stable between pH 7 and 10 and is stable from 40 to 60 °C at pH 7. Maximal activity was displayed at 90 °C and 60% of activity remained at 100 °C.¹

α -Amylase hydrolyzes the α -(1,4) glucan linkages in polysaccharides of three or more α -(1,4) linked D-glucose units. The α -(1,6) bond is not hydrolyzed. Starch or glycogen, the "natural" substrates, can be replaced to a limited extent by low molecular weight compounds.²

The product is supplied as a saline sucrose solution containing 10-50 mg/ml protein (Biuret).

Precautions and Disclaimer
For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

Storage/Stability
This enzyme maintains over 98% of activity after 60 minutes at pH 6.2 at 85 °C,¹ and maintained 100% of activity after storage for 1 hour at 91 °C.⁴

- References**
1. Morgan, F.J., and Priest, F.G., Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346, *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 107-114 (1981).
 2. Enzyme Handbook, Barman, T.E., Springer-Verlag (New York: 1969) Vol. II, EC 3.2.1.1, p. 560.
 3. The Enzyme Handbook, Schomburg, D., and Salzmann, M., Springer-Verlag (Berlin Heidelberg: 1991) Vol. 4, EC 3.2.1.1, p. 7.
 4. Medda, S., and Chandra, A., New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 47-58 (1980).

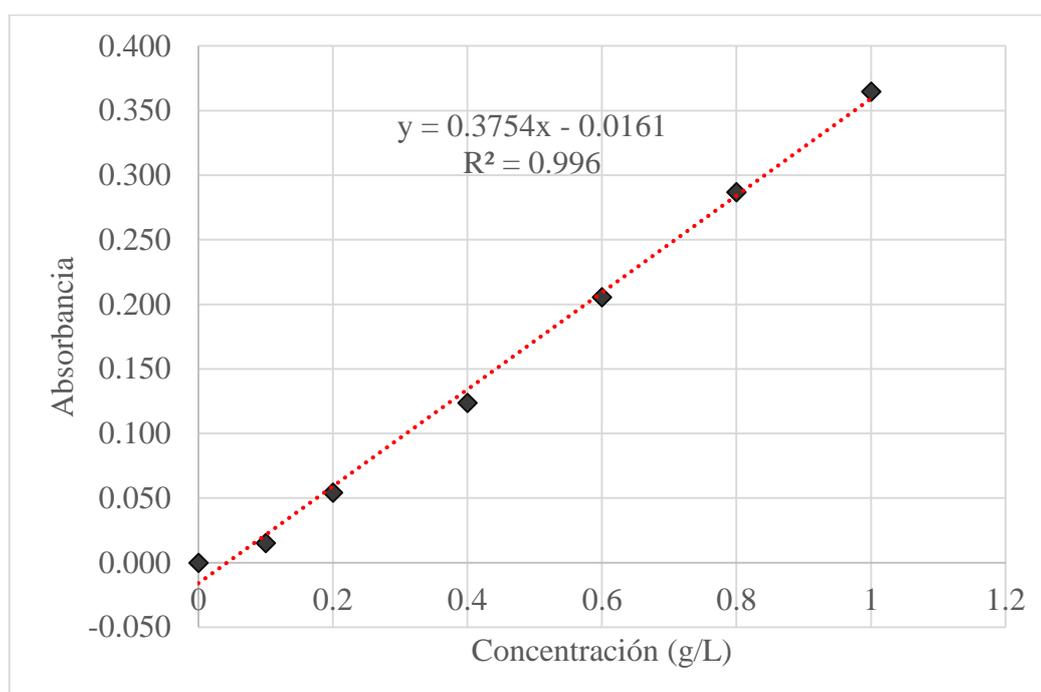
MES/AJH 1/03

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ANEXO 2: Determinación de curva de calibrado de maltosa por DNS

Tabla 22: Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de maltosa

N° de Tubos	Vol. Sol. Standar (µl)	Vol. Agua (µL)	Concentración (g/L)	ABSORBANCIA			
				1	2	3	Promedio
1	500	0	1	0.367	0.364	0.363	0.365
2	400	100	0.8	0.287	0.286	0.288	0.287
3	300	200	0.6	0.205	0.209	0.203	0.206
4	200	300	0.4	0.132	0.121	0.118	0.124
5	100	400	0.2	0.059	0.05	0.054	0.054
6	50	450	0.1	0.021	0.011	0.014	0.015
7	0	500	0	0	0	0	0.000



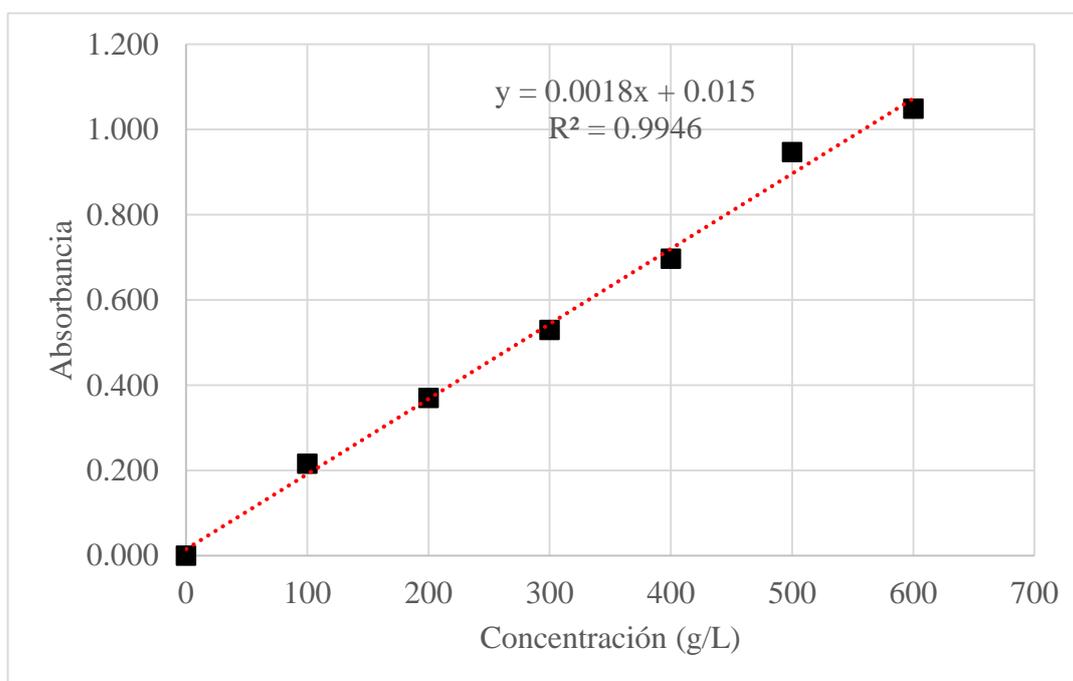
Ecuación de la curva de calibrado lineal ajustado:

$$\text{Abs} = 0.3754 * \text{Concentración maltosa} - 0.0161$$

ANEXO 3: Curva de calibrado de almidón (USDA Starch Research method)

Tabla 23: Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de almidón

N° de Tubos	Vol. Sol. Standar (µl)	Vol. Agua (µL)	Concentración (g/L)	ABSORBANCIA			
				1	2	3	Promedio
1	1800	1200	600	1.045	1.06	1.04	1.048
2	1500	1500	500	0.954	0.957	0.929	0.947
3	1200	1800	400	0.687	0.699	0.703	0.696
4	900	2100	300	0.536	0.526	0.527	0.530
5	600	2400	200	0.383	0.364	0.362	0.370
6	300	2700	100	0.216	0.215	0.215	0.215
7	0	3000	0	0	0	0	0.000



Ecuación de la curva de calibrado lineal ajustado:

$$\text{Abs} = 0.0018 * \text{Concentración maltosa} - 0.015$$

ANEXO 4: Pruebas preliminares de la enzima alfa amilasa de *Bacillus Licheniformis*

Temperatura Óptima

Tabla 24: Valores de actividad enzimática en función a la temperatura

Temperatura (°C)	Actividad (UI/ml)
60	43.49
70	52.58
80	55.34
90	76.69
100	35.97

pH Óptimo

Tabla 25: Valores de actividad enzimática en función al pH

pH	Actividad (UI/ml)
6	18.78
6.5	46.05
7	48.43
7.5	45.07

ANEXO 5: Determinación del rango de linealidad de la enzima alfa amilasa de *Bacillus Licheniformis*

Tabla 26: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:500

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración maltosa (g/L)	Concentración corregida (g/L)
0	0.081	0.272	0.291
5	0.107	0.341	0.365
10	0.115	0.362	0.387
15	0.122	0.382	0.408
20	0.125	0.390	0.417
30	0.144	0.441	0.472

Tabla 27: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:200

Tiempo	Absorbancia	Concentración maltosa (g/L)	Concentración corregida (g/L)
0	0.104	0.333	0.357
5	0.130	0.404	0.432
10	0.136	0.418	0.447
15	0.141	0.432	0.462
20	0.146	0.446	0.477
30	0.155	0.470	0.503

Tabla 28: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:100

Tiempo	Absorbancia	Concentración maltosa (g/L)	Concentración corregida (g/L)
0	0.137	0.422	0.452
5	0.152	0.462	0.495
10	0.170	0.511	0.547
15	0.185	0.550	0.588
20	0.199	0.589	0.630
30	0.236	0.688	0.736

Tabla 29: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:50

Tiempo	Absorbancia	Concentración maltosa (g/L)	Concentración corregida (g/L)
0	0.156	0.473	0.506
5	0.171	0.513	0.549
10	0.187	0.556	0.595
15	0.205	0.605	0.647
20	0.216	0.634	0.679
30	0.238	0.694	0.742

Tabla 30: Producción de maltosa en función al tiempo con enzima diluida 1:25

Tiempo	Absorbancia	Concentración maltosa (g/L)	Concentración corregida (g/L)
0	0.169	0.508	0.544
5	0.224	0.656	0.702
10	0.228	0.667	0.714
15	0.233	0.679	0.726
20	0.241	0.702	0.751
30	0.248	0.720	0.771

ANEXO 6: Determinación de parámetros cinéticos de la enzima alfa amilasa de *Bacillus Licheniformis*

Tabla 31: Producción de maltosa en función a las de las diferentes concentraciones de sustrato

Concentración Sustrato (g/L)	Absorbancia		Concentración maltosa		Concentración corregida		Promedio (g/L)
	1	2	1	2	1	2	
0.1	0.013	0.012	0.089	0.086	0.098	0.095	0.097
0.2	0.062	0.062	0.220	0.220	0.244	0.244	0.244
0.3	0.083	0.080	0.277	0.269	0.306	0.297	0.301
0.4	0.105	0.089	0.336	0.293	0.371	0.324	0.348
0.5	0.115	0.138	0.363	0.425	0.401	0.469	0.435
0.6	0.176	0.171	0.527	0.513	0.582	0.567	0.575
0.7	0.176	0.183	0.527	0.546	0.582	0.603	0.593
0.8	0.216	0.211	0.634	0.621	0.701	0.686	0.694
0.9	0.238	0.219	0.694	0.642	0.766	0.710	0.738
1	0.26	0.260	0.753	0.753	0.832	0.832	0.832

Tabla 32: Velocidad de reaccion en función de la concentración de sustrato para el diagrama de Lineweaver- Burk

Concentración Sustrato (g/L)	Concentración maltosa (g/L)	Velocidad (g/L*m)	1/S	1/V
0.1	0.097	0.0048	10.00	207.170
0.2	0.244	0.0122	5.00	82.110
0.3	0.301	0.0151	3.33	66.335
0.4	0.348	0.0174	2.50	57.547
0.5	0.435	0.0218	2.00	45.959
0.6	0.575	0.0287	1.67	34.796
0.7	0.593	0.0296	1.43	33.750
0.8	0.694	0.0347	1.25	28.835
0.9	0.738	0.0369	1.11	27.095
1	0.832	0.0416	1.00	24.047

ANEXO 7: Desarrollo matemático de las ecuaciones obtenidas en la optimización de las condiciones ambientales de hidrolisis enzimática del almidón en el medio sintético del jugo de caña.

Ecuación de concentración de maltosa

$$C_m = -1.53923 + 0.00326327 * C_e + 0.058919 * T_r - 0.00000179613 * C_e^2 - 0.0000207829 * C_e * T_e - 0.00108717 * T_r^2$$

C_m: Concentración de maltosa

C_e: Concentración de enzima

T_r: Tiempo de reacción

$$\text{Derivada parcial } C_m/dC_e \quad 0.00326327 - 0.00000359226C_e - 0.000020783T_r = 0 \dots\dots (1)$$

$$\text{Derivada parcial } C_m/dT_r \quad 0.058919 - 0.0000207829C_e - 0.00217434T_r = 0 \dots\dots (2)$$

$$1C_e + 5.7856653T_r = 908.4169854 \dots\dots (3)$$

$$1C_e + 104.621588T_r = 2834.974907 \dots\dots (4)$$

$$98.8361214T_r = 1926.557922$$

$$T_r = 19.49244764 \text{ minutos}$$

$$C_e = 795.644082 \text{ ppm}$$

Ecuación de % de Hidrolisis

$$H = -311.451 + 0.660736 * C_e + 11.8214 * T_r - 0.000363082 * C_e^2 - 0.00423729 * C_e * T_r - 0.216838 * T_r^2$$

H: Porcentaje de hidrolisis

C_e: Concentración de enzima

T_r: Tiempo de reacción

$$\text{Derivada parcial } H/dC_e \quad 0.660736 - 0.000726164C_e - 0.00423729T_r = 0 \dots\dots (1)$$

$$\text{Derivada parcial } H/dT_r \quad 11.8214 - 0.00423729C_e - 0.433676T_r = 0 \dots\dots (2)$$

$$1C_e + 5.83516947T_r = 909.8991412 \dots\dots (3)$$

$$1C_e + 102.347491T_r = 2789.849172 \dots\dots (4)$$

$$96.5123215T_r = 1879.950031$$

$$T_r = 19.47886034 \text{ minutos}$$

$$C_e = 797.2366902 \text{ ppm}$$

ANEXO 8: Análisis de desviación promedio absoluta

Tabla 33: Análisis de desviación promedio absoluta de concentración de maltosa

Corrida	Valor experimental	Valor calculado	$\frac{ y_{iexp} - y_{ical} }{y_{iexp}}$	AAD
1	0.251	0.220	0.122	
2	0.333	0.274	0.177	
3	0.186	0.225	0.208	
4	0.197	0.179	0.093	
5	0.391	0.330	0.157	
6	0.200	0.256	0.278	
7	0.196	0.218	0.110	
8	0.175	0.168	0.038	
9	0.223	0.222	0.006	
10	0.264	0.330	0.249	
11	0.334	0.330	0.013	
		$\Sigma =$	1.450	13.185

Tabla 34: Análisis de desviación promedio absoluta de porcentaje de hidrolisis

Corrida	Valor experimental	Valor calculado	$\frac{ y_{iexp} - y_{ical} }{y_{iexp}}$	AAD
1	50	44	0.118	
2	67	55	0.179	
3	37	45	0.218	
4	39	35	0.092	
5	78	66	0.154	
6	40	51	0.278	
7	39	43	0.115	
8	35	33	0.045	
9	45	44	0.012	
10	53	66	0.245	
11	67	66	0.015	
		$\Sigma =$	1.471	13.375

Tabla 35: Análisis de desviación promedio absoluta de productividad

Corrida	Valor experimental	Valor calculado	$\frac{ y_{iexp} - y_{ical} }{y_{iexp}}$	AAD
1	0.557	0.430	0.229	
2	1.537	1.308	0.149	
3	1.115	1.260	0.130	
4	0.590	0.515	0.127	
5	1.173	0.989	0.157	
6	0.599	0.821	0.370	
7	0.435	0.517	0.189	
8	0.808	0.789	0.024	
9	0.446	0.447	0.003	
10	0.793	0.989	0.248	
11	1.002	0.989	0.013	
		$\Sigma =$	1.638	14.889

ANEXO 9: Desarrollo del trabajo de investigación



Figura 39: Hidrólisis enzimática del medio sintético de jugo de caña.



Figura 40: Ensayo para la curva de calibrado del DNS



Figura 41: Extracción de jugo de caña de azúcar mediante trapiche



Figura 42: Análisis de °Brix al jugo de caña de azúcar



Figura 43: Análisis de pH al jugo de caña de azúcar



Figura 45: Encalado del jugo de caña de azúcar



Figura 44: Sonificación del jugo de caña de azúcar



Figura 46: Medición por espectrofotómetro