

Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Técnicas
Departamento de Química e Ingeniería Química



**“Determinación del efecto de la hidrólisis enzimática del
almidón en Jugo Mezclado”**

Trabajo de diploma presentado en opción al título de Ingeniero
Químico

Autor: Dailys Caballero Plá

Tutores: Msc. Saul Dueñas Casas

Dr C. Jesús Luis Orozco

Dr C. Héctor Luis Ramírez Pérez

Matanzas, Cuba 2022

Resumen

La presencia de almidón en el proceso de producción de azúcar crudo trae consigo efectos negativos que afectan en la calidad y eficiencia del mismo. De aquí la necesidad de su eliminación. La hidrólisis enzimática del mismo mediante α -amilasa es uno de los métodos más aplicados y eficientes para su control. Esta investigación tiene como objetivo valorar si es factible aplicar el proceso de hidrólisis con α -amilasa, en el jugo mezclado. Para ello se realiza un diseño de experimentos de superficie de respuesta, donde se estudia la influencia de la dosis de enzima y el tiempo de contacto en las variables: porcentaje de remoción de almidón, incremento de reductores y pH. Se demuestra que la dosis de α -amilasa influye significativamente en la remoción de almidón, el incremento de reductores y la variación del pH; mientras que la influencia del tiempo no es significativa. Se obtienen los modelos matemáticos que describen el comportamiento de las variables de respuesta, demostrándose su validez en el intervalo experimental. Se determinó como dosis de enzima a aplicar 0.15 %.

Abstract

The presence of starch in the raw sugar production process brings with it negative effects that affect its quality and efficiency. Hence the need for its removal. Its enzymatic hydrolysis by α -amylase is one of the most applied and efficient methods for its control. This research aims to assess whether it is feasible to apply the hydrolysis process with α -amylase, in the mixed juice. For this, a design of response surface experiments is carried out, where the influence of the enzyme dose and the contact time on the variables are studied: percentage of starch removal, increase in reducers and pH. It is shown that the dose of α -amylase significantly influences the removal of starch, the increase of reducers and the variation of pH; while the influence of time is not significant. The mathematical models that describe the behavior of the response variables are obtained, demonstrating their validity in the experimental interval. The enzyme dose to be applied was determined as 0.15 %.

Declaración de autoridad

Yo, Dailys Caballero Plá, declaro ser la única autora de este Trabajo de Diploma y lo pongo a disposición de la Universidad de Matanzas, para hacer uso del mismo con el objetivo y finalidad que se estime conveniente.

Dailys Caballero Plá

Dedicatoria

- ✓ A mis padres, por ser mi motor impulsor y por deberles todo lo que he logrado hasta ahora.
- ✓ A mis hermanos por la confianza y el apoyo que me brindaron en este largo camino
- ✓ A mis abuelos que me inculcaron los deseos de superarme
- ✓ A mi abuela Ida que hoy no se encuentra a mi lado pero sin dudas estaría orgullosa de ver lo que he logrado

Agradecimientos

- ✓ A toda mi familia, principalmente mis padres por estar ahí siempre que los necesité y brindarme su apoyo en momentos que incluso fueron difíciles para ellos.
- ✓ A mi tutor Saul, quien me tuvo paciencia, puso su tiempo y disposición en todo momento, ayudándome incluso en las cosas más simples, sin él, el desarrollo de esta tesis no hubiese sido posible.
- ✓ A Ena por dedicarme su tiempo y ser sin duda un apoyo emocional durante mi carrera
- ✓ A mis principales fuentes de inspiración Claudia y Alexandra por impulsarme cuando pensé que no lograría llegar hasta el final, formaron parte de mi camino desde los inicios.
- ✓ A mis compañeros Eduardo, Meikol, Aismelis, Doris, Agustín, Hectico el medico que siempre estuvieron para mí.
- ✓ A mis hermanos, por sus consejos y brindarme su apoyo en los momentos más difíciles.
- ✓ A todos los profesores del departamento de química, a ellos les debo los conocimientos adquiridos durante estos 4 años, en especial a Yamile que me dedico parte de su tiempo.
- ✓ A todo aquel que de una forma u otra ha estado ahí, ayudándome y apoyándome.

Muchas Gracias.

Índice

Introducción.....	9
Capítulo I. Análisis bibliográfico.....	12
1.1 Proceso de producción de azúcar crudo. Parámetros de calidad.....	12
1.2 Caracterización del almidón. Propiedades.....	14
1.2.1 Influencia del almidón en la producción de azúcar crudo.....	16
1.3 Métodos que permiten la eliminación del almidón en el proceso de producción de azúcar crudo.....	18
1.4 Enzimas en el proceso de producción de azúcar crudo.....	19
1.4.1 Hidrólisis enzimática.....	21
1.5 Conclusiones parciales.....	23
Capítulo II. Materiales y Métodos.....	24
2.1 Descripción general del proceso objeto de estudio.....	24
2.1.1 Definición de las etapas del proceso objeto de estudio.....	24
2.2 Descripción del caso de estudio.....	27
2.2.1 Materiales y Reactivos.....	28
2.3 Caracterización de la enzima α -amilasa.....	28
2.3.1 Concentración de proteínas.....	29
2.3.2 Actividad enzimática.....	29
2.4 Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón.....	30
2.4.1 Diseño de experimentos.....	30
2.4.2 Caracterización de los hidrolizados.....	31
2.5 Herramientas estadísticas utilizadas.....	33

2.5.1 Análisis de varianza	33
2.5.2 Optimización simultánea	35
2.5.3 Diagrama de Pareto	35
2.5.4 Análisis de sensibilidad	35
2.5.5 Diseño de experimentos.....	36
Capítulo III. Análisis de los Resultados	37
3.1 Caracterización de la enzima α -amilasa libre	37
3.2 Diseño de experimento	37
3.3 Análisis estadístico de los resultados experimentales	37
3.3.1 Pruebas de Normalidad.....	38
3.4 Influencia de la dosis de enzima y el tiempo de contacto en las variables respuesta.....	38
3.4.1 Porcentaje de Remoción de Almidón	38
3.4.2 Azúcares Reductores	39
3.4.3 pH.....	40
3.5 Análisis de los resultados del diseño experimental.....	40
3.5.1 Análisis de la calidad de ajuste del modelo.....	42
3.6 Determinación de la dosis de enzima a aplicar.....	43
3.7 Conclusiones parciales	¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones.....	45
Recomendaciones.....	46
Referencias Bibliográficas	47
Anexos	54

Introducción

La fabricación de azúcar se lleva a cabo desde hace miles de años obteniéndose la sacarosa a partir de la caña de azúcar, constituyendo uno de los sectores más importantes de la Historia de Cuba, por sus múltiples aportes a la economía del país. Con la aparición del período especial la industria azucarera sufrió un grave deterioro en la calidad y eficiencia del proceso de producción (González, 2018; León, 2018). El contenido de polisacáridos es uno de los indicadores de calidad que afecta la calidad del proceso, el almidón se incorpora al proceso junto a la materia prima.

El almidón, es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de glucosa, está presente de manera natural en la caña de azúcar ya que es el compuesto químico de reserva energética de la planta para satisfacer necesidades metabólicas, almacenado en las hojas y en la punta del tallo de la caña de azúcar, su contenido en esta depende en gran parte de la variedad de caña, su madurez y condiciones climáticas (Tejerina, 2021). El contenido de este polisacárido está relacionado también con las operaciones de corte, alce y transporte de la caña de azúcar (Penados, 2004).

El almidón, tiende a gelatinizar durante el procesamiento, lo que provoca cambios en la viscosidad de jugos y mieles (González, 2018; León, 2018), problemas de coagulación y aumento en la presión durante la filtración. El almidón en el jugo no es soluble, y su calentamiento dificulta la clarificación y evaporación, ya que los gránulos de almidón en presencia de agua en exceso se hidratan, se hinchan y finalmente muchos de ellos se rompen lo que genera una solución viscosa. Además, eleva los costos de producción por reducción en los rendimientos de cristalización y centrifugación; reduce la capacidad de filtración, retarda el crecimiento de los cristales de sacarosa y compromete la forma de los mismos (Tejerina, 2021).

Atendiendo al efecto negativo que provoca en la calidad del azúcar crudo autores como Chiu y Solarek (2009) y Eggleston et al. (2015), proponen como el tratamiento más eficaz para su eliminación, la hidrólisis enzimática con α -amilasa. Las α -amilasas se encuentran entre las enzimas industriales más importantes de gran impacto en los

estudios biotecnológicos y representan alrededor del 25-33 % del mercado mundial de enzimas (Kumar, A.J., Partha, B., Pradeep, D.M., y Sangeeta, R. (2016) Kumar, A. P., Rani, R. S., y Pandey, A. (2016) .A pesar de sus ventajas el uso de enzimas se ve limitado por los altos costos de aislamiento y purificación, su sensibilidad a las condiciones ambientales y la dificultad de recuperarlas para su posterior reutilización y reprocesamiento (Homaei y Saberi, 2015).

Investigaciones realizadas en los últimos años entre el departamento de Química de la Facultad de Ciencias Técnicas y el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas, se han centrado en el estudio del comportamiento del contenido de almidón en el proceso de producción de azúcar crudo y su influencia en el mismo (Jiménez, 2017), la hidrólisis enzimática con α -amilasa como alternativa para su eliminación y la inmovilización de enzimas para su ahorro (Dueñas, 2020; Naranjo, 2019; Ojeda, 2021). Parte de estas investigaciones se han centrado en estudiar el efecto del proceso de hidrólisis a escala de laboratorio e industrial en las corrientes de jugo clarificado y meladura, donde la efectividad de la remoción de almidón ha demostrado ser alta. Sin embargo, para obtener una mejor descripción de este proceso, es necesario tener en cuenta el efecto de la α -amilasa en otras corrientes como el jugo mezclado.

En función de lo planteado anteriormente el **Problema Científico** a solucionar de la investigación, es:

¿Será factible aplicar el proceso de hidrólisis con α -amilasa en el jugo mezclado?

Para dar solución al problema la investigación se plantea la **Hipótesis** siguiente:

Si se realiza un estudio del efecto del proceso de hidrólisis enzimática con α -amilasa en el Jugo Mezclado, se podrá determinar si es factible o no la aplicación de la α -amilasa en el mismo.

Para comprobar la hipótesis se propone como **Objetivo Principal**:

Determinar la efectividad de la aplicación de la α -amilasa en el jugo mezclado de la industria.

Para dar cumplimiento al objetivo general se proponen los siguientes **Objetivos Específicos**:

- ✓ Evaluar la influencia del proceso de hidrólisis enzimática en la corriente objeto de estudio a escala industrial.
- ✓ Obtener los modelos matemáticos que describen el efecto del proceso de hidrólisis en los parámetros de calidad.
- ✓ Seleccionar la dosis de enzima a aplicar en la corriente seleccionada.

Capítulo I. Análisis bibliográfico

En este capítulo se realiza un estudio bibliográfico sobre las temáticas siguientes: proceso de producción de azúcar crudo, caracterización del almidón y sus propiedades, el almidón en el proceso de producción de azúcar crudo y su influencia en el mismo, métodos de eliminación del almidón en la industria azucarera y las enzimas en el proceso de producción de azúcar crudo. La búsqueda bibliográfica fue realizada en bibliotecas científico técnicas, en bibliotecas virtuales de química e ingeniería química, en bases de datos disponibles en internet mediante la utilización de los buscadores existentes (Google, AltaVista, Scirus, entre otros) y en las bases de datos remotas (ELSEVIER, EBSCO, Science direct entre otros).

1.1 Proceso de producción de azúcar crudo. Parámetros de calidad

El azúcar crudo es un producto de alta demanda en la industria nutritiva, posee más de un 80 % de demanda a nivel global (Meghanaa y Shastria, 2020), lo que hace necesario lograr que su manufactura sea eficiente y de calidad. El proceso de producción de azúcar crudo comienza en el campo, a partir de la cosecha de la caña de azúcar. Larrahondo (2013), plantea que inicialmente solo se utilizaban como indicadores de la calidad del jugo la concentración de sólidos disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$), la concentración de sacarosa en jugo (% Pol) y la pureza. Según Casanova *et al.* (2015), el nivel de azúcares reductores, fibra y el control de parámetros asociados a su frescura, como la acidez de sus jugos y el contenido de polisacáridos (dextranas), alcohol, etc, son parámetros a tener en cuenta en la cantidad de azúcar recuperable por tonelada de caña molida (Larrahondo, 1995).

Los principales factores que afectan la calidad del jugo de caña después del corte son el grado de quema y altura del mismo (Larrahondo, 1995). El grado de quema influye en los azúcares reductores, pues aumentan con el deterioro de la caña e incrementan el color del cristal de azúcar. Los constituyentes inorgánicos presentes como iones solubles en agua, sales o constituyentes de moléculas orgánicas complejas o compuestos insolubles, que se encuentran en el jugo de caña como sólidos suspendidos, también afectan la calidad de la misma (Zossi *et al.*, 2010). Además, plantea que los iones mayoritarios presentes en la caña de azúcar son: sodio, potasio,

silicatos, fostatos, sulfatos y estos son en general los componentes fundamentales de las cenizas, valores que oscilan entre un 2,28 y un 4,59 %. Rein (2007), establece que el contenido total de cenizas en el jugo de caña, representa un promedio de 4 %.

Según Bukhari *et al.* (2015), la dextrana es un polímero que afecta la calidad del producto, su presencia en jugo, meladura y azúcar crudo falsea las mediciones de Pol. Además, provoca la deformación del cristal, por elongación del mismo. Las dextranas tienen un efecto muy parecido al almidón, en el proceso de producción de azúcar se forman velozmente en condiciones de pH ácido y temperatura ligeramente elevada. Su presencia causa pérdidas en el rendimiento, baja recuperación, mayor pureza en las mieles finales, dificultades en la filtración, distorsión de los cristales y aumento de la viscosidad (Batule, 2009).

En la etapa de clarificación debe regularse frecuentemente el valor del pH manteniéndolo a un valor cercano al neutro. Para evitar la inversión de la sacarosa que se produce a pH ácidos y no debe ser superior que 8 pues se produce la destrucción de los azúcares reductores, exceso de incrustaciones en los evaporadores, aumento de producción de mieles, aumento de color, y azúcar de baja calidad (Rein, 2007).

El color es otro indicador que se tiene en cuenta en la calidad cuando se procesa caña verde. Esta incrementa la cantidad de no azúcares que ingresa a la fábrica, especialmente almidón y aquellos compuestos que aportan color (Zossi *et al.*, 2011). En gran parte, este indicador también resulta del material matizado formado por degradación de los azúcares, por reacciones entre azúcares reductores y los aminoácidos, y por otras reacciones similares (Páez, 2013).

La introducción del cogollo con la mecanización de las cosechas y el desarrollo anormal de los nudos de la caña por deterioro de la misma o mala formación en el crecimiento, así como el tipo de variedad, el grado de madurez, el tipo de fertilización y el clima; incrementan la presencia del almidón en la industria (Eggleston *et al.*, 2008b).

El almidón constituye una impureza que afecta negativamente el proceso de producción de azúcar crudo y el proceso de refinación en cuanto a calidad y cantidad (Zhou *et al.* 2008). Según Penados (2004), la presencia del almidón en el proceso tiene una

importancia relevante para la comercialización del azúcar, pues el contenido de almidón es un parámetro de calidad que se tiene en cuenta para la compra de este producto en el mercado internacional y crea la posibilidad de penalidades impuestas por las refinerías que parten del azúcar crudo. Es debido a ello que las refinerías establecen multas financieras a las fábricas que entregan azúcar crudo con concentraciones de almidón mayor que 250 ppm (Cole *et al.*, 2014; Eggleston *et al.* 2013).

1.2 Caracterización del almidón. Propiedades

El almidón se encuentra en el protoplasma de las hojas de la caña y en el extremo del tallo de la misma; las cañas maduras presentan un menor contenido de almidón que las inmaduras. Los mayores depósitos de almidón se localizan habitualmente cerca de los nudos a partir del cual se propaga la caña (Eggleston *et al.*, 2007).

El almidón existe en gránulos semicristalinos de 1 a 10 μm en el tejido y en el jugo extraído de la caña de azúcar. Los gránulos de almidón de caña de azúcar están formados por mezclas en proporciones variables de dos constituyentes distintos la amilosa y la amilopectina, y ambos son polímeros derivados de la α -D- glucosa (Chen *et al.*, 2016), en el Anexo 1 se puede observar la estructura de la amilosa.

La amilosa ocupa la parte interior del grano y no forma engrudo, es en esencia, un polímero lineal dispuesto en forma de espiral, y cada vuelta completa de la espiral abarca seis unidades de glucosa. La amilosa está constituida por moléculas de glucosa donde el enlace fundamental entre estas unidades es α -(1-4), donde aparece la glucosa en forma piranosa. En presencia de iodo la amilosa toma un color azul oscuro. Según Alencar *et al.* (2011), el almidón extraído de la caña de azúcar posee un 25 % de amilosa y un 75 % de amilopectina.

La amilopectina forma la encubierta o envoltura del gránulo, y es la que al gelificar forma el engrudo, constituye un polímero altamente ramificado, compuesto por muchas ramas cortas de 20 a 30 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1-4) y α -(1-6) (Chen *et al.*, 2016), en el anexo 2 se muestra la estructura correspondiente a la amilopectina.

Peña (2009), menciona que el almidón presenta dentro de sus propiedades la gelatinización y explica que se conoce como gelatinización al proceso donde los gránulos de almidón, que son insolubles en agua fría debido a que su estructura es altamente organizada, se solubilizan. Estos se calientan en suspensión acuosa entre 60 y 70 °C y empieza un proceso lento de absorción de agua. Además, se observa que a medida que se incrementa la temperatura, se retiene más agua y el gránulo empieza a hincharse y aumentar de volumen al llegar a cierta temperatura; el rango de temperatura en el que tiene lugar el hinchamiento de todos los gránulos se conoce como rango de temperatura de gelatinización y es característico de la variedad particular de almidón. También al producirse el hinchamiento de los gránulos, ocurre la extracción de la amilosa, la cual liberada queda en dispersión coloidal, donde los gránulos intactos están en suspensión y si se continúa administrando calor a los gránulos hinchados, estos se rompen parcialmente y la amilosa y la amilopectina se dispersan en el seno de la disolución; al final de este proceso se genera un gel.

Otro criterio establece que la gelatinización es la disrupción del orden molecular dentro del gránulo. La evidencia de la pérdida del orden, incluye: hinchamiento irreversible del gránulo, pérdida de birrefringencia y pérdida de estructura cristalina. Se produce dentro de un estrecho margen de temperatura, gelatinizando primero los gránulos más grandes y por último los más pequeños. La temperatura inicial y el rango de gelatinización, dependen del método de medición, de la relación almidón/agua, tipo de gránulo y heterogeneidades dentro de la población de gránulos (Brumosky, 2014).

Acerca de las propiedades del almidón, Brumosky (2014), comenta sobre otra propiedad que presenta el almidón, conocida como retrogradación. Cuando el almidón gelificado se enfría, este se torna progresivamente menos soluble. En solución diluida, las moléculas de almidón precipitan, y este material insoluble es difícil de solubilizarlo por calentamiento. Esto quiere decir, que, si una solución de almidón concentrada se enfría, en ausencia de agitación, se forma un gel rígido, este retorno al estado insoluble

1.2.1 Influencia del almidón en la producción de azúcar crudo

La presencia de algunos polisacáridos indeseables en los jugos de la caña de azúcar tal como el almidón, puede ocasionar consecuencias irreversibles en la producción de azúcar crudo y provocar pérdidas, de ahí la importancia del estudio de su influencia.

En los estudios de Alencar *et al.* (2011), determinan que las variedades de la caña de azúcar presentan diferentes contenidos de almidón y de otras impurezas asociadas. También, establece que el contenido de almidón es más alto en cañas inmaduras con respecto a las maduras y se observa que el mismo decrece cuando la maduración en la caña de azúcar aumenta. Según Zossi *et al.* (2008b), la concentración del almidón en la caña depende de la variedad, la cual oscila entre 200 y 1200 mg/L. Otros como Viginotti *et al.* (2014), declaran que el contenido de almidón en el jugo de caña se encuentra en un rango de 1600 a 2600 mg/L, pero esto depende de diferentes factores, como: la variedad y madurez de la caña que se procesa.

El almidón entra en la fábrica en forma de gránulos que pueden dispersarse fácilmente en el jugo durante el proceso de maceración. Posteriormente, en el proceso de gelatinización causado por el calentamiento en la clarificación, se acaba de disolver y así se concentran en las mieles. Rein (2007), menciona que, en el proceso de molienda, gran parte del almidón que es insoluble en la caña se solubiliza por efecto del calor y pasa a los jugos; una parte se elimina en la clarificación, mientras el resto de alguna manera permanece en el proceso. Entre un 30 y 40 % de este polisacárido se incrusta en el cristal de azúcar crudo durante la cristalización.

Durante el proceso de clarificación el almidón se hace parcialmente soluble eliminándose una fracción, mientras que otra parte pasa a la meladura. Si la cantidad de almidón que pasa a la meladura es mayor de 150 ppm comienzan a existir afectaciones en el proceso. Se determina que el tamaño del almidón es de 1 a 6 μm y estas partículas tienden a coagularse a temperaturas entre los 65 y 80 °C. Esta coagulación forma partículas densas y de gran tamaño que pueden aumentar la viscosidad de la meladura, lo que provoca la disminución de la velocidad de la cristalización en los tachos, impide el agotamiento de las mieles y dificultan la purga en

las centrífugas (Penados, 2004). En consideración a lo anterior, contenidos de almidón en jugo, mayores a 200 mg/L, causan problemas durante el proceso de elaboración de azúcar crudo, entre los principales están: el aumento de la viscosidad por efecto de la gelatinización de los gránulos de almidón, la dificultad en los procesos de filtración, decantación, evaporación y cristalización.

Penados (2004), determina que el almidón reduce la calidad del jugo y azúcar crudo porque demora o inhibe la cristalización y aumentan las pérdidas de azúcar en la miel final. También, establece que debido a su naturaleza de carbohidratos y su gran solubilidad es muy difícil de remover en el proceso; tiene la tendencia de ocluirse en el cristal de azúcar crudo. Así que representa una pérdida en términos de azúcar disponible para el proceso, por causar demoras en el proceso debido a viscosidades excesivas y pérdidas de sacarosa por modificaciones en el crecimiento del cristal.

En varios estudios se expresa que el almidón reduce la filtración y la afinación del azúcar crudo, y constituye un impedimento para el proceso de decoloración en la refinación (Eggleston *et al.*, 2006). De acuerdo con la información anterior, se concibe que, ejerce una influencia considerable en la viscosidad de las masas cocidas y puede doblar dicha viscosidad al reducir la calidad de las mismas.

Autores como Eggleston *et al.* (2006), Zhou *et al.* (2008) y Zossi *et al.* (2008b), entre otros, coinciden en plantear que el almidón se ocluye en el cristal de azúcar en la etapa de cristalización, y de esta manera permanece en el azúcar crudo. La calidad de la producción se ve afectada porque el cristal obtenido no va a ser puro en sacarosa.

El almidón constituye una impureza del jugo de caña de azúcar y trae efectos adversos en los procesos de producción y refinación del azúcar crudo. Como consecuencia se afecta la cantidad y calidad del azúcar producido (Eggleston *et al.*, 2006). El contenido de almidón es consecuencia del metabolismo de la caña, y la industria no influye en nada sobre eso.

Aunque en el proceso de producción de azúcar crudo durante la etapa de clarificación se elimina una gran parte, el almidón soluble producto de la gelatinización por el efecto

de la temperatura permanece en el jugo de caña de azúcar, y de esta manera continua en todo el proceso (Zhou, *et al.*, 2008). El contenido de almidón es un parámetro importante a considerar durante el proceso de elaboración de azúcar crudo, en la industria, es común cuantificar su contenido en el proceso para disminuir sus efectos negativos en la capacidad productiva (Zossi, *et al.*, 2008b).

1.3 Métodos que permiten la eliminación del almidón en el proceso de producción de azúcar crudo

Debido a los efectos negativos que provoca la presencia de almidón en el proceso de producción de azúcar crudo a lo largo de los años se han estudiado las vías más factibles para lograr eliminarlo del proceso. En los últimos años algunas refinerías de los Estados Unidos han estado sugiriendo la posibilidad de que se comience a aplicar multas por la presencia de altas concentraciones de almidón en azúcar crudo, si no se intenta mejorar el control sobre el almidón (Eggleston *et al.*, 2007b).

Una de las soluciones a esta problemática es la utilización de métodos tales como: la extracción mecánica del almidón insoluble, la clarificación al vacío y la centrifugación del jugo. Estos métodos a pesar de que ofrecen resultados no eliminan la fracción soluble además de que exigen grandes inversiones encareciendo de esta forma el proceso. Otra de las soluciones es la selección de variedades de caña sobre la base del contenido de almidón, pero igual así persiste la presencia de este solo que en pequeñas cantidades (Zhou *et al.*, 2008). Según Rhode (2006), la utilización de métodos físicos de separación como la ultrafiltración u osmosis inversa, funcionan correctamente a pequeña escala, pero están lejos de ser desarrollados para su aplicación en procesos reales.

Se ha demostrado que la utilización de enzimas en la degradación de almidones es uno de los métodos más efectivos. Según Zhou *et al.* (2008), la hidrólisis es más eficaz cuando los gránulos de almidón están parcialmente solubilizados y gelatinizados por la maceración en caliente o el agua de imbibición, además explica que la degradación de almidón ocurre a bajas concentraciones de amilasas, lo que provoca un incremento en el tiempo de retención y a su vez la elevación de este tiempo trae como consecuencia que ocurra la degradación ácida de la sacarosa que es indeseado. Eggleston *et al.*

(2003), afirman que la degradación del almidón en un rango de 10 a 20 % ocurre para tiempos de retención de 12 minutos.

En el proceso de clarificación al utilizar la alcalización en caliente se conoce que una fracción del almidón es removida y precipitada por el precalentamiento del jugo antes de alcalizar y clarificar (Eggleston *et al.*, 2003).

Según Penados (2004), una de las formas de favorecer la hidrólisis del almidón es la de añadir la enzima α -amilasa en el penúltimo o último vaso del múltiple efecto ya que a estas condiciones de operación el almidón es un gel completamente soluble. De igual forma coinciden Eggleston *et al.* (2006) quienes además afirman que la temperatura, el pH y tiempo de retención en esta etapa favorecen la acción de la α -amilasa.

Tester *et al.* (2004), informan que la hidrólisis enzimática se realiza por lo regular en la estación de evaporación ya que a pesar de que en el proceso de clarificación se remueve un poco de almidón debido a la precipitación no se logra reducir en grandes cantidades como para aliviar los problemas en el proceso. Cuando los niveles de almidón en el jugo se encuentran alrededor de 1000 ppm/°Bx la hidrólisis de almidón utilizando α -amilasa se hace más difícil ya que el contacto entre el almidón y la enzima es muy bajo, de igual forma este problema puede reducirse aumentando la dosis de solución activa de α -amilasa (Eggleston *et al.*, 2008).

De las etapas del proceso de producción de azúcar crudo el mejor momento para adicionar la enzima pudiera ser durante la etapa de purificación en la corriente de jugo alcalizado por la presencia del cofactor Ca^{2+} que permite la estabilidad de la enzima además de mejorar su actividad catalítica (Peña *et al.*, 2009).

1.4 Enzimas en el proceso de producción de azúcar crudo

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que dirigen la actividad catalítica en distintos sistemas biológicos, gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas. Según Lehninger (2008) las enzimas son proteínas solubles que intervienen en todas las reacciones del metabolismo permitiendo que estas se produzcan, actúan en secuencia organizada en reacciones de degradación de nutrientes y en la síntesis de macromoléculas. Una propiedad importante de las enzimas es que son específicas, debido a que una sola enzima puede catalizar una reacción.

Gashtasbi (2014), plantea que las enzimas son catalizadores de origen biológico que cumplen muchos de los requisitos necesarios para impulsar la industria química. Su utilización en estos procesos constituye una solución a la necesidad planteada, ya que han demostrado sus excelentes potencialidades como biocatalizadores eficientes y de gran especificidad respecto a los catalizadores químicos convencionales. Es por ello que se ha producido un incremento significativo en el uso de las mismas en muchos sectores de la industria, en la agricultura, en la medicina, así como en la química analítica y preparativa.

Durante los últimos años han permitido reducir los costos de producción, mejorar la calidad de productos, desarrollar procesos más eficientes y un mayor rendimiento en procesos industriales (Meléndez, 2004). Ejemplo de esto es la industria azucarera donde debido al efecto negativo que provoca la presencia de almidones, se hace necesaria la implementación de enzimas específicamente, las α -amilasas, como un método que permite su eliminación.

Las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa) son endoglucanasas responsables de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos $\alpha(1,4)$ de polímeros como el almidón, el glucógeno y la dextrina produciendo maltosa, maltotriosa y otras dextrinas. Además de la hidrólisis, ellas también catalizan reacciones de condensación y transglicosilación dependiendo de las condiciones experimentales y especialmente de las altas concentraciones de sustrato (Brena *et al.*, 1996). Oficialmente el término amilasa fue usado para designar las enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos α 1-4 de la amilosa, la amilopectina, y el glicógeno. Sin embargo, investigaciones recientes han encontrado un gran número de enzimas que actúan sobre diferentes enlaces glucosídicos bajo acciones de tipo endo y exo reactivas (Taniguchi y Honnda, 2009).

Las α -amilasas son utilizadas como complementarios para resolver problemas relacionados con la viscosidad y la filtración de azúcar cruda que surgen por la presencia del almidón en el proceso (Eggleston *et al.*, 2013; Young y de Man, 2018). La enzima pudiera ser agregada en la etapa de purificación, punto donde se realiza la

alcalización (González 2018). La adición de CaOH (lechada de cal), aporta el cofactor Ca^{2+} que permite la estabilidad de la enzima además de mejorar su actividad catalítica (Peña, 2009).

La aplicación de α -amilasa en el proceso de azúcar crudo, en Cuba, se realiza en el tanque de jugo clarificado, en dosis de 2-5 g (de enzima importada) por tonelada de caña molida, lo que logra remociones de más de 65 % en jugos con un contenido de almidón relativamente elevado (Namer *et al.*, 1988). También se han obtenido buenos resultados, dosificando la enzima en la etapa de meladura, a razón de 5 g/t caña, esto es factible de hacer cuando la enzima es termostable a las temperaturas del proceso y no sufre afectación de su actividad hidrolítica por valores de grados brix cercanos a 60 (Namer *et al.*, 1988).

1.4.1 Hidrólisis enzimática

En la actualidad la hidrólisis enzimática es utilizada en la industria azucarera en muchos países, para la degradación del almidón. La hidrólisis es el proceso químico en el cual una molécula es separada en dos partes por la adición de una molécula de agua. La reacción se lleva a cabo cuando uno de los fragmentos del par molecular gana una molécula de hidrógeno (H^+) mientras que el otro grupo recibe un grupo hidroxilo (OH^-) (Bailey, 1995).

La hidrólisis industrial del almidón se puede realizar a través de dos procesos diferentes, uno ácido y otro enzimático. El primero consiste en la reacción llevada a cabo con un agente ácido como el sulfúrico o el clorhídrico entre otros, que actúan a altas temperaturas y/o presiones. Estos trabajan sobre el polisacárido afectando al azar los enlaces glicosídicos mediante dos fases: la primera afecta el material amorfo (amilopeptina) de la partícula y el segundo es un proceso que ataca el material cristalino lentamente debido a la dificultad que tienen los iones de hidrógeno en penetrar la densa capa de enlaces glicosídicos que se encuentran en el interior de la doble hélice (Jacobs, 1998). Entre los ácidos más utilizados industrialmente el ácido sulfúrico ha tenido amplia aceptación debido a su menor costo y a su menor poder corrosivo. Este proceso se conoce como hidrólisis ácida del almidón (Jacobs, 1998).

En el segundo caso el catalizador es un agente enzimático, conocido como catalizador biológico, el cual afecta el curso y la velocidad de una reacción sin afectar el equilibrio ni la morfología de la proteína. La reacción se lleva a cabo en el centro activo o cavidad catalítica, la cual se une específicamente al sustrato llevando a cabo la reacción en un complejo enzima-sustrato (Doble, 2004), lo que permite una alta selectividad de sustratos y productos.

La hidrólisis ácida ha sido reemplazada por la hidrólisis enzimática, pues para su realización se requiere el uso de materiales resistentes a la corrosión y un mayor consumo de energía, además tiene como resultado la formación de color y cenizas (Marwati *et al.*, 2017).

Las enzimas degradadoras del almidón (hidrolasas) se clasifican en exoenzimas y endoenzimas de acuerdo a su mecanismo de hidrólisis (Okafor, 2019). El grupo que más se emplea en el procesamiento industrial del almidón son las amilasas.

El término amilasa abarca una clase de enzimas que se producen en una amplia variedad de organismos, y se refiere a α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas (GA) (Yong & John, 2018). La α -amilasa (α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa) cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glicosídicos del almidón, el glucógeno y diversos polisacáridos relacionados de forma aleatoria y libera diferentes tamaños de oligosacáridos en una configuración α -anomérica (Aguloglu *et al.*, 2014; Bhanja & Tapati, 2015; Gibbs *et al.*, 2015).

Para la selección y aplicación de la α -amilasa a escala industrial deben considerarse parámetros tales como pH, temperatura, naturaleza del sustrato, concentración de sustrato, concentración de enzima, presencia de iones metálicos y otros agentes estabilizantes (Sivaramakrishnan *et al.*, 2016).

La hidrólisis del almidón es una de las aplicaciones más extendidas de la α -amilasa, donde se convierte en fructosa y glucosa. La conversión enzimática incluye la gelatinización que involucra la disolución de los gránulos de almidón formando una suspensión viscosa. La licuefacción, que involucra la hidrólisis parcial y disminución de la viscosidad y la sacarificación involucrada en la producción de la glucosa y maltosa como una extensión del hidrólisis (Monteiro & Oliveira, 2010).

Suriya *et al.* (2016) y Li (2018), coinciden en que la gelatinización, la licuefacción y la sacarificación son los procesos que se llevan a cabo para realizar la hidrólisis enzimática del almidón. Con relación a estas Barros (2012), no incluye la gelatinización como una de ellas; para él es conveniente que el almidón se encuentre gelatinizado para lograr una eficiente hidrólisis enzimática.

La aplicación de la enzima α -amilasa para la eliminación del almidón en los ingenios azucareros trae consigo el desarrollo de métodos de producción de enzimas más eficientes, que ayudan a reducir los precios de las mismas. Por otro lado, el uso de la enzima alfa amilasa es el método más eficiente para hidrolizar el almidón en los ingenios azucareros y refinerías, por lo que el uso de esta enzima ayuda en los siguientes aspectos: mejora la clarificación y calidad del azúcar refinado, elimina problemas de viscosidad, elimina problemas de cristalización, reduce las pérdidas de sacarosa a la miel final, elimina las sanciones por la presencia de almidón en el azúcar (Rohde, 2006).

1.5 Conclusiones parciales

- ✓ El corte mecanizado de la caña contribuye al incremento de las principales fuentes de entrada de almidón al proceso: cogollo y hojas.
- ✓ La presencia de almidón en los jugos dificulta la clarificación y la filtración, demora o inhibe la cristalización, incrementa la viscosidad y las pérdidas de azúcar en la miel final.
- ✓ La hidrólisis enzimática resulta más atractiva que la ácida, para la eliminación del almidón, específicamente con enzimas α -amilasas.

Capítulo II. Materiales y Métodos

En este capítulo se realiza la descripción del caso objeto de estudio y las metodologías empleadas para cumplir los objetivos de la investigación.

2.1 Descripción general del proceso objeto de estudio

Uno de los exponentes de la industria azucarera en Cuba lo constituye el central “Jesús Sablón Moreno” ubicado en el municipio de Calimete en la provincia de Matanzas, el cual será objeto de estudio del presente trabajo. En el anexo 3 se muestra el diagrama del proceso objeto de estudio.

2.1.1 Definición de las etapas del proceso objeto de estudio

Se definen como etapas del proceso de producción de azúcar crudo: preparación y molienda, purificación, concentración o evaporación, cristalización y centrifugación.

2.1.1.1 Etapa de preparación y molienda

En el ingenio se recibe la caña en camiones, la cual se pesa y pasa al basculador, donde es necesario prepararla para lograr eficiencia en la extracción del jugo. En esta área se troza y tritura la caña la cual se conduce por medio de esteras hacia los molinos.

El tándem de molinos está integrado por 5 unidades de 3 mazas cada una, el primer molino extrae el jugo de mayor concentración de sacarosa, mientras que el bagazo pasa por los restantes molinos para continuar la extracción del jugo. Para una mejor extracción y evitar el desarrollo de microbiano se añade agua de imbibición antes de pasar al último molino, la cual debe estar alrededor de los 70 °C; el jugo extraído pasa por un proceso de recirculación del quinto molino al cuarto y así sucesivamente hasta el segundo. Luego el jugo mezclado pasa por un filtro colador para separarlo de las partículas sólidas. El último molino entrega el bagazo a un conductor de banda que lo eleva al rastrillo repartidor de las calderas.

2.1.1.2 Etapa de purificación

Esta etapa comprende varias subetapas, siendo estas: la alcalización, calentamiento, filtración y clarificación.

El jugo mezclado con un pH alrededor de 5,2 a 5,7 pasa al tanque de alcalizar. Allí se le adiciona lechada de cal diluida previamente preparada con una proporción que va desde 500 y hasta 650 gramos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (lechada de cal) por tonelada de caña molida, con el objetivo de aumentar el pH del jugo entre 7,5 y 8,1 para evitar la inversión de la sacarosa, y favorecer el proceso de coagulación.

Seguidamente, el jugo alcalizado pasa por varios calentadores, primarios, secundarios y rectificadores, cuya función es elevar la temperatura del jugo ligeramente por encima del punto de ebullición para favorecer el proceso de coagulación de las impurezas y su posterior eliminación en la etapa de sedimentación.

El jugo calentado es bombeado al tanque flash para eliminar los gases que acompañan al jugo y mantener una temperatura uniforme alrededor de los 100 °C a la entrada del clarificador.

La etapa de clarificación tiene como objetivo eliminar la mayor cantidad posible de impurezas en suspensión, coloidales y solubles mediante la sedimentación. El jugo alcalizado se mezcla con floculante para completar la reacción de formación y sedimentación de los flóculos de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), donde se logra una separación en dos corrientes: una contiene el jugo claro y la otra contiene el sedimento. Los lodos se llevan a un mezclador donde se le adiciona bagacillo como medio filtrante, en proporción suficiente como para formar una torta con buenas propiedades físico-mecánicas. El proceso de agotamiento de la torta se lleva a cabo en los filtros rotatorios al vacío. De aquí se obtienen nuevamente dos corrientes: un jugo filtrado, de calidad intermedia que se recircula al tanque de alcalizar y un residual al que comúnmente se llama cachaza que va hacia la tolva de cachaza para posteriormente ser utilizada como fertilizante. El jugo clarificado pasa a la etapa de evaporación

2.1.1.3 Etapa de evaporación

La etapa de concentración está formada por un pre-evaporador y un múltiple efecto, en ella se evapora el agua contenida en el jugo clarificado. El múltiple efecto funciona bajo el principio de Rillieux para obtener una disolución más concentrada, pero sin llegar a la saturación. El producto final que se obtiene en este proceso es la meladura la cual posee aproximadamente 62 °Brix y una pureza de 85 %.

2.1.1.4 Etapa de cristalización

El proceso de cristalización de sacarosa se basa en elevar su concentración por encima de aquella correspondiente a una solución saturada, y llevarla en forma regulada y con precisión a la concentración requerida para lograr la cristalización. Dicho proceso ocurre en los tachos y la industria cuenta con siete, los cuales trabajan a simple efecto.

El sistema de masas cocidas que se emplea es el de tres masas cocidas con doble semilla, la elaboración de las masas cocidas en tachos se trabaja de la forma siguiente: la MCA se elabora con semilla B y meladura, la MCB se elabora con semilla C y miel A, la MCC se elabora con grano mejorado y miel B, el grano mejorado se elabora a partir del grano fino y miel B; el grano fino se elabora a partir de una cristalización a 82 % de pureza como mínimo y miel A, se adiciona miel B si las purezas son muy altas.

2.1.1.5 Etapa de centrifugación

La centrifugación tiene como objetivo separar los granos de azúcar de la miel o licor madre, o sea que se trata de un proceso de separación de mezclas, donde se separa la parte sólida (azúcar) de un líquido (miel). El flujo que entra a este proceso son las masas cocidas procedentes de la cristalización. En el caso de las masas comerciales, esta separación produce un azúcar con más del 98 % de pureza y granos con suficiente tamaño, alrededor de 0,65 a 0,80 mm para su comercialización, mientras que las mieles obtenidas de la separación (A y B) retornan al proceso para ser agotadas. En el caso de las masas de agotamiento, el azúcar centrifugado se retorna hacia los tachos (como semilla), pues su tamaño es del orden de los 0,25 a 0,40 mm y su pureza inferior al 90 % no constituyen un producto apto para la comercialización y la miel agotada como producto final se entrega a los tanques de almacenamiento.

En cada etapa del proceso se monitorean los parámetros de calidad y operación para tener una mejor comprensión de la influencia del almidón en las mismas.

2.2 Descripción del caso de estudio

La siguiente figura muestra el esquema de trabajo desarrollado durante la investigación.

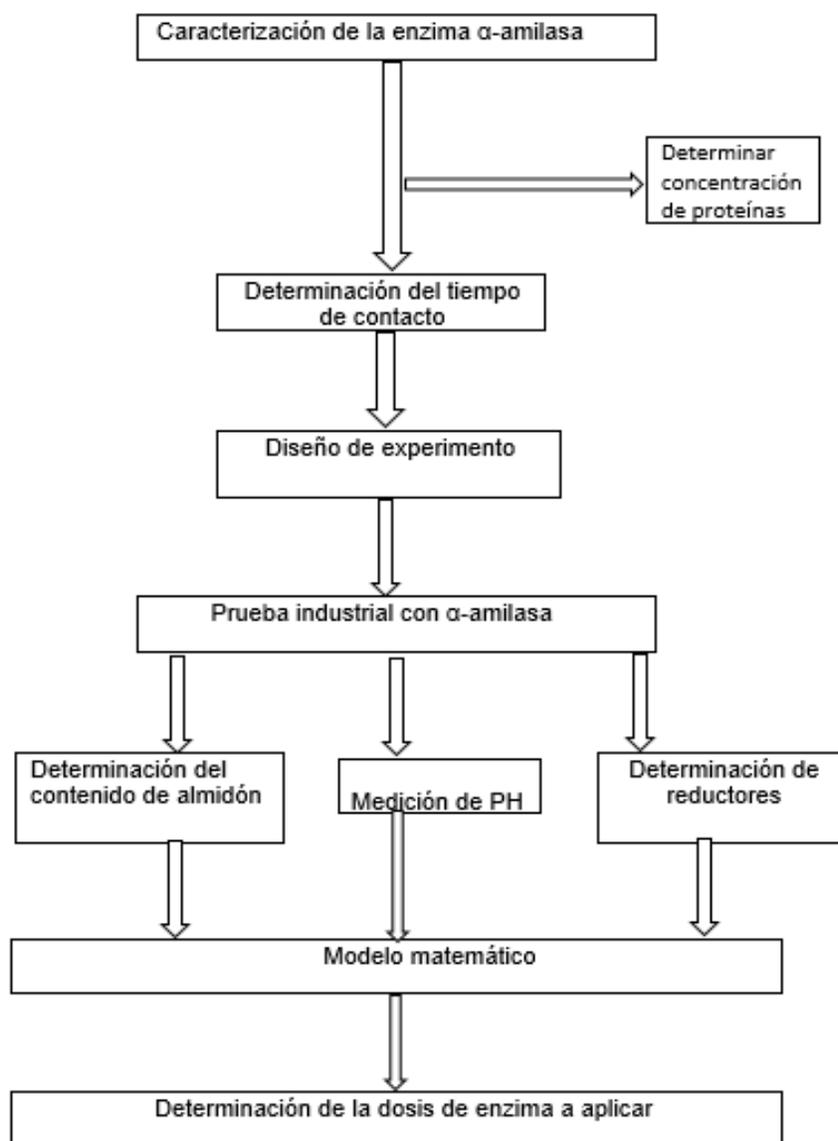


Figura 2.1: Esquema de trabajo.

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS Utrospec 2000 (*Pharmacia Biotech*, Suecia). Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado y los valores informados son el promedio de estas determinaciones.

2.2.1 Materiales y Reactivos

Los principales materiales y reactivos empleados en la investigación, se muestran en la tabla 2.1, así como su fuente de procedencia.

Tabla 2.1: Principales materiales y reactivos.

Materiales y Reactivos	Procedencia
α -amilasa industrial	Laboratorio Biológico Farmacéutico (LaBiofam), Cienfuegos(Actividad Especifica (AE)= 762 U/mg)
Ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNSA)	Panreac, España
Cloruro de calcio	UNI –Chem
Yoduro de Sodio	MERCK
Yodato de Potasio	MERCK
Ácido Clorhídrico (37 %)	BDH
Ácido Acético	UNI –Chem
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	BDH
NaHPO_4	BDH

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico.

2.3 Caracterización de la enzima α -amilasa

Para la caracterización de la enzima α -amilasa se realiza la determinación de la concentración de proteínas y la actividad enzimática.

2.3.1 Concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se efectúa mediante la aplicación del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), que consiste en la adición de 400 μL de la mezcla Lowry a 400 μL de la disolución enzimática. Se esperan 10 minutos y se adiciona 200 μL del reactivo Folin (1/10) y después de transcurridos 30 minutos se lee la absorbancia a 750 nm.

Para la preparación de la mezcla conocida como Lowry, se disuelven: 10 g de NaOH en 100 mL de agua destilada y 5 g de Na_2CO_3 en los mismos 100 mL anteriores; 1 g de Cu_2SO_4 en 100 mL de agua destilada; 2 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada (este reactivo es necesario conservarlo en frío) y por último se mezclan de las soluciones preparadas anteriormente en las siguientes proporciones 10 mL, 200 μL y 200 μL respectivamente.

2.3.2 Actividad enzimática

La actividad enzimática se determina adicionando 0,5 mL de disolución enzimática sobre 0,5 mL de almidón al 2 % (m/v) en una disolución tampón de fosfato de sodio 1 mmol/L, pH 6,9 a 6 mmol/L de NaCl. Se mantiene con agitación a 30 °C durante 10 minutos, se adiciona 1 mL de DNSA, y se introduce en baño maría por 10 minutos a 100 °C. Una vez que finaliza esta etapa del experimento, se mide la absorbancia a 546 nm. La actividad de la enzima se evalúa a través de la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{A_{546}}{t} * \frac{1}{m} * \frac{Denz}{Venz} \quad 2.1$$

Donde:

AE: actividad específica [U/mL].

A_{546} : valor de absorbancia.

t: tiempo que se encuentra en baño maría (10 minutos).

m: pendiente de la curva del ácido 3,5-dinitrosalisílico.

Dil enz : dilución de la enzima.

Venz : volumen de la enzima [0,5 mL].

La curva del ácido 3,5-dinitrosalicílico se determina por el método del DNSA, para ello se utiliza una disolución de glucosa patrón (Bernfel, 1955).

2.4 Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón

En este epígrafe se determina el efecto del proceso de hidrólisis en parámetros de calidad de la industria azucarera.

2.4.1 Diseño de experimentos

Se realiza un diseño de experimentos de superficie de respuesta con el objetivo de obtener un modelo matemático que permita describir el efecto de la hidrólisis enzimática en indicadores de calidad de la industria. Los factores experimentales que se analizan son: tiempo de contacto y concentración de enzima; y como variables de respuesta: % de remoción de almidón, incremento de azúcares reductores y pH.

Las condiciones de las corrientes del proceso en las que se aplica el proceso de hidrólisis se muestran en la tabla 2.2

Tabla 2.2: Condiciones de las corrientes analizadas.

Corriente experimental	Temperatura (°C)	pH	°Brix
Jugo Mezclado	30 -35	4,6–5,4	13,69 -15,79

2.4.1.1 Etapa experimental

La etapa experimental se llevo a cabo en el laboratorio químico del central azucarero "Jesús Sablón Moreno". Los ensayos se realizan en seis ocasiones y los valores utilizados son los promedios de estas determinaciones.

2.4.1.2 Hidrólisis enzimática del almidón en los jugos

La hidrólisis en el jugo, se desarrolla tomando inicialmente 25 mL del sustrato, y se adiciona la α -amilasa a diferentes concentraciones: 0,01 % (0,1 mg/mL; 76 U/mL), 0,08 % (0,8 mg/mL; 608 U/mL) y 0,15 % (1,5 mg/mL; 1143 U/mL) (Fadilah y Syamsiah, 2015). Se incuba durante 15, 30 y 45 min respectivamente, y se enfría a 4 °C con el objetivo de detener la reacción de hidrólisis.

2.4.2 Caracterización de los hidrolizados

En este epígrafe se dan a conocer las técnicas aplicadas en la caracterización de los hidrolizados obtenidos en las corridas del diseño de experimento.

2.4.2.1 Determinación del contenido de almidón

Para determinar el contenido de almidón presente en los jugos después del proceso de hidrólisis enzimática se utilizó la metodología propuesta por MACU (2007).

En un beaker de 100 mL, se agregan 20 mL de jugo y se adicionan 80 mL de etanol y 2 g de tierras infusorias activada. Se agita, se deja en reposo por 15 min y se filtra a presión reducida. El precipitado obtenido se trasvasa a un beaker de 200 mL y se le adiciona 40 mL de disolución cloruro de calcio-ácido acético (la disolución de cloruro de calcio se prepara a una concentración de 40 % m/m y se ajusta su pH a 3 con solución de ácido acético 0,033 mol/L) se cubre con un vidrio reloj y se mantiene a ebullición suave durante 15 min. Se enfría la solución y se enraza a un volumen de 100 mL. Se homogeniza, se filtra, se desechan los primeros 10 mL. Se toma 20 mL del filtrado y se adicionan: 2,5 mL de solución de ácido acético 2 mol/L, 0,5 mL de yoduro de potasio 10 % (m/v) (solución que se debe preparar inmediatamente antes de utilizar) y 5 mL de yodato de potasio 0,00167 mol/L. Se enraza a un volumen de 50 mL y se determina la absorbancia a 600 nm en una celda de 1 cm. Para la preparación del blanco se adicionan 8 mL de la disolución cloruro de calcio-ácido acético y los mismos volúmenes de la solución de ácido acético, yoduro de potasio, yodato de potasio, enunciadas anteriormente y se enraza a un volumen de 50 mL con agua destilada.

Para preparar la tierra de infusorios activada se pesan 50 g de tierra de infusorios, se añade aprox. 1 000 mL de agua y 50 mL (ó 59,0 g) de ácido clorhídrico ($d_{20}=1,18$ g/ml),

se agita 5 min, se filtra mediante vacío y se lava con agua hasta que el filtrado adquiera el pH del agua utilizada.

Para la elaboración de la curva de calibración de la técnica de determinación de almidón en jugo de caña se desarrollan 9 corridas, con una concentración de almidón diferente para cada una. Anexo 4

Se depositan en matraces de 50 mL. Se adicionan a cada matraz, agua destilada hasta aproximadamente 20 mL, 2,5 ml de solución de ácido acético (2 mol/L), 0,5 mL de solución de yoduro de potasio (10 % m/v) solución que se debe preparar inmediatamente antes de utilizar) y 5,0 mL de solución de yodato de potasio (0,00167 mol/L). Se enrasa con agua destilada y se mide la absorbancia a 600 nm en una celda de 1 cm, se utiliza como blanco la solución que no contiene almidón.

Una vez trazada la curva, con la absorbancia de la muestra y la misma se puede determinar la concentración de almidón de la muestra. Para el caso de la determinación de almidón en jugo, se calcula el contenido de almidón, mediante la ecuación:

$$CA = \frac{1000 * m}{mj * Bx} \quad 2.2$$

Donde, CA: concentración de almidón (mg/kg);

m: es la masa, en mg, de almidón obtenido a través de la curva de referencia;

Bx; sólidos disueltos, en % m/m, presentes en la masa (m_i) de jugo original;

mj: masa, en g, contenida en los 50 mL de solución a la que se le desarrolla color.

Para determinar la masa de la muestra a la que se le desarrolla color se utiliza la ecuación:

$$mj = \frac{mi * VA}{100} \quad 2.3$$

Donde:

VA: Volumen que se toma de la muestra una vez filtrada (mL).

2.4.2.2 Determinación de Reductores

Los reductores se determinan mediante el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNSA) (Benfeld, 1955).

Se toma 1 mL del jugo industrial, luego se añade 1 mL del DNSA y se incuba durante 10 min en baño de María a 100 °C. Se añade 1,2 mL de agua destilada, se enfría y se mide la absorbancia a 546 nm. En función de estas absorbancias se determina la correspondiente concentración de glucosa a partir de la siguiente ecuación:

$$y = 0.302 * x - 0.361 \text{ (}\mu\text{mol/mL)} \quad 2.4$$

2.4.2.3 Medición del pH

La medición del pH se realiza en un pH-metro PHSJ-3F previamente calibrado mediante la utilización de una solución tampón pH 7 y posteriormente pH 4.

2.5 Herramientas estadísticas utilizadas

Los resultados obtenidos son sometidos a un tratamiento estadístico para facilitar el análisis de evaluación del efecto de la hidrólisis en los parámetros de calidad de la industria. Para lo cual se utilizó como herramienta el *software Statgraphic Centurion 16.2*. Las técnicas estadísticas que se muestran a continuación fueron las utilizadas.

2.5.1 Análisis de varianza

La determinación del efecto de las dosis de aplicación de la enzima en el % de remoción de almidón, incremento de reductores y el pH, se encuentran entre las tareas de la investigación. Para poder estudiar como incide la aplicación de la enzima en estos parámetros, se propone la realización de los correspondientes análisis de varianza, para saber si existen diferencias significativas entre las dosis de α -amilasa adicionadas en los experimentos.

Para verificar si hay diferencias estadísticamente significativas entre medias cuando tenemos más de dos muestras o grupos en el mismo planteamiento, se utiliza el análisis de varianza. Este puede contemplarse como un caso especial de la modelización econométrica, donde el conjunto de variables explicativas son variables ficticias y la variable dependiente es de tipo continuo.

El análisis tiene como objetivo comparar una población con otra (Guerra y Sevilla, 1986). La varianza existe entre cada grupo individual y también existe la varianza entre los grupos, la relación entre ambas varianzas debe ser aproximadamente igual a uno para que las varianzas se acerquen a una misma población (Guerra et al., 2004). Esta relación es conocida como F de Fisher, generalmente el valor de dicha relación se compara con un valor de F tabulado (Guerra y Sevilla, 1986); la F de Fisher está relacionada con el P-value que indica la probabilidad de si existen o no diferencias entre las poblaciones. Si el valor del P-value es menor que el nivel de significación 0,05 % existen diferencias significativas entre las poblaciones con un nivel de confianza del 95 %. Además, para ampliar la justificación de los resultados que se obtiene en el análisis de varianza, se realiza la prueba de múltiples rangos, que identifica cuales son los grupos homogéneos y cuáles son los que presentan diferencias significativas. Para poder aplicar el procedimiento anterior es necesario realizar la prueba de normalidad, para verificar que los datos experimentales tengan una distribución normal, para ello se requiere del análisis de tres pruebas a desarrollar, de las cuales dos como mínimo deben realizarse para justificar el resultado. En la demostración de la distribución normal se establecen las siguientes pruebas a realizar:

- Analizar los valores de los coeficientes de *skewness* y *kurtosis*, los cuales deben estar dentro de un intervalo de -2 a 2, para considerar dicho caso con una distribución normal a partir de la caracterización estadística de los datos.
- Comparar entre el valor de la probabilidad y el error permisible. La condición necesaria para plantear la existencia de la distribución normal es que el valor de la probabilidad de los coeficientes de *skewness* y *kurtosis*, debe ser mayor que el nivel de significación si se trabaja con 5 %, pero en caso de no cumplirse se compara con un nivel de significación de 1 %.
- Realizar la construcción del histograma de frecuencia, para que exista una distribución normal, la curva que pasa por los puntos medios de cada intervalo del polígono de frecuencia tienen que representar una curva gaussiana, de forma tal, que la distribución sea simétrica.

2.5.2 Optimización simultánea

Existen varios indicadores de calidad en el proceso de producción de azúcar crudo tales como pH, Brix, color, cenizas, reductores y contenido de almidón, y todos son importantes para que el producto final tenga la calidad requerida. Es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés (Gutiérrez y de la Vara, 2008). Teniendo en cuenta que si la optimización sólo se hace para uno de estos parámetros podrían resultar condiciones inadecuadas para los otros.

Es preciso buscar una solución compromiso, donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio. A esa solución compromiso la llamaremos óptimo simultáneo (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

2.5.3 Diagrama de Pareto

El principio de Pareto se enuncia diciendo que el 80 % de los problemas están producidos por un 20 % de las causas según Ruiz-Falcó, (2009). Por lo que se hace necesario localizar y eliminar las causas que producen la mayor parte de los problemas. El diagrama de Pareto no es más que un histograma en el que se ordenan cada una de las "clases" o elementos por orden de mayor a menor frecuencia de aparición. A veces sobre este diagrama se superpone un diagrama de frecuencias acumuladas.

2.5.4 Análisis de sensibilidad

El análisis de sensibilidad permite determinar cómo los posibles valores de una variable independiente pueden afectar a una variable dependiente particular. Es una herramienta de gestión para resolver problemas de optimización (Santamaría *et al.*, 2019) que permite predecir los resultados del proyecto, ayudando a comprender las incertidumbres, las limitaciones y los alcances de un modelo de decisión.

Un análisis de sensibilidad incluye la variación de dos o más entradas al mismo tiempo y estudia el efecto sobre la salida sobre las salidas o resultados. Inevitablemente se hace progresivamente más difícil presentar los resultados de un análisis en la medida que sea mayor el número de entradas y las evaluaciones frecuentemente presentan

incertidumbre sobre más entradas de las que pueden ser manejadas (Velázquez, 2012).

2.5.5 Diseño de experimentos

El diseño estadístico de experimentos es precisamente la forma más eficaz de hacer pruebas (Gutiérrez y de la Vara (2008)). El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.

En la investigación, el diseño y análisis de experimentos permite determinar los factores (dosis de enzima y tiempo de contacto) del proceso de hidrólisis enzimática que más inciden el desdoblamiento de almidón, en el incremento de los reductores y las cenizas, y en la variación de pH. Además de permitir encontrar las condiciones de los factores que garantizan valores óptimos individuales en las respuestas.

Para poder solucionar las diversas situaciones que existen en la práctica, se han creado y propuesto diseños experimentales, entre los que se encuentra la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). La MSR es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas en el modelado y análisis de problemas y en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables, con las cuales el objetivo es optimizar esa respuesta (Montgomery, 2017). Según Gutiérrez y de la Vara (2008), los diseños de superficie de respuesta se construyen en el software *Statgraphics*, que utiliza como parámetros para su validación: el coeficiente de determinación (R^2), el diagrama de Pareto, y el estadístico de Durbin Watson.

Capítulo III. Análisis de los Resultados

En el presente capítulo se muestran los resultados alcanzados en la investigación después de aplicar las metodologías propuestas con anterioridad. Se analiza la incidencia de la enzima α -amilasa en la remoción del almidón, el pH y los azúcares reductores de las muestras. Además, se obtienen los modelos matemáticos que describen el proceso de hidrólisis enzimática.

3.1 Caracterización de la enzima α -amilasa libre

La enzima α -amilasa utilizada en este trabajo fue suministrada por la empresa LABIOFAM. La misma fue liofilizada y diluida en medio acuoso, debido a que no se disolvía completamente. El proceso de extracción realizado se describe a continuación.

Se dispersó 1 g de α -amilasa en 10 mL de solución tampón fosfato de sodio 20 mM, pH= 7, con agitación, durante 1 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo se centrifuga y el sólido resultante se somete a un nuevo proceso de extracción. Se determina la actividad específica a la solución y como resultado se obtiene que la enzima utilizada en este trabajo presenta una actividad de 762 U/mg.

3.2 Diseño de experimento

Se realiza un diseño de experimento mediante el software *Statgraphics Centurion* 16.2. Los factores experimentales que se analizan son tiempo de contacto y concentración de enzima, y como variables de respuesta: porcentaje de remoción de almidón, pH, e incremento de reductores. En el anexo 5, se definen las corridas experimentales generadas por el software.

3.3 Análisis estadístico de los resultados experimentales

Definido el diseño de experimento, se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de los jugos para luego determinar los valores de absorbancia, incremento de reductores y pH, según las metodologías descritas en el epígrafe 2.3.

En el anexo 6 se muestran los resultados de la medición de estos parámetros y la caracterización estadística de los mismos. En el mismo puede observarse que los

coeficientes de variación son inferiores al 12 % en todos los casos, por lo que se puede afirmar que los datos presentan una baja dispersión.

En el anexo 7 se aprecian los porcentajes de remoción de almidón, el incremento de azúcares reductores y el pH final de los experimentos, como resultado del tratamiento enzimático en el jugo mezclado. Donde se observa que la remoción de almidón varía entre un 0,40 y 54,26 %. Esto era de esperar, por la gran cantidad de impurezas presentes, provenientes de la materia extraña que entra al proceso. Otro factor influyente es el pH del jugo, pues afecta la actividad de la enzima. En estudios realizados por González (2018), se determina que la enzima presenta una efectividad de hidrólisis de aproximadamente 80 y 90 % para pH de 4,6 a 5,4 y de 5,8 a 7,4 respectivamente, entrando el pH del jugo en los rangos anteriores. Por otra parte la temperatura del jugo está entre 30 y 35 °C, valores que no favorecen la actividad catalítica de la enzima para desdoblar el almidón.

3.3.1 Pruebas de Normalidad

En el anexo 8, se muestran los resultados de la realización de las pruebas de normalidad a las variables de respuesta por experimento, obteniéndose en todos los casos una distribución normal.

3.4 Influencia de la dosis de enzima y el tiempo de contacto en las variables respuesta

Se analiza la influencia del proceso de hidrólisis enzimática en los porcentajes de remoción de almidón, en el incremento de los reductores, y en la variación del pH, en función de la dosis de enzima aplicada y el tiempo de contacto. Para ellos se realizan los análisis de varianzas y pruebas de múltiples rangos correspondientes.

3.4.1 Porcentaje de Remoción de Almidón

Para determinar la influencia de los niveles de α -amilasa en el desdoblamiento de almidón y si existen diferencias significativas entre los mismos, se realizan los análisis de varianza y las pruebas de múltiples rangos que se muestran en el anexo 9b.

En los análisis de varianza del anexo 9b, se observan que los valores de probabilidad son inferiores a 0,05, por lo que existen diferencias significativas entre las medias de los

porcentajes de remoción de almidón a cada nivel de α -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. Lo que se reafirma con la realización de las pruebas de múltiples rangos correspondientes en el mismo anexo. Del análisis anterior se establece que los niveles de α -amilasa influyen en el desdoblamiento del almidón. Pues en un mismo tiempo de contacto, se puede observar un aumento significativo en la capacidad de la enzima de desdoblar el almidón.

La influencia del tiempo de contacto en el desdoblamiento del almidón, se determina mediante la realización de los análisis de varianza y las pruebas de múltiples rangos que se muestran en el anexo 9a.

En los análisis de varianza del anexo 8a, se observan que los valores de probabilidad son inferiores a 0,05, para dosis de 76 y 608 U/mL por lo que existen diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de remoción de almidón para cada tiempo de contacto. Mientras que para una dosis de 1143 U/mL ocurre lo contrario el tiempo de contacto no es significativo. Esto se reafirma con la realización de las pruebas de múltiples rangos en el mismo anexo

3.4.2 Azúcares Reductores

El efecto de los niveles de α -amilasa en el incremento de azúcares reductores, se verifica a partir del análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos que se muestran en el anexo 10.

En los análisis de varianza del anexo 10b, se observan que los valores de probabilidad son inferiores a 0,05, por lo que existen diferencias significativas entre los incrementos de reductores por dosis de α -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. Lo que se reafirma con la realización de las pruebas de múltiples rangos correspondientes en el mismo anexo. Del análisis anterior se establece que los niveles de α -amilasa influyen en el incremento de reductores, a medida que estos aumentan se reduce la formación de los mismos.

En el caso de la influencia del tiempo de contacto en el incremento de reductores, puede observarse que para dosis de 608 y 1143 U/mL la formación de reductores es nula. Mientras que para una dosis de 76 U/mL como se observa en el anexo 9a, el valor de probabilidad del análisis de varianza es inferior a 0,05, por lo que existen diferencias

significativas entre los reductores por tiempo de contacto, a medida que este aumenta se reduce la formación de los mismos.

3.4.3 pH

En el caso de la variación de pH por dosis de enzima y tiempo de contacto, se observa en los análisis de varianza del anexo 11, que los valores de probabilidad son inferiores a 0,05 en todos los casos, por lo que existen diferencias significativas en la variación de pH en ambos casos.

3.5 Análisis de los resultados del diseño experimental

Obtenidos los valores de las variables de respuesta del diseño de experimento, se procede a la obtención de los modelos matemáticos mediante el software *Statgraphics Centurion 16.2*. En el *software*, se obtienen el análisis de varianza ANOVA, el diagrama de Pareto y el modelo matemático correspondiente a cada variable, como se muestra en los anexos del 12 al 14.

Los resultados obtenidos por el *software* para la remoción de almidón se pueden apreciar en el anexo 12. Como se observa en el análisis de varianza, un efecto concentración de enzima tienen un valor de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95 %.

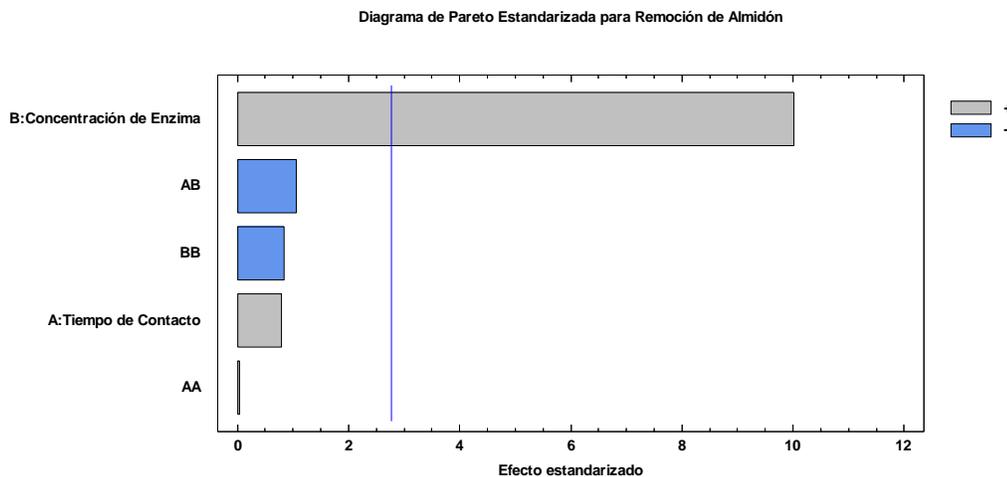


Figura 3.1. Diagrama de Pareto para remoción de almidón.

En el diagrama de Pareto (Figura 3.1), la línea vertical permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos. Se confirma que, la concentración de α -amilasa es la variable de mayor incidencia positiva sobre la respuesta, un incremento en el valor de esta variable conlleva a un aumento de la remoción del almidón pues se favorece la cantidad de sitios activos disponibles para la interacción enzima-sustrato.

En el anexo 13 se muestran los resultados obtenidos por el software para el incremento de reductores. Como se observa en el análisis de varianza, dos efectos la concentración de enzima y la misma al cuadrado, tienen un valor de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %. El efecto de los factores experimentales sobre la variable respuesta se refleja en el diagrama de Pareto de la figura 3.2. En este se aprecia que la mayor incidencia negativa sobre el incremento de los reductores lo tiene la concentración de enzima

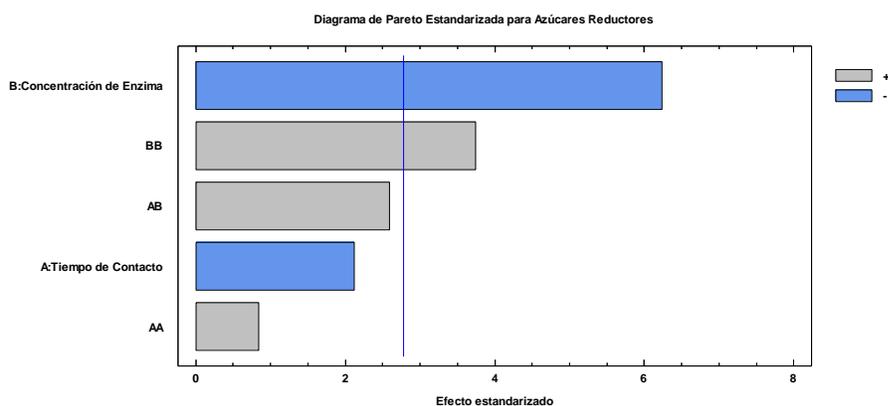


Figura 3.2: Diagrama de Pareto para incremento de reductores.

En el caso del pH, como se puede apreciar en el anexo 14, el análisis de varianza muestra que la concentración de enzima presenta un valor de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95 %. La influencia de positiva de la concentración de enzima sobre el pH se refleja en el diagrama de Pareto siguiente:

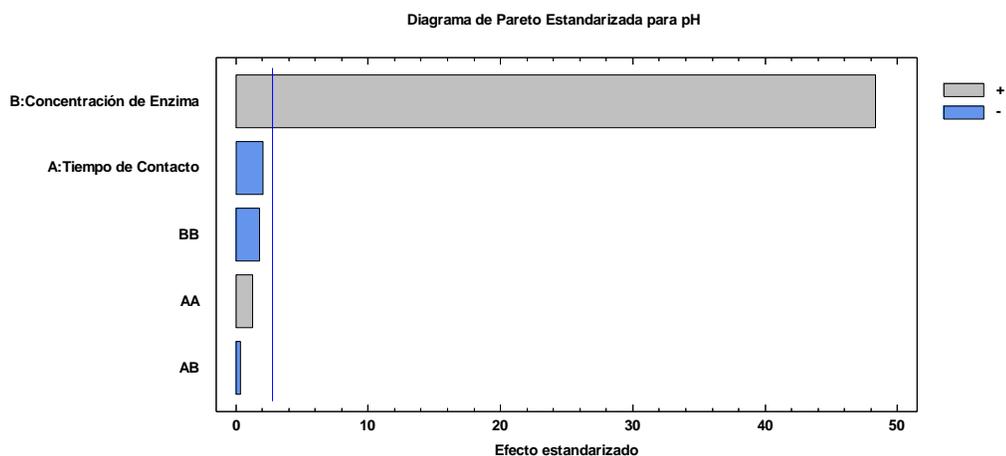


Figura 3.3: Diagrama de Pareto para el pH.

3.5.1 Análisis de la calidad de ajuste del modelo

Validación de los modelos matemáticos determinados para cada variable de respuesta, al tener en cuenta los criterios que se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Análisis de calidad de ajuste de los modelos matemáticos.

Parámetros para validar el modelo	Variables de Respuesta		
	% de remoción de Almidón (RA)	Incremento de Reductores (IR)	pH final
R^2 (%)	96.25	94.31	99.83
Estadístico Durbin-Watson (<i>P-value</i>)	2.77 (<i>P</i> =0.82)	2.097 (<i>P</i> =0.46)	2.65 (<i>P</i> =0.76)
F-Fischer (<i>P-value</i>)	0.0059	0.0134	0.0000

El estadígrafo R^2 indica en qué porcentaje los modelos, así ajustados, explican la variabilidad de las variables de respuesta, encontrándose en todos los casos por encima del 70 %, valor sugerido como mínimo para fines de optimización por Gutiérrez y de la Vara (2008).

Los valores de probabilidad correspondientes a la prueba de Durbin-Watson para todas las variables de respuesta son superiores a 0,05 para una confianza del 95 %, lo que permite inferir que los residuos no se encuentran correlacionados entre sí. Este análisis demuestra que todos los factores que inciden sobre la variable respuesta se encuentran controlados o son considerados en la modelación.

La prueba de Fisher de bondad de ajuste permite determinar la pérdida de ajuste por un estimador interno de la varianza del error experimental. El valor de probabilidad de los análisis de regresión múltiple en las variables de respuestas es inferior a 0,05 en todos los casos, por lo que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 95 %. Al no existir evidencias de pérdida de la calidad de ajuste de los modelos, no se debe modificar o remover ningún término de estos.

3.6 Determinación de la dosis de enzima a aplicar

A partir de datos históricos de la industria azucarera se evalúan los modelos en las condiciones que se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Influencia de las variables de respuesta a distintas dosis.

Concentración (%)	Tiempo (min)	RA (%)	IR ($\mu\text{mol/mL}$)	pH
0,01	45	15.21	2.51	4.86
0,03		21.38	1.25	5.05
0,05		27.12	0.32	5.22
0,07		32.42	0	5.39
0,09		37.29	0	5.55
0,11		41.73	0	5.71
0,13		45.74	0	5.86
0,15		49.31	0.50	6.01

Para la selección de la dosis de enzima a aplicar en el jugo mezclado, hay que tener en cuenta la influencia de la hidrólisis enzimática en el contenido de almidón, los reductores y el pH. En la tabla 3.4 se observa que a medida que aumenta la dosis de α -amilasa, hay un incremento en la remoción de almidón y en el pH. Mientras que la influencia del proceso de hidrólisis sobre la formación de reductores no es significativa. Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, la dosis de enzima a seleccionar sería 0,15 %, puesto que se logra una mayor remoción de almidón y se alcanza un pH de 6.01, evitándose que se provoque la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa (Rein, 2007).

Conclusiones

1. Mediante la realización de un estudio del proceso de hidrólisis con α -amilasa en el jugo mezclado del central Jesús Sablón Moreno, se demostró la efectividad de la aplicación de la enzima en dicha corriente.
2. La dosis de α -amilasa influye significativamente en el incremento de reductores, la variación del pH y en la remoción del contenido de almidón, mientras que con el tiempo de contacto ocurre lo contrario.
3. Los modelos matemáticos obtenidos para la remoción de almidón, el incremento de reductores y el pH demostraron ser válidos en el intervalo experimental.
4. Se determinó como dosis de enzima a aplicar 0,15 %.

Recomendaciones

1. Determinar el efecto que tiene la reducción de almidones en el rendimiento industrial y el consumo de vapor en tachos.
2. Analizar el efecto de la hidrólisis enzimática en el contenido de cenizas y el color del jugo.

Referencias Bibliográficas

- Alexander, J. B. 1954. Starch in Natal cane sugar. S. Afr. Sugar J. 54 (9): 617-623.
- Barros, F. S. (2012). Hidrólisis enzimática del almidón residual en extractos líquidos de camote, para elaboración de miel y estudio de sus propiedades funcionales. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador
- Bartens A. (1995). Energy Manual for sugar factories. 2^{da} Edición. Berlín
- BILIADERIS, C. G. *Structures and paste transitions of starch in food systems. Food Technology*, v. 46, n. 6, p. 98-109, 1992
- Bolaños, F. (2012). Medición de Almidón en el azúcar de Costa Rica. Costa Rica.
- BOYES B. (1960). *Starch in the manufacture of raw sugar*.
- Brumovsky, L. A. (2014). Química del almidón. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Cardona M. (2009). Seguimiento de las variables fisicoquímicas del clarificador y verificación de la eficiencia del tacho continuo fletcher smith para la optimización de la elaboración de azúcar en el ingenio Risaralda. Universidad tecnológica de Pereira. Escuela de tecnología química. Pereira.
- Carrazana Luis, L. (1975). El proceso de purificación de los jugos en la industria azucarera. Conferencia ATAC.
- Carrazana, L. (1987). Análisis Agro Industrial Azucarero Teoría y práctica, Editorial Pueblo y Educación.
- 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*, 6:33111, DOI: 10.1038/srep33111
- Chiu, C. y Solarek, D. (2009). *Modification of Starches. Akzo Nobel Surface Chemistry LLC Starch: Chemistry and Technology*, Third Edition. National Starch and Chemical Co., Bridgewater, New Jersey. ISBN: 978-0-12-746275-2.

Clark, J. A. 1975. Tecnología General de la Producción de Azúcar Crudo. Dpto. de Capacitación del MINAZ.

Cole, M.R., Eggleston, G., Gilbert, A. and Chung, Y.J. (2014) *Development of an Analytical Method to Measure Insoluble and Soluble Starch in Sugarcane and Sweet Sorghum Products. Food Chemistry (in Review).*

COPERSUCAR. 2004. Métodos de análisis emacucar, alcohol e procesos. Versao 03. [CD ROM]. Centrod Tecnología Copersucar, Estado de Sao Paulo, Brazil.

Cuddihy, J. A., Porro, M. E., and Rauh, J. S. (2001). *The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. J. Amer. Soc. of Sugar Cane Technol*, 21: 73-91

Castro N. (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. Published Online September 2014 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/jsbs>

Doherty, W; Rackemann, D. (2009). *Some aspects of calcium phosphate chemistry in sugar cane clarification. International Sugar Journal.* Disponible en <http://eprints.qut.edu.au/34335/1/c34335.pdf>. p 448-455.

Eggleston G., Wartelle, L., Triplett, A., Montes, B., Pontif, K., Cole M. and Cyr, E. St. (2015). *Insoluble and Soluble Starch: Changes Across Sugarcane Factories and How They Are Controlled by Amylase Applications. Southern Regional Research Center, New Orleans, LA.*

Eggleston, G., Antoine, A., Montes, B., Stewart, D., Kimbeng, C. y Zhou, M. (2008b). *Further optimization of α -amylase application in Louisiana factories.* ASSCT Louisiana Division meeting, Baton Rouge

Eggleston, G., Cole, M. and Andrzejewski, B. (2013). *New Commercially Viable Processing Technologies for the Production of Sugar Feedstocks from Sweet Sorghum (Sorghum bicolor L. Moench) for Manufacture of Biofuel and Bioproducts.* *Sugar Technology*, 15, 232-249. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-013-0229-6>

Eggleston, G., Grisham, M., Tew, T., Triche, R. y Antoine, A. (2008). *Delivery and processing quality of trash tissues by different sugarcane varieties*. *International Sugar Journal*

Eggleston, G., Monge, A. y Ogier, B. (2003). *Sugarcane factory performance of cold, intermediate, and hot lime clarification systems*. *Journal Food Process and Preservation*, 26(6), p. 433-454

Eggleston, G., Montes, B., Monge, A. y Guidry, D. (2006). *Optimization of α -amylase application in raw sugar manufacture*. Proc. Sug. Process. Res. Conf., Brazil, p. 319-340.

Eggleston, G., Viator, R. and Grisham, M. (2007). *Glyphosphateripener effects on the processing quality of different sugarcane tissues*. Proc. ISSCT Congress, South Africa, 26, p. 1460-1467

Godshall, M. A. (2004). *Collaborative study on starch in raw sugar using the SPRI rapid starch method*. Proc. SPRI Conference, Atlanta, Georgia, USA, p. 442-448

Godshall, M. A., Triche, R. and Moore, S. J. (2004). *A rapid starch test for use in cane mills*. En: Proc. SPRI Conference on Sugar Processing Research, Atlanta, Georgia, USA, pp. 428-440

Godshall, M. A.; M. A. Clarke and C. D. Dooley. (1990). *Starch: process problems and analytical developments*. En: Proc. SPRI Conference, San Francisco, CA, USA, pp. 244-264

Godshall, M.A., Clarke, M.A. and Dooley, C.D. (1991). *Starch: process problems and analytical developments*. Proceedings of the Sugar Processing Research Conference: 244 – 264

González, L. (2018). Estudio de las propiedades estructurales y funcionales de la enzima α -amilasa en el proceso de desdoblamiento de almidón para su aplicación industrial (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.

Greenwood, J; Rainey, T; Doherty, W. 2011. *Light scattering study on the size and structure of calcium phosphate/hydroxyapatite flocs formed in sugar solutions*. *Revista*

Colloid and Interface Science. Disponible en <http://eprints.qut.edu.au/14792/1/14792.pdf>. Consultado 23/4/2014. p66-71.

Herrera, Ana C. (2011). Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el ingenio Pichichí S.A. Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías.

Homaei, A., y Saberi, D. (2015). Immobilization of α -amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. *Process Biochemistry*, 50, 1394-1399.

Honing, Peter. (1987). Principios de la Tecnología Azucarera. Editorial Pueblo y Educación, La Habana

Hugot, E. (1986). *Handbook of cane sugar engineering.* Elsevier Science Publishers: New York.

Hugot, E. (1987). Manual para Ingenieros Azucareros. Tercera reimpresión. Editorial Edición Revolucionaria.

ICUMSA (2005). *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). Method book.* Bartens, Berlín, Germany.

Instrucción no. 07/2014. Penalización y bonificación por los polisacaridos en azúcar crudo.

ICUMSA. (2007). *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. Method book.* Ed. Bartens, Berlin, Germany

Jenkins, G. 1971. Introducción a la Tecnología del Azúcar de Caña. Ediciones de Ciencia y Técnica. La Habana.

Jimenez, A., Luis., Lugo, R., Ramírez., Gómez. (2016). Influencia del almidón y tecnologías de control en el proceso de producción de azúcar crudo y refino. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas.

Jimenez, A. (2014). Desarrollo de un modelo matemático para el pronóstico del funcionamiento de un generador de vapor de un solo paso. Trabajo de diploma en opción del título: Ingeniero Químico. Cuba.

Jiménez, A., Lugo, R., Ramírez, H., Gómez, L., y Orozco, L. (2016). Influencia del almidón y tecnologías de control en el proceso de producción de azúcar crudo y refino (Monografía). Universidad de Matanzas, Cuba

Jiménez, 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.

Kampen, W.H., Tan, Q. and Cuddihy, J.A. Jr (1998). *The action of alphaamylase on sugar cane starch. American Society of Sugar Cane Technologists.* June 17 to 19, St. Petersburg, Florida.

Keenan Joseph H .1988.*Steam Tables.*Edición Revolucionaria. La Habana.

Kern, DQ. (1991). "Procesos de Transferencia de Calor". Continental S.A.

Knutzon and Grove M., (1994). *Rapid method for estimation of amylose in maize starches. Cereal Chemistry, 71(5), p.469.*

Kumar, A.J., Partha, B., Pradeep, D.M., y Sangeeta, R. (2016). Thermostables amylase production from hot spring isolate *Exiguobacterium* sp: A promising for natural detergents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy, 3, p. 59-68.*

Kumar, A. P., Rani, R. S., y Pandey, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the industry. *Current Opinion in Food Science, 7, p. 64- 72.*

Larrahondo, J. E. (1995). Calidad de la caña de azúcar. En CENICAÑA: El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali. p. 337-354.

Larrahondo, J. E. (2013). Definición y alcances de la alcoquímica: la calidad de las materias primas y su impacto en el proceso alcoquímico. III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador.

MACU (Manual de métodos analíticos para azúcar crudo). (2004). Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. División de Aseguramiento de la Calidad.

Manual de Operaciones. (2013). Grupo Azucarero AZCUBA.

Hernández M., Torruco J., CHEL L., BETANCUR D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(3): 718-726.

Matic, M. (1971). *Starch determination in raw sugar by colorimetric methods*. En: Proc. ISSCT Congress, 14, New Orleans, Louisiana, USA: p 1434-1443.

Mendez S. (2014). Evaluación de floculantes en la clarificación de jugos de caña de la Unidad Empresarial de Base Jesús Rabí. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Facultad de Ingenierías. Cuba

Li M., Cole M., Tonnis B., Pinnow D., Xin Z., Davis J., Hung Y., Yu J., Pederson G., Eggleston G. (2014). *Comparison of Stem Damage and Carbohydrate Composition in the Stem Juice between Sugarcane and Sweet Sorghum*. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Monteiro, P. y Oliveira, P. (2010). *Application of microbial alfa-amylase in industry- A review*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: p. 850-861. ISSN 1517-8382

Morales, Y. L; Kafarov, V; Ruiz, F; Castillo, E. F. (2010). Modelamiento de los procesos de producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de caña de azúcar. Etapas; preparación, molienda y clarificación. *Umbral Científico*, núm. 16, junio, 2010, pp. 47-59. Universidad Manuela Beltrán, Bogotá, Colombia.

NC 85: 2011. Norma Cubana. Azúcar crudo –especificaciones. Oficina nacional de normalización.

Pavlov, K.(1981). Problemas y ejemplos para el curso de operaciones básicas y aparatos en Tecnología Química .Moscú: Editorial MIR.

Pedrosa Puertas, R.1983. Fabricación de Azúcar Crudo.

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

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). Escuela de Ingeniería Química: Universidad de San Carlos de Guatemala.

Pérez, Héctor. (2009). El análisis de procesos y el empleo adecuado de la energía en la producción de azúcar crudo y electricidad en ingenios cubanos. Editorial Universitaria, Ciudad de La Habana, Cuba

Posada, E. D. (1987). Tecnología de la Producción Azucarera. ISPJAE. La Habana, Cuba.

Rein, P. (2007). *Cane Sugar Engineering*. Ed. Bartens, Berlin, Germany

Rohde, A. (2006). *Sugazym – dextranasa y amylasa en la industria azucarera*. Published by agrimedia Gmb.

Rosero, E. y Ramírez, J. (2009). Modelado y Control de Molinos de Caña de Azúcar usando Accionamientos Eléctricos. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial*. [on line]. Vol. 6, Núm. 3, Julio 2009, pp. 44-53. Disponible en: <http://www.elsevier.es>

Sargent, R. G. (2009). *Verification and validation of simulation models*. En: *Proceedings of the 2009 Winter Simulation Conference*. Syracuse, Estados Unidos.

Schlesinger, S. (1979). *Terminology for model credibility*. *Simulation*, 32: 103-104

Svarovsky, L. 2011. *Solid-Liquid Separation*. Cuarta Edición. Londres: Editorial Elsevier.

Tester, R.F., Karkalas, Qi, X. (2004). *Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship*. *World's Poultry Science Journal* 60: 186-195.

Tejerina, M. (2021) Impacto económico y consecuencias en la calidad del azúcar por la presencia de Microorganismos y Almidón Impacto económico y consecuencias en la calidad del azúcar por la presencia de Microorganismos y Almidón

Ramírez, R. (2012). Universidad nacional abierta y a distancia (UNAD). Escuela de ciencias básicas tecnología e ingeniería. Programa de ingeniería de alimentos. Duitama.

Van der Poel, P. W.; Schiweck, H.; Schwartz, T. (1998). *Sugar Technology beet and cane manufacture*. Published with support of the beet sugar development foundation, Denver, USA

Wang, I. Z.; White, p. J. *Structure and properties of amylose, amylopectin and intermediate materials of oat starches*. *Cereal Chemistry*, v. 71, n. 5, p. 263-268, 1994b.

Zhou, M., Kimbeng, C. A., Eggleston, Viator, R.P., Hale, R.P., and Gravois K.A. (2008). *Issues of starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content in sugarcane. SUGAR CANE INTERNATIONAL, VOL. 26, NO.3.*

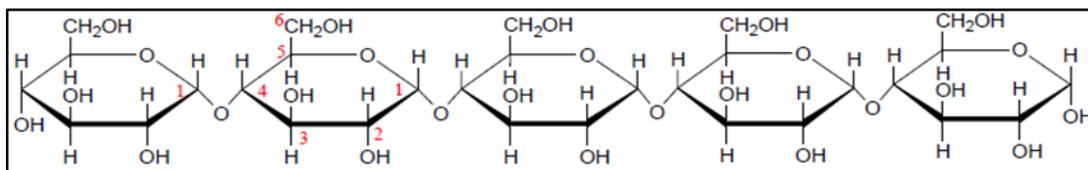
Zossi, B. S., Cárdenas J. G., Sorol, N. y Sastre, M. (2010). Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán (R. Argentina) Parte 1: caña limpia y despuntada. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 87 (1): p.15-27. ISSN 0370-5404.

Zossi, B. S., Cárdenas, G., Sorol Natalia y Sastre, M. (2011). Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán. R. Argentina: caña verde y quemada. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, Tomo 88 (1):13-21

Zossi, B. S., Navarro M. E., Sorol, N., Sastre, M. y Ruiz, R. M. (2008). Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 85 (2). ISSN 1851-3018.

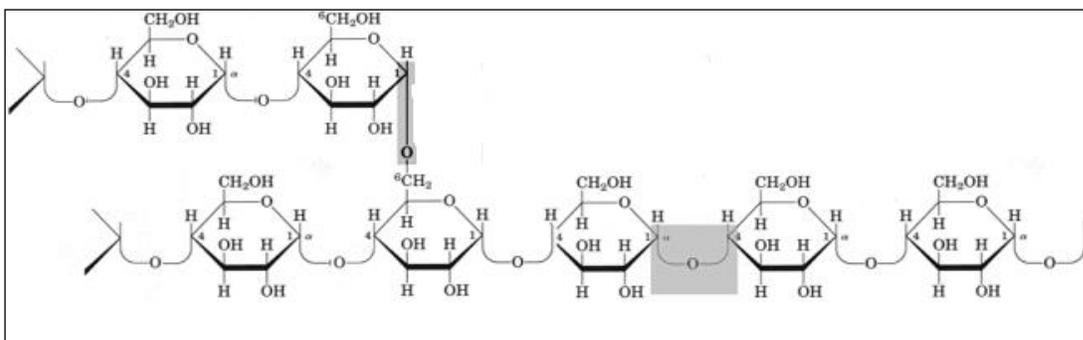
Anexos

Anexo 1. Estructura de la amilosa.



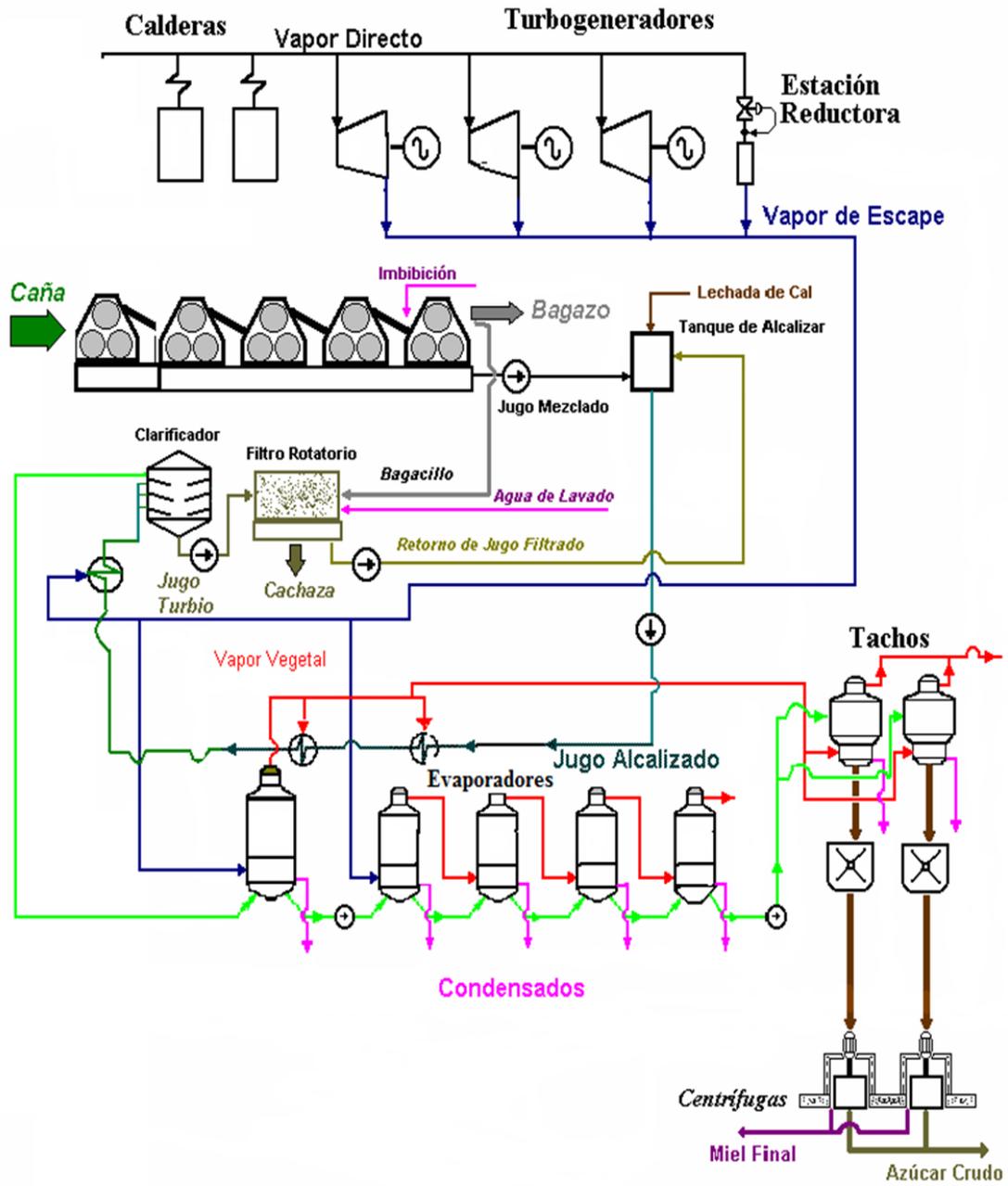
Fuente: Brumosky (2014).

Anexo 2. Estructura de la amilopectina.



Fuente: Brumovsky (2014).

Anexo 3. Diagrama de flujo del proceso de producción de azúcar crudo.



Anexo 4 Datos para la curva de calibración del almidón

Corridas	Alícuotas de la solución de referencia de almidón (0,8 g/L) (mL)	Concentración de almidón (mg/mL)
1	0	0.00
2	0.25	0.20
3	0.50	0.40
4	0.75	0.60
5	1.00	0.80
6	2.00	1.60
7	3.00	2.40
8	4.00	3.20
9	5.00	4.00

Anexo 5. Condiciones de diseño experimental.

Corridas Experimentales	Dosis de enzima			Tiempo de contacto(min)
1	0,08 %	0,8 mg/mL	608 U/mL	45
2	0,01 %	0,1 mg/mL	76 U/mL	45
3	0,15 %	1,5 mg/mL	1143 U/mL	15
4	0,15 %	1,5 mg/mL	1143 U/mL	30
5	0,01 %	0,1 mg/mL	76 U/mL	15
6	0,01 %	0,1 mg/mL	76 U/mL	30
7	0,08 %	0,8 mg/mL	608 U/mL	30
8	0,08 %	0,8 mg/mL	608 U/mL	15
9	0,15 %	1,5 mg/mL	1143 U/mL	45
10	0,08 %	0,8 mg/mL	608 U/mL	30

Anexo 6. Resultados de las variables de para el diseño de experimento para jugo mezclado

Experimentos	Absorbancia (600 nm) posterior al tratamiento enzimático						Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación (%)
1	0.163	0.169	0.168	0.167	0.17	0.165	0.17	0.0042	2.5558
2	0.215	0.21	0.208	0.212	0.204	0.21	0.21	0.0035	1.6638
3	0.092	0.1	0.092	0.099	0.097	0.095	0.10	0.0057	5.8926
4	0.086	0.098	0.099	0.097	0.099	0.098	0.09	0.0085	9.2231
5	0.235	0.25	0.25	0.249	0.249	0.25	0.24	0.0106	4.3739
6	0.21	0.216	0.212	0.213	0.215	0.214	0.21	0.0042	1.9919
7	0.178	0.179	0.16	0.176	0.178	0.179	0.17	0.0092	5.3289
8	0.161	0.151	0.158	0.159	0.158	0.16	0.15	0.0092	5.9498
9	0.089	0.096	0.095	0.094	0.093	0.096	0.09	0.0049	5.3511
10	0.166	0.179	0.178	0.178	0.179	0.177	0.17	0.0092	5.3289
Ex.	pH final						Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación (%)
1	5.47	5.51	5.44	5.48	5.51	5.51	5.49	0.0283	0.5152
2	4.84	4.86	4.85	4.83	4.85	4.87	4.85	0.0141	0.2916
3	6.14	6.04	6	6.17	6.12	6.01	6.09	0.0707	1.1611
4	6.01	5.99	6	5.98	5.98	6.01	6.00	0.0141	0.2357
5	4.95	4.88	4.9	4.93	4.87	4.83	4.92	0.0495	1.0071
6	4.83	4.87	4.82	4.85	4.88	4.81	4.85	0.0283	0.5832
7	5.43	5.52	5.38	5.55	5.45	5.51	5.48	0.0636	1.1624
8	5.39	5.56	5.6	5.37	5.3	5.53	5.48	0.1202	2.1956

9	5.97	6.02	5.94	6.06	5.98	6	6.00	0.0424	0.7071
10	5.43	5.52	5.42	5.59	5.49	5.48	5.48	0.0636	1.1624
Experimentos	Contenido de reductores ($\mu\text{mol/ml}$)						Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación (%)
1	30.2	31.1	29.9	31.2	31.8	30.3	30.75	0.7287	2.3697
2	50.1	52.3	51.3	46.3	47.0	47.4	49.07	2.4985	5.0921
3	24.0	23.5	23.5	25.4	25.3	24.7	24.40	0.8579	3.5160
4	26.0	26.8	25.4	25.1	25.7	25.4	25.73	0.6055	2.3531
5	53.2	53.2	51.6	52.6	54.0	54.9	53.25	1.1345	2.1304
6	46.8	47.4	47.1	52.2	52.5	51.6	49.60	2.7604	5.5654
7	31.4	31.2	30.2	30.0	30.5	29.3	30.43	0.7815	2.5677
8	30.5	30.9	30.9	32.1	31.8	31.4	31.27	0.6088	1.9472
9	26.6	27.5	26.5	26.5	26.6	26.6	26.72	0.3869	1.4480
10	31.4	31.2	30.2	30.0	30.5	29.3	30.43	0.7815	2.5677

Anexo 7. Resultados experimentales para remoción de almidón (a), incremento de reductores (b) y pH (c) en jugo mezclado

a)

Experimentos	A (600 nm) de la corriente sin tratamiento enzimático	% de remoción de almidón						Media
1	0.250	34.80	32.40	32.80	33.20	32.00	34.00	33.46693387
2	0.251	14.34	16.33	17.13	15.54	18.45	16.33	15.16966068
3	0.188	51.06	46.81	51.06	47.34	48.40	49.47	48.93617021
4	0.188	54.26	47.87	47.34	48.40	47.34	47.87	51.06382979
5	0.251	6.37	0.40	0.40	0.80	0.80	0.40	3.193612774
6	0.251	16.33	13.94	15.54	15.14	14.34	14.74	14.97005988
7	0.250	28.80	28.40	36.00	29.60	28.80	28.40	30.86172345
8	0.250	35.60	39.60	36.80	36.40	36.80	36.00	38.0761523
9	0.188	52.66	48.94	49.47	50.00	50.53	48.94	50.79787234
10	0.250	33.60	28.40	28.80	28.80	28.40	29.20	30.86172345

b)

Experimentos	Contenido inicial de azúcares reductores ($\mu\text{mol/mL}$)	Incremento de contenido de reductores ($\mu\text{mol/mL}$)						Media
1	39.11686	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
2	46.5507	3.87	6.10	5.65	1.34	0.00	0.00	2.527505

3	43.32937	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
4	43.32937	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
5	46.5507	6.99	6.99	5.95	7.73	5.35	7.29	6.715234
6	46.5507	0.59	1.19	1.49	7.29	3.87	4.01	3.072653
7	39.11686	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
8	39.11686	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
9	43.32937	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
10	39.11686	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0

c)

Experimentos	pH Inicial	Variación de pH					
1	5.47	0	0.04	-0.03	0.01	0.04	0.04
2	5.76	-0.92	-0.9	-0.91	-0.93	-0.91	-0.89
3	5.03	1.11	1.01	0.97	1.14	1.09	0.98
4	6.01	0	-0.02	-0.01	-0.03	-0.03	0
5	4.76	0.19	0.12	0.14	0.17	0.11	0.07
6	4.76	0.07	0.11	0.06	0.09	0.12	0.05

7	4.92	0.51	0.6	0.46	0.63	0.53	0.59
8	4.92	0.47	0.64	0.68	0.45	0.38	0.61
9	5.03	0.94	0.99	0.91	1.03	0.95	0.97
10	4.92	0.51	0.6	0.5	0.67	0.57	0.56

Anexo 8. Pruebas de normalidad a los porcentajes de remoción (a), incremento de reductores (b) y la variación de pH (c) para cada experimento.

a)

Experimentos para remoción de almidón	Skewness	Kurtosis	<i>P- value</i>
1	0.60906	-0.324394	0.996256
2	0.109249	0.263965	0.9937
3	0.0559788	-1.01345	0.96808
4	-1.85238	0.407703	0.295142
5	0.493462	-1.22634	0.169493
6	0.451731	-0.162839	0.999993
7	0.811441	-0.514403	0.332674
8	1.85567	1.98316	0.454445
9	1.49818	1.15364	0.953616
10	1.26982	0.765571	0.832651

b)

Experimentos para incremento de reductores	Skewness	Kurtosis	<i>P- value</i>
2	0.147081	-1.23032	0.962174
5	-0.737649	-0.331562	0.705041
6	0.954389	0.172141	0.892267

c)

Experimentos para variación de pH	Skewness	Kurtosis	<i>P- value</i>
-----------------------------------	----------	----------	-----------------

1	-0.863901	-0.199987	0.687883
2	0	-0.15	0.996255
3	0.0711815	-1.23004	0.954485
4	0	-1.14958	0.976374
5	-0.1397	-0.258482	0.9999
6	0.223591	-0.931844	0.988136
7	-0.348319	-0.617898	0.941408
8	-0.121476	-1.08188	0.925737
9	0.430282	0.056	0.999796
10	0.69615	0.130389	0.998233

Anexo 9. Porcentajes de remoción de almidón en función de los niveles de enzima (a), y en función del tiempo de contacto (b).

Anexo 9a

Análisis de varianza dosis 76

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	806.438	2	403.219	144.89	0.0000
Intra grupos	41.7442	15	2.78294		
Total (Corr.)	848.183	17			

Múltiples rangos dosis 76

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,1 15	6	1.52833	X
0,1 30	6	15.005	X
0,1 45	6	16.3533	X

Análisis de varianza dosis 608

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	141.671	2	70.8356	17.81	0.0001
Intra grupos	59.6533	15	3.97689		
Total (Corr.)	201.324	17			

Múltiples rangos dosis 608

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
--	--------------	--------------	--------------------------

0,8 30	6	30.0	X
0,8 45	6	33.2	X
0,8 15	6	36.8667	X

Análisis de varianza dosis 1143

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.42973	2	2.71487	0.65	0.5349
Intra grupos	62.4041	15	4.16027		
Total (Corr.)	67.8338	17			

Múltiples rangos dosis 1143

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1,5 30	6	48.8467	X
1,5 15	6	49.0233	X
1,5 45	6	50.09	X

Anexo 9b

Análisis de varianza tiempo 15

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7304.71	2	3652.36	996.24	0.0000
Intra grupos	54.992	15	3.66613		
Total (Corr.)	7359.71	17			

Múltiples rangos tiempo 15

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
15 0,1 Alm	6	1.52833	X
15 0,8 Alm	6	36.8667	X
15 1,5 Alm	6	49.0233	X

Análisis de varianza tiempo 30

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3458.67	2	1729.34	432.68	0.0000
Intra grupos	59.9516	15	3.99677		
Total (Corr.)	3518.62	17			

Múltiples rangos tiempo 30

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30 0,1 Alm	6	15.005	X
30 0,8 Alm	6	29.5333	X
30 1,5 Alm	6	48.8467	X

Análisis de varianza tiempo 45

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3414.49	2	1707.24	1024.70	0.0000
Intra grupos	24.9913	15	1.66609		
Total (Corr.)	3439.48	17			

Múltiples rangos tiempo 45

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
45 0,1 Alm	6	16.3533	X
45 0,8 Alm	6	33.2	X
45 1,5 Alm	6	50.09	X

Anexo 10. Incremento de reductores en función de los niveles de enzima (a), y en función del tiempo de contacto (b).

Anexo 10a

Análisis de varianza dosis 76

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	56.9336	2	28.4668	5.81	0.0135
Intra grupos	73.4384	15	4.89589		
Total (Corr.)	130.372	17			

Múltiples rangos dosis 76

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,1 45	6	2.82667	X
0,1 30	6	3.07333	X
0,1 15	6	6.71667	X

Anexo 9 b

Análisis de varianza tiempo 15

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	180.454	2	90.2272	341.72	0.0000

Intra grupos	3.96053	15	0.264036		
Total (Corr.)	184.415	17			

Múltiples rangos tiempo 15

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
15 0,8	6	0	X
15 1,5	6	0	X
15 0,1	6	6.71667	X

Análisis de varianza tiempo 30

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	37.7815	2	18.8908	8.99	0.0027
Intra grupos	31.5131	15	2.10088		
Total (Corr.)	69.2946	17			

Múltiples rangos tiempo 30

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
30 0,8	6	0	X
30 1,5	6	0	X
30 0,1	6	3.07333	X

Análisis de varianza tiempo 45

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

Entre grupos	31.9602	2	15.9801	6.31	0.0102
Intra grupos	37.9647	15	2.53098		
Total (Corr.)	69.9249	17			

Múltiples rangos tiempo 45

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
45 0,8	6	0	X
45 1,5	6	0	X
45 0,1	6	2.82667	X

Anexo 11 PH en función de los niveles de enzima (a), y en función del tiempo de contacto (b).

Análisis de varianza dosis 76

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.15551	2	2.07776	2184.56	0.0000
Intra grupos	0.0142667	15	0.000951111		
Total (Corr.)	4.16978	17			

Múltiples rangos dosis 76

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,1 45	6	-0.91	X
0,1 30	6	0.0833333	X
0,1 15	6	0.133333	X

Análisis de varianza dosis 608

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.12074	2	0.560372	85.99	0.0000
Intra grupos	0.09775	15	0.00651667		
Total (Corr.)	1.21849	17			

Múltiples rangos dosis 608

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,8 45	6	0.0166667	X
0,8 15	6	0.538333	X
0,8 30	6	0.553333	X

Análisis de varianza dosis 1143

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.2037	2	2.10185	878.21	0.0000
Intra grupos	0.0359	15	0.00239333		
Total (Corr.)	4.2396	17			

Múltiples rangos dosis 1143

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1,5 30	6	-0.015	X
1,5 45	6	0.965	X
1,5 15	6	1.05	X

Análisis de varianza tiempo 15

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.53221	2	1.26611	174.85	0.0000
Intra grupos	0.108617	15	0.00724111		
Total (Corr.)	2.64083	17			

Múltiples rangos tiempo 15

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
15 0,1	6	0.133333	X
15 0,8	6	0.538333	X
15 1,5	6	1.05	X

Análisis de varianza tiempo 30

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.17034	2	0.585172	360.23	0.0000
Intra grupos	0.0243667	15	0.00162444		
Total (Corr.)	1.19471	17			

Múltiples rangos tiempo 30

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30 1,5	6	-0.015	X

30 0,1	6	0.0833333	X
30 0,8	6	0.568333	X

Análisis de varianza tiempo 45

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	10.5473	2	5.27367	5697.85	0.0000
Intra grupos	0.0138833	15	0.000925556		
Total (Corr.)	10.5612	17			

Múltiples rangos tiempo 45

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
45 0,1	6	-0.91	X
45 0,8	6	0.0166667	X
45 1,5	6	0.965	X

Anexo 12. Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para porcentaje de remoción de almidón.

Anexo 12a

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo de Contacto	14.1943	1	14.1943	0.62	0.4753
B:Concentración de Enzima	2299.65	1	2299.65	100.34	0.0006

AA	0.0274321	1	0.0274321	0.00	0.9741
AB	25.575	1	25.575	1.12	0.3504
BB	16.3385	1	16.3385	0.71	0.4460
Error total	91.67	4	22.9175		
Total (corr.)	2447.7	9			

Anexo 12b

Remoción de Almidón = $-0.990093 + 0.266279*A + 438.328*B + 0.000481902*A^2 - 2.40818*A*B - 540.035*B^2$

Anexo 13. Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para incremento de reductores.

Anexo 13a

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo de Contacto	2.92285	1	2.92285	4.49	0.1014
B:Concentración de Enzima	25.2782	1	25.2782	38.84	0.0034
AA	0.456861	1	0.456861	0.70	0.4493
AB	4.38427	1	4.38427	6.74	0.0603
BB	9.13667	1	9.13667	14.04	0.0200
Error total	2.60358	4	0.650894		

Total (corr.)	45.757	9			
---------------	--------	---	--	--	--

Anexo 13b

$$\text{Azúcares Reductores} = 10.268 - 0.244294*A - 123.849*B + 0.00196662*A^2 + 0.997078*A*B + 403.84*B^2$$

Anexo 14. Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para pH final.

Anexo 14A

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo de Contacto	0.00375	1	0.00375	4.37	0.1048
B:Concentración de Enzima	2.00682	1	2.00682	2338.04	0.0000
AA	0.00145833	1	0.00145833	1.70	0.2624
AB	0.0001	1	0.0001	0.12	0.7500
BB	0.00285833	1	0.00285833	3.33	0.1421
Error total	0.00343333	4	0.000858333		
Total (corr.)	2.01784	9			

Anexo 14b

$$\text{pH} = 4.9019 - 0.00795238*A + 9.54762*B + 0.000111111*A^2 - 0.0047619*A*B - 7.14286*B^2$$

