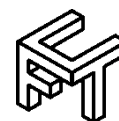




Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Técnicas



OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES QUE PERMITEN UNA MEJOR EFICIENCIA TÉCNICO- ECONÓMICA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE MAÍZ

Tesis Presentada como Requisito Parcial
para la Obtención del Título de
Máster en Ingeniería Asistida por Computadora

Autor: Ing. Jonathan Serrano Febles

Tutores: DrC. Jesús Luis Orozco

DrC. Héctor Luis Ramírez

Tutor consultante: DrC. Leissy Gómez Brizuela

Matanzas, 2020

A mi familia, especialmente
a mi madre por estar siempre ahí...
A Zaidiris y Lorena, que sin su sudor y desvelo
nada de esto fuera posible...

Pensamiento:

*Llegar juntos es el principio. Mantenerse juntos, es el progreso.
Trabajar juntos es el éxito*

Henry Ford

Nota de aceptación

Presidente del Tribunal

Firma

Miembro del Tribunal

Firma

Miembro del Tribunal

Firma

Miembro del Tribunal

Firma

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD Y NOTA LEGAL

Yo, Jonathan Serrano Febles, declaro que soy el único autor de la siguiente tesis, titulada Obtención de los parámetros operacionales que permiten una mejor eficiencia técnico-económica en la hidrólisis enzimática del almidón de maíz y, en virtud de tal, cedo el derecho de copia de la misma a la Universidad de Matanzas, bajo la licencia *Creative Commons* de tipo *Reconocimiento No Comercial Sin Obra Derivada*, con lo cual se permite su copia y distribución por cualquier medio siempre que mantenga el reconocimiento de sus autores, no haga uso comercial de la obra y no realice ninguna modificación de ella.

Matanzas, 10 de enero de 2020.

Jonathan Serrano Febles

Agradecimientos:

A mi madre, por ser lo más grande que tengo en el mundo. Por todo su apoyo incondicional, amor desmedido y mayor orgullo. A ti, que me das sentido a la vida y fuerzas para hacer todo, muchas gracias. Todo lo que he hecho fue pensando en ti.

A mi padre por ser mi mayor ejemplo, héroe y sostén. Gracias por todo tu sacrificio, por complacerme en cuantas cosas te he pedido y por seguirme la corriente en todas mis "locuras". No concibo mi vida y mis logros sin ti.

A mi hermana, por ser mi tesoro pequeño, por darme cada día más razones para estar orgulloso de ella. Te quiero inmensamente. Gracias por darme seguridad y confianza, por saber que en este mundo nunca estaré solo.

A mi novia, por ser la persona que ilumina todos mis días. La razón por la que lucho día a día, por ser mi mejor amiga, mi universo, el motivo de mi vivir y el pretexto para ser mejor persona. Mi ángel, te amo profundamente.

A mis abuelos, por ser la sustancia, la esencia, mi protección, mi paradigma. Por consagrar sus vidas fecundas a mi cuidado, por su cariño infinito y por inspirarme cada día. No paso un día sin sentirme orgullosos de ustedes

A mi otra familia: Mama, Amarilis, Alexander, Alex y Mima. Mil gracias por su ayuda, aceptación y consejos. Gracias por acogerme como a un hijo. Los quiero inmensamente.

Al profesor Orozco, que lo quiero como a un padre. Mil gracias por toda su ayuda, por su desmedido talento, amor, cariño. Mil gracias por todos los sacrificios que hace a diario para podernos atender, gracias por ser el motivo más fuerte por el que estoy en la universidad, gracias por iluminarme con toda su sapiencia, por ser el profesor más maravilloso que he tenido, por ser mi paradigma como ingeniero, por su pensamiento agudo, por la universalidad de su conocimiento y preparación, por su inmensa calidad humana e intelectual.

A mis queridos tutores Héctico y Leissy. Gracias por ser seres humanos excepcionales, excelentes profesionales, ángeles, por confiar en mí, por su honestidad, por perdonar mis torpezas en el laboratorio, por abrirme las puertas de sus vidas. Gracias por todos sus conocimientos, por enseñarme la importancia del trabajo en equipo, por todo y absolutamente todo. No tengo palabras para expresar lo inmensamente agradecidos que estoy con ustedes. Ustedes son de los que llegaron para quedarse por siempre, en mi vida

profesional y personal. Mis queridos profe, tutores, colegas, amigos, tíos, los adoro muchoooooo !!!

A Lisdeisy, por participar activamente en esta investigación, por ponerle mucho de su amor y talento a cada experimento. Gracias por hacer tuyos estos resultados también. Gracias y mil gracias, eres otra protagonista más de esto.

A Mayito, que es lo máximo. Gracias profe por ser como mi abuelo, por sus inmensos consejos, por confiar en mí, por su inteligencia, por su carisma, por su erudición. Gracias por su cercanía, por ser un amigo cabal. No tengo palabras para expresarle lo infinitamente agradecido que estoy con usted.

Al profesor Agustín. Mil gracias por todo su conocimiento y ocurrencia. Mil gracias por sacarme de todos mis apuros, por tener siempre la respuesta a cualquier pregunta. Gracias por ser absolutamente un genio. Usted ha marcado mucho mi vida. Gracias y mil gracias querido profe.

A la profesora Yamilé. Mil gracias por ser la persona por la que cogí esta carrera, por ser una magnífica profesional, por la inmensidad de su conocimiento, por confiar en mí, por enseñarme la importancia del sacrificio y la seriedad en las cosas. Querida profe mil gracias.

A la profesora Lourdes por ser una excelente profesional y compañera, magnífico ser humano, por ayudarme siempre en todo y por estar siempre pendiente de mí. Mil gracias por todo su talento, amor, genialidad e inteligencia, por ser una gran ingeniera. La quiero muchísimo!!!.

A Conrado Camacho. Por ser la persona de la chispa, por todo su talento y conocimiento, por tener siempre la respuesta precisa. Amigo te estoy eternamente agradecido por todo. Fuiste junto a Madyu, otro tutor más en esta investigación.

A la profesora Irina, por todos sus consejos y ayuda, por sus conocimientos estadísticos, por su calidad humana, por ser una excelente profesional. Muchas gracias profe.

A Yoney por ser mi profesor y amigo. Muchísimas gracias por tu ejemplo, toda tu ayuda a lo largo de mi vida académica, por todo tu carisma, conocimiento. Te debo mucho de lo que soy, mi socio.

A Yiliet, por ser mi amiga incondicional, mi hermana y confidente. Gracias por ayudarme a lo largo de toda mi vida, por labrar mi camino, por quererme como tu hermano. Te adoro mucho, mucho.

A Luisbel, que es mi hermano y "socio mafioso". Gracias por confiar en mí, por toda tu ayuda, por ser leal y las mil aventuras que hemos vivido juntos. Te quiero amigo.

A Sheila, por ser mi amiga de siempre, por sentirte bien cerca a pesar de estar tan lejos. Gracias mi vida.

A Julio, mi hermano. Mil gracias por tu sinceridad, por decirme siempre lo que piensas "sin filtros", por tu ayuda y por estar siempre al lado mío en cualquier circunstancia. Te debo mucho, amigo.

A Camelis, Roberto y Adielis. Por toda su ayuda, por ser de los amigos que aunque no vea siempre, se mantienen vivos en el corazón.

A todos los miembros del "team CETENZ" por su confianza, ayuda, consejos y por estar pendientes del transcurso de la investigación. Amigos siéntense partícipes de todos los logros de esta investigación.

A la empresa Gydema, especialmente a Bello, Poma y Rafael por todo el interés y apoyo mostrado. Por su hospitalidad cienfueguera, por su confianza y entusiasmo. Queridos colegas y amigos, nada de esto hubiese sido posible sin ustedes.

Resumen:

En la presente investigación se realiza un análisis de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz para la obtención industrial de jarabes de glucosa. A través de la caracterización enzimática se determina que las enzimas Bialfa-T (α -amilasa) y Glucozyme (glucoamilasa) presentan el potencial catalítico suficiente, y la tolerancia al pH y la temperatura necesaria para ser empleadas en el estudio del proceso hidrolítico. A partir de un diseño de experimentos de compuesto central fraccionado se obtiene un modelo de superficie que presenta buena calidad de ajuste, hecho que se demuestra fundamentalmente por la prueba de Fisher. El pH y el tiempo de licuefacción no ejercen influencia significativa sobre el equivalente de dextrosa, contrariamente a lo que sucede con las dosis de α -amilasa y glucoamilasa, la temperatura de licuefacción, el pH, el tiempo y la temperatura de sacarificación. Los mayores valores de equivalente de dextrosa se obtienen principalmente para un tiempo de sacarificación entre 28 y 39 horas, un intervalo de pH de sacarificación de 4,4 a 5,35, una temperatura de sacarificación de 51 a 62 °C y dosis de glucoamilasa de 0,95 a 1,35 mg de enzima/g de almidón hidrolizado. Se determinaron los parámetros de las variables operacionales que permiten un costo operacional mínimo mediante una optimización técnico-económica a través del algoritmo genético del *software* Matlab (2015), para lo cual se empleó como restricción el modelo de superficie respuesta. Los costos operacionales que más influyen en el proceso hidrolítico son: el asociado a mantener la temperatura constante en la sacarificación, la inactivación enzimática y la dosificación de las enzimas.

Palabras claves: sirope de glucosa, α -amilasa, glucoamilasa, hidrólisis enzimática, modelo de superficie respuesta, optimización técnico-económica

Abstract:

In present investigation an analysis of the enzymatic hydrolysis of corn starch for industrial production of glucose syrups is carried out. Through enzymatic characterization it is determined that the enzymes Bialfa-T (α -amylase) and Glucozyme (glucoamylase) have sufficient catalytic potential and the pH and temperature tolerance necessary to be used in the study of the hydrolytic process. From a design of experiments: Central Composite design: $2^{8-2} + star$, a response surface model is obtained that presents adequate goodness of fit, a fact that is demonstrated fundamentally by Fisher test. The pH and liquefaction time do not exert significant influence on the equivalent of dextrose, contrary to doses of α -amylase and glucoamylase, liquefaction temperature, pH, the time and the saccharification temperature. The highest equivalent dextrose values are obtained mainly for a saccharification time between 28 and 39 hours, a saccharification pH between 4,4 and 5,35, a saccharification temperature of 51 to 62 °C and glucoamylase doses of 0,95 to 1,35 mg enzyme / g hydrolyzed starch. The parameters of operational variables that allow a minimum operational cost were determined through a technical-economic optimization through the genetic algorithm of Matlab (2015), for which the response surface model was used as a restriction. The operational costs that most influence the hydrolytic process are the associated with maintaining constant temperature, enzymatic inactivation and the dosage of enzymes.

Keywords: glucose syrup, α -amylase, glucoamylase, enzymatic hydrolysis, response surface model, technical-economic optimization

Contenido

Introducción:	1
Capítulo 1: Análisis bibliográfico	4
1.1 Almidón. Composición, estructura y propiedades	4
1.2 Enzimas. Características y propiedades	6
1.2.1 Enzimas degradadoras del almidón	8
1.2.2 Enzima aminolítica α -amilasa	9
1.2.3 Enzima sacarificante glucoamilasa	12
1.3 Hidrólisis industrial de almidón	15
1.3.1 Hidrólisis enzimática	15
1.4 El jarabe de glucosa como producto final de la hidrólisis	19
Conclusiones parciales del capítulo:	23
Capítulo 2: Materiales y métodos	25
2.1 Descripción de la instalación	25
2.1.1 Descripción del proceso tecnológico	25
2.1.2 Hidrólisis enzimática	26
2.2 Caracterización de las enzimas hidrolíticas	28
2.2.1 Determinación de la actividad de la enzima	29
2.2.2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática	30
2.3 Modelación empírica de la hidrólisis enzimática	31
2.4. Caracterización de la suspensión de almidón	34
2.5 Desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del almidón	36
2.6 Caracterización de los hidrolizados	38
2.7 Optimización técnico-económica	40
2.7.1 Desarrollo de la función objetivo: costo de producción	41
2.7.2 Implementación de la optimización técnico-económica por algoritmos genéticos ..	49
Capítulo 3: Análisis de resultados	51
3.1 Caracterización enzimática	51
3.1.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática	51
3.3 Desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del almidón	56
3.4 Análisis de la modelación empírica de la hidrólisis enzimática	57
3.4.1 Análisis de la calidad de ajuste del modelo de superficie respuesta	60
3.4.2 Sensibilidad del modelo de superficie respuesta	62
3.4.3 Determinación de los parámetros operacionales que permiten obtener un máximo equivalente de dextrosa	65

3.5 Resultados de la optimización técnico-económica	66
Conclusiones parciales del capítulo:	70
Conclusiones:	71
Recomendaciones:	72
Bibliografía	73
Anexos:	80

Introducción:

Las enzimas tienen gran utilización en los procesos industriales, cuya demanda se incrementa considerablemente a la par de los avances de la biotecnología (Rathna, Nakkeeran, Varjani y Madhumitha, 2019). A tal punto son sus beneficios, que en los años recientes su aplicación industrial aumentó de manera explosiva (Wang *et al.*, 2018). Estas se usan en importantes sectores como el de la industria panadera, de bebidas, detergentes, de productos fermentados, farmacéutica, textil, del procesamiento de cuero, entre otros (Singh, Singhy Pandey, 2019). Se emplean en la manipulación de biopolímeros para mejorar su valor nutricional, alargar su tiempo de duración y sus características funcionales (Fallahi, Habte-Tsion y Rossi, 2018). Se controlan fácilmente por el pH y la temperatura, hecho que las convierten en herramientas muy útiles en el estudio de alimentos (Okafor, Ofoedu, Nwakaudu y Daramola, 2019).

No obstante, en la práctica se evidencian ciertas limitaciones que restringen su utilización, por ejemplo, la desnaturalización de las enzimas reduce su eficiencia e incrementan el costo operacional asociado a su empleo (Wang *et al.*, 2018). Es por ello que Läufer (2019) señala que se continúa en la búsqueda de enzimas con mejor actividad y estabilidad bajo determinadas condiciones de pH y temperatura.

Las enzimas son productos caros que se producen y comercializan por un pequeño grupo de países altamente desarrollados. Su utilización en muchos casos resulta imprescindible en procesos industriales para alcanzar la mayor eficiencia y calidad posible.

El mercado de enzimas industriales más grande es el relacionado con la fabricación de bebidas y alimentos, el que representa un 26 % del mercado global (Rathna *et al.*, 2019). Este se encuentra liderado principalmente por dos fuertes productores: *Novozymes* y *Dupont Enzymes* (Läufer, 2019). En Rathna *et al.*, 2019 se plantea que dado un informe del *Freedonia Group*, la demanda global de enzimas para el 2021 se espera que sea de 5 billones de dólares con un crecimiento anual de 4 %. También señala de acuerdo al *Global Market Insights*, que en el 2024 el comercio de enzimas de interés en la industria alimentaria podría ascender a 3,6 billones de dólares.

De gran importancia reviste entonces hacer un uso más racional de las enzimas que se emplean en la hidrólisis del almidón, si se considera que representan cerca del 30 % de la producción mundial de enzima (Elmarzugi *et al.*, 2014). Entre las enzimas que se utilizan para este fin se tienen a las amilasas (enzimas aminolíticas). Según Paludo *et al* (2018),

presentan gran interés también debido a que se producen por microorganismos no patogénicos y que se obtienen desde el medio extracelular.

Su uso es prácticamente imprescindible en la fabricación de jarabes de glucosa debido a las innumerables ventajas que presenta frente a la hidrólisis ácida. Entre los principales problemas que se mitigan mediante la aplicación de la alternativa enzimática se tienen: la corrosión, desarrollo del color y bajo rendimiento de glucosa.

Desde los últimos años se evidencia una tendencia al incremento de la producción de jarabes de glucosa. Según Agama-Acevedo, Flores-Silva y Bello-Perez (2019) de los 9,3 millones de toneladas de almidón y derivados que se consumieron en la Unión Europea, el 55 % era con fines edulcorantes.

El control del proceso de hidrólisis enzimática es sumamente complejo, cuya eficiencia depende directamente del grado de conversión del almidón a glucosa. Las enzimas son catalizadores que requieren de condiciones de trabajo particulares para expresar su máxima actividad catalítica; sin embargo, estas condiciones no necesariamente coinciden con las de mayor factibilidad tecnológica. Ello se debe a que son sumamente sensibles a cambios en las condiciones de trabajo, que pueden conllevar a su inactivación, frecuentemente irreversible (desnaturalización) bajo determinadas condiciones de pH y temperatura.

En Cuba solamente se cuenta con una planta productora de sirope de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz (de importación) perteneciente a la empresa GydeMa de Cienfuegos. Esta se inaugura en 1979 para producir 25 mil toneladas de sirope de glucosa por vía ácida; pero dada la necesidad de jarabes de alto equivalente de dextrosa y la demanda especial de una planta de sorbitol en Camagüey, se comienza desde 1996 la producción estable de este producto por vía enzimática. La producción de esta planta, fuertemente permeada por bajos rendimientos productivos, es incapaz de satisfacer la demanda nacional que supone la industria alimenticia y farmacéutica. Ello conlleva a la importación de cuantiosos volúmenes de este producto.

Cuba no está exenta de los altos precios de las enzimas, de los materiales auxiliares que se emplean en la refinación de los jarabes (por ejemplo: carbón activado y tierra infusoria) así como de las especificaciones precisas de un mercado altamente competitivo. Por ello, es imprescindible el desarrollo del proceso industrial bajo una adecuada eficiencia técnico-económica.

Por tales motivos, se formula el siguiente problema científico:

¿Cómo se garantiza una mejor eficiencia técnico-económica en el proceso industrial de hidrólisis enzimática del almidón de maíz?

Para dar solución a lo planteado si tiene la siguiente hipótesis:

Mediante la optimización técnico-económica de las principales variables operacionales se determinan los valores de los parámetros que garantizan una mayor eficiencia del proceso.

Se tiene como objetivo general en la investigación:

Obtener los parámetros operacionales que permiten una mejor eficiencia técnico-económica en la hidrólisis enzimática del almidón de maíz.

Se plantean como objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar las enzimas hidrolíticas que se emplean en el proceso.
- ✓ Obtener un modelo matemático que describa la hidrólisis enzimática del almidón de maíz.
- ✓ Determinar la influencia de las variables operacionales sobre el equivalente de dextrosa.
- ✓ Determinar la repercusión económica de los principales costos operacionales asociados al proceso hidrolítico.

Capítulo 1: Análisis bibliográfico

En el presente capítulo se realiza una búsqueda en la literatura científica de los principales aspectos teóricos de la hidrólisis enzimática del almidón. Se abordan tópicos básicos de gran importancia para la comprensión de la misma como son: las características de las reacciones enzimáticas y estructurales del almidón. A su vez, se realiza una revisión sobre el proceso a escala industrial y de sus principales variables de control y calidad. Estos elementos en su conjunto sientan las bases conceptuales para el desarrollo de la presente investigación.

1.1 Almidón. Composición, estructura y propiedades

La mayor fuente de interés industrial de almidón es el maíz, aunque se destacan otras como la papa, el trigo y el arroz, que se explotan también considerablemente (Carvalho y Fernandes, 2019). Es un polisacárido de reserva muy abundante y una de las fuentes de energía más importantes para la nutrición humana (Parashar y Satyanarayana, 2017; Villarroel, Gómez, Vera y Torres, 2018). Específicamente el maíz contiene entre un 75 a 80 % de almidón (Fox, 2018).

El origen botánico condiciona su morfología y organización cristalina, factores más importantes que determinan la velocidad y extensión de la hidrólisis de los gránulos de almidón (Li, 2018). Por ejemplo, el almidón de maíz céreo es más susceptible al ataque de las enzimas amilolíticas que el de papa (Lee y deMan, 2018).

Se almacena en forma de gránulos semicristalinos (Das y Kayastha, 2019; Gunaratne, 2018); generalmente esféricos en los tejidos de las plantas (Balakrishnan, Kumar y Sugathan, 2019). Es insoluble en agua fría (Lin *et al.*, 2018) y en alcohol (Balakrishnan *et al.*, 2019). El almidón se compone esencialmente por amilopectina y amilosa (Park, Na, Kim, Kang y Park, 2018; Villarroel *et al.*, 2018); dispuestas en forma de anillos cuya composición depende esencialmente de su origen botánico (Schmiele, Sampaio y Pedrosa, 2019). Generalmente, la amilosa representa entre un 20 y 25 % de su composición y la amilopectina entre un 75 y 80 % (Jain y Katyal, 2018; Suriya, Bharathiraja, Krishnan, Manivasagan y Kim, 2016)

El contenido de amilosa determina considerablemente sus propiedades reológicas, grado de gelificación y degradabilidad del almidón (Li, 2018). Se encuentra en la zona amorfa del gránulo (Agama-Acevedo *et al.*, 2019) aunque en pequeñas cantidades se localiza también en la región cristalina (Wong, 2018). Presenta gran capacidad para formar

complejos con lípidos debido a su estructura helicoidal (Schmiele *et al.*, 2019) y es muy viscosa en medios alcalinos (Balakrishnan *et al.*, 2019).

La amilosa es un polímero lineal mientras que la amilopectina es un polímero altamente ramificado (Miao, Jiang, Jin y BeMiller, 2018; Negi y Vibha, 2017) (anexo 1). Está compuesta de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos (Adeoyo, Pletschke y Dames, 2018; Aung, Shein, Aye y Nwe, 2018) aunque otros autores como Balakrishnan *et al* (2019) señalan que la amilosa presenta enlaces α -1,6 glucosídicos asociado a muy pocas ramificaciones (cerca del 1 %).

De acuerdo a Li, 2018 tiene entre 9 y 20 puntos de ramificación, que equivale a un número de cadenas por molécula entre 3 y 11; mientras que (Wong, 2018) señala que oscila entre 2 y 8 puntos de ramificación cada 4 a 100 unidades de glucosa. Las moléculas de amilosa presentan un grado de polimerización entre 324 y 4 920 (Li, 2018); tienen un extremo reductor y otro no reductor (Miao *et al.*, 2018; Okafor *et al.*, 2019). Su masa molecular se encuentra entre 105 y 106 Da (Schmiele *et al.*, 2019; Wong, 2018).

En cambio, la amilopectina se compone de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos, cuyas cadenas se entrelazan entre sí por enlaces α -1,6 glucosídicos (Das y Kayastha, 2019; Friedl, 2019) (anexo 1). Presenta ramificaciones cada 15 y 25 unidades de glucosa (Berski, Ziobro, Witczak y Gambuś, 2018), lo que representa aproximadamente el 5 % de la molécula (Okafor *et al.*, 2019; Wong, 2018).

Su grado de polimerización se encuentra de 9 500 a 16 000 y su masa molecular promedio entre 107 y 109 Da (Li, 2018; Wong, 2018). Presenta un extremo reductor y a diferencia de la amilosa, muchos extremos no reductores (Miao *et al.*, 2018; Okafor *et al.*, 2019). Según Balakrishnan *et al* (2019), sus cadenas lineales contienen entre 10 y 60 moléculas de glucosa, aunque Schmiele *et al* (2019) señala que poseen entre 18 y 25 unidades de glucosa.

La amilopectina es mucho más grande que la amilosa sin embargo comparado con ella, sus cadenas son relativamente más cortas con un perfil amplio de distribución (Schmiele *et al.*, 2019). En la literatura especializada existen diferentes criterios en cuanto a la cantidad de unidades de glucosa que contiene, por ejemplo: Miao *et al* (2018) plantea que posee como promedio 2 000 000 o más unidades, mientras que para Okafor *et al* (2019) contiene cerca de 100 000.

Según Wong, 2018 posee tres tipos de cadenas: las que solamente se conectan a otra cadena (A), las que se conectan a otra cadena y se encuentran también sustituidas por una o más cadenas (B) y las que solamente llevan el grupo reductor de la molécula (C) (anexo 1). En solución acuosa, la amilopectina es relativamente estable producto a que no puede formar agregados compactos por sus ramificaciones Balakrishnan *et al* (2019).

Las características que se mencionaron anteriormente de los gránulos de almidón como su forma, tamaño, composición, grado de polimerización, entre otras influyen sustancialmente sobre su funcionalidad y en la extensión de la hidrólisis.

1.2 Enzimas. Características y propiedades

Las enzimas son catalizadores biológicos mayormente de naturaleza proteica (Lee y deMan, 2018; Nelson y Cox, 2019). Estas pueden aumentar los índices de la reacción por factores de al menos 10^6 (Kennelly y Rodwell, 2013). Tal como sucede con los catalizadores químicos convencionales, no se consumen y permanecen inalteradas al finalizar la reacción química.

Según Kennelly y Rodwell (2013) se clasifican en seis grandes clases de acuerdo a las reacciones que catalizan:

- ✓ Oxirreductasas que catalizan reacciones de oxidación y reducción.
- ✓ Transferasas que catalizan reacciones de trasferencias de grupos, por ejemplo: glucosilo, metilo o fosforilo.
- ✓ Hidrolasas que catalizan la división hidrolítica de enlaces covalentes.
- ✓ Liasas que catalizan la división de enlaces covalentes mediante la eliminación de átomo dejando dobles enlaces.
- ✓ Isomerasas que catalizan cambios geométricos o estructurales de una molécula
- ✓ Ligasas que catalizan la unión de dos moléculas en reacciones acopladas a la hidrólisis de ATP.

La actividad catalítica de una enzima depende de la integridad de su conformación proteica, tanto de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Nelson y Cox, 2019). Resulta de gran importancia para evaluar la viabilidad industrial de su uso, la actividad enzimática (expresión de su potencia catalítica) y la estabilidad que presenta bajo las condiciones de experimentación.

Punekar (2018) y Whitehurt y Law (2002) definen la actividad enzimática como la cantidad de enzima expresada en términos de unidades (sin referir a la pureza) necesaria para catalizar la obtención de un micromole de producto por minuto a las condiciones de operación. Por otro lado, la actividad específica se determina como el cociente entre la actividad de la enzima y su contenido de proteína (Punekar, 2018). Estas dependen principalmente de la temperatura, pH, cantidad y tipo de sustrato (Okafor *et al.*, 2019).

En determinados casos, de acuerdo a la velocidad de reacción, las magnitudes de masa y tiempo de la actividad se pueden ofrecer en unidades superiores o inferiores a conveniencia. No obstante, se recomienda el uso del *katal* por parte de la Unión Internacional de Bioquímica (Punekar, 2018; Whitehurt y Law, 2002). Se tiene que 16, 67 nkatal equivale a un mole de producto por segundo o a una unidad de enzima (U).

La velocidad de reacción generalmente es proporcional a la concentración activa de enzima y depende del pH, temperatura, concentración de sustrato, inhibidores y cofactores (Kennelly y Rodwell, 2013; Lee y deMan, 2018; Nelson y Cox, 2019). En la figura 1.1 se ofrece el efecto de algunos de ellos sobre las reacciones enzimáticas:

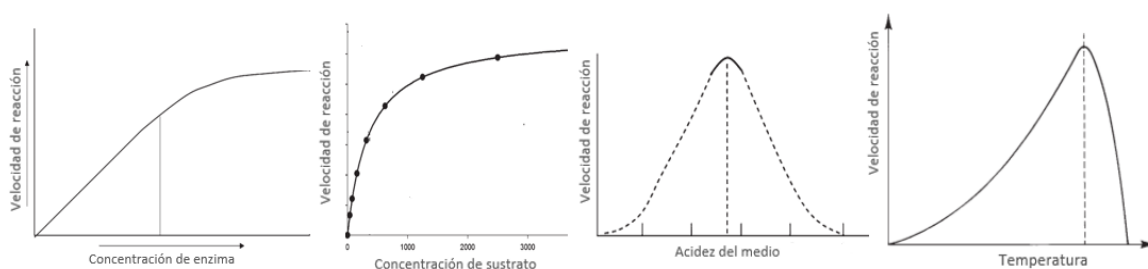


Figura 1.1: Efecto de algunos factores sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas [Fuente: Lee y deMan (2018)].

El comportamiento usual de las reacciones enzimáticas frente a la temperatura se divide en dos partes fundamentales. Primeramente, la velocidad de reacción aumenta hasta un máximo y luego a partir de ese máximo, la velocidad disminuye a medida que se incrementa la temperatura producto a su paulatina desnaturalización hasta un punto donde se verifica su inactivación (Lee y deMan, 2018).

La acidez del medio influye marcadamente sobre la actividad catalítica: valores excesivamente altos o bajos alteran la estructura de la enzima y conllevan en última instancia a su desnaturalización (Subin y Bhat, 2016).

Cuando se emplean pocas cantidades de enzima, su concentración es directamente proporcional a la velocidad de reacción porque el sustrato está en abundancia (Lee y deMan, 2018). En cambio, al aumentar la dosis, la relación con la velocidad de reacción deja de comportarse linealmente y empieza a presentar una tendencia asintótica porque la cantidad de sustrato es un factor limitante. Delimitar esta etapa resulta de gran importancia, ya que en ella un incremento en la dosis de enzima no ejerce ninguna variación en la velocidad de reacción de manera significativa.

Al contrario, para una misma cantidad de enzima, la velocidad inicial de reacción varía al aumentar la cantidad de sustrato (Subin y Bhat, 2016). Estos refieren que cuando la concentración de sustrato es baja en comparación con la cantidad de enzima disponible, la velocidad inicial se comporta de forma lineal porque la enzima no se encuentra saturada de este. Luego, a medida que se incrementa la cantidad de sustrato, la velocidad de reacción se vuelve cada vez menos susceptible a su concentración, hasta un punto en que permanece prácticamente inalterada con un valor máximo.

Existen algunos compuestos que dificultan el desarrollo de las reacciones enzimáticas porque bloquean el centro activo de enzima y disminuyen como consecuencia la velocidad de reacción. Los inhibidores que se asocian al centro activo e impiden su unión con el sustrato, se conocen como inhibidores competitivos (Subin y Bhat, 2016). En caso contrario, los que se asocian a otras partes de la enzima y que distorsionan su configuración, cuya acción no está directamente relacionada con el sitio activo se llaman inhibidores no competitivos (Grahame, Bryksa y Yada, 2015; Lee y deMan, 2018).

En ocasiones las enzimas requieren de ciertos compuestos, conocidos como cofactores, para desplegar su función catalizadora (Nelson y Cox, 2019). Ellos son de naturaleza no proteica y juegan un papel efectivo en la activación y estabilización de la enzima. De acuerdo a Kennelly y Rodwell (2013) se unen de manera transitoria y disociable a ella.

Resulta de gran interés conocer el comportamiento típico de la cinética de las reacciones enzimáticas, para la determinación de las condiciones de trabajo que permiten una adecuada conversión del sustrato y una mejor utilización de los recursos.

1.2.1 Enzimas degradadoras del almidón

Existen en la naturaleza una gran variedad de enzimas involucradas en la degradación de la amilosa y la amilopectina. Esencialmente estas enzimas se dividen en dos grandes grupos según su modo de acción: las exoenzimas y endoenzimas que hidrolizan los

enlaces α -1,4 y/o los α -1,6 glucosídicos en presencia de agua y las glucotransferasas (Okafor *et al.*, 2019). Es importante señalar que los términos endoenzima y exoenzima en otro contexto pueden hacer alusión al medio celular donde se obtienen (BeMiller, 2019).

Según BeMiller (2019) la glucanotransferasa es una enzima que origina anillos con enlaces α -1,4 glucosídicos en unidades de D-glucopiranososa a partir de la amilosa y amilopectina. Esta enzima puede formar compuestos de 6, 7 y 8 unidades a través de un proceso de ciclación. Entre otras enzimas de gran protagonismo en el proceso de hidrólisis se tienen a las de función desramificadora como la isoamilasa y pululanasa; que hidrolizan los enlaces α -1,6 glucosídicos del almidón ya sea de forma granular o gelatinizado.

No obstante, las amilasas son las enzimas que más se utilizan en la hidrólisis industrial del almidón; en cuya actividad son extremadamente eficientes (Pasin *et al.*, 2017). A su vez, son las más importantes del grupo glucohidrolasas (Lee y deMan, 2018).

La funcionalidad de las amilasas depende principalmente de su termoestabilidad, origen y de los productos que resultan de su actividad hidrolítica (Fallahi *et al.*, 2018). Una desventaja importante que presentan es su alta sensibilidad a condiciones oxidantes (Suriya *et al.*, 2016). Entre las principales amilasas se tienen a la β -amilasa, la α -amilasa y la glucoamilasa (Paludo *et al.*, 2018).

1.2.2 Enzima aminolítica α -amilasa

La α -amilasa se produce en plantas, animales y una amplia variedad de bacterias y hongos (Abdulaal, 2018). La que se utiliza en la hidrólisis enzimática del almidón proviene principalmente del *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus* (Läufer, 2019) aunque existen otras fuentes como *Bacillus amyloliquefaciens* y *P. furiosus* (Suriya *et al.*, 2016).

Revisten gran importancia en la hidrólisis industrial las termorresistentes producto a las altas temperaturas que se alcanzan (Binod, Papamichael, Varjani y Sindhu, 2019). Al respecto, Läufer (2019) señala que existen α -amilasas con alta eficiencia catalítica a temperaturas mayores a 80 °C e incluso superiores a 105 °C, pero por pequeños tiempos de exposición.

Las enzimas termorresistentes se obtienen por tres vías fundamentales: biosprospección de microorganismos extremófilos, ingeniería genética de organismos extremófilos y mesófilos y desde los últimos años por avances metagenómicos (Carvalho y Fernandes,

2019). Sus principales técnicas de obtención son la fermentación sumergida y fermentación en estado sólido.

La α -amilasa (nombre común) es una hidrolasa que se conoce también como α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa (nombre sistemático) y como EC 3.2.1.11 (Lee y deMan, 2018). Generalmente, el diámetro de sus moléculas se encuentra entre 5 y 10 nm y su masa molecular entre 25 y 75 kDa (Whitehurt y Law, 2002). Esto último concuerda con lo que plantea (Wong, 2018), cuando refiere que es del orden de los 50 kDa.

Es una endoenzima (BeMiller, 2019; Carvalho y Fernandes, 2019) porque cataliza la hidrólisis de los enlaces internos de las cadenas de almidón (Lee y deMan, 2018; Suriya *et al.*, 2016; Wong, 2018) de forma aleatoria (Hartel, von Elbe y Hofberger, 2018). En la figura 1.2 se muestra la estructura tridimensional de la α -amilasa:

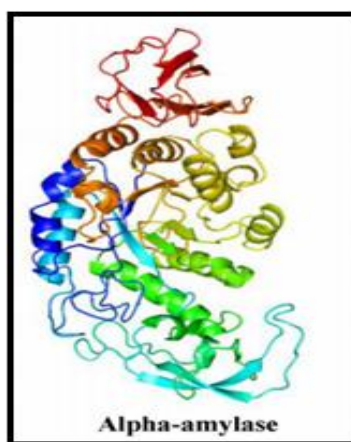


Figura 1.2: Conformación tridimensional de la α -amilasa [Fuente: Park *et al* (2018)].

Actúa sobre los enlaces α -1,4-glucosídicos de las cadenas de almidón (Friedl, 2019; Läufer, 2019) y es incapaz de hidrolizar los enlaces α -1,6 glucosídicos de la amilopectina (Hartel *et al.*, 2018; Okafor *et al.*, 2019) (anexo 2). En los puntos de ramificación realiza un desvío (en inglés: *by pass*), a diferencia de otras enzimas como la β -amilasa que detienen su ataque (Hartel *et al.*, 2018).

Según BeMiller (2019) típicamente el producto final de la hidrólisis está compuesto en primer lugar por carbohidratos entre 6 y 12 unidades de glucosa, luego por los que tienen 5 unidades; en mucho menor proporción a estos primeros, maltotriosa y posteriormente en cantidades bastante inferiores maltosas, tetrasas y glucosa. También refiere que los oligosacáridos que se obtienen pueden ser lineales o tener entre dos y tres puntos de ramificación.

Según Purich y Allison (2002) la α -amilasa requiere al menos tres unidades de glucosa en el sustrato para efectuar la hidrólisis (endoenzima); lo que explica los bajos rendimientos de glucosa que se obtienen. Todos estos criterios justifican la necesidad de otra enzima (exoenzima) en la degradación del almidón para incrementar el contenido de glucosa a partir de la conversión de los oligosacáridos lineales y dextrinas límites resultantes.

La α -amilasa necesita del ion calcio para incrementar su actividad y estabilidad (Paludo *et al.*, 2018; Whitehurst y Van Oort, 2010) aunque generalmente contiene un átomo-gramo por mole de proteína (Lee y deMan, 2018; Wong, 2018). Necesita como mínimo 50 ppm, no obstante, el que contiene el maíz es suficiente para garantizar su estabilidad (Läufer, 2019). La adición de este ion se debe realizar con mucho cuidado puesto que un exceso repercute en el pH y en el color, además tiene como inconveniente su posterior remoción por técnicas como la de intercambio iónico (Carvalho y Fernandes, 2019).

Los parámetros de trabajo de la α -amilasa están en dependencia de su fuente biológica (la que define sus características) y de los requerimientos que exige el proceso a escala industrial, los que en última instancia restringen su aplicación. Normalmente cuando se refiere a los valores óptimos de los parámetros de una enzima, se hace alusión a aquellos para los que se alcanza la máxima actividad catalítica; los que necesariamente no tienen que coincidir con los óptimos de operación en el proceso industrial. En estos últimos, hay involucrado en el análisis otros factores como son la viscosidad y reología de los fluidos, el ritmo productivo, costo operacional, calidad que se desea del producto, capacidad de producción y otros que se avalan ingenierilmente por estudios de factibilidad técnico-económicos.

En la literatura existen varios criterios sobre su intervalo de pH y temperatura de trabajo, que difieren significativamente según su fuente. Whitehurst y Law (2002) señalan que la presente en cereales malteados tiene un intervalo de trabajo de pH entre 4,5 y 8,5, la de origen bacteriano entre 4,8 y 7,5 mientras que la de mohos lo presenta alrededor de 4,3 a 6. En el caso de la α -amilasa que se emplea en la hidrólisis del almidón Whitehurst y Van Oort (2010) plantean que el grado de acidez óptimo oscila entre 5,5 y 6 mientras que Läufer (2019) plantea que es alrededor de 6 y 7. En el caso de la temperatura los valores se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 1.1: Relación de las temperaturas de trabajo y de mayor actividad catalíticas de la α -amilasa según su origen.

Origen	Temperatura de trabajo (°C)	Valor óptimo (°C)
Cereales malteados	70-80	cercano a 75
Bacterias	65-95	cercano a 70
Mohos	45-60	cercano a 55

Fuente: Law (2002)

La dosificación de la enzima depende del grado de hidrólisis que se desea y de su actividad. Whitehurst y Van Oort (2010) señalan que la α -amilasa termorresistente que se emplea en la hidrólisis enzimática del almidón, tanto la del *Bacillus licheniformis* (comercializada como Termamyl R por Novozymes) como la de *Bacillus amyloliquefaciens*, se deben dosificar de 0,5 a 0,6 kg de enzima por cada 1 000 kg de sustrato. En cambio, Whitehurst y Law (2002) plantean que debe ser entre 0,3 y 0,6 kg de enzima por cada 1 000 kg de sustrato. A su vez, Genencor International (2006) plantea que la Multifect®AA 21L (α -amilasa termoestable) para su uso en suspensión de almidón (base seca) se debe suministrar a 0,69 kg de enzima por cada 1 000 kg de almidón.

1.2.3 Enzima sacarificante glucoamilasa

La glucoamilasa se obtiene mediante procesos fermentativos a través de una gran cantidad de microorganismos, capaces de crecer en disímiles sustratos (Negi y Vibha, 2017). Se produce generalmente en hongos filamentosos como son los de *Aspergillus* y *Rhizopus spp* tanto por fermentación en fase sólida como sumergida (Negi y Vibha, 2017). La principal fuente de glucoamilasa industrial es el *Aspergillus Niger* (Hanif, Qader y Zohra, 2018) aunque existen otras igualmente viables como el *Aspergillus oryzae* (Läuffer, 2019) y *Aspergillus awamori* (Jain y Katyal, 2018).

Esta es una hidrolasa que se conoce también como EC 3.2.1.3 (Bagheri, Khodarahmi y Mostafaie, 2014), 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa (Wong, 2018), γ -amilasa (Paludo *et al.*, 2018), exo-1,4- α -glucosidasa, amiloglucosidasa y lisosomal α -glucosidasa (Purich y Allison, 2002)

Es una glicoproteína que contiene de 5 a 20 % de carbohidratos con muchas isoformas. La de origen fúngico posee una masa molar del orden de los 70 kDa (Wong, 2018). En la figura 1.3 se muestra la estructura tridimensional de esta enzima:

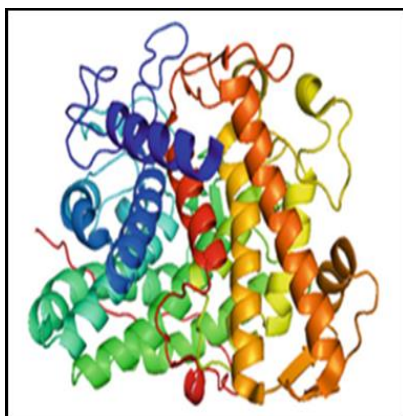


Figura 1.3: Estructura tridimensional de la glucoamilasa [Fuente: Balakrishnan *et al* (2019)].

Es una exoenzima (Friedl, 2019; Suriya *et al.*, 2016) debido a que actúa sobre los extremos no reductores de las cadenas de carbohidratos (Läufer, 2019; Xian y Feng, 2018). Esta enzima remueve sucesivamente las unidades de glucosa de las cadenas de almidón (Pasin *et al.*, 2017; Zhao, Huo, Feng y Li, 2018) lo que permite obtener D-glucosa (Syed *et al.*, 2016; Xian y Feng, 2018) en configuración beta (Adeoyo *et al.*, 2018), ya que ocurre inversión de la configuración anomérica (Purich y Allison, 2002). Es muy importante el hecho de que el producto formado sea solamente glucosa ya que tal como lo plantean Lee y deMan (2018) es una característica relevante que la diferencia de la α -amilasa y la β -amilasa.

Hidroliza los enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos de las cadenas de almidón (Amirbandeh y Taheri-Kafrani, 2016; Hartel *et al.*, 2018) (anexo 2) aunque también actúa raramente sobre los enlaces α -1,3 y los β -1,6 glucosídicos (Zhao *et al.*, 2018). No obstante, la velocidad de hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,6 es menor que la de los enlaces α -1,4 (Lee y deMan, 2018; Purich y Allison, 2002) y mucho mayor que la de los enlaces α -1,3 (Pasin *et al.*, 2017).

En Whitehurst y Van Oort (2010) se plantea que para el procesamiento industrial del almidón la glucoamilasa necesita de la acción previa de una α -amilasa (dextrinización), ya que de esta manera hay más extremos disponibles en las cadenas de carbohidratos (específicamente, extremos no reductores).

La velocidad de hidrólisis de la malttriosa y de la maltosa mediante la glucoamilasa es menor en comparación con la de los sacáridos de mayores unidades de glucosa. Al respecto Purich y Allison, 2002 exponen que hidroliza más fácilmente carbohidratos con

al menos seis unidades de glucosa y que actúa más rápidamente en polisacáridos que sobre oligosacáridos.

Los parámetros de operación de la glucoamilasa dependen de las restricciones tecnológicas del proceso y de las condiciones para las que se alcanzan la mayor estabilidad y actividad catalítica. En las fuentes que se consultaron existen diversos criterios que están sujetos también por las características del sustrato y la procedencia biológica de la enzima.

La amiloglicosidasa AMG que produce Novozymes de *Aspergillus niger* presenta mayor actividad a una temperatura de 75 °C y un pH de 3,5 (NOVOZYMES, 2011). Su mayor estabilidad se alcanza a un pH de 5 y una temperatura de 60 °C. La actividad se refiere a la cantidad de enzima que se necesita para hidrolizar un micromole de maltosa por minuto a 25 °C y a pH de 4,3 regulado con tampón de acetato para 30 minutos de reacción.

La enzima OPTIDEX L-400 es una glucoamilasa producida por Genencor a partir de *Aspergillus Niger*. Esta presenta una actividad mínima de 350 GAU/g, un pH óptimo entre 4 y 4,5 así como una temperatura óptima cercana a los 65 °C. Se recomienda que se dosifique para la sacarificación en condiciones típicas (pH de 4,3 y temperatura de 60 °C) entre 0,36 a 1 kilogramo de enzima por cada 1 000 kg de almidón (base seca) para un tiempo de trabajo entre 24 y 72 horas (Genencor International, 2006).

A pesar de las grandes potencialidades de las glucoamilasas, estas presentan una serie de limitaciones que dificultan en ocasiones su aplicación industrial y que, a su vez, suponen restricciones al proceso tecnológico. La mayoría (principalmente las de hongos) actúan eficientemente solamente a un estrecho intervalo de temperatura y a bajos valores de pH. Sin embargo, normalmente se requiere de altas temperaturas para reducir la actividad microbiana y la viscosidad, así como condiciones alcalinas de trabajo a escala industrial (Negi y Vibha, 2017).

A su vez, esta enzima presenta la capacidad de catalizar la reacción inversa de la hidrólisis para producir maltosa e isomaltosa, principalmente a alta concentración de azúcares (Negi y Vibha, 2017). Ello es de suma importancia en el proceso de sacarificación, puesto que hace que el rendimiento máximo esté limitado y que por tanto deba existir un monitoreo y control estricto sobre esta etapa.

1.3 Hidrólisis industrial de almidón

La hidrólisis industrial del almidón para obtener glucosa se puede realizar por vía ácida, enzimática o combinación de ambas (BeMiller, 2019; Helstad, 2019).

La hidrólisis ácida del almidón durante muchos años fue el método convencional de hidrólisis, pero sus serios inconvenientes conllevaron a que se sustituyera por la enzimática. Entre los problemas que se presenta en la hidrólisis por vía ácida se encuentra la corrosión (Binod *et al.*, 2019), formación de compuestos secundarios (Sunarti, Derosya y Yuliasih, 2018) algunos de ellos coloreados (Whitehurst y Van Oort, 2010), gran cantidad de sales producto a la neutralización (Sunarti *et al.*, 2018), bajo equivalente de dextrosa final (de 28 a 55 %) (Whitehurst y Van Oort, 2010), entre otros. Según Sunarti *et al* (2018) entre los compuestos secundarios que se forman se destacan: el 5-hidroximetilfurfural, el ácido levulínico y derivados del ácido fórmico.

En teoría se puede convertir todo el almidón a glucosa por hidrólisis ácida, sin embargo, a valores de equivalente de dextrosa entre 58 y 60 se forman compuestos de color y sabor indeseables difíciles de remover (Hartel *et al.*, 2018). Helstad (2019) coincide con este planteamiento, aunque establece como valor máximo de equivalente de dextrosa 45 % y asocia también el desarrollo del color a las reacciones de Maillard. Además, actualmente los jarabes de glucosa por vía ácida se limitan a un equivalente de dextrosa entre 25 y 45 porque a menores valores se verifica la retrogradación del almidón (existe la presencia de grandes cadenas lineales) (Helstad, 2019).

Mediante la hidrólisis enzimática, muchas de estas limitaciones se eliminan a la vez que se obtiene un mayor equivalente de dextrosa (Whitehurst y Van Oort, 2010). Con la hidrólisis enzimática durante la licuefacción, se disminuye el costo de producción en un 30 %, las cenizas en un 50 % y los productos secundarios en un 90 % (Whitehurst y Law, 2002). Sunarti *et al* (2018) plantea que la hidrólisis ácida generalmente se realiza a elevadas presiones y temperaturas durante varias horas. Debe haber un control riguroso de la temperatura durante este proceso debido a que un exceso de calentamiento provoca caramelización y desarrolla sabores indeseables.

1.3.1 Hidrólisis enzimática

La conversión enzimática del almidón comienza con la gelatinización, proceso en el que los gránulos de almidón se disuelven en agua para producir una solución viscosa (Suriya *et al.*, 2016). En esta etapa se rompe el gránulo de almidón con calentamiento para lixiviar

a la amilosa y la amilopectina y de esta manera permitir una mejor degradación enzimática (Li, 2018). Durante esta etapa se destruyen estructuras helicoidales y segmentos poliméricos con lípidos polares del almidón, en cuya forma nativa la α -amilasa es incapaz de hidrolizar (BeMiller, 2019).

La gelatinización de almidón involucra diversos cambios en el gránulo, como son: la pérdida de birrefringencia (Agama-Acevedo *et al.*, 2019), hinchazón granular (Okafor *et al.*, 2019), incremento de su solubilidad (Agama-Acevedo *et al.*, 2019) y el aumento de la viscosidad (Paludo *et al.*, 2018). La magnitud de la gelatinización del almidón depende de su origen (Agama-Acevedo *et al.*, 2019; Läufer, 2019).

La gelatinización es un proceso que requiere de mucha energía y que por lo tanto, incrementa sustancialmente el costo por este concepto (Sakwa, Cripwell, Rose y Viljoen-Bloom, 2018). Friedl (2019) plantea que la temperatura de gelatinización oscila entre 50 y 60 °C, específicamente para el almidón de maíz, mientras que Whitehurst y Van Oort (2010) refieren que se encuentra entre 72 y 76 °C. Esta variable depende del tipo de cereal y del sirope que se desea obtener (Läufer, 2019).

Una variante para efectuarla consiste en mantener la suspensión de almidón en el intervalo de temperatura de gelatinización aproximadamente durante 20 minutos y luego adicionar la enzima para desarrollar la licuefacción (Friedl, 2019). La otra variante, mayormente empleada en la producción de jarabes de glucosa, consiste en desarrollar gelatinización y comenzar la etapa de licuefacción de manera simultánea (Helstad, 2019). Al respecto, Friedl (2019) plantea que se calienta rápidamente la suspensión de almidón entre 105 y 120 °C en un reactor tubular presurizado durante 5 minutos una vez que se adiciona la enzima. La primera variante se debe realizar en un reactor de tanque agitado producto al incremento de la viscosidad. Whitehurst y Van Oort (2010) señalan que la segunda alternativa es la que más se utiliza.

En esta etapa la enzima tiene un papel fundamental que consiste en la disminución de la viscosidad (Friedl, 2019). Whitehurst y Van Oort (2010) refieren que ello se debe a la reducción de interacciones en el sustrato gelatinizado, por ejemplo, puentes de hidrógeno; aunque se debe aclarar que también es producto al desdoblamiento de las cadenas de almidón. De esta etapa se obtienen principalmente hidrolizados de alto peso molecular en presencia de α -amilasa.

BeMiller y Whistler (2009) señalan que la completa gelatinización del almidón depende del porcentaje de sólidos de la suspensión; que generalmente se encuentran entre 30 y 40 °Bx (Carvalho y Fernandes, 2019; Whitehurt y Law, 2002). El pH del almidón nativo oscila entre 3,2 y 4,5 (Carvalho y Fernandes, 2019) por lo que se hace necesario su ajuste en ocasiones para lograr una mayor compatibilidad con el intervalo de trabajo de la enzima. Se debe prestar especial atención en la dosificación del ion calcio, no solamente por la dependencia especial que presenta la enzima sino porque es un inhibidor de la glucosaisomerasa; enzima relativamente cara que se utiliza en la producción de siropes de alta fructosa (Läufer, 2019).

Los parámetros de operación de la α -amilasa en la gelatinización y licuefacción dependen de la tecnología del proceso y de las características específicas del sustrato así como de la enzima. En la tabla siguiente se muestran los valores más comunes de operación de acuerdo al criterio de diferentes autores:

Tabla 1.2: Parámetros operacionales más comunes para la etapa de gelatinización en presencia de α -amilasa.

Temperatura (°C)	pH	Iones Ca ²⁺ (mg/L)
90-100 (Hargono, Kumoro y Jos, 2018; Zhu, Ma, Mei y Li, 2017)	5,3-6,5 Whitehurt y Law, 2002)	5-80 (Whitehurt y Law, 2002)
105 (Läufer, 2019; Parashar y Satyanarayana, 2017; Whitehurst y Van Oort, 2010)	5,8-6,5 (Carvalho y Fernandes, 2019)	20-80 (Whitehurst y Van Oort, 2010)
105-110 (Whitehurt y Law, 2002)	6,0-6,5	30-80 (BeMiller y Whistler, 2009)
105-120 (Friedl, 2019)	6,5 (Whitehurst y Van Oort, 2010)	50-300 (Carvalho y Fernandes, 2019)

En la gelatinización el tiempo de calentamiento es muy corto, limitado principalmente por la termoestabilidad de la enzima cuando se trabaja a altas temperaturas; que por lo general es de alrededor de 5 minutos (Helstad, 2019; Parashar y Satyanarayana, 2017).

La temperatura y el tiempo de reacción se deben estrictamente controlar en las primeras etapas de la hidrólisis para evitar la retrogradación del almidón. Este fenómeno consiste en la reasociación de polímeros por uniones de hidrógeno cuando se enfría el almidón

gelatinizado a una temperatura inferior a la de gelatinización (Gunaratne, 2018); en el que se pasa de un estado inicialmente amorfo a uno cada vez más cristalino y ordenado (Park *et al.*, 2018).

Según Whitehurst y Van Oort (2010) cuando el almidón sale de la etapa de gelatinización, se enfría hasta 95 y 100 °C y se mantiene en esta condición entre 1 y 2 horas hasta que se alcance el equivalente de dextrosa deseado. En Parashar y Satyanarayana (2017) se plantea que la temperatura debe ser de 95 °C, el pH de 6,5 y el período de incubación de 2 horas. En cambio, Läufer (2019) plantea que la temperatura en esta etapa debe estar entre 85 y 95 °C mientras que Friedl (2019) señala que es entre 80 y 90 °C. Estos valores están sujetos principalmente a las condiciones de trabajo de la enzima, a la composición de los hidrolizados que se requiera obtener así como de la tecnología en particular con que se dispone para efectuar el proceso.

En el caso de una amilasa del género *Bacillus* el máximo valor de equivalente de dextrosa que se alcanza es cercano a 40 %, valor que no es conveniente de forma práctica producto que a elevados períodos de reacción se forma maltulosa (compuesto incapaz de ser degradado por amilasas) (Whitehurst y Van Oort, 2010). Respecto a la cantidad de unidades de glucosa en las dextrinas resultantes de la licuefacción. Friedl (2019) apunta que es de 7 a 10, aunque Okafor *et al* (2019) plantea que es de hasta de 12 unidades.

Después de la licuefacción, la mezcla se enfría y se desarrolla el proceso de sacarificación (Friedl, 2019). En esta etapa las dextrinas se convierten a glucosa por la acción de la enzima glucoamilasa (Läufer, 2019). Otros autores como Okafor *et al* (2019) y BeMiller (2019) plantean que resultan de esta etapa además maltosa, maltriosa y en algunos casos dextrinas más pequeñas; aunque esto está en dependencia del tipo de enzima que se emplea y del grado de hidrólisis.

Normalmente la temperatura de la etapa de sacarificación oscila alrededor de 60 °C, el pH de 4,5 y el tiempo de conversión de hasta 72 horas (Parashar y Satyanarayana, 2017; Whitehurst y Van Oort, 2010). Se efectúa principalmente en operación discontinua (Whitehurst y Van Oort, 2010), lo que es completamente razonable si se analiza el tiempo de incubación que usualmente presenta.

En el anexo 3 se ofrece una tabla donde se muestran los parámetros de trabajo de las principales enzimas que se emplean en la hidrólisis enzimática del almidón.

1.4 El jarabe de glucosa como producto final de la hidrólisis

Los edulcorantes que se obtienen de la hidrólisis del almidón de maíz presentan grandes aplicaciones en la industria de alimentos. Se clasifican en siropes de maíz convencionales, dextrosa sólida y siropes de maíz de alta fructuosa (Wong, 2018). En este contexto normalmente el término dextrosa hace alusión a la glucosa en estado puro, mientras que el vocablo glucosa se usa frecuentemente para describir a este producto como sirope (Hartel *et al.*, 2018).

Entre las especificaciones más importantes de los siropes de glucosa se encuentra el equivalente de dextrosa y la densidad, las que constituyen las especificaciones primarias (Hartel *et al.*, 2018).

El Equivalente de Dextrosa (ED) es una medición del poder reductor de un producto que se refiere en términos de glucosa y se expresa como porcentaje total en base seca (BeMiller, 2019; Hartel *et al.*, 2018; Helstad, 2019; Okafor *et al.*, 2019; Wong, 2018). Este parámetro se calcula mediante la expresión siguiente:

$$ED(\%) = \frac{\text{Cantidad de azúcares reductores (mg)}}{\text{Cantidad de almidón (mg)}} \cdot 100 \% \quad (1.1)$$

Generalmente se expresa como glucosa por ser la unidad monomérica del almidón y el producto final de su hidrólisis. No obstante, a pesar que conceptualmente se refiere a ella algunos autores como Das y Kayastha (2019) la establecen en base a maltosa. Esta particularidad se debe a la enzima que se utiliza en la sacarificación, tal es el caso de la β -amilasa y a la extensión de la hidrólisis que se necesita en base a la composición y tipo de sirope que se desea.

Otro modo de calcularlo es en base a la composición específica del producto y la relación del poder reductor de cada compuesto respecto al de la glucosa. Para ello Eshra, El-Iraki y Abo Bakr (2014) emplean la expresión siguiente:

$$ED = \text{Glucosa} (\%) + \text{Maltosa} (\%) \cdot 0,5 + \text{Maltriosa} (\%) \cdot 0,33 \quad (1.2)$$

Esta última variante presenta la gran desventaja de requerir de complejas y exhaustivas técnicas analíticas cuyo equipamiento es muy costo.

En la literatura especializada los principales métodos que se emplean para cuantificar los azúcares reductores en jarabes de glucosa son el método de Eynon-Lane (tradicional) y el del ácido 3,5-dinitrosalisílico.

El método de Eynon-Lane es el que establece la Asociación de Refinadores de Maíz (en inglés: *Corn Refiners Associations*) y la AACCI (siglas en inglés de: *American Associations of Cereal Chemists International*) para el control analítico del equivalente de dextrosa, que aparece claramente reportado en BeMiller y Whistler (2009), Helstad (2019) y CRA (2019). Tiene como principal inconveniente que los azúcares reductores se determinan mediante valoración (método clásico), cuyos resultados son menos exactos que los métodos analíticos-instrumentales modernos. Además, se necesita de la preparación previa del reactivo de Fehling y la cantidad de azúcares reductores no se determina inmediatamente, sino que requiere de una expresión empírica.

El uso del 3,5-ácido dinitrosalicílico como agente para determinar la concentración de azúcares reductores se utiliza mayoritariamente, tanto para calcular el equivalente de dextrosa específicamente o para determinar la actividad de las enzimas aminolíticas, en cuyo último caso se rige por el mismo principio. Es muy ventajoso puesto que resulta relativamente sencillo y mediante espectrofotometría a partir de una curva de calibración, se determina rápidamente la concentración de azúcares reductores. Existen muchas investigaciones que cuantifican los hidrolizados como glucosa por esta vía, entre las que se destacan a: Adeoyo *et al.*, (2018), Jain y Katyal, (2018), Pasin *et al.*, (2017), Amirbandeh y Taheri-Kafrani (2016), Ayodeji, Bamidele, Kolawole y Ajele, (2017), Meng, Li y Zhu, (2018) y Amirbandeh, Taheri-Kafrani, Soozanipour y Gaillard (2017).

Según BeMiller (2019) el ED es inversamente proporcional al peso molecular promedio y corresponde al recíproco del grado de polimerización. El equivalente de dextrosa del almidón puro es 0 mientras que el de la D-glucosa es de 100 % (BeMiller, 2019; Whitehurst y Van Oort, 2010). El ED describe el grado de conversión del almidón (Okafor *et al.*, 2019).

El poder reductor de la maltosa es la mitad del de la glucosa porque al estar dos moléculas de glucosa unidas (maltosa) solamente está disponible un sitio no reductor. Asimismo, cuando hay tres unidades de glucosa juntas, como en la maltriosa, el poder reductor es de un tercio de glucosa (Okafor *et al.*, 2019). En los jarabes de glucosa, mientras mayor sea el grado de hidrólisis, mayor será su poder edulcorante debido a que aumenta el contenido de glucosa y maltosa (Hartel *et al.*, 2018).

El equivalente de dextrosa expresa el grado de hidrólisis, aunque no cuantifica el contenido específico de este; jarabes de composiciones diferentes pueden tener igual ED.

Este efecto se muestra en la tabla 1.3, donde se aprecia que para un mismo equivalente de dextrosa en un jarabe pueden existir diferentes composiciones según la vía de la hidrólisis:

Tabla 1.3: Composición típica de un jarabe de glucosa de equivalente de dextrosa de 42 % según el método de obtención:

Contenido de sacáridos (%)	Tipo de conversión		
	Ácida	Ácida/enzimática	Enzimática
Glucosa	19	6	2
Maltosa	34	42	55
Trisacáridos	12	12	18
Sacáridos mayores	55	35	25

Fuente: Hartel *et al.* (2018)

En la hidrólisis enzimática mientras mayor sea el ED menor es el tamaño de las dextrinas presentes (Whitehurst y Van Oort, 2010) y más cantidad de sacáridos de baja masa molecular (Wong, 2018). En esencia, con el incremento de las unidades de glucosa en un compuesto, disminuye su poder reductor y por lo tanto el ED. Los productos con los valores de ED bajos (pesos moleculares relativamente altos) presentan largos fragmentos de cadena lineales que provocan la formación de geles (BeMiller, 2019).

Con el incremento del ED en los siropes de glucosa aumenta el número de grupos reductores y con ellos los riesgos de caramelización y de ocurrencia de la reacción de Maillard (Hartel *et al.*, 2018). Entonces, un valor alto de ED aumenta la probabilidad de desarrollo del color (Okafor *et al.*, 2019). Según Hartel *et al.* (2018) al aumentar el ED, este se vuelve más higroscópico y puede cristalizar con mayor facilidad; a su vez provoca el aumento del punto de ebullición y la disminución de la viscosidad Okafor *et al.* (2019). En la figura 1.4 se ilustra la relación de las propiedades y uso funcionales de los siropes según el equivalente de dextrosa:

Propiedades o uso funcional del jarabe	Equivalente de dextrosa del sirope de glucosa			
	Bajo	Regular	Intermedio	Alto
Para dar cuerpo en la confección de productos	←—————→			
Reacciones de desarrollo del color	—————→			
Fermentabilidad	—————→			
Mejoramiento del sabor	—————→			
Estabilización de espumas	←—————→			
Elevación del punto de congelación	—————→			
Uso como humectante	—————→			
Higroscopicidad	—————→			
Contenido de sólidos nutritivos	—————→			
Presión osmótica	—————→			
Prevención de cristalización de azúcares	←—————→			
Prevención de la formación de hielo durante la congelación	←—————→			
Brillantez	—————→			
Dulzura	—————→			
Viscosidad	—————→			

Figura 1.4: Efecto del equivalente de dextrosa sobre las propiedades de los jarabes [Fuente: Helstad (2019)].

Las concentraciones de azúcares en los siropes dependen del origen del carbohidrato y del tipo de enzima que se utiliza en la hidrólisis. En caso de emplear la glucoamilasa en la sacarificación, se alcanzan siropes con alto equivalente de dextrosa (entre 70 y 95 %), alto porcentaje de glucosa con menos maltosa y malttriosa; pero si la enzima sacarificante es α -amilasa de origen fúngico, se obtienen siropes con ED moderados (entre 42 y 55 %), menor contenido de glucosa con altos contenidos de maltosa y malttriosa (Okafor *et al.*, 2019).

Cada sirope de glucosa tiene un peso molecular promedio diferente según el grado y la naturaleza de la hidrólisis (Hartel *et al.*, 2018). Comercialmente los productos finales contienen solamente hasta un 95 % de D-glucosa, porque bajo soluciones altamente concentradas de sólidos se verifica un proceso inverso de reasociación en el que se forma un 1 % de maltosa y entre 2 y 3 % de altos oligosacáridos (BeMiller, 2019).

BeMiller y Whistler (2009) expresan que el ED del sirope de glucosa de maíz es de 20 a 95 %. Comúnmente el jarabe de glucosa presenta condiciones osmóticas suficientes (aproximadamente 70 % sólidos) para prevenir crecimiento de microorganismos ordinarios (BeMiller, 2019).

Los siropes con bajo ED (menor que 43 %) contienen alta concentración de maltooligosacaridos y se emplean en productos glaseados porque aportan cuerpo y flexibilidad. A su vez, los que tienen un valor intermedio de ED (entre 43 y 49 %) tienen una alta concentración de maltosa y los que presentan un ED superior a 64 % contienen grandes cantidades de D-glucosa (BeMiller, 2019). En la tabla 1.4 se muestran las composiciones típicas que se asocian en jarabes de hidrolizados de almidón según el ED:

Tabla 1.4: Composiciones típicas de diferentes jarabes según su equivalente de dextrosa:

Equivalente de dextrosa	Composición (%)			
	DP ₁	DP ₂	DP ₃	DP ₄₊
28	8	8	11	73
36	14	11	10	65
43	19	14	12	55
53	28	18	13	41
63	36	31	13	20
66	40	35	8	17
95	95	3	0,5	1,5

DP: Grado de polimerización

DP₁: Monosacáridos (Glucosa) DP₂: Disacáridos (principalmente maltosa)

DP₃: Trisacáridos (principalmente maltotriosa) DP₄₊: Oligosacáridos (maltotetraosa y altos azúcares)

Fuente: BeMiller y Whistler(2009)

La glucosa monohidratada no debe presentar un contenido de sólidos menor que un 90 % en masa y un ED menor de 95 % en base seca. De forma semejante, en la dextrosa anhidra el contenido de sólidos totales no puede ser menor que el 98 % (Helstad, 2019).

Lo anteriormente planteado, demuestra el efecto significativo que ejerce el equivalente de dextrosa en las propiedades de los productos finales de la hidrólisis. Esta es la principal variable de control del proceso de hidrólisis en sus distintas etapas y un indicador directo de la eficiencia de la conversión del almidón a azúcares reductores.

Conclusiones parciales del capítulo:

- ✓ Para el análisis de la hidrólisis enzimática del almidón resulta imprescindible considerar la concentración de sustrato y enzima, acidez del medio, temperatura

y presencia de cofactores; variables que en su conjunto condicionan la eficiencia del proceso.

- ✓ Las mejores condiciones de actividad y estabilidad de las enzimas aminolíticas no necesariamente coinciden con las de mayor factibilidad tecnológica.
- ✓ El equivalente de dextrosa constituye la principal variable de control del proceso, indicador que define el valor comercial de los hidrolizados.
- ✓ En el proceso se pueden formar compuestos resistentes a la degradación enzimática y verificar reacciones indeseables, que están relacionadas con el deterioro de las propiedades organolépticas de los jarabes ante condiciones desfavorables de pH, equivalente de dextrosa y tiempo de reacción.

Capítulo 2: Materiales y métodos

En el presente capítulo se describe el proceso tecnológico de obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz. En el mismo se aborda todo lo referente a la metodología experimental correspondiente a la caracterización de las enzimas hidrolíticas y del sustrato, la modelación experimental del proceso hidrolítico y la determinación de la calidad de los hidrolizados. También se describe el procedimiento para la optimización técnico-económica del proceso industrial por algoritmos genéticos.

2.1 Descripción de la instalación

La Planta de Glucosa, perteneciente a la empresa Gydema, se ubica en el consejo popular Pueblo Griffó de la Zona Industrial 2 de Cienfuegos. Esta se funda en 1979 y se diseña inicialmente para producir 25 000 000 kg anuales de jarabe de glucosa por hidrólisis ácida. En 1996 se produce la reconversión de su tecnología de fabricación para desarrollar la hidrólisis por vía enzimática, dada la demanda de siropes de glucosa con alto equivalente de dextrosa de una fábrica de sorbitol, recientemente creada por aquel entonces en Camagüey.

Opera con maíz de importación, principalmente de Argentina, Brasil y Estados Unidos de América. El procesamiento de maíz de producción nacional no es de gran factibilidad para la industria por su bajo contenido de almidón.

2.1.1 Descripción del proceso tecnológico

El proceso tecnológico de obtención de la suspensión de almidón de maíz, materia prima fundamental para la producción de sirope de glucosa, se realiza mediante una serie de etapas a partir del grano de maíz en esta misma instalación.

Primeramente, el maíz se limpia con el objetivo de eliminar las impurezas para su posterior maceración durante un período de 72 horas; tratamiento que permite separar interiormente los componentes solubles del grano por hinchamiento y ablandarlo para lograr un proceso eficiente de molienda. Se emplea para ello agua sulfurosa, que inhibe el crecimiento microbiano y evita el deterioro del grano por este concepto. Luego se dirige hacia la sección de molienda húmeda, para desgarrar el grano y liberar el germen sin dañarlo; igualmente se emplea agua sulfurosa para mantener las proporciones correctas de agua y maíz en los molinos. Después de cada molino en esta etapa existen

desgerminadoras que por diferencia de densidad separan al germen de los demás componentes, el que posteriormente se envía a un proceso de lavado y secado para su empleo como pienso animal.

A continuación, se verifica una etapa final de molienda (fina) que ajusta la granulometría de las fibras del grano para la segregación del gluten y suspensión de almidón. El gluten se extrae por centrifugación y de igual manera que el germen y las fibras, se trata en otra línea de proceso para su comercialización dado el alto valor nutricional que poseen.

La suspensión de almidón que resulta de la centrifugación se puede emplear para la obtención de maicena mediante procesos de filtración y secado, o para a producción de jarabes de glucosa por vía ácida o enzimática. En la figura 2.1 se ilustra un esquema general del proceso tecnológico de la instalación:

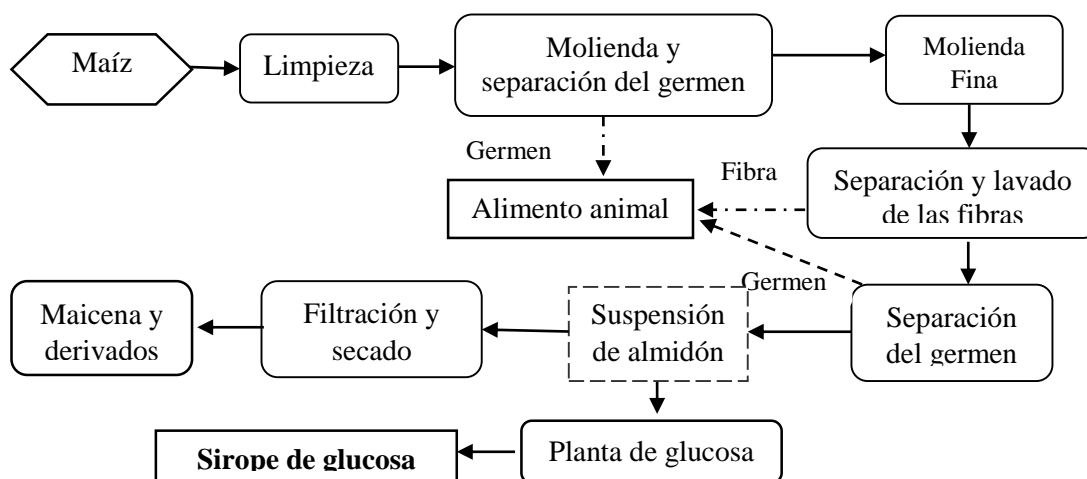


Figura 2.1: Principales etapas del proceso tecnológico.

2.1.2 Hidrólisis enzimática

La suspensión de almidón que se emplea presenta una densidad entre 17 y 17,5 °Bé, (aproximadamente un 35 % m/v), un contenido de proteína cercano al 0,8 % y una temperatura entre 29 y 30 °C. Esta se deposita en un tanque (C1140A) de capacidad igual a 0,4 m³ (anexo 4) provisto de agitación (860 rpm) en el que se adiciona carbonato de sodio (hasta ajustar el pH a 6,5) y la enzima α -amilasa termoestable. Posteriormente se envía hacia un tanque de retención (C1150), que presenta agitación a 57 rpm para evitar la sedimentación y lograr homogeneidad en la mezcla.

A continuación, la suspensión de almidón se bombea hasta un reactor tubular (que se conoce para estos procesos como *jet-cooking* en inglés) a razón de 7,2 m³/h y una presión

de 3040 kPa que está dividido en dos secciones, una para el calentamiento y la otra propiamente para la reacción. La primera se compone de 5 tubos longitudinales con una disposición interior de 3 tubos concéntricos; el fluido circula por el espacio comprendido entre los dos interiores y el vapor saturado de 304 a 405 kPa de presión por el centro y exterior de la sección anular. Luego le siguen nueve tubos que integran la sección de reacción. En este equipo se verifica la gelatinización a una temperatura de 100 a 105 °C y una presión de 2 533 a 3 040 kPa, por un período comprendido entre 5 y 7 minutos. Al concluir esta etapa, el producto presenta un equivalente de dextrosa entre 5 y 7 %.

El hidrolizado que proviene del reactor pasa por un ciclón de expansión (C9200), donde se verifica su enfriamiento mediante una caída brusca de presión. Luego, se bombea a razón de 8 m³/h a un tanque de licuefacción (C1610-1) con una capacidad nominal de 45 m³. En este se alcanza un tiempo de permanencia de dos horas que corresponde a un 35 % de su capacidad. La reacción se desarrolla entre 90 y 95 °C hasta alcanzar un equivalente de dextrosa entre 12 y 15 %.

Posteriormente se disminuye su temperatura mediante un intercambiador de placas (7600A) hasta 60 °C y se dirige al tanque C1140, de una capacidad de 0,4 m³ provisto de agitación a 860 rpm. En este equipo se ajusta el pH a 4,5 mediante ácido clorhídrico y se dosifica la enzima sacarificante glucoamilasa para desarrollar la última etapa de reacción.

Luego el producto se transporta mediante una bomba (C3300A), a razón de 7 m³/h hacia los tanques de sacarificación: C16102, C16103, C16104, C16105, C16106, C16107 y C16108. Estos equipos tienen una capacidad de 45 m³ y un agitador que gira a 43 rpm. Cada tanque consta de un serpentín en su interior para mantener la temperatura constante a 60 °C durante el período de sacarificación. Cuando el equivalente de dextrosa se mantiene fijo o comienza a disminuir por encima de 92 %, se procede inmediatamente a inactivar la enzima glucoamilasa para evitar la reasociación de las moléculas de glucosa.

El producto proveniente de los tanques de sacarificación, se envía por bombeo (C3302) hacia un intercambiador de calor tubular (C7600 del tipo P 132 HB) con un área de transferencia de calor de 10,86 m²; donde se eleva la temperatura hasta 80 °C para inactivar la enzima.

Posteriormente pasa a un tanque de retención (R1110) y de ahí al separador de proteínas (R9110). El hidrolizado libre de proteínas se envía a un tanque (R1510 o R6514) provistos de agitación a 57 rpm en el que se adiciona carbón activado con el objetivo de eliminar

compuestos indeseables y mejorar sus propiedades organolépticas. Este se dosifica de forma manual a razón de un tercio de saco cada media hora en determinados tanques de preparación (R1610 y R1620). Luego el hidrolizado se envía a un tanque (R1640) para aumentar el tiempo de contacto con el carbón activado y de ahí a un filtro rotatorio (R9310) para la separación de impurezas como grasas, proteínas y carbón activado. Se emplea para la filtración tierra infusoria, que se prepara a base de dilicate en el tanque correspondiente (R1310).

Posteriormente el producto pasa por un ciclón de expansión (R9320) para disminuir su temperatura mediante vacío y se envía por bombeo a un tanque (E1120) provisto de agitación a 860 rpm donde se adiciona carbonato de sodio para el ajuste fino del pH (de 4,4 a 5,2). Después se envía hacia un tanque de retención (E2110) con agitación a 57 rpm para una mejor homogenización. Luego se bombea hacia un filtro de seguridad (R9540-1) con capacidad de procesamiento de 9 m³/h, con el objetivo de quitar restos de carbón activado y mejorar el color. El producto llega a un tanque de retención (E1220) para la posterior etapa de concentración.

El proceso de concentración consta de un evaporador de múltiple efecto de película descendente a cuatro etapas [I (E9230-1), II (E9230-2), III (E9230-3) y ‘‘súper’’ concentrador (E9230)]. En esta etapa se logra concentrar el jarabe de 40 a 65 °Bx. No debe exceder este último valor para evitar la cristalización de la glucosa. Bajo estas concentraciones no es posible el desarrollo de microorganismos y por lo tanto se garantiza por este concepto la inocuidad del jarabe.

El producto que proviene del último efecto entra a un enfriador (E9320) para disminuir su temperatura. Luego, el sirope de glucosa se deposita en un tanque de producto final (E1410) provisto de agitación para una mejor homogenización y mediante una bomba (E3401) se envía hasta los tanques de almacenamiento de producto terminado.

2.2 Caracterización de las enzimas hidrolíticas

Las enzimas que conciernen a este análisis son dos enzimas aminolíticas, una α -amilasa termorresistente de *Bacillus licheniformis* y una glucoamilasa de *Aspergillus niger*, ambas de calidad alimentaria proporcionadas por la empresa Gydema, perteneciente a LABIOFAM en Cienfuegos (Cuba). Se producen por la empresa biotecnológica BIOCON (España) bajo los nombres comerciales *Bialfa-T* y *Glucozyme*, respectivamente.

La caracterización de las mismas comprende la determinación de la actividad enzimática y concentración de proteínas, así como la influencia del pH y la temperatura sobre dicha actividad. Ello permite determinar si las enzimas presentan el potencial catalítico suficiente, bajo determinadas condiciones de pH y temperatura que las avalen para su empleo en la hidrólisis enzimática del almidón de maíz con perspectiva industrial.

2.2.1 Determinación de la actividad de la enzima

La determinación de la actividad enzimática se realiza por el método de Miller, empleado por numerosos autores como: Abidi, Iram, Furkan y Naeem (2017; Meng *et al* (2018); Pasin *et al* (2017). La determinación de la actividad enzimática para cada enzima se efectúa de manera independiente bajo las mismas condiciones de pH y temperatura que reporta el fabricante en el catálogo (BIOCON, 2019). La determinación para la α -amilasa se efectúa a 40 °C a un pH de 6,5, mientras que para la glucoamilasa se realiza a 60 °C y a 4,5 de pH. Se emplea como sustrato almidón de papa reactivo (Panreac, España).

Para la cuantificación de la actividad se prepara una disolución de sustrato al 1 % (m/v), en tampón de ácido acético y acetato de sodio a 0,2 mol/L según el pH correspondiente. Se toman 0,5 mL de la disolución de sustrato, se le añaden 0,5 mL de la enzima diluida y se encuba durante 10 minutos a la temperatura de análisis en un baño de María (Kottermann, Alemania).

Una vez concluido el tiempo de hidrólisis, se adiciona 1 ml de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS del inglés: *dinitrosalicylic acid*) (Panreac, España), reactivo que interrumpe la reacción y que funciona como agente desarrollador de color según la concentración de azúcares del medio. Luego se coloca la muestra en baño de María durante 10 minutos a 100 °C, se añaden 1,2 mL de agua destilada y se determina la absorbancia a 546 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Utrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia. La curva de calibración se realiza a partir de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida, en este caso, se utiliza una disolución estándar de glucosa (1 mg/mL).

La actividad enzimática se determina por medio de la ecuación siguiente:

$$AE = \frac{c(AR)}{t} \cdot \frac{d_{enzima}}{V_{enzima}} \quad (2.1)$$

Donde:

AE: actividad enzimática [U/mL].

c (AR): concentración de azúcares reductores referidos como glucosa [mg/mL].

t: tiempo de incubación [minutos].

d_{enzima} : factor de dilución de la disolución enzimática.

V_{enzima} : volumen añadido de la disolución enzimática [mL].

La concentración de azúcares reductores se determina como:

$$c(AR) = \frac{A_{546} - n}{m} \quad (2.2)$$

Donde:

A_{546} : absorbancia a 546 nm.

n: intersección de la curva de calibración.

m: pendiente de la curva de calibración.

Debido a que la actividad enzimática no contempla la pureza de la enzima, se calcula la actividad enzimática específica a partir de la concentración proteica de la enzima, tal como lo refleja la ecuación 2.3:

$$AE^* = \frac{AE}{c(p)} \quad (2.3)$$

Donde:

AE*: actividad enzimática específica [U/mg]

c(p): concentración proteica de la enzima [mg/mL]

La concentración proteica de la enzima se determina a partir del método de Lowry, tal como lo realizan en: Chen, Yang, Dong, Li y Dai (2019); El-Dalatony *et al* (2019) y Fan *et al.* (2019). Para ello, se mezclan 0,4 mL de disolución enzimática y 0,4 mL de reactivo de Lowry, se esperan 10 minutos y se adicionan 0,2 mL de reactivo de Folin. Después de 30 minutos, se determina la absorbancia a 750 nm. El contenido de proteínas de la enzima se cuantifica mediante una curva de calibración, que se construye a partir de un patrón de 1 mg/mL de albumina de suero bovino (BSA, siglas en inglés de: *bovine serum albumin*).

2.2.2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

Se analiza el comportamiento de la actividad enzimática bajo determinadas condiciones de temperatura y pH. La actividad se cuantifica mediante el mismo procedimiento

descrito anteriormente para determinadas condiciones de pH y temperatura y se expresa como porcentaje de actividad relativa en función del mayor valor de actividad enzimática.

Para la α -amilasa se determina la influencia de la temperatura desde 40 hasta 95 °C a un pH constante de 6,5, mientras que el comportamiento frente al pH se hace entre 2,5 y 11 a una temperatura constante de 40 °C. La influencia del pH para la enzima glucoamilasa se evalúa en un intervalo de 2,5 a 8,5 a una temperatura de 60 °C así como la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática en un intervalo de 40 a 85 °C a un pH constante de 4,5.

Para mantener el pH constante en los diferentes experimentos se preparan disoluciones de tampón de ácido acético y acetato de sodio a 0,2 mol/L para un pH comprendido entre 2,5 y 6,5; tampón de hidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de sodio a 0,2 mol/L para el pH entre 7 y 8,5 así como tampón de hidróxido de sodio y dihidrogenofosfato de sodio a 0,2 mol/L para un pH entre 9 y 11.

2.3 Modelación empírica de la hidrólisis enzimática

Se realiza un diseño de experimentos de superficie respuesta para obtener un modelo matemático que describa la hidrólisis a partir de la influencia de las variables de operación que más repercuten; ellas son: temperatura, pH, dosis de enzima y tiempo de reacción para cada etapa. A su vez, se establece como variable respuesta el equivalente de dextrosa, función directa de la conversión del almidón.

La gelatinización se debe efectuar a 100 °C durante un tiempo de exposición de 7 minutos; condiciones semejantes a las que se verifica esta etapa en el proceso industrial objeto de estudio. El hecho de que la suspensión presente una cantidad considerable de almidón (35 % m/v) hace que resulte imprescindible emplear elevadas temperaturas, aunque a períodos de exposición muy cortos, ya que se puede desnaturalizar la enzima.

En la etapa de licuefacción, la temperatura y el pH se analizan en un intervalo de 70 a 95 °C y de 5,5 a 7,5 respectivamente, que incluyen el intervalo de mayor actividad enzimática y de operación. En el caso de la dosis de la enzima α -amilasa se establece entre 0,5 y 1,5 mg de enzima/g de almidón, que contiene el intervalo que recomienda el fabricante de 0,5 a 1 mg de enzima/g de almidón (BIOCON, 2019). El tiempo de reacción comprende de 1 a 2 horas, que coincide con el del proceso industrial.

En la sacarificación se analiza la influencia de la dosis de enzima de 0,5 a 1,5 mg de enzima/g de almidón hidrolizado, intervalo que contiene el intervalo que recomienda el fabricante de 0,5 a 1 mg de enzima/ g de almidón (BIOCON, 2019). El pH de trabajo oscila entre 4 y 6, donde se encuentran los valores de mayor actividad catalítica y de operación; el tiempo de reacción entre 24 y 48 h (tiempo en que se verifica industrialmente la etapa) así como la temperatura entre 50 y 70 °C, que incluye igualmente el valor operacional y de mayor actividad.

Establecer correctamente los intervalos en que se analizan el pH, la temperatura y el tiempo de reacción para cada etapa es de gran importancia, ya que las interacciones entre estas variables agudizan considerablemente los efectos desnaturalizantes del medio. Por otro lado, el modelo matemático que se obtiene solamente es válido en el dominio de estudio de dichas variables. En la tabla 2.1 se resumen los intervalos de estudio de los 8 factores experimentales:

Tabla 2.1: Intervalos de estudio de las variables independientes

Factor experimental	Intervalo de estudio
Dosis de α -amilasa [mg enzima/ g almidón]	0,5 - 1,5
Temperatura de licuefacción [°C]	70 - 95
pH de licuefacción	5,5 - 7,5
Tiempo de licuefacción [h]	1- 2
Dosis de glucoamilasa [mg enzima/g almidón hidrolizado]	0,5 - 1,5
Temperatura de sacarificación [°C]	50 - 70
pH de sacarificación	4 - 6
Tiempo de sacarificación [h]	24 - 48

A través del *software* Statgraphics Plus (2000) se selecciona el diseño de superficie respuesta *Compuesto Central Reducido: 2⁸⁻² + estrella*, diseño que es fraccionado producto al alto número de factores experimentales. Este constituye entre todas las propuestas que establece el *software* el que más corridas experimentales requiere, lo que supone un mayor grado de libertad del error, aunque implique una experimentación más trabajosa.

Se establece como característica fundamental del diseño que sea centrado en las caras, lo que define una distancia axial de uno. De esta manera es posible en la práctica realizar los experimentos con los valores intermedios de las variables independientes que establece el programa; de otro modo se obtienen experimentos a dosis de enzimas negativas o a condiciones de temperatura y pH totalmente desnaturalizantes, debido al factor de escala que supone el intervalo de análisis de cada una de estas variables. Se establecen cinco réplicas en el centro, valor que recomienda Montgomery (2017) para una mejor calidad del modelo. Ello en su conjunto hace un total de 85 corridas experimentales con 40 grados de libertad del error.

Este diseño es suficiente para ajustar un modelo cuadrático con la estructura que se presenta por la expresión 2.4. No se incluyen las interacciones entre los factores experimentales por la naturaleza fraccionada del modelo:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (2.4)$$

Donde:

Y : Variable respuesta.

β_0 , β_i , β_{ii} : Coeficientes de regresión.

X_i : Variables independientes (factores experimentales)

k : Número de factores experimentales (8)

El análisis estadístico de la modelación experimental se realiza mediante el *software* Statgraphics Plus (2000). La significación de la influencia de los factores experimentales y sus efectos cuadráticos sobre la respuesta se determina mediante el diagrama de Pareto.

La calidad de ajuste del modelo matemático se determina mediante la prueba de Fisher y la relación entre los valores observados y predichos de la variable respuesta. También se analiza el porcentaje de los valores predichos del modelo que se encuentran dentro del

intervalo de estimación que establece el software para un 95 % de confianza, para de esta manera evaluar la calidad de la explicación de la realidad experimental. Mediante el estadígrafo de Durbin-Watson se determina si los errores no se encuentran correlacionados entre sí para un 95 % de confianza.

Se realizan análisis de sensibilidad para estudiar la respuesta ante la variación de los valores de los factores experimentales más influyentes, según sus límites de estudio. También, se determinan los valores de los factores experimentales que permiten un máximo equivalente de dextrosa a través de la optimización por superficie respuesta.

2.4. Caracterización de la suspensión de almidón

Se realiza la caracterización de la suspensión de almidón que se emplea en el desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz. Esta se prepara al 35 % (m/v) a partir de maicena procedente de la Planta de Almidón de la empresa Gydema.

La maicena se obtiene mediante etapas puramente físicas de deshumidificación y secado a partir de la misma corriente que suministra la suspensión de almidón a la Planta de Glucosa, por lo que no existen diferencias en la composición química entre este sustrato y el del proceso. No obstante, se determina experimentalmente el contenido de proteínas, grasas y dióxido de azufre de la suspensión de almidón para verificar su similitud con esta corriente, según las técnicas analíticas que se emplean en la industria.

- ✓ Determinación del contenido de dióxido de azufre.

Para determinar el contenido de dióxido de azufre se diluyen 200 g de muestra en 500 mL de agua y se decanta durante 2 horas. Luego se toman 250 mL de la disolución, se añade 1 mL de indicador de almidón y se valora con solución de yodo a 0,1 mol/L hasta obtener una coloración azul-violeta.

El contenido de dióxido de azufre se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$c_{(SO_2)} = \frac{a \cdot 32 \cdot 100 \cdot 2}{m} \quad (2.5)$$

Donde:

$c_{(SO_2)}$: concentración de dióxido de azufre (mg/L)

a: volumen de solución de yodo 0,1 N que se consume en la valoración (mL).

m: masa de la muestra (g).

✓ Determinación del contenido de grasa.

Se coloca un balón de 250 mL en estufa por 15 minutos, se enfría en desecadora y se pesa. Luego se pesan 10 g de muestra en un papel de filtro, se envuelve y se coloca dentro de un dedal en el extractor. Posteriormente, se vierte el solvente (tetracloruro de carbono) en el balón, de tal manera que represente 1,5 veces el volumen de este y se conecta el extractor al condensador.

Se practica la extracción a reflujo durante 4 o 5 horas a un ritmo de condensación de 5 a 6 gotas por segundo. Luego se retira el dedal y se destila el solvente hasta que queden aproximadamente 2 mL. Se desconecta el balón del equipo y se termina de evaporar en una campana de gases. Posteriormente se coloca la muestra en estufa a 105 °C durante una hora y media de tal manera que no queden residuos de solvente. Finalmente, se enfría en desecadora y se pesa.

El contenido de grasa se determina mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Contenido de grasa (\%)} = \frac{(a-b) \cdot 100 \%}{m} \quad (2.6)$$

Donde:

a: masa del balón con la grasa (g).

b: tara del balón (g).

m: masa inicial de la muestra (g).

✓ Determinación del contenido de proteínas.

Se pesan 8 g de muestra y se transfieren a un balón Kjeldahl de 500 mL. A este se le añaden 10 g de sulfato de potasio, 0,5 g de sulfato de cobre (II) y 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se coloca el balón en posición inclinada en la unidad digestora y se calienta a una temperatura por debajo del punto de ebullición, hasta que cese la espuma. Luego, se aumenta la temperatura hasta que el ácido hierva vigorosamente y se digiere durante 1 hora después que se aclare la mezcla reaccionante. Se enfría cuidadosamente sin que cristalice y solidifique, se diluye en 300 mL de agua y se mezcla completamente para proceder a su destilación.

Se colocan 50 mL de solución de ácido bórico al 0,4 % (m/v) en un erlenmeyer de 300 mL y se conecta a un aparato de destilación de tal manera que el tubo de descarga del

condensado este sumergido en la solución de ácido absorbente. Se añaden 2 o 3 granallas de zinc y 75 mL de una disolución de hidróxido de sodio al 50 % (m/v) al balón que contiene la muestra. Se destila a una velocidad moderada hasta que se obtengan entre 200 y 240 mL del condensado.

Se separa el erlenmeyer del equipo antes de apagar la fuente de calor y se completa con agua hasta 300 mL, de forma tal de tener en cada experimento siempre el mismo volumen. Se añaden 0,5 mL de indicador (rojo de metilo-azul de metileno) y se valora con ácido clorhídrico a 0,02 mol/L.

Se realiza un ensayo en blanco con todos los reactivos, a excepción de la muestra, que se sustituye por glucosa.

Se determina el contenido de proteína por la expresión 2.7:

$$\text{Contenido de proteína (\%)} = \frac{(a - b) \cdot n \cdot x \cdot 875}{m \cdot s} \quad (2.7)$$

Donde:

a: volumen de ácido clorhídrico consumido en la valoración de la muestra (mL).

b: volumen de ácido clorhídrico consumido en la valoración del blanco (mL).

n: concentración del ácido clorhídrico (mol/L).

m: masa de la muestra (g).

s: contenido de sustancia seca de la muestra (%).

2.5 Desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del almidón

Para cada experimento se prepara una suspensión de almidón al 35 % (m/v) a partir de maicena de maíz de la empresa Gydema. A ella se le dosifica una disolución de cloruro de calcio de tal manera que presente una concentración de iones Ca^{2+} de 50 mg/L, tal como señala BIOCON (2019) y Whitehurt y Law (2002). Este cofactor es necesario para incrementar la actividad y estabilidad de la enzima α -amilasa (Läuffer, 2019; Paludo *et al.*, 2018; Whitehurst y Van Oort, 2010).

Se realiza el ajuste de pH con un pH-metro Testo 206 (Suecia), según esta condición en el diseño experimental, con una disolución de carbonato de sodio a 0,1 mol/L o ácido clorhídrico a 0,1 mol/L. Es importante mantener el uso de los mismos agentes que se utilizan en la industria debido a que otros, como las disoluciones tampón pueden afectar el comportamiento enzimático e introducir interferencias en los resultados. Se dosifica la

enzima α -amilasa y se gelatiniza en un baño de calentamiento a 100 °C durante 7 minutos con agitación manual constante para aumentar el contacto de la enzima con el sustrato.

Una vez concluida la gelatinización, se procede a determinar el contenido de almidón sin hidrolizar. Preliminarmente, se realiza una determinación cualitativa mediante el procedimiento que establece la Asociación de Refinadores de Maíz (Estados Unidos) en CRA (2019) a partir de un indicador de yoduro-yodato. En caso de dar un color violeta el indicador en contacto con la muestra, la prueba es negativa y se deduce que todo el almidón fue gelatinificado. En cambio, si se obtiene un color azul significa que es positiva y se procede a su cuantificación mediante una técnica iodométrica de mayor complejidad experimental igualmente avalada por la CRA.

Luego se efectúa la licuefacción en un baño de calentamiento, según el valor de temperatura y durante el tiempo que corresponden al experimento. Posteriormente, el hidrolizado se enfría, se mide el pH y se reajusta con los mismos agentes de la etapa anterior hasta el valor deseado. Luego se dosifica la enzima glucoamilasa y se mantiene en una zaranda (MLW THYS 2) dentro de una incubadora a temperatura constante y durante un tiempo específico, según las condiciones experimentales de la sacarificación.

En la figura 2.2 se presenta la secuencia de trabajo que resume el procedimiento experimental:

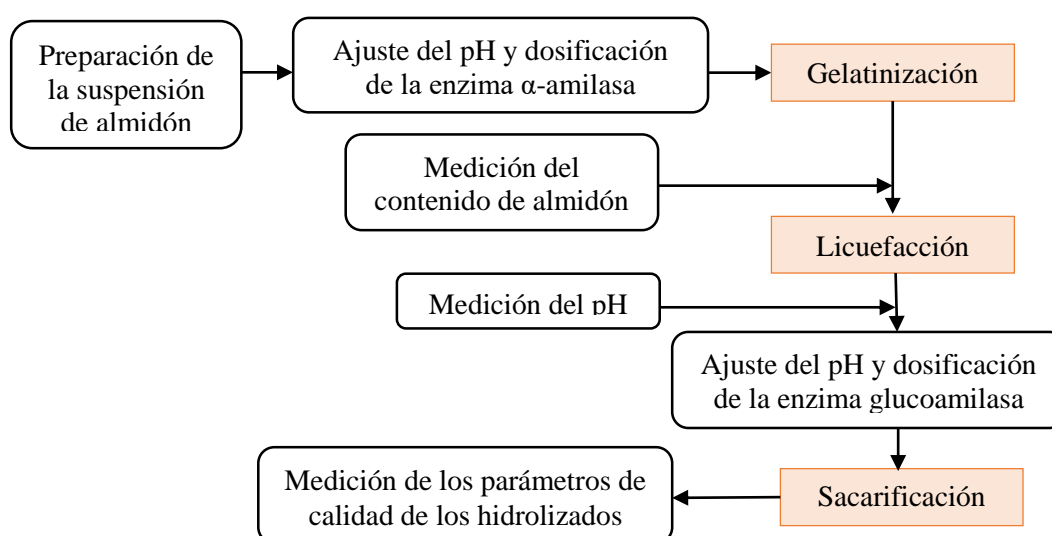


Figura 2.2: Secuencia de la experimentación (Fuente: Elaboración propia).

2.6 Caracterización de los hidrolizados

Se realiza la caracterización de los hidrolizados en base a la concentración de azúcares reductores referidos como equivalente de dextrosa (variable respuesta), porcentaje de acidez, color y el porcentaje de sólidos disueltos.

- ✓ Determinación de la concentración de azúcares reductores. Equivalente de dextrosa

La concentración de azúcares reductores se determina por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico tal como lo realizan los siguientes autores: Adeoyo *et al* (2018); Amirbandeh y Taheri-Kafrani (2016); Amirbandeh *et al* (2017); Ayodeji *et al* (2017). Este es el método más frecuentemente utilizado en este propósito (Sindhu, Binod y Pandey, 2017).

Para ello se añade a 1 mL de la disolución de hidrolizado 1 mL de DNS y se incuba en baño de María a 100 °C durante 10 minutos. Luego se adicionan 1,2 mL de agua y se determina la absorbancia a 546 nm. Dada la concentración de azúcares reductores de los hidrolizados, se necesita realizar varias diluciones; lo que conlleva a que la muestra no presente color y que ello no introduzca errores experimentales en la determinación espectrofotométrica. La curva de calibración se realiza a partir de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida, en este caso se utiliza una disolución estándar de glucosa (1 mg/mL). Luego se determina el equivalente de dextrosa mediante la ecuación 2.8:

$$ED(\%) = \frac{\text{Cantidad de azúcares reductores (mg)}}{\text{Cantidad de almidón (mg)}} \cdot 100 \% \quad (2.8)$$

- ✓ Determinación de la acidez

La determinación de la acidez se realiza bajo el mismo procedimiento analítico que se utiliza en el laboratorio de control de la calidad de la Planta de Glucosa (ICSG, 2019). Para ello se pesan 12,5 g del hidrolizado en una balanza técnica y se enrasa con agua destilada en un volumétrico de 50 mL. Ello se trasvasa a un erlenmeyer de 250 mL, se añaden 3 gotas de indicador de fenolftaleína y se valora con hidróxido de sodio (previamente normalizado con ácido oxálico) hasta la aparición del primer color rosado permanente. La acidez del hidrolizado se expresa como ácido clorhídrico y se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\text{acidez} = \frac{a \cdot c_{(\text{NaOH})} \cdot 0,0365 \cdot 100 \%}{m} \quad (2.9)$$

Donde:

α : volumen de la disolución de hidróxido de sodio consumido en la valoración [mL].

$c(\text{NaOH})$: concentración de hidróxido de sodio [mol/L].

m : masa de la muestra [g].

✓ Determinación del color

En el laboratorio de control de calidad de la Planta de Glucosa se realiza por comparación visual con determinados patrones de color, preparados con disoluciones de yodo o amarillo de metionilo; técnica cualitativa y altamente subjetiva. Es por ello que la determinación del color se realiza mediante un método espectrofotométrico, avalado por CRA (2019) y por Helstad (2019); que es totalmente válido para glucosa anhidra, siropes de glucosa y como es el caso, para hidrolizados de almidón de maíz.

Se determina la absorbancia a 450 nm y 600 nm de una muestra de hidrolizado en un espectrofotómetro con un blanco (agua destilada). Según el color del hidrolizado, se pueden hacer diluciones del 10 % o del 1 % para la lectura o bien, si no presenta un color intenso o turbidez, se realiza la medición directamente. El color se determina por la expresión siguiente:

$$\text{Color} = \frac{(A_{450 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \cdot \text{FD} \cdot 100}{b} \quad (2.10)$$

Donde:

$A_{450 \text{ nm}}$: absorbancia a 450 nm.

$A_{600 \text{ nm}}$: absorbancia a 600 nm.

FD: Factor de corrección de la dilución (en caso de emplearse el hidrolizado puro es igual a 3, si se efectúa una dilución al 10 % es 30 y si es al 1 % es 300).

b : Longitud de la celda [cm]

Para establecer el límite admisible de este parámetro, se cuantifica el color de los patrones de comparación visual por este método. El color no debe ser mayor que un patrón III, que se prepara a partir de la dilución de 15 mL de una solución de amarillo al 0,01 % en un volumétrico de 500 mL.

✓ Determinación del porcentaje de sólidos disueltos

El porcentaje de sólidos disueltos se mide con un refractómetro manual y se corrige la lectura según el valor de la temperatura, mediante la tabla de corrección que viene anexada al instrumento.

2.7 Optimización técnico-económica

Se efectúa la optimización técnico-económica ya que los parámetros que permiten un máximo equivalente de dextrosa no necesariamente son los más apropiados desde el punto de vista económico.

Se plantea como criterio de optimización minimizar el costo operacional, para lo cual se consideran las variables de influencia significativa sobre el equivalente de dextrosa que se contemplan en el modelo de superficie respuesta.

En la optimización técnico-económica la temperatura de licuefacción se mantiene constante debido a que la actividad de la α -amilasa, insumo muy costoso, se favorece a elevadas temperaturas. Un enfriamiento inferior a su valor operacional supone un desaprovechamiento del potencial catalítico de la enzima y del alto contenido energético de la corriente de almidón gelatinizado, lo que atenta directamente contra la economía de esta etapa. Se considera para este análisis una temperatura de licuefacción de 92,4 °C.

La dosis de α -amilasa, la dosis de glucoamilasa, la temperatura, el tiempo y el pH de sacarificación constituyen las variables de decisión de la optimización técnico-económica. Las cuatro primeras se consideran de acuerdo al intervalo de análisis de la modelación experimental (condición de frontera), sin embargo, el pH de sacarificación solamente se estudia entre 4 y 5,5. Ello se debe a que un valor por encima de 5,5 (valor propuesto para la licuefacción) supone incurrir en gastos por consumo de carbonato de sodio sin propiciar un incremento en el equivalente de dextrosa, ya que la máxima conversión se alcanza a valores de pH entre 4,4 y 5,4.

Se tiene como restricción que el equivalente de dextrosa debe ser igual a 92 %, valor a partir del cual se comercializa el sirope de glucosa. Esta restricción se formula a partir del modelo de superficie respuesta:

$$-321,6 + 0,1071 \cdot 92,4 + 2,469 \cdot D1 + 5,844 \cdot T2 + 71,251 \cdot pH2 + 53,112 \cdot D2 + 2,170 \cdot t2 - 0,0515 \cdot T2^2 - 7,299 \cdot pH2^2 - 23 \cdot D2^2 - 0,0321 \cdot t2^2 = 92 \quad (2.11)$$

Donde:

T1: temperatura de licuefacción [°C]

D1: dosis de α -amilasa [mg enzima/g almidón]

T2: temperatura de sacarificación [°C]

pH2: pH de sacarificación

D2: dosis de glucoamilasa [mg enzima/g almidón hidrolizado]

t2: tiempo de sacarificación [h]

2.7.1 Desarrollo de la función objetivo: costo de producción

Se desarrolla la función objetivo para la optimización técnico-económica a partir del costo operacional asociado a cada una de las variables de decisión. Para ello se modelan mediante balances de masa y energía las etapas del proceso donde la variación de estos parámetros repercute significativamente sobre la economía.

Se establece como base de cálculo 45 m³ de almidón hidrolizado (carga de un reactor de sacarificación), que representa 11 000 kg de sirope de glucosa a 65 °Bx (producto final). Ello se hace necesario porque la etapa de sacarificación, contrariamente a las anteriores, es discontinua.

✓ Costo asociado a la dosis de α -amilasa

El costo asociado a esta variable se determina como:

$$C_{D1} = D1 \cdot m_{\text{almidón}} \cdot C_{\alpha\text{-amilasa}} \quad (2.12)$$

Donde:

C_{D1} : costo asociado al empleo de la α -amilasa [CUP]

$C_{\alpha\text{-amilasa}}$: costo unitario de la α -amilasa [14,56 CUP /kg de acuerdo a Economía (2019)]

D1: dosis de α -amilasa [kg enzima/ kg almidón]

$m_{\text{almidón}}$: masa de almidón (base seca) en la licuefacción [kg].

La masa de almidón en la licuefacción es igual a la masa de sustrato de la sacarificación (base seca) para una carga del reactor:

$$m_{\text{almidón}} = V_R \cdot C_{(s)} \quad (2.13)$$

Donde:

V_R : volumen de una carga en el reactor de sacarificación [45 m³]

$C_{(s)}$: concentración de sustrato [350 kg/m³]

✓ Costo asociado a la dosis de glucoamilasa

Se determina de manera análoga al costo asociado a la dosis de α -amilasa:

$$C_{D2} = D2 \cdot m_{\text{almidón}} \cdot C_g \quad (2.14)$$

Donde:

C_{D2} : costo asociado al empleo de la glucoamilasa [CUP]

D2: dosis de glucoamilasa [kg enzima/ kg almidón]

C_g : costo unitario de la enzima glucoamilasa [7,91 CUP/kg de acuerdo a Economía (2019)]

✓ Costo asociado a la temperatura de sacarificación

El costo que se incurre para mantener la temperatura constante en la etapa de sacarificación se divide en tres partes fundamentales: el correspondiente al enfriamiento del hidrolizado en el intercambiador de placas (consumo de potencia por el agua de enfriamiento), al calentamiento del agua que circula por el serpentín del reactor (consumo de vapor) y al consumo de vapor en el intercambiador de calor de inactivación. En la figura 2.3 se ofrece un esquema que muestra su relación:

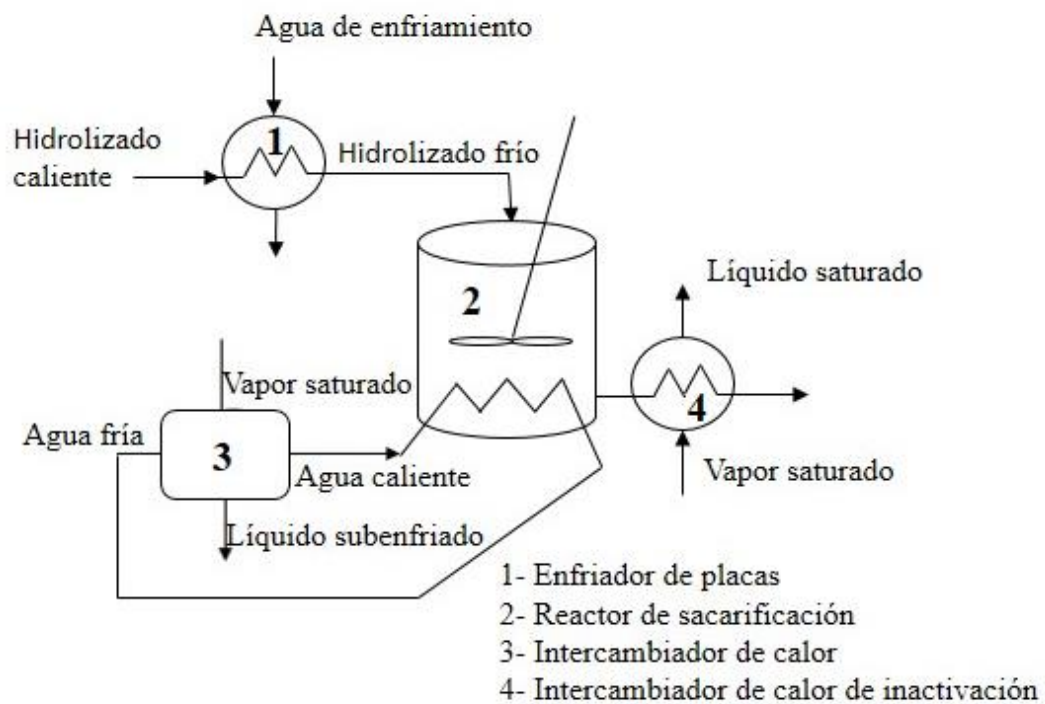


Figura 2.3: Relación tecnológica de los equipos de intercambio de calor en la sección sacarificación-inactivación.

El costo asociado a la temperatura de sacarificación se determina por la expresión 2.15:

$$C_{T_2} = C_{T(e)} + C_{T(m)} + C_{T(i)} \quad (2.15)$$

Donde:

C_{T_2} : costo asociado a la temperatura de sacarificación [CUP]

$C_{T(e)}$: costo del enfriamiento del hidrolizado [CUP]

$C_{T(m)}$: costo de mantener la temperatura de sacarificación [CUP]

$C_{T(i)}$: costo de inactivación de la enzima [CUP]

En el enfriamiento del hidrolizado hasta la temperatura de sacarificación no se considera el costo por consumo de agua, ya que existe suficiente disponibilidad en la piscina de enfriamiento y la cantidad de reposición es muy pequeña. A su vez, se requiere de un bajo tiempo de retención en el enfriadero producto a la temperatura de salida en la etapa de intercambio de calor (50 °C).

Entonces la repercusión económica está dada principalmente por el consumo de potencia por bombeo de acuerdo a la cantidad de hidrolizado a enfriar:

$$C_{T(e)} = P_B \cdot C_{kW} \cdot t \quad (2.16)$$

Donde:

P_B : potencia eléctrica que requiere la bomba [kW]

C_{kW} : costo unitario de la energía eléctrica [0,23 CUP/kW de acuerdo a Economía (2019)]

t : tiempo que se necesita para el enfriamiento de una carga de sacarificación [h]

Este tiempo se determina como:

$$t = \frac{V_R}{q} \quad (2.17)$$

Donde:

q : flujo de hidrolizado que procesa el equipo [7 m³/h]

A su vez, según Rosabal y Garcell (2006) la potencia eléctrica de la bomba se determina como:

$$P_B = \frac{P}{\eta} \quad (2.18)$$

Donde:

P: potencia hidráulica que se suministra al fluido [kW]

η : eficiencia eléctrica de la bomba [75 %]

La potencia que se suministra al fluido en este caso agua según Rosabal y Garcell (2006) se determina mediante la ecuación 2.19.

$$P = H \cdot W \cdot g \cdot 10^{-3} \quad (2.19)$$

Donde:

H: carga hidráulica [m]

W: flujo másico de fluido [kg/s]

g: aceleración de la gravedad [9,8 m/s²]

Se considera que la carga hidráulica es de 5 m, diferencia de altura entre la piscina del enfriadero y el intercambiador de calor.

El flujo de agua de enfriamiento necesario se determina mediante un balance de energía en el intercambiador de calor. El calor que cede la corriente de hidrolizado se determina como:

$$Q_{ced} = \rho_H \cdot q_H \cdot c_{pH} \cdot (T_H - T_2) \quad (2.20)$$

Donde:

Q_{ced} : calor cedido por la corriente de hidrolizado [kW]

ρ_H : densidad del hidrolizado al 35 % [1 133,86 kg/m³ de acuerdo a CRA (2018)]

q_H : flujo de hidrolizado que procesa el equipo [m³/s]

c_{pH} : capacidad calorífica del hidrolizado a la temperatura media entre la temperatura de entrada (92,5 °C) y el menor valor que puede alcanzar a la salida (50 °C) [3,42 kJ/kg °C, de acuerdo a CRA (2018)]

T_H : temperatura de salida del reactor de licuefacción [°C]

T_2 : temperatura de sacarificación [°C]

El calor absorbido por el agua de enfriamiento se determina como:

$$Q_{abs} = W_{agua} \cdot C_{p_{agua}} \cdot (T_{a2} - T_{a1}) \quad (2.21)$$

Donde:

Q_{abs} : calor absorbido por el agente de calentamiento [kW]

W_{agua} : flujo másico del agua [kg/s]

$C_{p_{\text{agua}}}$: capacidad calorífica del agua a la temperatura media (40 °C) [4,1785 kJ/kg °C de acuerdo a Cengel y Chajar (2015)]

T_{a1} : temperatura de entrada del agua [30 °C]

T_{a2} : temperatura de salida del agua [50 °C]

Luego, si se considera un 5 % de pérdidas de energía se tiene que:

$$Q_{\text{abs}} = 0,95 \cdot Q_{\text{ced}} \quad (2.22)$$

Finalmente se sustituyen las ecuaciones 2.20 y 2.21 en la ecuación 2.22 y se tiene que:

$$W_{\text{agua}} = \frac{0,95 \cdot \rho_H \cdot q_H \cdot C_{p_H} \cdot (T_H - T_2)}{C_{p_{\text{agua}}} \cdot (T_{a2} - T_{a1})} \quad (2.23)$$

El costo asociado a mantener la temperatura de operación está dado por el consumo de vapor, que depende de la temperatura de reacción y del tiempo al que se necesita mantener esta condición (tiempo de sacarificación). La incidencia económica del consumo de vapor en la etapa se determina a partir del combustible que es necesario emplear para su generación. Entonces, el costo económico de la etapa por concepto de temperatura y tiempo de reacción se determina como:

$$C_{T(m)} = (W_{\text{vapor}} \cdot \frac{1}{I_g \cdot \rho_c} \cdot C_{\text{comb}}) \cdot t_2 \quad (2.24)$$

Donde:

W_{vapor} : flujo de vapor [kg/h]

I_g : índice de generación de vapor [4,78 kg vapor/kg combustible de acuerdo a Economía (2019)]

ρ_c : densidad del combustible [1 023 kg/m³ según Poling, Thomsom, Firend, Rowley y Wilding (2018)]

C_{comb} : costo unitario del combustible [724 CUP /m³ de acuerdo a Economía (2019)]

t_2 : tiempo de sacarificación [h]

El consumo de vapor se determina mediante un balance de energía en el calentador de mezcla. Para determinar el calor cedido por el vapor saturado, se considera el calor involucrado en el cambio de fase y el calor sensible entre la temperatura de condensación y la de salida del agua de calentamiento, en la que se alcanza el equilibrio térmico:

$$Q_{ced} = W_{vapor} (H^{\circ}_f + c_{p_c} \cdot (T_{sat} - T_2)) \quad (2.25)$$

Donde:

Q_{ced} : calor cedido por el vapor [kW]

W_{vapor} : flujo de vapor saturado a 200 kPa [kg/s]

H°_f : entalpía de vaporización a 200 kPa [2 706,7 kJ/kg de acuerdo a Cengel y Chajar (2015)]

c_{p_c} : Capacidad calorífica a la temperatura media, entre la de saturación y la menor temperatura posible de sacarificación (50 °C) [4,2 kJ/kg °C de acuerdo a Cengel y Chajar (2015)]

T_{sat} : temperatura de saturación a 200 kPa [120 °C de acuerdo a Cengel y Chajar (2015)]

A su vez, el calor absorbido por el agua se determina como:

$$Q_{abs} = q_{agua} \cdot \rho_{agua} \cdot c_{p_{agua}} \cdot \Delta T \quad (2.26)$$

Donde:

q_{agua} : flujo de agua de calentamiento [$6,94 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$]

ΔT : diferencia entre la temperatura de salida del agua y de retorno en el calentador [5 °C]

ρ_{agua} : densidad del agua a la temperatura media entre el mayor (70 °C) y el menor valor (45 °C) posible de acuerdo temperatura de sacarificación [984,4 kg/m³ a 57,5 °C de acuerdo a Rosabal y Garcell (2006)]

$c_{p_{agua}}$: capacidad calorífica del agua a la temperatura media [4,184 kJ/kg °C de acuerdo a Cengel y Chajar (2015)]

Se tiene que la diferencia de temperaturas entre la entrada y salida del agua de calentamiento en el reactor es de 5 °C. Este depende de la agitación y del aislamiento del equipo, así como de la velocidad del agua de calentamiento en el sistema.

Luego, si se igualan las ecuaciones 2.25 y 2.26 y se despeja el flujo de vapor se tiene que:

$$W_{vapor} = \frac{q_{agua} \cdot \rho_{agua} \cdot c_{p_{agua}} \cdot \Delta T}{H^{\circ}_f + c_{p_c} \cdot (T_{sat} - T_2)} \quad (2.27)$$

La temperatura de sacarificación influye también sobre la demanda de vapor necesario para lograr la inactivación de la enzima. Su repercusión económica se determina de igual

manera por la ecuación 2.24, a diferencia de que se afecta por el tiempo que se necesita para inactivar toda la carga del reactor de sacarificación. Este tiempo se determina de acuerdo a la ecuación 2.16, donde en este caso el flujo de hidrolizado que procesa el intercambiador de calor de inactivación es 9 m³/h Economía (2019).

El flujo de vapor necesario se determina mediante un balance de energía en el intercambiador de calor. Este equipo emplea vapor a una presión de 200 kPa e intercambia energía a pocos grados de sobrecalentamiento hasta una condición de líquido saturado, por tal motivo, solamente se considera calor de cambio de fase. El calor que cede el vapor se determina por la ecuación siguiente:

$$Q_{ced} = W_{vi} \cdot H^{\circ}_f \quad (2.28)$$

En cambio, para el calor absorbido se emplea la ecuación siguiente:

$$Q_{abs} = q_H \cdot \rho_H \cdot cp_H \cdot (T_{H3} - T_2) \quad (2.29)$$

Donde:

T_{H3} : temperatura de inactivación (80 °C)

cp_H : capacidad calorífica del hidrolizado a la temperatura entre la temperatura de inactivación y el menor valor posible de sacarificación (50 °C) [3,37 kJ/kg °C de acuerdo a CRA (2018)]

Si se considera un 5 % de pérdida de energía se tiene que el consumo de vapor en función de la temperatura de sacarificación se determina mediante la expresión siguiente:

$$W_{vapor} = \frac{q_H \cdot \rho_H \cdot cp_H \cdot (T_{H4} - T_{H3})}{0,95 \cdot H^{\circ}_f} \quad (2.30)$$

✓ Costo asociado al tiempo de sacarificación

El tiempo de sacarificación además de influir en el costo de mantenimiento de la operación isotérmica en el reactor también repercute en el costo asociado a la agitación, tal como se muestra en la expresión siguiente:

$$C_{ag} = P_{ag} \cdot t_2 \cdot C_{kW} \quad (2.31)$$

Donde:

C_{ag} : costo asociado a la agitación [CUP]

P_{ag} : potencia eléctrica que requiere el motor del agitador [3,5 kW]

t_2 : tiempo de agitación [h]

✓ Costo asociado al pH de sacarificación

La incidencia de esta variable sobre la economía del proceso viene dada principalmente por el costo que se incurre en el consumo de ácido clorhídrico para su ajuste, el que se determina mediante la ecuación siguiente.

$$C_{pH2} = m_{(HCl)} \cdot C_{(HCl)} \quad (2.32)$$

Donde:

C_{pH2} : costo asociado al consumo de ácido clorhídrico [CUP]

$m_{(HCl)}$: cantidad que se consume de ácido clorhídrico [kg]

$C_{(HCl)}$: costo del ácido clorhídrico [0,292 CUP/kg de acuerdo a Economía (2019)]

La cantidad de ácido que se requiere se determina en base a la cantidad de iones hidronio que se deben de incorporar a una carga del reactor de sacarificación para lograr el pH de reacción. Para el pH de operación, la concentración de iones hidronio presente en el medio se determina como:

$$C_{(H^+)} = 10^{-pH} \quad (2.33)$$

Donde:

$C_{(H^+)}$: concentración de iones hidronio [kmol/m³]

pH: pH de operación

Por otro lado, el incremento de la cantidad de iones hidronio referidos como masa teórica de ácido clorhídrico necesaria se calcula por la expresión siguiente:

$$m_{(HCl)t} = V_{tanq} \cdot (10^{-pH} - 10^{-pHo}) \cdot M_{(HCl)} \quad (2.34)$$

Donde:

$m_{(HCl)t}$: masa de ácido clorhídrico teórica [kg]

V_{tanq} : volumen de la carga [45 m³]

pHo: pH inicial [5,5]

$M_{(HCl)}$: masa molar de ácido clorhídrico [36,46 kg/kmol de acuerdo a Poling *et al.* (2008)]

Como el ácido clorhídrico que se emplea en el proceso presenta una concentración de 370 kg/m³ (NEMINAG,2015) la cantidad real que se debe adicionar de este producto en disolución se determina mediante la ecuación siguiente:

$$m_{(\text{HCl})r} = \frac{m_{(\text{HCl})t}}{c_{(\text{HCl})}} \cdot \rho_{(\text{HCl})} \quad (2.35)$$

Donde:

$m_{(\text{HCl})r}$: masa de ácido clorhídrico real [kg]

$c_{(\text{HCl})}$: concentración de ácido clorhídrico [kg/m³]

$\rho_{(\text{HCl})}$: densidad del ácido clorhídrico al 37 % [1 120 kg/m³ de acuerdo a Poling *et al.* (2008)]

2.7.2 Implementación de la optimización técnico-económica por algoritmos genéticos

Se propone a los algoritmos genéticos como método de solución por las ventajas que ofrece respecto a los métodos tradicionales. Entre sus potencialidades se destaca el hecho de que en cada iteración no se trabaja con una única posible solución, sino con una población o generación entera de soluciones; lo que permite que sean menos vulnerables a óptimos locales en comparación con las técnicas clásicas. Estos permiten además acelerar el proceso de búsqueda de una solución al avanzar en más de una dirección, contrariamente a lo que sucede con los métodos convencionales.

Los algoritmos genéticos parten de una población inicial de individuos seleccionados al azar, de tal forma que cada uno de ellos representa una posible solución del problema. A cada uno de estos individuos, se les debe asignar un valor que represente su grado de adaptación, es decir, se especifica qué tan buena es esa solución para el problema. Al igual que en la naturaleza, los individuos mejor dotados (los que ofrecen las mejores soluciones) son los que más probabilidades tienen de ser seleccionados para reproducirse. Mientras que los individuos peor adaptados (los que ofrecen peores soluciones) son los que tienen más dificultad para propagar su "material genético" a las nuevas generaciones.

Después, cada nueva generación contará con una mayor proporción de características mejores de tal forma que, si el algoritmo genético ha sido diseñado correctamente, la población convergerá hacia una solución óptima del problema para un determinado número de iteraciones.

En la optimización se emplea el algoritmo genético que trae implementado el *software* Matlab (2015), para lo cual se crean tres ficheros que corresponden: a la función objetivo, la restricción y la optimización con las opciones del algoritmo genético y las condiciones de frontera (anexo 5).

El método requiere de una función de ajuste, que asigna un número real a cada posible solución codificada; esta es la función que se crea en el fichero de igual nombre ('costo'). La función de ajuste depende de un vector x que tiene tantos componentes como número de variables de decisión se tengan (NVARs: $x(1)$; $x(2)$; $x(3)$; $x(4)$ y $x(5)$). La convergencia del algoritmo aporta un vector x cuyos componentes constituyen la solución de la optimización y retorna el costo total que suponen los valores de las variables de decisión (FVAL). Se mantienen los restantes parámetros que trae por defecto el software como son: la tasa de entrecruzamiento, la cantidad de generaciones, la razón de migración, entre otros.

Capítulo 3: Análisis de resultados

En este capítulo se analizan los resultados de la presente investigación que comprenden esencialmente: la caracterización enzimática y del sustrato que se emplea, la modelación matemática del proceso hidrolítico así como la optimización técnico-económica de las variables del proceso que más influyen en este proceso a nivel industrial.

3.1 Caracterización enzimática

Las enzimas que se emplean se encontraban desde hace aproximadamente tres años en condiciones de almacenamiento desfavorables para su conservación en la Planta de Glucosa. Por tal motivo, surge la necesidad de caracterizarlas para detectar algún posible grado de afectación y de envejecimiento, así como evaluar la potencialidad de su uso en el estudio proceso industrial.

La actividad enzimática de la enzima α -amilasa es de 25 629 U/mL. A su vez presenta una concentración de proteína de 39 mg/mL, así como una actividad enzimática específica de 663U/mg. La glucoamilasa tiene una actividad enzimática de 21 678 U/mL y una concentración de proteína de 100 mg/mL; lo que define una actividad enzimática específica de 216 U/mg. Estos resultados coinciden con los aportados por el fabricante en su catálogo (BIOCON, 2019).

3.1.1 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

El estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática resulta de vital importancia en la evaluación de la factibilidad tecnológica del empleo de las enzimas y en conjunto con el efecto de la estabilidad; permiten establecer los parámetros operacionales de mejor actividad catalítica.

✓ Enzima α -amilasa

La enzima α -amilasa presenta un 90 % de actividad enzimática en un intervalo de temperatura entre 70 y 95 °C con un valor máximo a 90 °C, lo que demuestra la capacidad de hidrólisis de esta enzima a elevados valores de temperatura. Este resultado concuerda con lo informado por el fabricante (BIOCON, 2019), el que plantea que se alcanza la máxima actividad a 90 °C y alto potencial catalítico en un intervalo entre 95 y 105 °C. El comportamiento de la actividad enzimática de la α -amilasa respecto a la temperatura se ofrece en la figura 3.1:

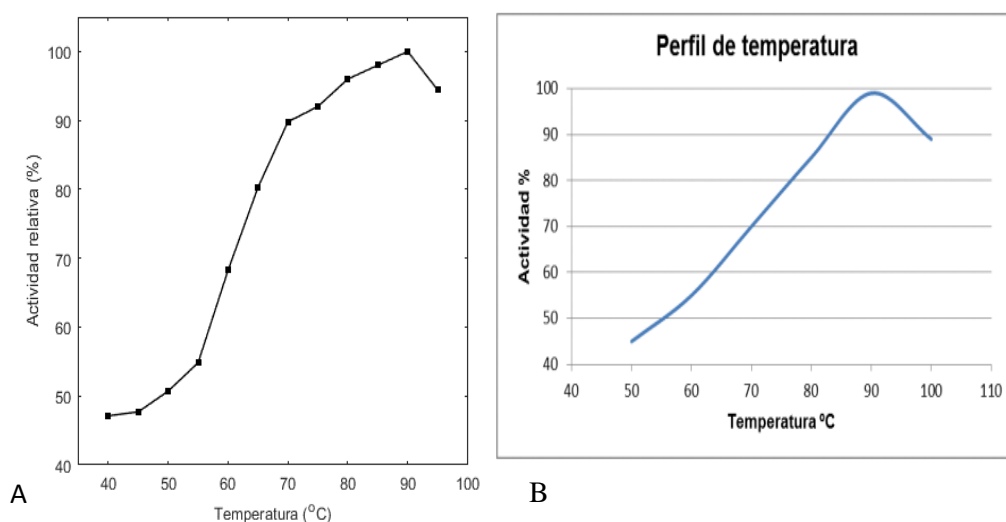


Figura 3.1: Comportamiento de la actividad enzimática de la α -amilasa frente a la temperatura. A: determinado experimentalmente. B: informado por el fabricante (BIOCON, 2019).

En la literatura se refieren otras variedades de α -amilasa de aplicación industrial con igual origen biológico y similar comportamiento frente a elevadas temperaturas; las que se presenta en la tabla 3.1:

Tabla 3.1: Temperatura de trabajo de diferentes α -amilasas.

Enzima	Temperatura (°C)	Fuente
α -amilasa termorresistente	90	Eggleston, Gober y Cyr (2013)
α -amilasa termorresistente (Termamyl Tipo L)1	80-105	Whitehurt y Law (2002)
α -amilasa termorresistente Termamyl1	85-90	NOVOZYMES (2011)
α -amilasa termorresistente (Termamyl Tipo LS)1	80-105	Whitehurt y Law (2002)
α -amilasa termorresistente (Termamyl Tipo LC)1	80-110	Whitehurt y Law (2002)
α -amilasa termorresistente	95-110	Balakrishnan <i>et al.</i> (2019)

La enzima α -amilasa presenta más de un 80 % de su actividad enzimática a un pH entre 5 y 8 con un valor máximo de actividad catalítica a un pH entre 6,5 y 7; que concuerda con lo especificado por el fabricante en su catálogo BIOCON (2019). En la figura 3.2 se muestra el comportamiento de la actividad enzimática respecto al pH:

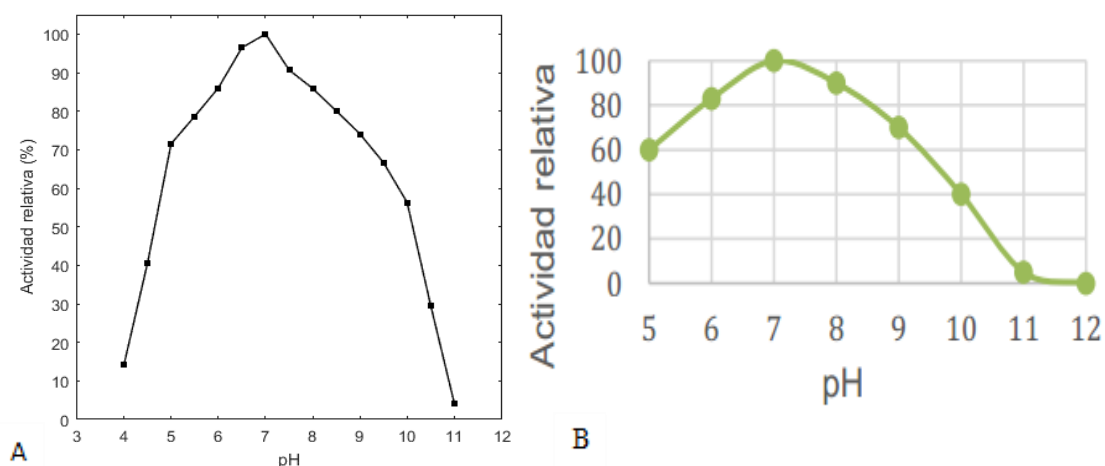


Figura 3.2: Comportamiento de la actividad enzimática de la α -amilasa frente al pH. A: determinado experimentalmente. B: informado por el fabricante

En la tabla 3.2 se ofrecen algunas variedades de α -amilasa de interés industrial con igual origen microbiano y similar comportamiento frente al pH.

Tabla 3.2: Valores de pH de trabajo y de mayor actividad enzimática de algunas α -amilasas.

Enzima	pH	Referencia
α -amilasa	5,5-7	Wong (2018)
α -amilasa termorresistente	5,5-9,0	Eggleston <i>et al.</i> (2013)
α -amilasa termorresistente Termamyl1	5,5-6,5	NOVOZYMES (2011)
α -amilasa termorresistente (Termamyl Tipo LS)1	5,7-6,5	Whitehurt y Law (2002)
α -amilasa	7,5	de Souza y de Oliveira Magalhaes (2010)
α -amilasa termorresistente	5-7	Balakrishnan <i>et al.</i> (2019)
α -amilasa	7	Balakrishnan <i>et al.</i> (2019)

✓ Enzima glucoamilasa

La enzima glucoamilasa presenta más de un 90 % de su actividad a valores de pH entre 3,5 y 5,5 a 60 °C, intervalo que coincide con el que señala el fabricante (BIOCON, 2019). Además, presenta una tendencia frente al pH y un máximo valor a 4,5, lo que concuerda significativamente con lo que se ofrece en su catálogo. En la figura 3.3 se muestra este comportamiento:

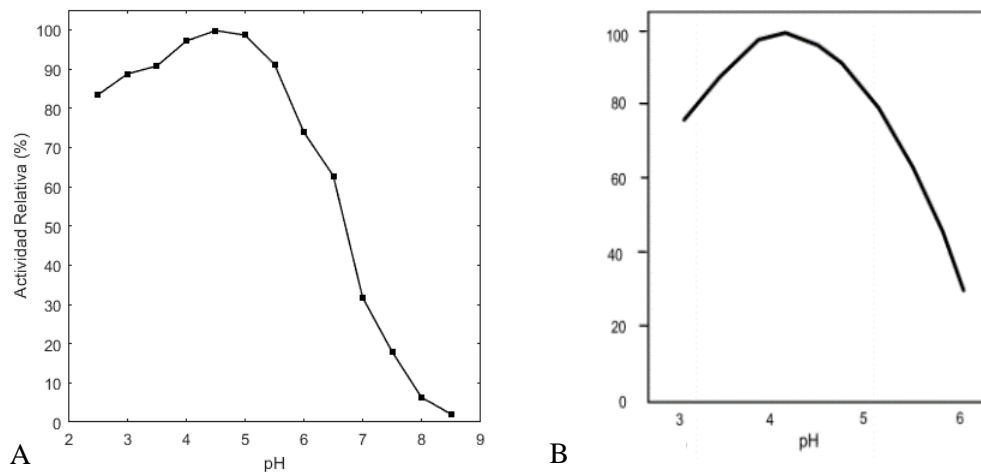


Figura 3.3: Comportamiento de la actividad enzimática de glucoamilasa frente al pH. A: determinado experimentalmente. B: informado por el fabricante

En el caso de la temperatura, a un pH igual a 4,5 esta enzima presenta más de un 85 % de actividad catalítica a valores entre 60 y 70 °C, intervalo que concuerda con lo que plantea el fabricante en el catálogo (65 a 70 °C). La máxima actividad enzimática se verifica a 65 °C, valor que igualmente coincide con BIOCON (2019). En la figura 3.4 se muestra tal comportamiento:

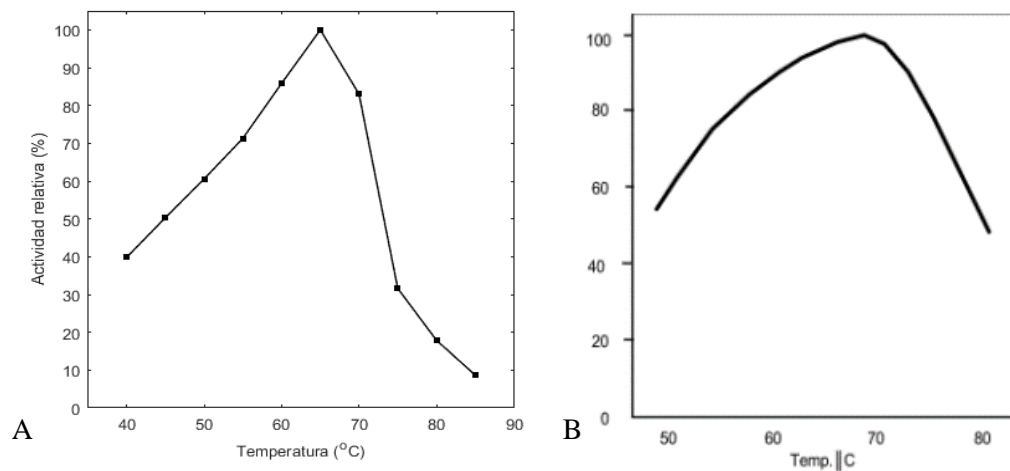


Figura 3.4: Comportamiento de la actividad enzimática de la glucoamilasa frente a la temperatura. A: determinado experimentalmente. B: informado por el fabricante

Este comportamiento coincide con los referidos en diferentes catálogos de otras glucoamilasas de uso industrial con similar comportamiento frente al pH y la temperatura. Según DUPONT (2012) la glucoamilasa de *Trichoderma reeseide*, que se comercializa bajo el nombre de *Destillase CS WB*, presenta una mayor actividad a pH de 4,5 (con un

90 % de esta a valores ente 4 y 5) y a una temperatura entre 60 y 65 °C. De igual manera la glucoamilasa *AMG 300 L* que produce Novozymes de *Aspergillus niger* presenta un 100 % de actividad a un pH entre 3,5 y 4,5 (NOVOZYMES, 2011). La enzima *OPTIDEX L-400* que produce Genencor a partir de *Aspergillus Niger* presenta su mayor actividad a un pH entre 4 y 4,5 y una temperatura cercana a los 65 °C (Genencor International, 2006).

En la literatura diversas fuentes refieren como típico este comportamiento, tal como se ofrece en la tabla siguiente:

Tabla 3.3: Valores de temperatura y pH de mayor actividad catalítica para la enzima glucoamilasa.

Temperatura de mayor actividad (°C)	pH de mayor actividad	Referencia bibliográfica
60	3,4-5	Friedl (2019)
55-65	3,5-5	Whitehurst y Law (2002)
-	4-4,4	Wong (2018)
60	4-5	Helstad (2019)
60	4,0-5,2	Whitehurst y Van Oort (2010)
50 - 70	4,5-6,5	Gatt, Rigal y Vandebossche (2018)
-	5	Läufer (2019)

Los resultados obtenidos demuestran que las enzimas presentan un potencial catalítico suficiente y un comportamiento frente al pH y la temperatura favorable para emplearse en el estudio del proceso de hidrólisis enzimática del almidón de maíz. Estos valores se encuentran dentro de los límites de análisis del pH y la temperatura en la modelación por superficie respuesta, lo que permite inferir por este sentido que en el análisis de la hidrólisis enzimática se consideran las condiciones en que estas expresan su mayor actividad posible.

3.2 Caracterización de la suspensión de almidón que se emplea como sustrato

La composición química de la suspensión de almidón influye directamente sobre la actividad catalítica de la enzima. Por ello, es de vital importancia demostrar la similitud entre la corriente simulada que se emplea en la experimentación y la que se procesa a escala industrial.

Debe tenerse en cuenta que simular la suspensión de almidón del proceso industrial constituye la mejor alternativa. Obtener el almidón a partir del grano de maíz es un proceso totalmente complejo; que es imposible recrear en el laboratorio por las complejas etapas de separación y refinación que se verifican en la industria. Además, resulta totalmente inviable utilizar muestras de la suspensión de almidón directamente extraídas del proceso industrial; ya que ello implica utilizar preservantes químicos para impedir la contaminación microbiológica, lo que afecta la actividad de la enzima.

La suspensión de almidón simulada presenta una composición de grasas, proteínas y dióxido de azufre que cumplen con las especificaciones de calidad que avalan su uso como sustrato en el proceso hidrolítico, tal como se ofrece en la tabla siguiente:

Tabla 3.4: Resultados experimentales y normados de la caracterización de la suspensión de almidón.

Experimento	Grasa (%)	Proteína (%)	Dióxido de azufre (ppm)
1	0,93	0,69	64
2	0,95	0,73	61
3	0,93	0,75	59
Valor normado en NEMINAG (2015)	Menor que 1 %	Menor que 0,8 %	Menor que 70 ppm

3.3 Desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del almidón

Al concluir la etapa de gelatinización, se tiene que para todos los experimentos se logra la total solubilización del almidón en virtud de una hidrólisis parcial; ya que la prueba cualitativa del yoduro-yodato resulta negativa. Este resultado de gran importancia, pues indica una correcta homogenización y calentamiento uniforme de la muestra en la etapa experimental.

El buen desarrollo de la gelatinización es imprescindible para garantizar la máxima degradación enzimática. Al respecto Okafor *et al* (2019) acota que el almidón sin gelatinizar es un sustrato relativamente inerte cuya degradación por enzimas ocurre lentamente. De modo contrario, el almidón solubilizado es más fácilmente atacado por las amilasas (Hartel *et al.*, 2018; Läufer, 2019).

✓ Caracterización de la calidad de los hidrolizados

Se realiza el procesamiento estadístico de los parámetros de calidad de los hidrolizados para evaluar su cumplimiento con las normas operacionales mediante el *software* Statgraphics Plus (2000). Hecho de gran importancia ya que para la toma de decisiones no es suficiente con alcanzar un determinado valor de equivalente de dextrosa; sino que se debe garantizar que esas condiciones no supongan una sobrecarga al sistema de purificación y refinación.

Todos los parámetros de calidad analizados (color, contenido de acidez y de sólidos disueltos) cumplen con lo normado para la etapa de hidrólisis, producto a que los valores máximos y mínimos se encuentran perfectamente acotados en el intervalo permisible (anexo 6). No se verifica un desarrollo considerable del color debido a que no existe en la etapa un calentamiento excesivo, contrariamente a lo que sucede en procesos posteriores como la inactivación y concentración. Este parámetro incide significativamente sobre el consumo de carbón activado en la etapa de refinación, insumo que es altamente costo.

El porcentaje de acidez cumple con la norma correspondiente, lo que indica que el menor pH al cual se estudia la sacarificación no supone un sobreconsumo de carbonato de sodio (agente regulador del pH en el proceso industrial). El contenido de sólidos disueltos cumple con la norma operacional e indica que la mayor parte del almidón de maíz presente en la suspensión inicial se convierte en azúcares solubles (lo que corrobora la correcta gelatinización en la experimentación). Un valor deficiente, supone un mayor consumo de vapor en la etapa de concentración para alcanzar los 65 °Bx, valor al cual se comercializan los siropes de glucosa.

3.4 Análisis de la modelación empírica de la hidrólisis enzimática

Los resultados del diseño de experimentos descrito en el epígrafe 2.3 se ofrecen en el anexo 7. A través de estos se obtiene un modelo de superficie respuesta, que contempla

los términos lineales y cuadráticos de los factores experimentales. Se excluyen de este las interacciones entre las variables independientes por ser el diseño estadístico de naturaleza fraccionada.

Mediante el diagrama de Pareto se analiza la significación de las interacciones de los factores experimentales sobre la variable dependiente. Ello parte de un análisis de varianza (anexo 8), donde los efectos de mayor influencia presentan un valor de probabilidad menor que 0,05 para una confianza del 95 %. El diagrama de Pareto que resulta de este análisis se ofrece en la figura siguiente:

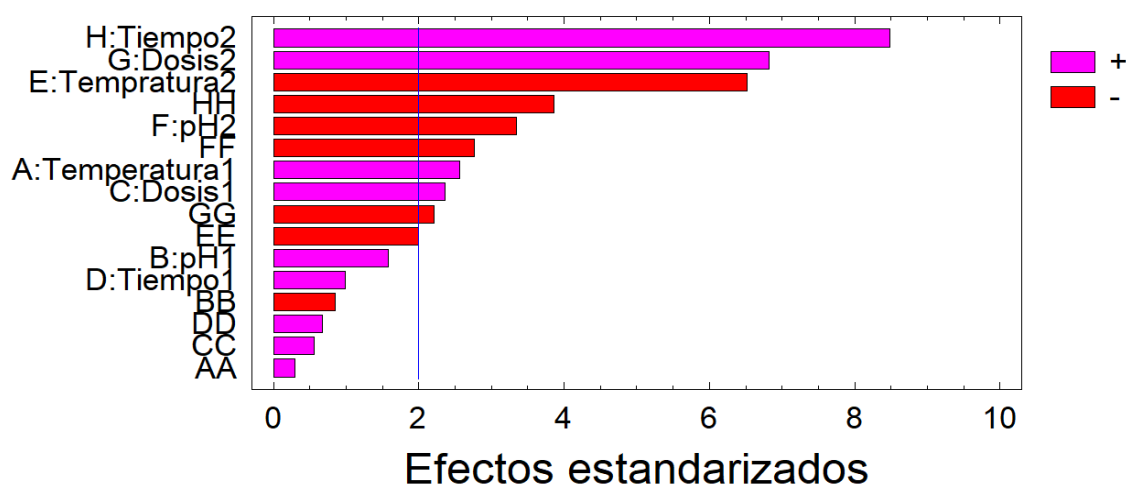


Figura 3.5: Diagrama de Pareto

Se aprecia que el tiempo de sacarificación y la dosis de glucoamilasa son los factores experimentales que más influyen en el equivalente de dextrosa, ambos de forma positiva, lo que significa que un aumento en su valor conduce a un incremento en la respuesta.

El efecto del tiempo de sacarificación viene dado por la propia naturaleza de la hidrólisis de la glucoamilasa (exoenzima); ya que esta solamente remueve las moléculas de glucosa de las cadenas de dextrinas que resultan de la conversión parcial del almidón desde el extremo no reductor de la molécula (BeMiller y Whistler, 2009; Suriya *et al.*, 2016; Wong, 2018; Xian y Feng, 2018). Muchas de ellas constituyen dextrinas límites que no fueron totalmente hidrolizadas por la α -amilasa por la existencia de enlaces de ramificación α -1,6-glucosídicos; los que son más lentamente degradadas por esta enzima en comparación con los α -1,4-glucosídicos (BeMiller y Whistler, 2009; Lee y deMan, 2018; Whitehurt y Law, 2002). Por tal motivo se necesita de un tiempo relativamente mayor a 12 horas (límite inferior del factor) para alcanzar un mayor valor en la respuesta.

Además, la concentración de sustrato es considerable, de forma tal que este no limita a la hidrólisis. De lo contrario, a una concentración insuficiente para una dosis de enzima dada, es muy probable que culmine la hidrólisis por la limitación de sustrato y que desde ese momento el tiempo no influya. Por otro lado, el intervalo de estudio es muy amplio en comparación con el de otros factores; presenta un valor inferior de 12 horas, significativamente menor si se considera que en ocasiones se necesita de hasta 72 horas (Fernandes y Carvalho, 2016; Zhu, Wu y Hua, 2019).

El comportamiento de la dosis de glucoamilasa se encuentra estrechamente relacionado con el del tiempo de sacarificación, o sea existe una concentración de sustrato suficiente para altas dosis de enzimas. La temperatura de sacarificación influye significativamente de forma negativa, ya que durante prolongados tiempos de exposición a una temperatura mayor de 60 °C la actividad enzimática de la glucoamilasa disminuye exponencialmente (termoestabilidad); tal como se aprecia en BIOCON (2019).

El efecto del pH en la sacarificación repercute de forma negativa debido a la alta variación que presenta la actividad enzimática en los valores extremos de este factor. En el valor superior del intervalo de análisis se tiene una menor actividad respecto al inferior, tal como se observa en la figura 3.3. A su vez, a medida que se incrementa el pH, disminuye su estabilidad (BIOCON, 2019).

La temperatura de licuefacción y la dosis de α -amilasa presentan una repercusión estadísticamente significativa en el equivalente de dextrosa, aunque en menor magnitud que los factores propios de la sacarificación. En el caso de la temperatura se debe a la variación que experimenta la actividad de la enzima α -amilasa en los valores extremos de este factor, tal como se muestra en la figura 3.1. Además, esta es una enzima termorresistente, lo que supone una mejor tolerancia a elevadas temperaturas.

La dosis de la α -amilasa tiene una influencia significativa, ya que esta enzima es la encargada de condicionar el sustrato para la acción de la glucoamilasa. Un incremento en la dosis de enzima, dentro de ciertos límites admisibles y a una concentración de sustrato suficiente, provoca una mayor conversión del almidón. Este análisis solamente es válido para el tiempo de hidrólisis que se considera, ya que a un valor mayor para estas dosis de enzimas pueden obtenerse compuestos no degradables por la glucoamilasa (Whitehurst y Van Oort, 2010). La hidrólisis parcial puede finalizar a partir de un valor crítico por la

formación de dextrinas límites; lo que hace que disminuya significativamente la influencia de este factor.

El efecto cuadrático de la dosis de glucoamilasa, del tiempo y pH en la sacarificación tienen una influencia significativa, lo que anticipa un punto de inflexión apreciable para cada uno de ellos en el modelo de superficie de respuesta.

El pH de licuefacción no influye sobre el equivalente de dextrosa. En base a ello se plantea no realizar el ajuste en esta etapa, sino desarrollarla al mismo pH que presenta la suspensión de almidón, que coincide con el límite inferior de este factor (5,5). Ello permite reducir el gasto por consumo de carbonato de calcio y ácido clorhídrico, a la vez que se disminuye la salinidad del hidrolizado final. De igual manera sucede con el tiempo de licuefacción, por lo que se establece un tiempo de retención de 1 hora; lo que permite aumentar el ritmo productivo y disminuir la complejidad operacional.

Se excluye del modelo matemático los factores que no ejercen una influencia significativa sobre la variable respuesta. De esta manera se obtiene una expresión menos compleja, de igual nivel de descripción y con mayor calidad de ajuste. La ecuación 3.1 corresponde al modelo matemático que resulta:

$$ED = -321,6 + 0,1071 \cdot 92,4 + 2,469 \cdot D1 + 5,844 \cdot T2 + 71,251 \cdot pH2 + 53,112 \cdot D2 + 2,170 \cdot t2 - 0,0515 \cdot T2^2 - 7,299 \cdot pH2^2 - 23 \cdot D2^2 - 0,0321 \cdot t2^2 \quad (3.1)$$

Donde:

T1: temperatura de licuefacción [°C]

D1: dosis de α -amilasa [mg enzima/g almidón]

T2: temperatura de sacarificación [°C]

pH2: pH de sacarificación

D2: dosis de glucoamilasa [mg enzima/g almidón hidrolizado]

t2: tiempo de sacarificación [h]

3.4.1 Análisis de la calidad de ajuste del modelo de superficie respuesta

El valor de probabilidad correspondiente a la prueba de Durbin-Watson (0,1559) es mayor que 0,05 para una confianza del 95 %, lo que significa que los errores experimentales no se encuentran correlacionados entre sí (Colón *et al.*, 2017; Jiménez *et al.*, 2015). Ello reviste gran importancia para evaluar la calidad del trabajo experimental, ya que indica que todas las variables que inciden sobre el equivalente de dextrosa se encuentran

controladas o contempladas en la modelación. Dicho análisis se corrobora con el comportamiento que se ofrece en la figura 3.6:

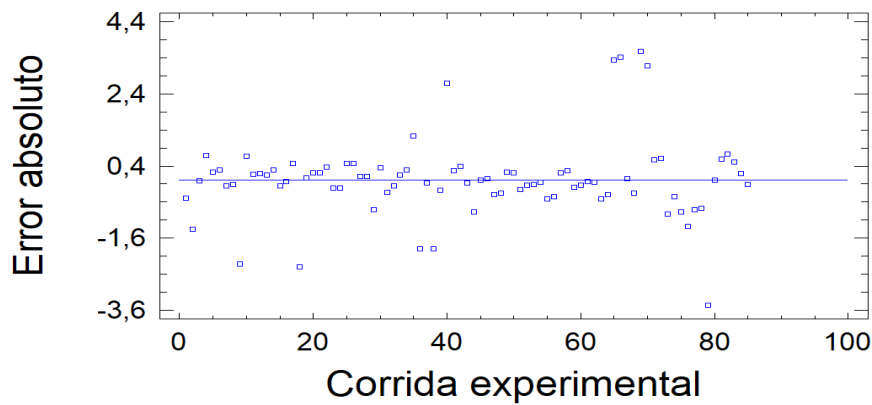


Figura 3.6: Comportamiento de los residuos según la corrida experimental.

A su vez, el hecho de que los errores no estén correlacionados respecto al orden de los experimentos resulta de gran importancia; ya que por razones propiamente organizativas no se consideró el efecto de la aleatoriedad en la planificación experimental.

Al analizar la variación entre los valores observados y predichos de la variable respuesta se tiene que un 27,06 % de los experimentos no se encuentran en el intervalo de estimación que establece el *software* para un 95 % de confianza (anexo 9). También, de los 85 valores observados solamente un 5,88 % presenta un error relativo mayor al 10 %, por lo que se considera de acuerdo a este criterio que el modelo explica correctamente la realidad experimental. Además, tal como se refleja en la figura 3.7 los valores observados y predichos se agrupan favorablemente alrededor de la diagonal de 45°:

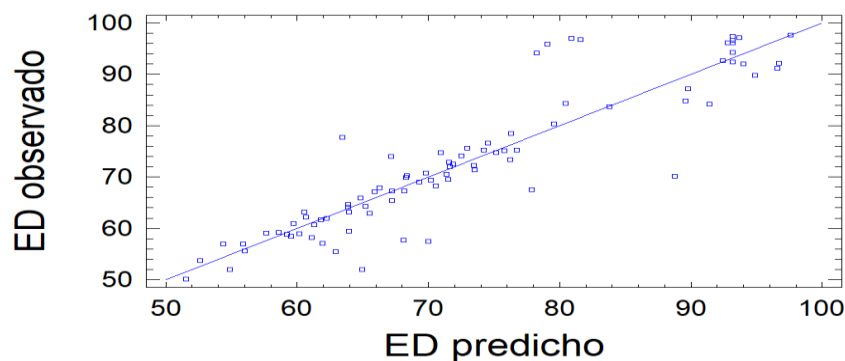


Figura 3.7: Relación entre los valores observados y predichos.

Mediante la prueba de Fisher se analiza la pérdida de ajuste por un estimador interno de la varianza del error experimental. En este caso como el valor de probabilidad del análisis de regresión múltiple es menor que 0,01 hay una relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99 %. De esta forma se establece que no existen evidencias desde un punto de vista estadístico de mala calidad de ajuste del modelo.

3.4.2 Sensibilidad del modelo de superficie respuesta

Una vez que se comprueba que el modelo describe adecuadamente la realidad experimental, se analiza la sensibilidad de la respuesta ante la variación de los términos independientes. Se realiza este análisis con los factores experimentales de la etapa de sacarificación, por ser los de mayor influencia sobre el equivalente de dextrosa y, además porque están presentes en el modelo sus términos cuadráticos (representan una superficie diferente a un plano).

La relación que existe entre el tiempo de sacarificación y la dosis de glucoamilasa con la variable respuesta se ofrece en la figura 3.8:

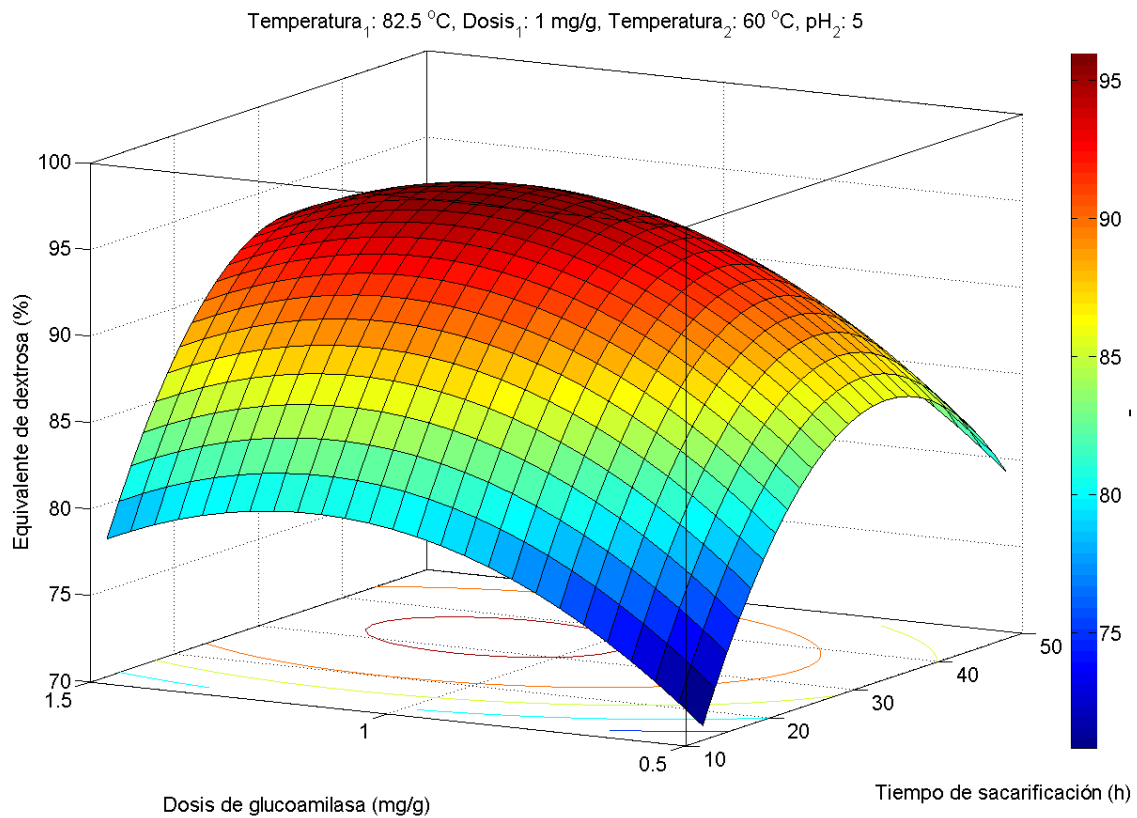


Figura 3.8: Relación del tiempo de sacarificación y la dosis de glucoamilasa con el equivalente de dextrosa.

En esta se aprecia una región de máximo equivalente de dextrosa para un tiempo de sacarificación entre 28 y 39 horas, a una dosis de glucoamilasa de 0,95 a 1,35 mg de enzima/ g de almidón hidrolizado. Para este caso, a un tiempo de hidrólisis constante se evidencia como al aumentar la dosis de enzima se incrementa significativamente el equivalente de dextrosa hasta un valor máximo, producto a que aumenta el número de sitios activos disponibles para una cantidad suficiente de sustrato.

Sin embargo, para dosis mayores se obtiene una menor producción de azúcares reductores debido al fenómeno de la reversión. Este consiste en la capacidad que presenta esta enzima de catalizar la reacción inversa de la hidrólisis para producir maltosa e isomaltosa, principalmente a altas concentración de azúcares reductores (Hua y Yang, 2016; Negi y Vibha, 2017; Subin y Bhat, 2016; Whitehurt y Law, 2002). Este fenómeno es totalmente indeseable en el proceso, por tal motivo cuando se alcanza el valor deseado se procede inmediatamente a su inactivación.

La relación que existe entre el pH y la temperatura de sacarificación se muestra en la figura 3.9:

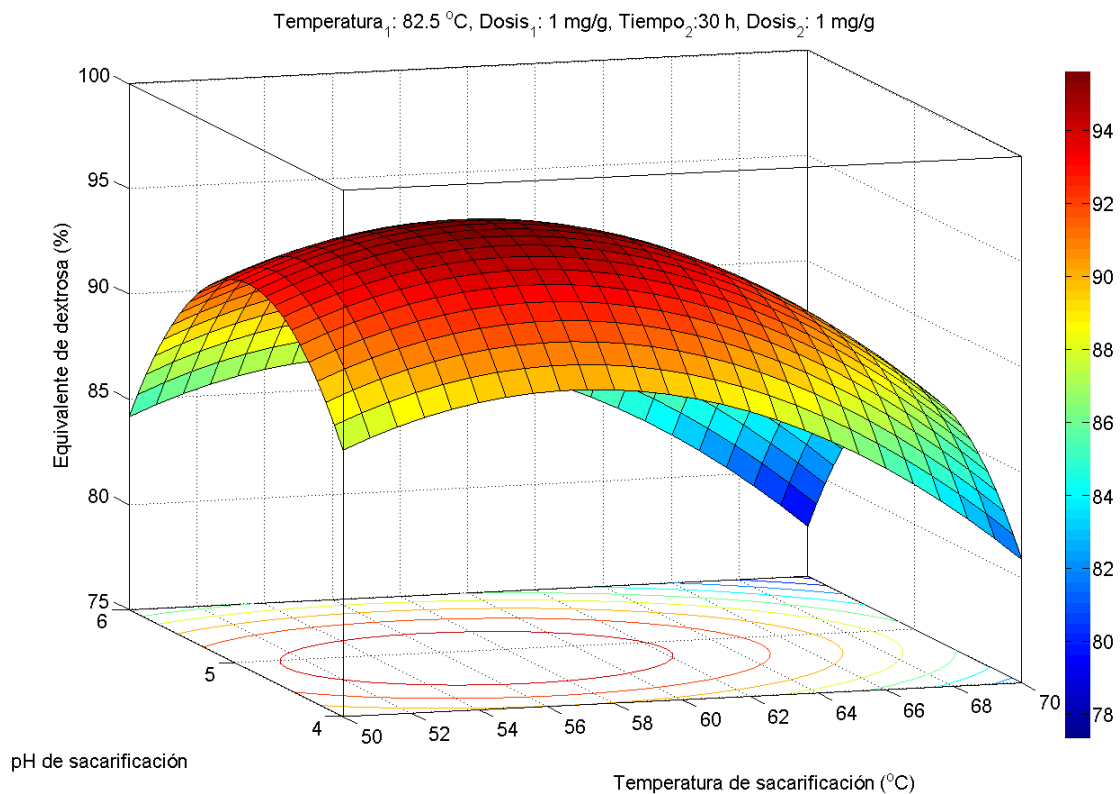


Figura 3.9: Relación del pH y la temperatura de sacarificación con el equivalente de dextrosa.

En ella se aprecia una región de máximo equivalente de dextrosa a un pH entre 4,4 y 5,35, intervalo que incluye el valor de máxima actividad y estabilidad tal como se especifica en BIOCON (2019). El control del pH en una reacción enzimática es sumamente importante porque la velocidad de reacción presenta valores máximos al igual que la estabilidad de la enzima a un rango definido de pH (Lee y deMan, 2018). La acidez del medio influye marcadamente sobre la actividad catalítica: valores excesivamente altos o bajos alteran la estructura de la enzima y conllevan en última instancia a su desnaturalización (Subin y Bhat, 2016). Este comportamiento se produce porque cambia la carga de los grupos que son ionizables de la enzima, ya sea en su superficie y/o en su interior (Grahame, Bryksa y Yada, 2015).

Además, con el aumento de la temperatura de sacarificación se favorece la hidrólisis hasta alcanzar una zona de máxima producción de glucosa a una temperatura de 51 a 62 °C. A partir de este último valor, dicha producción disminuye por el efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad, pues a 60 °C la enzima presenta su mayor actividad catalítica; sin embargo, durante un tiempo de exposición prolongado dicha actividad disminuye exponencialmente (BIOCON, 2019).

En el anexo 10 se muestran los gráficos de contorno de la superficie respuesta.

3.4.3 Determinación de los parámetros operacionales que permiten obtener un máximo equivalente de dextrosa

A partir del modelo de superficie de respuesta se determinan los parámetros operacionales que permiten un máximo equivalente de dextrosa mediante el *software* Statgraphics Plus (2000). El valor óptimo de equivalente de dextrosa que se puede obtener para un 95 % de confianza es de 98,93 %. En la tabla 3.5 se muestran los valores de los factores experimentales que condicionan esta respuesta:

Tabla 3.5: Valores de los factores experimentales que permiten el máximo equivalente de dextrosa

Factor	Valor
Temperatura de licuefacción [°C]	92,41
pH de licuefacción	6,33
Dosis de α -amilasa [mg enzima/g almidón]	1,50
Tiempo de licuefacción [h]	1,00
Temperatura de sacarificación [°C]	56,83
pH de sacarificación	4,88
Dosis de glucoamilasa [mg enzima/g almidón hidrolizado]	1,15
Tiempo de sacarificación [h]	34,37

El valor de la temperatura de licuefacción se corresponde con los valores comunes a que se verifica la etapa a escala industrial. Al respecto, Läufer (2019) plantea que encuentra alrededor de 90 °C, Friedl (2019) entre 80 y 90 °C, Whitehurt y Law (2002) a 95 °C y Hua y Yang (2016) entre 90 y 100 °C.

El valor del tiempo de la primera etapa de hidrólisis se encuentra como valor típico de operación de acuerdo a lo planteado por Whitehurst y Van Oort (2010) y Carvalho y Fernandes (2019). De igual manera sucede con el pH de licuefacción, de acuerdo a BeMiller y Whistler (2009); Carvalho y Fernandes (2019); Hua y Yang (2016); Raghul y Bhat (2016); Whitehurt y Law (2002).

La temperatura de sacarificación también coincide con los valores operacionales del proceso industrial. Autores como: BeMiller (2019); Fernandes y Carvalho (2016); Friedl

(2019); Hua y Yang (2016); Läufer (2019); Whitehurt y Law (2002) informan como valores típicos temperaturas comprendidas entre 55 y 60 °C.

El pH de la segunda etapa se encuentra entre los valores usuales según BeMiller y Whistler (2009); Fernandes y Carvalho (2016); Friedl, 2019; Läufer, 2019; Whitehurst y Van Oort (2010); Whitehurt y Law (2002); Zhu *et al.* (2019). Igual comportamiento se tiene para el tiempo de sacarificación, de acuerdo a lo señalado por BeMiller y Whistler (2009); Zhu *et al.* (2019).

Se comprueba de forma experimental que es posible alcanzar valores semejantes de equivalente de dextrosa que el predicho por el modelo para las condiciones óptimas (error relativo inferior a un 5 %), tal como se ofrece en la tabla siguiente:

Tabla 3.6: Resultados experimentales para las condiciones operacionales que permiten un valor máximo de equivalente de dextrosa.

Experimento	Equivalente de dextrosa observado (%)	Error relativo (%)
1	94,17	4,8
2	96,53	2,4
3	97,12	1,8

3.5 Resultados de la optimización técnico-económica

Mediante la optimización técnico-económica en el *software* Matlab (2015) se obtiene la mejor combinación de los parámetros operacionales, que garantizan un hidrolizado con un equivalente de dextrosa suficiente para su comercialización (igual a 92 %) al costo operacional mínimo posible.

Al ser opción *exitflag* del algoritmo genético igual a 1, indica que este converge exitosamente hacia una solución que implica un valor mínimo en la función objetivo y que, a su vez cumple con la restricción de un equivalente de dextrosa igual a 92 %. Ello es sumamente importante para análisis donde se aplique esta técnica, ya que permite corroborar la correcta funcionalidad de sus operadores, así como la calidad de la población inicial (definida por el propio programa). El resultado de la optimización se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 3.7: Resultados de la optimización técnico-económica

Factor	Valor
Dosis de α -amilasa [mg enzima/g almidón]	0,50
Dosis de glucoamilasa [mg enzima/g almidón hidrolizado]	1,08
Temperatura de sacarificación [°C]	59,15
Tiempo de sacarificación [h]	22,60
pH de sacarificación	4,88

Esta solución implica un costo operacional mínimo de 1 055,6 CUP para una carga del reactor de sacarificación o 95,95 CUP por cada 1 000 kg de sirope de glucosa (65 °Bx) por concepto de dosificación de enzimas, tiempo, pH y temperatura de sacarificación. Ello no significa que sea el costo de operación involucrado en el proceso, sino que es el menor en que se puede incurrir para alcanzar un ED de 92 % en las etapas hidrolíticas; de acuerdo a las operaciones de mayor incidencia técnico-económica que se consideran. En otras palabras, el costo operacional mínimo que se presenta no involucra aquellos que son invariables ante los valores que adopten los parámetros operacionales, por ejemplo: la mano de obra, la amortización, el costo de la suspensión de almidón, entre otros.

En la figura 3.10 se muestra la repercusión económica que presentan las operaciones tecnológicas contempladas en la modelación técnico-económica sobre el costo operacional mínimo de las etapas hidrolíticas:

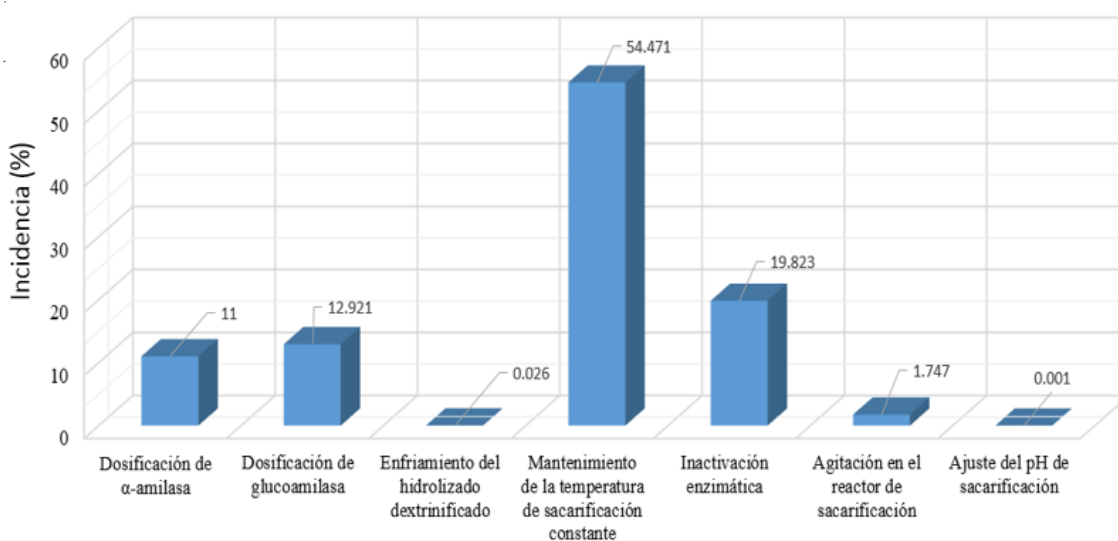


Figura 3.10: Incidencia de las operaciones tecnológicas sobre el costo de operación total contemplado.

Se evidencia como se mantiene en el óptimo técnico-económico, el pH de sacarificación al que se alcanza un máximo de equivalente de dextrosa; ya que este presenta una incidencia significativa sobre esta variable y tiene una repercusión económica despreciable (0,001 %) en comparación con los restantes factores experimentales. Por tal motivo, para alcanzar un equivalente de dextrosa de 92 % es económicamente conveniente efectuar la sacarificación a este valor, que garantiza la mayor actividad catalítica de la enzima por este sentido y prescindir de mejores condiciones de actividad en otras variables de mayor incidencia económica.

Mantener la condición isotérmica de sacarificación es la operación de mayor incidencia económica, lo que se debe al prolongado tiempo de reacción que se necesita para alcanzar elevados valores de equivalente de dextrosa. Por tal motivo, como se aprecia en los resultados de la optimización, la minimización del costo operacional está encaminada hacia la disminución de este tiempo, aunque ello suponga como compensación una mayor dosis de enzima.

El valor óptimo de temperatura de sacarificación desde un punto de vista económico tiene gran similitud al que se alcanza un máximo equivalente de dextrosa, ya que influye marcadamente sobre esta variable. No es factible económicamente desarrollar la etapa al menor valor de temperatura (50 °C). Ello se debe a que aumenta sustancialmente el costo de inactivación en el intercambiador de calor C7600 por concepto de aumento del consumo de vapor, a pesar de ser el de mantener la operación isotérmica en el reactor, el mayor costo asociado (figura 3.10). El comportamiento descrito anteriormente se muestra en la figura siguiente:

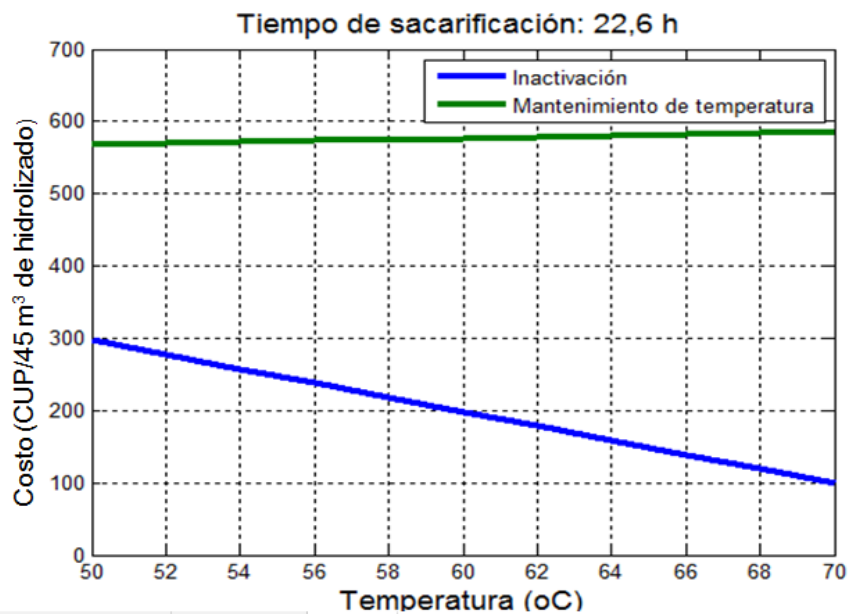


Figura 3.11: Relación de los principales costos asociados a la temperatura de sacarificación.

Se comprueba que es posible alcanzar un equivalente de dextrosa de 92 % a las condiciones que resultan de la optimización técnico-económica. Tal como se aprecia en la siguiente tabla, existe una variación inferior a un 5 % entre el equivalente de dextrosa determinado experimentalmente y el que restringe la optimización (92 %).

Tabla 3.8: Resultados experimentales para las condiciones operacionales que permiten un valor máximo de equivalente de dextrosa.

Experimento	Equivalente de dextrosa observado (%)	Error relativo (%)
1	94,2	2,34
2	93,4	1,50
3	93,5	1,60

Conclusiones parciales del capítulo:

1. La enzima α -amilasa tiene una actividad enzimática específica de 663 U/mg de proteína y mayor actividad a una temperatura entre 70 y 95 °C y a un pH entre 5 y 8.
2. La enzima glucoamilasa tiene una actividad enzimática específica de 216 U/mg de proteína y mayor actividad a una temperatura entre 60 y 70 °C y a un pH entre 3,5 y 5,5.
3. El pH y el tiempo de licuefacción no ejercen influencia significativa sobre el equivalente de dextrosa, contrariamente a lo que sucede con las dosis de α -amilasa y glucoamilasa, temperatura de licuefacción, pH, tiempo y temperatura de sacarificación.
4. El costo operacional de mantenimiento de la temperatura constante en la sacarificación es el que más influye sobre el total asociado a las variables operacionales de la hidrólisis.

Conclusiones:

1. Mediante la optimización técnico-económica se determina que una dosis de α -amilasa y de glucoamilasa de 0,50 mg enzima/g almidón y de 1,08 mg enzima/g almidón hidrolizado respectivamente, una temperatura de sacarificación de 60 °C, un tiempo de sacarificación de 23 horas así como un pH de sacarificación de 5, permiten una mejor eficiencia técnico-económica del proceso hidrolítico.
2. La caracterización enzimática manifiesta que a partir de los valores de actividad específica de las enzimas hidrolíticas y el comportamiento de esta frente al pH y la temperatura, pueden ser utilizadas en la hidrólisis industrial del almidón de maíz.
3. Se obtiene un modelo de superficie respuesta que describe la realidad experimental con una adecuada calidad de ajuste.
4. Se determina que influyen de manera significativa sobre el equivalente de dextrosa, la dosis de α -amilasa y glucoamilasa, temperatura de licuefacción, pH, tiempo y temperatura de sacarificación.
5. Los costos operacionales que más repercuten sobre la economía del proceso hidrolítico son: el asociado a mantener la temperatura constante en la sacarificación, la inactivación enzimática y la dosificación de las enzimas.

Recomendaciones:

Modelar el proceso de hidrólisis enzimática en una escala de banco para una descripción más acertada del proceso industrial objeto análisis.

Bibliografía

1. Abdulaal, W. (2018). Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochemistry*, 19. doi:10.1186/s12858-018-0094-8
2. Abidi, M., Iram, A., Furkan, M. y Naeem, A. (2017). Secondary structural alterations in glucoamylase as an influence of protein aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.086.
3. Adeoyo, O. R., Pletschke, B. y Dames, J. F. (2018). Purification and characterization of an amyloglucosidase from an ericoid mycorrhizal fungus (*Leohumicola incrustata*). *AMB Express*, 8(1), 154. doi:10.1186/s13568-018-0685-1
4. Agama-Acevedo, E., Flores-Silva y Bello-Perez, L. A. (2019). Cereal Starch Production for Food Applications. En: M. T. P. Silva Clerici y M. Schmiele (Eds.), *Starches for Food Application* (pp. 71-102): Academic Press.
5. Amirbandeh, M. y Taheri-Kafrani, A. (2016). Immobilization of glucoamylase on triazine-functionalized Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite: Improved stability and reusability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1183-1191. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.092>
6. Amirbandeh, M., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A. y Gaillard, C. (2017). Triazine-functionalized chitosan-encapsulated superparamagnetic nanoparticles as reusable and robust nanocarrier for glucoamylase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 119-127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.001>
7. Aung, S., Shein, H. H. H., Aye, K. N. y Nwe, N. (2018). Environment-Friendly Biopolymers for Food Packaging: Starch, Protein, and Poly-lactic Acid (PLA). En: S. Ahmed (Ed.), *Bio-based Materials for Food Packaging: Green and Sustainable Advanced Packaging Materials* (pp. 173-195). Singapore: Springer.
8. Ayodeji, A. O., Bamidele, O. S., Kolawole, A. y Ajele, J. O. (2017). Physicochemical and kinetic properties of a high salt tolerant *Aspergillus flavus* glucoamylase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 35-40. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.11.002>
9. Bagheri, A., Khodarahmi, R., y Mostafaie, A. (2014). Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food Chemistry*, 161, 270-278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.095>
10. Balakrishnan, D., Kumar, S. y Sugathan, S. (2019). Amylases for Food Applications—Updated Information. In B. Parameswaran, S. Varjani, y S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability*. Singapore: Springer.
11. BeMiller, J. y Whistler, R. (2009). *Starch: Chemistry and Technology* (3 ed.). Ámsterdam: Elsevier.
12. BeMiller, J. (2019). Starches: Conversions, Modifications, and Uses. En: BeMiller, J. (Ed.), *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)* (pp. 191-221): AACC International Press.

13. Berski, W., Ziobro, R., Witczak, M. y Gambuś, H. (2018). The retrogradation kinetics of starches of different botanical origin in the presence of glucose syrup. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.019
14. Binod, P., Papamichael, E., Varjani, S. y Sindhu, R. (2019). Introduction to Green Bioprocesses: Industrial Enzymes for Food Applications. En: B. Parameswaran, S. Varjani, y S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing* (pp. 1-8). Singapore: Springer Singapore.
15. BIOCON. (2019). Product Data Sheet. Retrieved from www.biocon.es
16. Carvalho, F. y Fernandes, P. (2019). Enzymes in Sweeteners Production. En: B. Parameswaran, S. Varjani, y S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing* (pp. 151-179). Singapore: Springer.
17. Cengel, Y. y Chajar, A. (2015). *Heat and Mass Transfer: Fundamental y Applications* (5 ed.). Nueva York: McGrawHill.
18. Chen, S., Yang, D., Dong, B., Li, N., y Dai, X. (2019). Sludge age impacted the distribution, occurrence state and structure of organic compounds in activated sludge and affected the anaerobic degradability. *Chemical Engineering Journal*, 123261. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123261>
19. Colón, J., Alvarez, C., Vinot, M., Lafuente, F. J., Ponsá, S., Sánchez, A. y Gabriel, D. (2017). Characterization of odorous compounds and odor load in indoor air of modern complex MBT facilities. *Chemical Engineering Journal*, 313, 1311-1319. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.026>
20. CRA. (2018). *Critical data tables: Corn sweeteners, starches and other corn carbohydrate products* (4 ed.). Washington: Corn Refiners Association.
21. CRA. (2019). *Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association*. <https://corn.org/analytical-methods/>
22. Das, R. y Kayastha, A. M. (2019). Enzymatic hydrolysis of native granular starches by a new β -amylase from peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Chemistry*, 276, 583-590. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.058>
23. de Souza, P. M. y de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41(4), 850-861. doi:10.1590/S1517-83822010000400004
24. DUPONT. (2012). Destillase CS WB. In (pp. 4). Nueva York: Dupont S. A.
25. Economía, D. (2019, 21 de mayo del 2019). [Información sobre costos, precios y normas de consumo].
26. Eggleston, G., Gober, J., y Cyr, E. S. (2013). Development of an industrial method to quantitatively measure carry-over amylase activity in raw and refined sugars. *International Sugar Journal*, 115, 123-131.
27. El-Dalatony, M. M., Salama, E.-S., Kurade, M. B., Kim, K.-Y., Govindwar, S. P., Kim, J. R y Jeon, B.-H. (2019). Whole conversion of microalgal biomass into biofuels through successive high-throughput fermentation. *Chemical Engineering Journal*, 360, 797-805. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.042>

28. Elmarzugi, N. A., El Enshasy, H. A., Abdulhamid, M., Hasham, R., Aziz, A., Elsayed, E y Muhant, N. (2014). α -amylase economic and application value. *World J. Pharm. Res*, 3, World J. Pharm. Res.
29. Eshra, D. H., El-Iraki, S. M. y Abo Bakr, T. (2014). Performance of starch hydrolysis and production of corn syrup using some commercial enzymes. *International Food Research Journal*, 21, 815-821.
30. Fallahi, P., Habte-Tsion, H.-M. y Rossi, W. (2018). Depolymerizing enzymes in human food: Bakery, dairy products, and drinks. En: C. S. Nunes y V. Kumar (Eds.), *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 211-237): Academic Press.
31. Fan, C., Zhou, M., Tang, X., Zeng, G., Xu, Q., Song, B. y Wei, J. (2019). Triclosan enhances short-chain fatty acid production from sludge fermentation by elevating transcriptional activity of acidogenesis bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 123285. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123285>
32. Fernandes, P. y Carvalho, F. (2016). Enzymes in Food Processing. En: G. S. Dhillon y S. Kaur (Eds.), *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production* (pp. 173-199). San Diego: Academic Press.
33. Fox, G. (2018). Chapter 16 - Starch in Brewing Applications. En: M. Sjöö y L. Nilsson (Eds.), *Starch in Food* (2 ed.) (pp. 633-659): Woodhead Publishing.
34. Friedl, A. (2019). Bioethanol from Sugar and Starch. In M. Kaltschmitt (Ed.), *Energy from Organic Materials (Biomass): A Volume in the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology, Second Edition* (pp. 905-924). Nueva York: Springer.
35. Gatt, E., Rigal, L. y Vandenbossche, V. (2018). Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review. *Industrial Crops and Products*, 122, 329-339. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>
36. Genencor International, G. (2006). Multifect AA21L: Low calcium, low pH, Thermoestable Alpha-amylase. In D. Company (Ed.), (pp. 1-4). Dinamarca.
37. Grahame, D., Bryksa, B. y Yada, R. (2015). Factors affecting enzyme activity In R. Yada (Ed.), *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. Cambridge: Elsevier.
38. Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C. y Yada, R. Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. In R. Y. Yada (Ed.), *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (pp. 11-55): Woodhead Publishing.
39. Gunaratne, A. (2018). Heat-Moisture Treatment of Starch. In Z. Sui y X. Kong (Eds.), *Physical Modifications of Starch* (pp. 15-36). Singapore: Springer.
40. Hanif, E., Qader, A. y Zohra, R. (2018). Role of Metal Ions, Surfactants and Solvents on Enzymatic Activity of Partial Purified Glucoamylase from *Aspergillus niger* ER05. *Journal of Basic y Applied Sciences*, 14, 141-146. doi:10.6000/1927-5129.2018.14.21
41. Hargono, H., Kumoro, A. y Jos, B. (2018). Enzymatic hydrolysis of bitter cassava and Gadung starches with different compositions at low temperature. *MATEC Web of Conferences*, 156, 01009. doi:10.1051/mateconf/201815601009
42. Hartel, R. W., von Elbe, J. H. y Hofberger, R. (2018). *Confectionery Science and Technology* (1 ed.). Singapore: Springer International Publishing.

43. Helstad, S. (2019). Corn Sweeteners. In S. O. Serna-Saldivar (Ed.), *Corn* (3 ed., pp. 551-591). Oxford: AACC International Press.
44. Hua, X. y Yang, R. (2016). Enzymes in Starch Processing. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in Food and Beverage Processing* (pp. 138-169). Nueva York: CRC Press.
45. ICSG. (2019). Industria Confitera Sirope de Glucosa. Métodos de ensayo para almidón y glucosa. In (pp. 138). Cienfuegos: LABIOFAM.
46. Jain, D. y Katyal, P. (2018). Optimization of gluco-amylase production from *Aspergillus* spp. for its use in saccharification of liquefied corn starch. *3 Biotech*, 8(2), 101. doi:10.1007/s13205-018-1131-4
47. Jiménez, J., Guardia-Puebla, Y., Cisneros-Ortiz, M. E., Morgan-Sagastume, J. M., Guerra, G. y Noyola, A. (2015). Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. *Chemical Engineering Journal*, 259, 703-714. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.031>
48. Kennelly, P. y Rodwell, V. (2013). Emzimas: cinética. En: R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell y P. A. Weil (Eds.), *Harper: Bioquímica ilustrada* (28 ed., pp. 62-83). México: McGraw Hill.
49. Läufer, A. (2019). Starch Biorefinery Enzymes. En: K. Wagemann y N. Tippkötter (Eds.), *Biorefineries* (pp. 137-152). Cham: Springer International Publishing.
50. Law, B. (2002). The nature of enzymes and their action in foods. En: R. Whitehurst y B. Law (Eds.), *Enzymes in Food Technology* (1 ed., pp. 1-18). Reino Unido: CRC Press.
51. Lee, C. Y. y deMan, J. M. (2018). Enzymes. En: J. M. deMan, J. W. Finley, W. J. Hurst, y C. Y. Lee (Eds.), *Principles of Food Chemistry* (pp. 397-433). Springer International Publishing.
52. Li, X. (2018). Resistant Starch and Its Applications. En: Z. Jin (Ed.), *Functional Starch and Applications in Food* (pp. 63-90). Singapore: Springer Singapore.
53. Lin, L., Zhang, L., Cai, X., Liu, Q., Zhang, C. y Wei, C. (2018). The relationship between enzyme hydrolysis and the components of rice starches with the same genetic background and amylopectin structure but different amylose contents. *Food Hydrocolloids*, 84, 406-413. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.029>
54. Meng, H., Li, D. y Zhu, C. (2018). The effect of ultrasound on the properties and conformation of glucoamylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 411-417. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.129>
55. Miao, M., Jiang, B., Jin, Z. y BeMiller, J. N. (2018). Microbial Starch-Converting Enzymes: Recent Insights and Perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1238-1260. doi:10.1111/1541-4337.12381
56. Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9 ed.). Nueva York: Wiley.

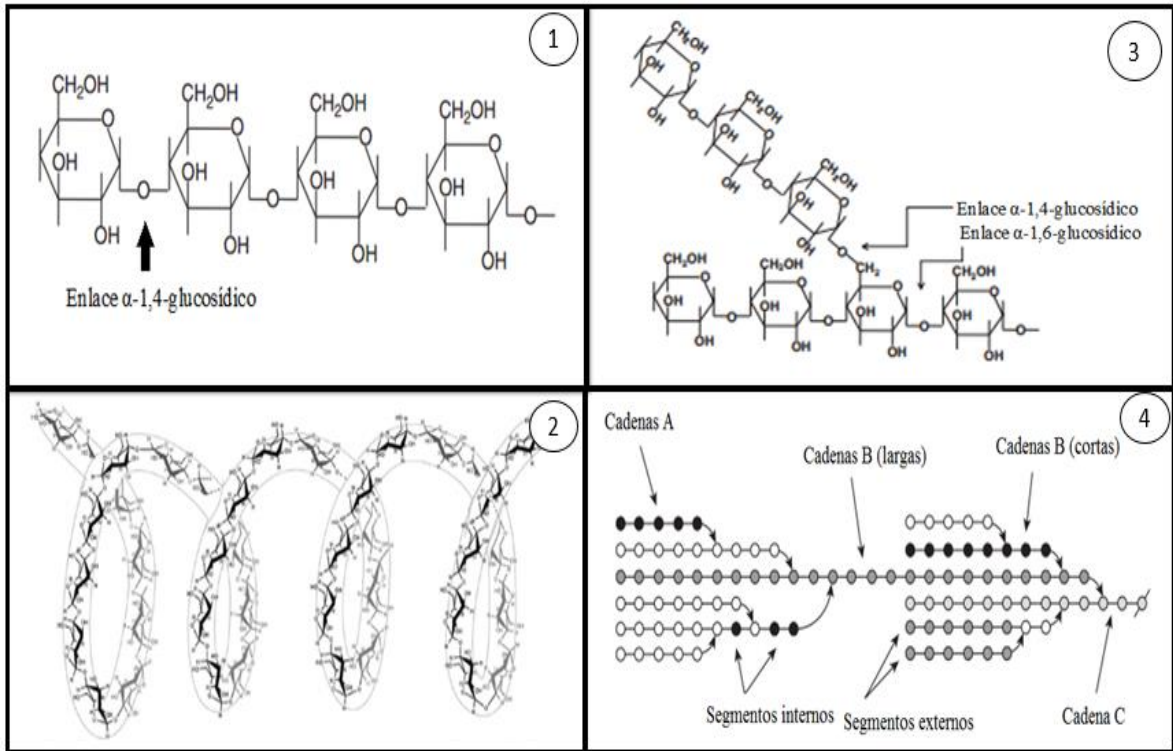
57. Negi, S. y Vibha, K. (2017). Amylolytic Enzymes: Glucoamylases. En: A. Pandey, S. Negi, y C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 25-46): Elsevier.
58. Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2019). *Lehninger: Principles of Biochemistry* (7 ed.). Nueva York: Macmillan Learning.
59. NEMINAG. (2015). Empresa Labiofam (Cienfuegos) UEB Glucosa Enzimática. Cienfuegos: LABIOFAM.
60. NOVOZYMES. (2011). Enzyme information. En: (pp. 7). Dinamarca: NOVOZYMES S.A.
61. Okafor, D. C., Ofoedu, C. E., Nwakaudu, A., y Daramola, M. O. (2019). Enzymes as Additives in Starch Processing: A Short Overview. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 149-168): Academic Press.
62. Paludo, L. C., Frantz, S. C., Ançay, R., Stutz, H., Dantas, T. L. P. y Spier, M. R. (2018). Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 529-537. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.022>
63. Parashar, D. y Satyanarayana, T. (2017). Engineering a chimeric acid-stable α -amylase-glucoamylase (Amy-Glu) for one step starch saccharification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 274-281. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.083>
64. Park, S. H., Na, Y., Kim, J., Kang, S. D. y Park, K.-H. (2018). Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 299-312. doi:10.1007/s10068-017-0261-5
65. Pasin, T. M., Benassi, V. M., Heinen, P. R., Damasio, A. R. d. L., Cereia, M., Jorge, J. A. y Polizeli, M. d. L. T. d. M. (2017). Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 779-788. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.016>
66. Poling, B., Thomsom, G., Firend, D., Rowley, R. y Wilding, W. (2008). Physical and Chemical Data. In G. D y R. Perry (Eds.), *Engineers' Handbook* (8 ed., pp. 44-186). Nueva York: McGraw-Hill.
67. Preiss, J. (2018). Plant Starch Synthesis. En: M. Sjöö & L. Nilsson (Eds.), *Starch in Food* (Second Edition) (pp. 3-95): Woodhead Publishing.
68. Punekar, N. S. (2018). *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (1 Ed.). Singapore: Springer.
69. Purich, D. y R, Allison. (2002). *The Enzyme Reference: A Comprehensive Guidebook to Enzyme Nomenclature, Reactions, and Methods* (1 ed.): Academic Press.
70. Raghul, S. y Bhat, S. (2016). Enzymes: Basics and Development of Novel Biocatalysts. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in Food and Beverage Processing* (1 ed., pp. 3-38). Nueva York: CRC Press.
71. Rathna, R., Nakkeeran, E., Varjani, S. y Madhumitha, B. (2019). Intriguing Disposition of Marine Algae-Derived Enzymes in Food Biotechnology. En: B.

- Parameswaran, S. Varjani, y S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing* (pp. 305-321). Singapore: Springer Singapore.
72. Rosabal, J., y Garcell, L. (2006). *Hidrodinámica y separaciones mecánicas* (3 ed. Vol. 1). La Habana: Félix Varela.
 73. Sakwa, L., Cripwell, R. A., Rose, S. H. y Viljoen-Bloom, M. (2018). Consolidated bioprocessing of raw starch with *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing fungal alpha-amylase and glucoamylase combinations. *FEMS Yeast Research*, 18(7). doi:10.1093/femsyr/foy085
 74. Schmiele, M., Sampaio, U. M. y Pedrosa Silva Clerici, M. T. (2019). Basic Principles: Composition and Properties of Starch. In M. T. P. Silva Clerici y M. Schmiele (Eds.), *Starches for Food Application* (pp. 1-22): Academic Press.
 75. Sindhu, R., Binod, P. y Pandey, A. (2017). 1 - α -Amylases. In A. Pandey, S. Negi, y C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 3-24): Elsevier.
 76. Singh, R. S., Singh, T. y Pandey, A. (2019). Chapter 1 - Microbial Enzymes—An Overview. En: R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, y C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 1-40): Elsevier.
 77. Subin, S. R. y Bhat, S. G. (2016). Enzymes: Basics and Development of Novel Biocatalysts. En: M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in Food and Beverage Processing* (1 ed., pp. 3-38). New York: CRC Press.
 78. Sunarti, T. C., Derosya, V. y Yuliasih, I. (2018). Acid Modification of Sago Hampas for Industrial Purposes. En: H. Ehara, Y. Toyoda, y D. V. Johnson (Eds.), *Sago Palm: Multiple Contributions to Food Security and Sustainable Livelihoods* (pp. 271-281). Singapore: Springer.
 79. Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P. y Kim, S. K. (2016). Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. In S.-K. Kim y F. Toldrá (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 79, pp. 161-177): Academic Press.
 80. Syed, F., Ali, K., Asad, M. J., Fraz, M. G., Khan, Z., Imran, M. y Ahmad, A. (2016). Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 309-317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.002>
 81. Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C. y Torres, J. (2018). Almidón resistente: Características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Revista chilena de nutrición*, 45, 271-278. doi:10.4067/s0717-75182018000400271
 82. Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J. y Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 453-461. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>
 83. Whitehurst, R. y Van Oort, M. (2010). *Enzymes in bread making* (1 ed.). Nueva York: John Wiley y Sons.

84. Whitehurt, R. y Law, B. (2002). *Enzymes in Food Technology* (1 ed.). Reino Unido: Sheffield Academic Press.
85. Wong, D. (2018). *Mechanism and Theory in Food Chemistry* (2 Ed.). Singapore: Springer International Publishing.
86. Xian, L. y Feng, J.-X. (2018). Purification and biochemical characterization of a novel mesophilic glucoamylase from *Aspergillus tritici* WZ99. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1122-1130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.095>
87. Zhao, C., Huo, N., Feng, H. y Li, Z. (2018). An Overview and Application of Amylase. Paper presented at the International Conference on Energy, Power and Materials Engineering (EPME 2018). <http://www.dpi-proceedings.com/index.php/dteees/article/viewFile/24657/24290>
88. Zhu, D., Wu, Q. y Hua, L. (2019). 3.01 - Industrial Enzymes. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (3 ed.) (pp. 1-13). Oxford: Pergamon.
89. Zhu, L., Ma, T., Mei, Y. y Li, Q. (2017). Enhancing the hydrolysis of corn starch using optimal amylases in a high-adjunct-ratio malt mashing process. *Food Science and Biotechnology*, 26(5), 1227-1233. doi:10.1007/s10068-017-0140-0

Anexos:

Anexo 1: Estructura de los componentes del almidón



1: Representación de una cadena lineal de amilosa

[Fuente: Whitehurst y Van Oort (2010)]

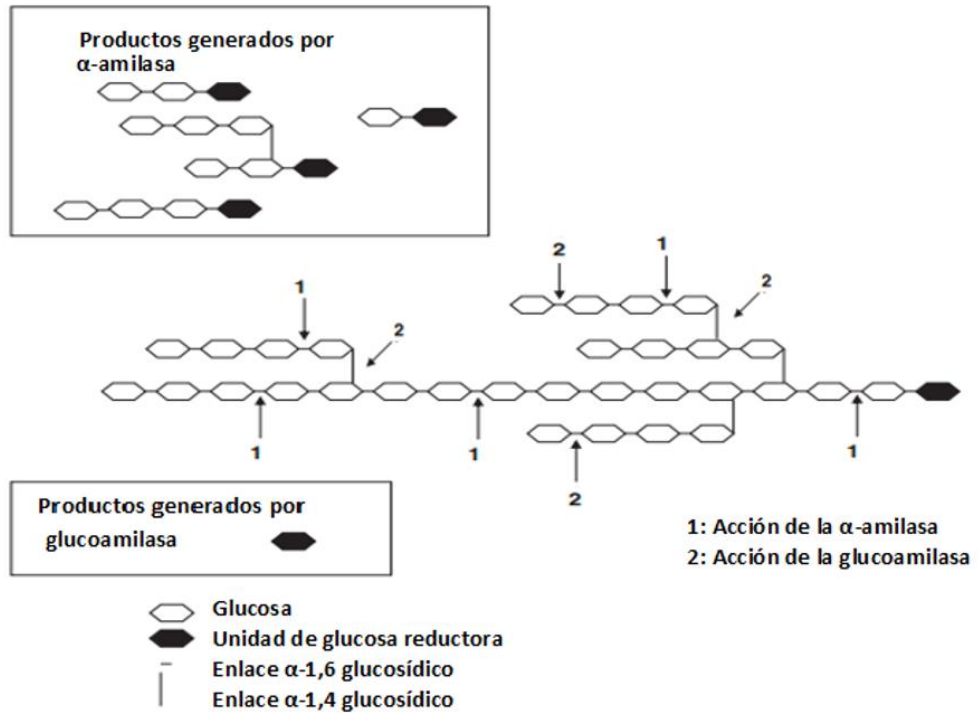
2: Disposición espacial de una cadena de amilosa [Fuente: Fallahi, Habte-Tsion y Rossi (2018)]

3: Representación de la estructura de amilopectina

[Fuente: Whitehurst y Van Oort (2010)]

4: Tipos de ramificaciones de la amilopectina [Fuente: Preiss (2018)]

Anexo 2: Hidrólisis del almidón por α -amilasa y glucoamilasa



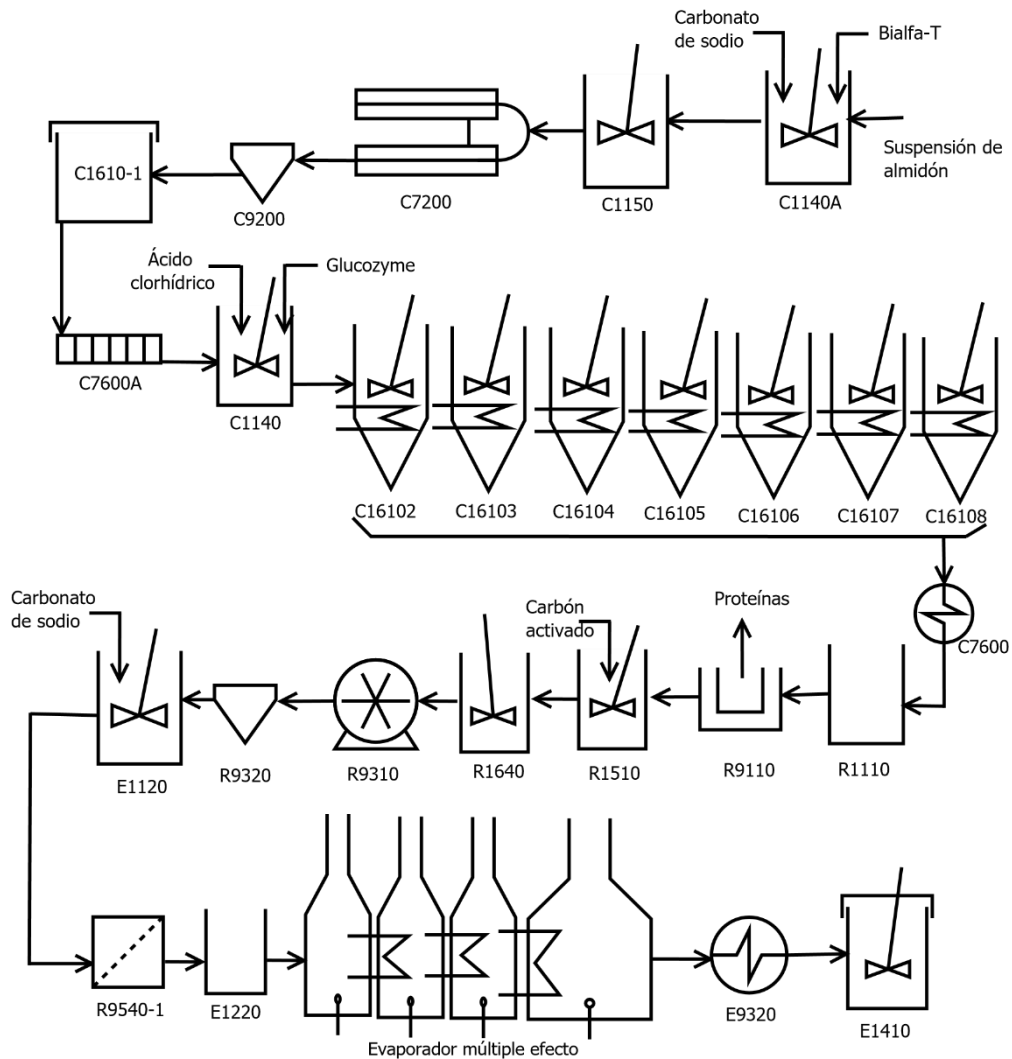
Fuente: Whitehurst y Van Oort (2010)

Anexo 3: Parámetros de las enzimas que más se emplean en la producción de siropes de glucosa.

Tipo de enzima	Actividad enzimática	Dosis de enzimas (% en DS)	Sustrato (°Bx)	Temperatura (°C)	Condiciones de reacción típicas de las enzimas			
					pH	Tiempo (h)	ED inicial	ED final
α -amilasa bacteriana resistente a altas temperaturas	60 K-Novo/g	0,03	30-35	105	6,0-6,5	0,1	0	2 (licuefacción)
α -amilasa bacteriana resistente a altas temperaturas	60 K-Novo/g	0,12	30-35	95	6,0-6,5	1,5	2	12 (licuefacción)
α -amilasa bacteriana	120 K-Novo/g	0,15	30-40	85	6,0-6,5	1,5	0	15 (licuefacción)
α -amilasa bacteriana	120 K-Novo/g	0,04	35-45	76,7	5,8-6,2	6	15	22
Fúngica-maltosa α -amilasa	40000 SKB/g	0,01	35-45	54-56	4,9-5,3	48	22	48
Fúngica-maltosa α -amilasa	40000 SKB/g	0,02	35-45	54-56	4,9-5,3	48	22	48
Glucoamilasa	150 Novo AG/ml	0,175	30-35	58-60	4,0-5,0	48	15	95
Glucoamilasa	150 Novo AG/ml	0,175	30-35	58-60	4,0-5,0	48	15	98
Malta- β -maltosa-amilasa	816°C	0,01	35-45	54-56	4,9-5,3	48	22	48
Malta- β -maltosa-amilasa	816°C	0,02	35-45	54-56	4,9-5,3	48	22	48
Sirope de Fúngica- α -amilasa y Glucoamilasa	40000 SKB/g 150 Novo AG/ml	0,0075 0,01	35-45	54-56	4,9-5,3	48	22	48
Glucosa isomerasa	150 IGIC/g	-	35-45	60-66	7,5-8,5	-	95	-

Fuente: BeMiller y Whistler (2009)

Anexo 4: Diagrama del proceso tecnológico.



C1140A Tanque de preparación de la suspensión de almidón	R1110 Tanque de retención de los hidrolizados
C1150 Tanque de retención de la suspensión de almidón	R9110 Centrífuga
C7200 Reactor tubular	R1510 Tanque de decoloración
C9200 Ciclón de expansión	R1620 Tanque de retención de carbón activado
C1610-1 Reactor de dextrinización	R9310 Filtro Rotatorio
C7600 A Intercambiador de calor de placas	R9320 Ciclón de expansión
C1140 Tanque de preparación del almidón dextrinificado	E1120 Tanque de ajuste fino de pH
C16102-C16108 Reactores de sacarificación	R9540-1 Filtro de seguridad
C7600 Intercambiador de calor de inactivación	E1220 Tanque de retención
	E9320 Enfriador
	E1410 Tanque de almacenamiento de producto terminado

Anexo 5: Optimización técnico-económica en Matlab (2015)

- Fichero para ejecutar la optimización por el algoritmo genético:

```
ObjetivoFunction = @costo;
nvars= 5;
LB = [0.5 0.5 50 12 4];
UB = [1.5 1.5 70 48 5.5];
rng (1, 'twister')
ConstraintFunction = @restriccion;
options = gaoptimset ('PopulationSize', 300, 'PlotFcns',
{@gplotbestf,@gplotmaxconstr}, 'Display', 'iter');
[x,fval, exitflag] = ga (ObjetivoFunction, nvars, [], [], [], [], LB,
UB, ConstraintFunction, options)
```

- Fichero de la restricción de la optimización:

```
function [c,ceq] = restriccion (x)
c= [-(-321.604+0.107082*92.4+2.46948*x(1)+5.84484*x(3)+71.2516*x(5)
+53.1126*x(2)+2.17003*x(4)-0.0515404*x(3)^2-7.29954*x(5)^2-23.0002
*x(2)^2-0.0320727*x(4)^2-92);...
-321.604+0.107082*92.4+2.46948*x(1)+5.84484*x(3)+71.2516*x(5)
+53.1126*x(2)+2.17003*x(4)-0.0515404*x(3)^2-7.29954*x(5)^2
-23.0002*x(2)^2-0.0320727*x(4)^2-92]
ceq= [];
```

- Fichero de la función objetivo:

```
function y=costo(x)

%-----COSTO ASOCIADO A LA DOSIS DE ALFA-AMILASA-----
%
%x(1) DOSIS DE ALFA AMILASA (kg enzima/ kg almidón)
Cs=14.56;           %(CUP/kg de enzima)
VR=45;             % Volumen del reactor (m^3)
cs=350;           % Concentración de la suspensión de almidón
(kg/m^3)
m=VR*cs;          % Masa de almidón (kg)
CD1= m*x(1)*Cs;   %Gasto incurrido por consumo de alfa-amilasa
(CUP)

%-----GASTO ASOCIADO A LA DOSIS DE GLUCOAMILASA-----
%
%x(2) DOSIS DE GLUCOAMILASA (kg enzima/ t almidón hidrolizado)

Cg=7.91;           %(CUP/kg de enzima)
CD2= m*x(2)*Cg;   %Gasto incurrido por consumo de alfa-amilasa

%-----GASTO ASOCIADO A LA TEMPERATURA DE SACARIFICACION-----
%
%x(3) TEMPERATURA DE SACARIFICACION (*C)
H=5;               %Carga hidráulica de la bomba (m)
g=9.8;             %Aceleración de la gravedad (m/s^2)
N=0.75;           %Eficiencia eléctrica de la bomba (%)

PH= 1133.86;       %Densidad del hidrolizado (kg/m^3)
qH=7/3600;         %Flujo que procesa el IC de placas (m^3/s)
cpH=3.42;          %Capacidad calorífica del hidrolizado (kJ/kg*C)
TH=92.4;           %Temperatura de licuefacción (*C)
cpa=4.1785;        %Capacidad calorífica del agua (kJ/kg *C)
```



```

ta1=30;           %Temperatura de entrada del agua (*C)
ta2=50;           %Temperatura de salida del agua (*C)

Wa=0.95*PH*qH*cpH*(TH-x(3))/(cpa*(ta2-ta1));%Consumo de agua de
enfriamiento

Pb=((H*Wa*g)/N)*10^-3;%Pb=Potencia eléctrica de la bomba (kW)

q=7;              % Flujo de hidrolizado (m^3/h)
t=VR/q;          % Tiempo q necesita para el enfriamiento de una
carga
% del reactor de sacarificación (h)

CkW=0.23;        %Costo de la electricidad (CUP/kW)
CTe=Pb*CkW*t;    %Costo del enfriamiento del hidrolizado (CUP)
%.
.....
.....
%x(4) TIEMPO DE SACARIFICACIÓN (h)
Ig=4.78;         %Índice de generación de vapor (kg vapor/kg comb.)
Pc=1023;         %Densidad de comb. (kg/m^3)
CC=724;          %Costo unitario del combustible (CUP/m^3)

qH2O=6.94*10^-3; %Flujo de agua de calentamiento (m^3/s)
PH2O=984.4;      %Densidad del agua (kg/m^3)
cpH2O=4.184;    %Capacidad calorífica del agua (kJ/kg*C)
Hf=2706.7;      %Entalpia de vaporización del agua a 200 kPa
(kJ/kg)
cpc=4.2;         %Capacidad calorífica del condensado (kJ/kg oC)
Tsat=120;        %Temperatura de saturación (*C)

Wv=((qH2O*PH2O*cpH2O*(5))/(Hf+cpc*(Tsat-x(3)))); %Flujo de vapor
(kg/s)

CTm= Wv*(1/(Ig*Pc))*CC*x(4)*3600; %Costo asociado a mantener la temp.
cte

%.
.....
.....
qi=9;            %Flujo que procesa el IC de inactivación (m^3/h)
ti=VR/qi;        %Tiempo de inactivación (h)
cps=3.37;        %Capacidad calorífica del jarabe de glucosa
(kJ/kg*C)
TH3=80;          %Temperatura de inactivación (*C)

Wvapor=((qi*PH*cps*(TH3-x(3)))/(0.95*Hf));

CTi=Wvapor*(1/(Ig*Pc))*CC*ti; %Costo de inactivación de la enzima

CT2=CTe +CTm + CTi;%Costo asociado a la temperatura de sacarificación,
%que comprende el del enfriamiento del hidrolizado(e)
%el del mantenimiento de la temperatura de
%sacarificación(m) y el de la inactivación (i).

%-----Costo asociado al tiempo de sacarificación-----
-----
Pag=3.5;         %Potencia eléctrica del motor de agitación (kW)
Cag=Pag*x(4)*CkW; %Costo asociado a la agitación.

```

```

%-----Costo asociado al pH de sacarificación-----
-----
CHCl=0.292;          %Costo del ácido clorhídrico (CUP/kg)
MHCl=36.46;         %Masa molar de ácido clorhídrico (kg/kmol)
cHCl= 370;          %Concentración de ácido clorhídrico (kg/m^3)
PHCl=1 120;         %Densidad del ácido clorhídrico (kg/m^3)

mHCl= (VR*(10^(-x(5))-0.000003162)*MHCl)*PHCl/cHCl;
CpH2=mHCl*CHCl;    %Costo asociado al consumo de HCl

y=CD1+CD2+CT2+Cag+CpH2;

```

Anexo 6: Norma operacional de los parámetros de calidad.

Parámetro de calidad	Valor máximo	Valor mínimo	Norma operacional
Porcentaje de sólidos disueltos (°Brix)	34,2	35,1	Mayor que 34 °Bx
Color	209	87	Menor que 350 (Patrón 3)
Acidez (%)	0,004	0,031	Menor que 0,500

Fuente: NEMINAG (2015)

Anexo 7: Resultados del diseño de experimentos.

No.	Temperatura1	pH1	Dosis1	Tiempo1	Tempratura2	pH2	Dosis2	Tiempo2	ED
1	70	5,5	0,5	1	50	4	1,5	48	73,421
2	95	5,5	0,5	1	50	4	0,5	12	55,496
3	70	7,5	0,5	1	50	4	0,5	12	61,714
4	95	7,5	0,5	1	50	4	1,5	48	84,281
5	70	5,5	1,5	1	50	4	0,5	48	72,88
6	95	5,5	1,5	1	50	4	1,5	12	74,124
7	70	7,5	1,5	1	50	4	1,5	12	70,495
8	95	7,5	1,5	1	50	4	0,5	48	75,128
9	70	5,5	0,5	2	50	4	0,5	48	57,533
10	95	5,5	0,5	2	50	4	1,5	12	74,692
11	70	7,5	0,5	2	50	4	1,5	12	70,81
12	95	7,5	0,5	2	50	4	0,5	48	75,287
13	70	5,5	1,5	2	50	4	1,5	48	80,383
14	95	5,5	1,5	2	50	4	0,5	12	67,917
15	70	7,5	1,5	2	50	4	0,5	12	64,296
16	95	7,5	1,5	2	50	4	1,5	48	83,671
17	70	5,5	0,5	1	70	4	1,5	12	63,181
18	95	5,5	0,5	1	70	4	0,5	48	52,043
19	70	7,5	0,5	1	70	4	0,5	48	64,184
20	95	7,5	0,5	1	70	4	1,5	12	65,935
21	70	5,5	1,5	1	70	4	0,5	12	57,037
22	95	5,5	1,5	1	70	4	1,5	48	76,557
23	70	7,5	1,5	1	70	4	1,5	48	72,271
24	95	7,5	1,5	1	70	4	0,5	12	58,987
25	70	5,5	0,5	2	70	4	0,5	12	56,97
26	95	5,5	0,5	2	70	4	1,5	48	75,602
27	70	7,5	0,5	2	70	4	1,5	48	72,508
28	95	7,5	0,5	2	70	4	0,5	12	59,224
29	70	5,5	1,5	2	70	4	1,5	12	59,459
30	95	5,5	1,5	2	70	4	0,5	48	70,313
31	70	7,5	1,5	2	70	4	0,5	48	65,399
32	95	7,5	1,5	2	70	4	1,5	12	67,311
33	70	5,5	0,5	1	50	6	1,5	12	64,736
34	95	5,5	0,5	1	50	6	0,5	48	69,93
35	70	7,5	0,5	1	50	6	0,5	48	74,018
36	95	7,5	0,5	1	50	6	1,5	12	57,767
37	70	5,5	1,5	1	50	6	0,5	12	58,883
38	95	5,5	1,5	1	50	6	1,5	48	67,511
39	70	7,5	1,5	1	50	6	1,5	48	75,272
40	95	7,5	1,5	1	50	6	0,5	12	77,784
41	70	5,5	0,5	2	50	6	0,5	12	59,122
42	95	5,5	0,5	2	50	6	1,5	48	78,478

43	70	7,5	0,5	2	50	6	1,5	48	74,812
44	95	7,5	0,5	2	50	6	0,5	12	57,038
45	70	5,5	1,5	2	50	6	1,5	12	67,291
46	95	5,5	1,5	2	50	6	0,5	48	71,971
47	70	7,5	1,5	2	50	6	0,5	48	68,304
48	95	7,5	1,5	2	50	6	1,5	12	69,562
49	70	5,5	0,5	1	70	6	1,5	48	67,184
50	95	5,5	0,5	1	70	6	0,5	12	53,766
51	70	7,5	0,5	1	70	6	0,5	12	50,1
52	95	7,5	0,5	1	70	6	1,5	48	69,456
53	70	5,5	1,5	1	70	6	0,5	48	60,677
54	95	5,5	1,5	1	70	6	1,5	12	61,935
55	70	7,5	1,5	1	70	6	1,5	12	58,268
56	95	7,5	1,5	1	70	6	0,5	48	62,948
57	70	5,5	0,5	2	70	6	0,5	48	60,917
58	95	5,5	0,5	2	70	6	1,5	12	62,174
59	70	7,5	0,5	2	70	6	1,5	12	58,508
60	95	7,5	0,5	2	70	6	0,5	48	63,188
61	70	5,5	1,5	2	70	6	1,5	48	69,085
62	95	5,5	1,5	2	70	6	0,5	12	55,667
63	70	7,5	1,5	2	70	6	0,5	12	52,001
64	95	7,5	1,5	2	70	6	1,5	48	71,356
65	70	6,5	1	1,5	60	5	1	30	94,09
66	95	6,5	1	1,5	60	5	1	30	97,059
67	82,5	5,5	1	1,5	60	5	1	30	92,695
68	82,5	7,5	1	1,5	60	5	1	30	91,998
69	82,5	6,5	0,5	1,5	60	5	1	30	95,906
70	82,5	6,5	1,5	1,5	60	5	1	30	96,737
71	82,5	6,5	1	1	60	5	1	30	96,111
72	82,5	6,5	1	2	60	5	1	30	97,181
73	82,5	6,5	1	1,5	50	5	1	30	91,14
74	82,5	6,5	1	1,5	70	5	1	30	87,123
75	82,5	6,5	1	1,5	60	4	1	30	89,828
76	82,5	6,5	1	1,5	60	6	1	30	84,144
77	82,5	6,5	1	1,5	60	5	0,5	30	84,867
78	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1,5	30	92,204
79	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	12	70,123
80	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	48	97,665
81	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	30	96,569
82	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	30	97,423
83	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	30	96,124
84	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	30	94,209
85	82,5	6,5	1	1,5	60	5	1	30	92,461

Anexo 8: Analisis de varianza de los efectos sobre el equivalente de dextrosa.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón de Fisher	Valor de probabilidad
A: Temperatura de licuefacción	118,25	1	118,25	6,58	0,0125
B: pH de licuefacción	44,584	1	44,584	2,48	0,1198
C: Dosis de licuefacción	100,623	1	100,623	5,60	0,0208
D: tiempo de licuefacción	17.469	1	17.469	0.97	0,3275
E: Temperatura de sacarificación	763,008	1	763,008	42,84	0,0000
F: pH de sacarificación	200,693	1	200,693	11,17	0,0014
G: Dosis de sacarificación	834,643	1	834,643	46,47	0,0000
H: Tiempo de sacarificación	1290,59	1	1290,59	71,86	0,0000
AA	1,569	1	1,569	0,09	0,7685
BB	13,111	1	13,111	0,73	0,3959
CC	5,666	1	5,666	0,32	0,5762
DD	8,239	1	8,239	0,46	0,5005
EE	71,824	1	71,824	4,00	0,0495
FF	137,222	1	137,222	7,64	0,0073
GG	87,886	1	87,886	4,89	0,0303
HH	268,384	1	268,384	14,94	0,0003
Error total	1221,26	68	17,9597	-	-
TOTAL	15487,6	84	-	-	-

Anexo 9: Predicción del equivalente de dextrosa. Intervalos de estimación

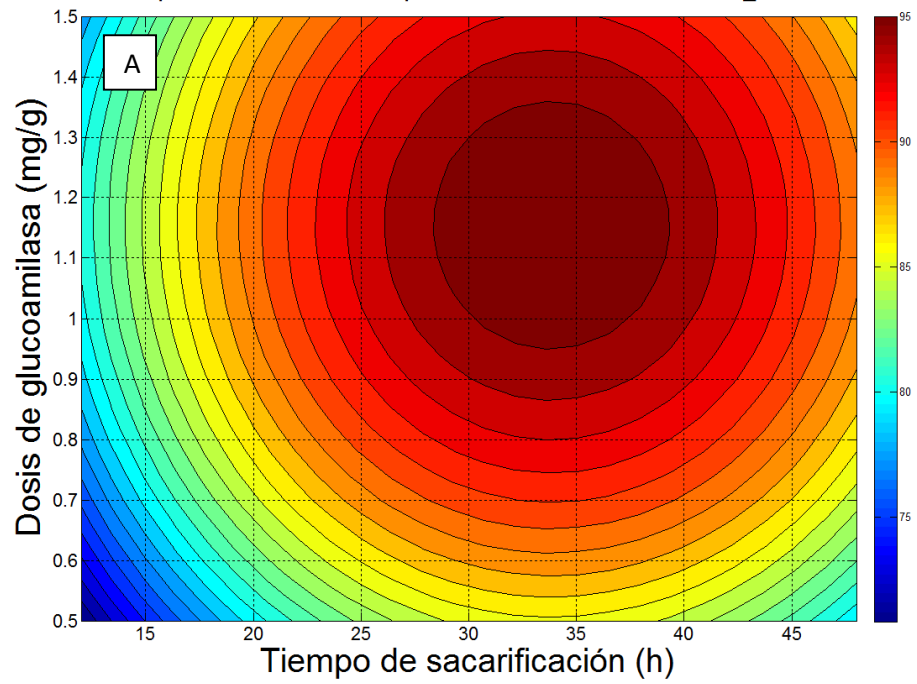
Experi- mento	Valor Obser- vado	Valor ajus- tado	Límite Inferior (95 %)	Límite Supe- rior (95 %)	Experi- mento	Valor Obser- vado	Valor ajus- tado	Límite Inferior (95 %)	Límite Supe- rior (95 %)
1	73.42	74.65	67.82	81.49	44	57.04	61.12	54.28	67.95
2	55.50	57.55	50.72	64.39	45	67.29	64.66	57.82	71.49
3	61.71	61.89	55.05	68.73	46	71.97	72.50	65.66	79.33
4	84.28	80.97	74.14	87.81	47	68.30	70.53	63.69	77.36
5	72.88	68.78	61.95	75.62	48	69.56	67.16	60.32	73.99
6	74.12	72.73	65.89	79.56	49	67.18	68.37	61.53	75.21
7	70.50	71.41	64.58	78.25	50	53.77	51.05	44.22	57.89
8	75.13	79.22	72.38	86.05	51	50.10	52.95	46.11	59.79
9	57.53	64.07	57.24	70.91	52	69.46	68.42	61.59	75.26
10	74.69	72.70	65.87	79.54	53	60.68	61.74	54.90	68.57
11	70.81	68.76	61.93	75.60	54	61.94	59.74	52.90	66.57
12	75.29	73.21	66.38	80.05	55	58.27	55.98	49.15	62.82
13	80.38	77.94	71.11	84.78	56	62.95	65.90	59.07	72.74
14	67.92	68.18	61.35	75.02	57	60.92	60.85	54.01	67.68
15	64.30	63.86	57.02	70.69	58	62.17	63.52	56.69	70.36
16	83.67	85.95	79.12	92.79	59	58.51	57.15	50.31	63.98
17	63.18	62.43	55.60	69.27	60	63.19	63.71	56.88	70.55
18	52.04	57.86	51.02	64.70	61	69.09	68.22	61.39	75.06
19	64.18	63.39	56.55	70.22	62	55.67	58.24	51.41	65.08
20	65.94	63.91	57.08	70.75	63	52.00	51.48	44.64	58.32
21	57.04	55.71	48.88	62.55	64	71.36	69.97	63.13	76.80
22	76.56	73.24	66.41	80.08	65	94.09	94.40	88.04	100.76
23	72.27	73.12	66.28	79.95	66	97.06	97.07	90.72	103.43
24	58.99	61.31	54.47	68.14	67	92.70	91.69	85.33	98.04
25	56.98	52.34	45.50	59.17	68	92.00	93.33	86.97	99.69
26	75.60	78.06	71.23	84.90	69	95.91	95.25	88.89	101.61
27	72.51	75.32	68.48	82.15	70	96.74	97.72	91.36	104.08
28	59.22	56.64	49.80	63.47	71	96.11	96.29	89.93	102.65
29	59.46	65.42	58.58	72.25	72	97.18	97.32	90.96	103.68
30	70.31	66.97	60.14	73.81	73	91.14	92.69	86.33	99.05
31	65.40	63.84	57.00	70.67	74	87.12	85.89	79.53	92.25
32	67.31	68.59	61.75	75.43	75	89.83	88.89	82.53	95.25
33	64.74	63.29	56.45	70.12	76	84.14	85.40	79.04	91.76
34	69.93	65.00	58.16	71.83	77	84.87	85.14	78.78	91.50
35	74.02	71.69	64.86	78.53	78	92.20	92.25	85.89	98.61
36	57.77	64.10	57.26	70.93	79	70.12	79.63	73.27	85.99
37	58.88	63.23	56.39	70.06	80	97.67	88.48	82.12	94.84
38	67.51	74.47	67.64	81.31	81	96.57	94.91	92.73	97.08
39	75.27	75.51	68.68	82.35	82	97.42	94.91	92.73	97.08
40	77.78	68.15	61.32	74.99	83	96.12	94.91	92.73	97.08
41	59.12	57.49	50.65	64.32	84	94.21	94.91	92.73	97.08
42	78.48	76.93	70.09	83.76	85	92.46	94.91	92.73	97.08
43	74.81	75.35	68.51	82.18					

Anexo 10: Gráficos de contorno.

A: ED según la dosis de glucoamilasa y el tiempo de sacarificación

B: ED según el pH y la temperatura de sacarificación

Temperatura₁: 82.5 °C, Dosis₁: 1 mg/g, Temperatura₂: 60 °C, pH₂: 5



Temperatura₁: 82.5 °C, Dosis₁: 1 mg/g, Tiempo₂:30 h, Dosis₂: 1 mg/g

