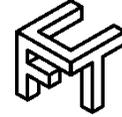




Universidad de Matanzas  
Facultad de Ciencias Técnicas



# VALORACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA EL DESDOBLAMIENTO ENZIMÁTICO DE ALMIDÓN EN LA INDUSTRIA AZUCARERA

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

Autor: Ing. Saul Dueñas Casas

Tutor: Ing. Jesús D. Luis Orozco, DrC

Lic. Leissy Gómez Brizuela, DrC.

Matanzas, [2020]

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD Y NOTA LEGAL**

Yo, Saul Dueñas Casas, declaro que soy el único autor de la siguiente tesis, titulada [Título del trabajo] 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, [día] de [mes] de [año].

Saul Dueñas Casas

## RESUMEN

La presente investigación se encuentra dirigida a demostrar la efectividad de la  $\alpha$ -amilasa en el desdoblamiento de almidones en la industria azucarera. Para ello se estudian las propiedades de la  $\alpha$ -amilasa para su aplicación a escala industrial, y se caracteriza estructural y funcionalmente la misma. Se estudia el proceso de hidrólisis enzimática y se analiza su incidencia en parámetros de calidad como cenizas, contenido de almidón, reductores y pH. Por último, se determinan los costos de aplicar la hidrólisis enzimática en el proceso de producción de azúcar crudo, así como los beneficios que aporta en el consumo de vapor. La enzima  $\alpha$ -amilasa presenta una actividad específica de 86 U/ $\mu$ g, un pH óptimo de 5,0, una temperatura óptima de 60 °C, Km de 6,4 g/L y Vmax de 28 571  $\mu$ mol/mL\*min; la enzima es estable de 35 a 50 °C y en un intervalo de pH de 5,0 a 8, lográndose una actividad superior al 80 %. Las dosis de  $\alpha$ -amilasa influyen en el desdoblamiento de almidón y en el incremento de cenizas, pero no en el incremento de reductores, ni en la variación del pH. Se determinó que la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis enzimática más factible tanto técnica como económicamente es la meladura. Los valores óptimos de reductores, cenizas, pH y almidón se alcanzan al aplicar una dosis de 0,01 % de  $\alpha$ -amilasa.

**Palabras claves:** hidrolisis enzimática;  $\alpha$ -amilasa; almidón; proceso de producción de azúcar.

## **ABSTRACT**

This research is aimed at demonstrating the effectiveness of  $\alpha$ -amylase in the unfolding of starches in the sugar industry. For this, the properties of  $\alpha$ -amylase are studied for its application on an industrial scale, and it is structurally and functionally characterized. The enzymatic hydrolysis process is studied and its incidence is analyzed in quality parameters such as ashes, starch content, reducers and pH. Finally, the costs of applying enzymatic hydrolysis in the raw sugar production process are determined, as well as the benefits that it brings in steam consumption. The enzyme  $\alpha$ -amylase has a specific activity of 86 U /  $\mu$ g, an optimum pH of 5.0, an optimum temperature of 60 °C, Km of 6.4 g / L and Vmax of 28 571  $\mu$ mol / mL \* min; The enzyme is stable at 35 to 50 ° C and in a pH range of 5.0 to 8, achieving an activity greater than 80 %. The doses of  $\alpha$ -amylase influence the unfolding of starch and the increase of ashes, but not the increase of reducers, nor the variation of the pH. It was determined that the current of application of the most feasible enzymatic hydrolysis process both technically and economically is the cane shake. The optimal values of reducers, ashes, pH and starch are achieved by applying a dose of 0.01 %  $\alpha$ -amylase.

**Keywords:** enzymatic hydrolysis; alpha amylase; starch; sugar production process.

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción .....	3
Capítulo 1. Estado del Arte.....	6
1.1 Calidad en el proceso de producción de azúcar crudo .....	6
1.2 Propiedades del almidón .....	9
1.3 Influencia del almidón en la producción de azúcar crudo.....	10
1.4 Tecnologías de control del contenido de almidón en la industria azucarera.....	12
1.5 Hidrólisis enzimática del almidón .....	14
1.5.1 Enzimas. $\alpha$ -amilasas .....	15
1.5.2 Aplicación de la $\alpha$ -amilasa en la industria.....	17
1.6 Conclusiones parciales del capítulo .....	21
Capítulo 2 Materiales y Métodos .....	22
2.1 Descripción del proceso objeto de estudio .....	22
2.1.1 Etapa de preparación y molienda .....	22
2.1.2 Etapa de purificación.....	23
2.1.3 Etapa de evaporación.....	24
2.1.4 Etapa de cristalización .....	25
2.1.5 Etapa de centrifugación .....	25
2.2 Determinación de las propiedades estructurales y funcionales .....	25
2.2.1 Caracterización de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	26
2.2.2 Determinación de las propiedades estructurales .....	26
2.2.3 Determinación de las propiedades funcionales.....	27
2.3 Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón.....	28

2.3.1	Diseño de experimento .....	28
2.3.2	Caracterización de los hidrolizados.....	30
2.3.3	Selección de la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis .....	31
2.4	Herramientas estadísticas .....	31
Capítulo 3	Análisis de los Resultados .....	32
3.1	Propiedades estructurales y funcionales de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	32
3.1.1	Caracterización de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	32
3.1.2	Propiedades estructurales de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	32
3.1.3	Determinación de las propiedades funcionales de la enzima $\alpha$ -amilasa .....	37
3.2	Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón.....	41
3.2.1	Diseño de experimento .....	41
3.2.2	Influencia de la dosis de $\alpha$ -amilasa en la hidrolisis enzimática .....	44
3.2.3	Análisis de los resultados del diseño experimental.....	49
3.3	Selección de la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis enzimática .....	61
3.3.1	Ahorro del consumo de vapor.....	64
3.3.2	Costo de aplicación de la enzima .....	65
3.3.3	Dosis y corriente de aplicación de la $\alpha$ -amilasa.....	66
3.4	Conclusiones parciales del capítulo .....	67
Conclusiones	.....	69
Recomendaciones	.....	70
Referencias Bibliográficas	.....	71
Anexos	.....	89

## INTRODUCCIÓN

Dentro del sector industrial, la producción de azúcar crudo se considera uno de los procesos más importantes en el área de la industria alimentaria y el comercio, por los innumerables aportes que realiza a la economía del país. Cualquier investigación dirigida a aumentar la calidad y eficiencia del proceso de producción de azúcar crudo, beneficia la sociedad.

Precisamente uno de los parámetros que más afecta la calidad del proceso de producción y del producto final es el contenido de polisacáridos. Muchas investigaciones se han realizado sobre los tipos de polisacáridos que se encuentran en la caña de azúcar y sus efectos negativos en el proceso de producción de azúcar crudo (Alonso, 2017; González, 2018; León, 2018). Sin embargo, en el transcurso de la última década la presencia de almidón en la industria ha tomado una importancia relevante para la comercialización de azúcar.

El almidón es un polisacárido que se incorpora al proceso por medio de la caña de azúcar que es la principal materia prima (Castro, 2015). Su presencia en el proceso de producción de azúcar crudo demora o inhibe la cristalización y aumenta las pérdidas de azúcar en la miel final, causa demoras en el proceso debido a viscosidades excesivas y pérdidas de sacarosa por modificaciones en el crecimiento del cristal (Castro, 2015; Penados, 2004), tiene la tendencia de ocluirse en el cristal de azúcar crudo (Eggleston, Viator, y Grisham, 2007; Penados, 2004; Zhou *et al.*, 2008), reduce la filtración y la afinación del azúcar crudo, y constituye un impedimento para el proceso de decoloración en la refinación (Eggleston *et al.*, 2007). De aquí la importancia de la cuantificación del

mismo en el proceso de producción de azúcar crudo, en aras de la toma de medidas que reduzcan su contenido.

Atendiendo al efecto negativo que provoca el almidón en la calidad del azúcar crudo Zhou *et al.* (2008) propone para su eliminación la selección de variedades de caña sobre la base del contenido de almidón. Según Popper, Schafer, y Freund (2006), la utilización de métodos físicos de separación como la ultrafiltración u ósmosis inversa, funcionan correctamente a pequeña escala, pero están lejos de ser desarrollados para su aplicación en procesos reales. Sin embargo, Chiu y Solarek (2009) y Eggleston *et al.* (2015) coinciden en que el tratamiento más eficaz para su eliminación consiste en adicionar la enzima  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar el almidón presente en el jugo.

Las  $\alpha$ -amilasas se encuentran entre las enzimas industriales más importantes de gran impacto en los estudios biotecnológicos y representan alrededor del 25-33 % del mercado mundial de enzimas (Kumar, Partha, Pradeep, y Sangeeta, 2016; Kumar, Rani, y Pandey, 2016). A pesar de sus ventajas el uso de enzimas se ve limitado por los altos costos de aislamiento y purificación, su sensibilidad a las condiciones ambientales y la dificultad de recuperarlas para su posterior reutilización y reprocesamiento (Homaei y Saberi, 2015).

Teniendo en consideración los elementos planteados el Problema Científico a solucionar en la investigación, es:

¿En qué corriente del proceso de producción de azúcar crudo será más factible aplicar un tratamiento con  $\alpha$ -amilasa para el desdoblamiento del almidón?

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

Si se realiza un estudio de la hidrólisis enzimática con  $\alpha$ -amilasa en diferentes corrientes del proceso de producción de azúcar crudo, será posible determinar en cuál de ellas es más factible su aplicación.

Se propone como Objetivo General para el desarrollo de la investigación:

Determinar la efectividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa en el desdoblamiento de almidones en diferentes corrientes del proceso de producción de azúcar.

Para el cumplimiento del objetivo general se proponen los Objetivos Específicos siguientes:

1. Determinar las propiedades estructurales y funcionales de la enzima  $\alpha$ -amilasa.
2. Determinar la influencia del proceso de hidrólisis enzimática en los parámetros de calidad de las corrientes objeto de estudio.
3. Seleccionar bajo criterios técnicos y económicos la corriente de aplicación de la hidrólisis enzimática.

## **CAPÍTULO 1. ESTADO DEL ARTE**

En este capítulo se profundiza en las siguientes temáticas: calidad en el proceso de producción de azúcar, características y propiedades del almidón, influencia del almidón en la producción de azúcar crudo y tecnologías de control del contenido de almidón en la industria azucarera. La investigación se realiza mediante búsqueda bibliográfica en bibliotecas científico técnicas y en las diferentes bases de datos disponibles en internet, a través del uso de buscadores existentes, como: Google, AltaVista, Scirus, entre otros. Además, se emplean bases de datos remotas (EBSCO, ScienceDirect, entre otros) y bibliotecas virtuales de química e ingeniería química.

### **1.1 Calidad en el proceso de producción de azúcar crudo**

El análisis de la calidad en el proceso de producción de azúcar crudo es de vital importancia para el desarrollo de la agroindustria azucarera, pues aumenta el rendimiento de esta actividad en los países productores de azúcar, y a su vez el desarrollo del país (Jiménez, Lugo, Ramírez, Gómez, y Orozco, 2016). Mientras mayor sea la calidad del producto final, mayores serán los posibles destinos de exportación del mismo y por tanto los ingresos económicos al país.

El procesamiento de la caña de azúcar comienza en el campo, por lo que la calidad del azúcar final depende en gran medida del estado de la caña, su madurez, tiempo entre su corte, molienda y el contenido de materia extraña que es incorporado al proceso durante el corte y alce (Larrahondo, 2013). Cuando se procesa caña verde, que contiene cantidad significativa de hojas, se incrementa la cantidad de no azúcares que ingresa a fábrica,

especialmente almidón y aquellos compuestos que aportan color (Zossi, Cárdenas, Sorol, y Sastre, 2011).

Según Larrahondo (1995), el cogollo tiene alta incidencia en los niveles de color y de impurezas como los polisacáridos solubles, y representa la principal fuente de entrada de almidón al proceso, el cual depende en gran medida del tipo de caña y el grado de madurez de la misma (Alencar, Hoffmann, y Harumi, 2011). Esto último se debe al desarrollo del corte mecanizado, pues aumenta la cantidad de materia extraña generalmente formada por cogollo y hojas.

Los principales factores que afectan la calidad del jugo de caña después del corte son: grado de quema y altura del corte (Larrahondo, 1995). El grado de quema influye en los azúcares reductores, los cuales aumentan con el deterioro de la caña e incrementan el color del cristal de azúcar. El color del azúcar crudo es un parámetro de calidad importante, pues este incide en los costos de refinación para obtener azúcar blanca (Zossi, Cárdenas, Sorol, y Sastre, 2010). En gran parte el color también resulta del material coloreado formado por degradación de los azúcares, por reacciones entre azúcares reductores y los aminoácidos, y por otras reacciones similares (Páez, 2013).

El almidón constituye una impureza que afecta negativamente el proceso de producción de azúcar crudo y el proceso de refinación en cuanto a calidad y cantidad (Zhou *et al.*, 2008). Según Penados (2004), el contenido de almidón es un parámetro de calidad que se tiene en cuenta para la compra de este producto en el mercado internacional y crea la posibilidad de penalidades impuestas por las refinerías que parten del azúcar crudo. Es debido a ello que las refinerías establecen multas financieras a las fábricas que entregan

azúcar crudo con concentraciones de almidón mayor que 250 ppm (Cole, Rose, Chung, y Eggleston, 2015; Cole, Eggleston, Gilbert, y Chung, 2016; Eggleston, Cole, y Andrzejewski, 2013).

Otro indicador de calidad que genera la mayoría de los efectos que produce el almidón lo constituye la dextrana. Según Bukhari, Salem, Abdalmoneim, y Hegazi (2015), la dextrana en jugo, meladura y azúcar crudo falsea las mediciones de pol, además produce gomas que aumenta la viscosidad de los jugos y afecta la clarificación, la filtración y provoca la deformación del cristal, por elongación del mismo.

Según Zossi *et al.* (2011), la calidad de la caña también se afecta por constituyentes inorgánicos presentes como iones solubles en agua, sales o constituyentes de moléculas orgánicas complejas o compuestos insolubles, que se encuentran en el jugo de caña como sólidos suspendidos; en otras investigaciones los cationes mayoritarios son potasio y sodio, y los aniones son silicatos, fosfatos y sulfatos; en general estos compuestos se conocen como cenizas. Además, establece que los valores de cenizas se encuentran entre 2,28 y 4,59 %. Con respecto a esto, Rein (2007), establece que el contenido total de cenizas en el jugo de caña, representa un promedio de 4 %.

La concentración de sólidos disueltos (°Brix), la concentración de sacarosa en jugo (% pol) y la pureza son indicadores de calidad del jugo. Sin embargo, investigaciones más recientes señalan que la calidad se reconoce en la molienda por la cantidad de azúcar recuperable que se obtiene por tonelada de caña molida. Ello depende en gran medida del alto contenido de sacarosa, bajo contenido de materiales extraños, bajo contenido de sólidos solubles diferentes a la sacarosa, y bajos niveles de fibra (Zhou *et al.*, 2008).

## 1.2 Propiedades del almidón

Para analizar la influencia del almidón en las diferentes etapas del proceso de producción de azúcar es necesario conocer sus características y propiedades, pues esto permite verificar su comportamiento ante las condiciones del ambiente de operación.

El almidón es un polímero de glucosa que se encuentra en el protoplasma de las hojas de la caña y en el extremo del tallo de la misma. Se plantea que los mayores depósitos de este polisacárido se localizan habitualmente cerca de los nudos a partir del cual se propaga la caña (Eggleston *et al.*, 2007). Se presenta en forma de gránulos, que habitualmente presentan una forma redondeada, irregular, con tamaños que oscilan entre 2 y 100  $\mu\text{m}$ . Tanto la forma como el tamaño de los gránulos son característicos de la especie vegetal y pueden utilizarse para identificar su origen (Coultale, 1997). Para el caso específico del almidón de caña de azúcar, sus gránulos están formados por mezclas en proporciones variables de dos constituyentes distintos la amilosa y la amilopectina, y ambos son polímeros derivados de la  $\alpha$ -D- glucosa (Chen *et al.*, 2016). Según Alencar *et al.* (2011), el almidón extraído de la caña de azúcar posee un 25 % de amilosa y un 75 % de amilopectina.

Las propiedades físico-químicas del almidón más frecuentes en aplicaciones industriales son: la gelatinización y la retrogradación.

Según Peña (2009), la gelatinización ocurre cuando los gránulos de almidón se calientan en suspensión acuosa entre 60-70 °C y empieza un proceso lento de absorción de agua. A medida que se incrementa la temperatura, se retiene más agua y el gránulo empieza a hincharse y aumentar de volumen hasta llegar a cierta temperatura, este hinchamiento

provoca que la amilosa y amilopectina sean liberadas en dispersión coloidal, generándose al final de este proceso un gel. Las temperaturas iniciales de gelatinización son características de cada tipo de almidón, pero generalmente se hallan en el intervalo 55-70 °C (Alves, Polesi, y Aguiar, 2014).

Ramírez (2012), define la retrogradación como la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente y accionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidróxilos. Chiu y Solarek (2009) y Brumovsky (2014), establecen que la retrogradación ocurre cuando la solución de almidón concentrada se enfría y en ausencia de agitación se forma un gel rígido.

### **1.3 Influencia del almidón en la producción de azúcar crudo**

El almidón constituye una impureza del jugo de caña de azúcar y trae efectos adversos en los procesos de producción y refinación del azúcar crudo. Como consecuencia se afecta la cantidad y calidad del azúcar producido (Eggleston, Montes, Monge, y Guidry, 2006), de ahí la importancia del estudio de su influencia.

Las variedades de caña de azúcar presentan diferentes contenidos de almidón y de otras impurezas asociadas (Alencar *et al.*, 2011). Además, el contenido de almidón es más alto en cañas inmaduras con respecto a las maduras y se observa que el mismo decrece cuando la maduración en la caña aumenta. Según Castro (2015), la concentración del almidón en la caña puede oscilar entre 275 y 1500 mg/kg de sólidos, con un promedio aproximadamente de 700 mg/kg. Otros como Viginotti, Polesi, Lima, y Silveira (2014)

declaran que el contenido de almidón en el jugo de caña se encuentra en un rango de 1600 a 2600 mg/L.

Rein (2007), plantea que en el proceso de molienda, gran parte del almidón que es insoluble en la caña se solubiliza por efecto del calor y pasa a los jugos. Durante el proceso de clarificación el almidón se hace parcialmente soluble eliminándose una fracción, mientras que otra parte pasa a la meladura. Si la cantidad de almidón que pasa a la meladura es mayor de 150 ppm comienzan a existir afectaciones en el proceso (Penados, 2004).

Las partículas de almidón tienden a coagularse a temperaturas entre los 65 y 80 °C. Esta coagulación forma partículas densas y de gran tamaño que pueden aumentar la viscosidad de la meladura, lo que demora e inhibe la cristalización, impide el agotamiento de las mieles y dificultan la purga en las centrífugas (Penados, 2004), además de provocar pérdidas de sacarosa por modificaciones en el crecimiento del cristal (Zossi, Navarro, Sorol, Sastre, y Marcelo, 2008). Debido a su naturaleza de carbohidrato y su gran solubilidad es muy difícil de remover en el proceso, tiene la tendencia de ocluirse en el cristal de azúcar crudo (Penados, 2004). Entre un 30 y 40 % de este polisacárido se incrusta en el cristal de azúcar crudo durante la cristalización (Rein, 2007), así que representa una pérdida en términos de azúcar disponible para el proceso (Zossi *et al.*, 2008). Castro (2015), plantea que el almidón disminuye la eficiencia del proceso ya que se adhiere a las paredes de los tachos aumentando el tiempo de cocimiento de las masas. Además las altas viscosidades provocan el incremento de los costos energéticos al disminuir la transferencia de calor en los evaporadores, cristalizadores y tachos incrementando así el punto de ebullición del jugo (Castro, 2015).

Contenidos de almidón en jugo mayores a 950 mg/kg de sólidos en base seca dificultan los procesos de filtración, decantación, evaporación y cristalización; el incremento de la pureza en las melazas, así como el aumento de la viscosidad por efecto de la gelatinización de los gránulos de almidón (Zossi *et al.*, 2008).

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

Aunque en el proceso de producción de azúcar crudo durante la etapa de clarificación se elimina una gran parte, el almidón soluble producto de la gelatinización por el efecto de la temperatura permanece en el jugo de caña de azúcar, y de esta manera continua en todo el proceso (Zhou *et al.*, 2008). El contenido de almidón es un parámetro importante a considerar durante el proceso de elaboración de azúcar crudo, en la industria, es común cuantificar su contenido en el proceso para disminuir sus efectos negativos en la capacidad productiva (Zossi *et al.*, 2008).

#### **1.4 Tecnologías de control del contenido de almidón en la industria azucarera**

Los efectos negativos del almidón en la calidad y eficiencia del proceso de producción de azúcar crudo y refino, evidencian la necesidad de su eliminación, por lo que los países productores de azúcar, desarrollan investigaciones dirigidas a mejorar las tecnologías de control de este parámetro.

Una de las alternativas de solución es la selección de las variedades de caña sobre la base del contenido de almidón, pero igual así persiste la presencia de este solo que en pequeñas cantidades (Zhou *et al.*, 2008). La utilización de métodos físicos de separación como la ultrafiltración u ósmosis inversa, funcionan correctamente a pequeña escala, pero están lejos de ser desarrollados para su aplicación en procesos reales (Popper *et al.*, 2006). Otras de las alternativas de solución es la utilización de métodos tales como: la extracción mecánica del almidón insoluble, la clarificación al vacío y la centrifugación del jugo, sin embargo, estos métodos exigen grandes inversiones encareciendo el proceso, y ofrecen resultados parciales pues no eliminan la fracción soluble (Jiménez, 2017). Eggleston, Monge, y Ogier (2003), expresan que si en la clarificación se opera la alcalización en caliente una fracción del almidón es removido y precipita por el precalentamiento del jugo antes de alcalizar y clarificar. Sin embargo, Zhou *et al.* (2008) comentan que si se trabaja la alcalización en frío el suceso anterior no ocurre, solo una parte del contenido de almidón precipita durante el proceso de clarificación. Aunque estas tecnologías y operaciones representan un gran avance, solo permiten eliminar una parte del almidón en el proceso, mientras el resto afecta el rendimiento del mismo.

Chiu y Solarek (2009) y Popper *et al.* (2006), coinciden en que el uso de la enzima  $\alpha$ -amilasa es el método más eficiente para hidrolizar el almidón en los ingenios azucareros y refinerías. Pues elimina problemas de viscosidad y cristalización, reduce las pérdidas de sacarosa en la miel final y elimina las sanciones por la presencia de almidón en el azúcar (Popper *et al.*, 2006). Según Zhou *et al.* (2008), la hidrólisis es más eficaz cuando los gránulos de almidón están parcialmente solubilizados y gelatinizados por la maceración en caliente o el agua de imbibición. Tester y Karkalas (2004), informan que la hidrólisis

enzimática se realiza por lo regular en la estación de evaporación ya que a pesar de que en el proceso de clarificación se remueve un poco de almidón debido a la precipitación no se logra reducir en grandes cantidades como para aliviar los problemas en el proceso.

Cuando los niveles de almidón en el jugo se encuentran alrededor de 1000 ppm/°Brix la hidrólisis de almidón utilizando  $\alpha$ -amilasa se hace más difícil ya que el contacto entre el almidón y la enzima es muy bajo, de igual forma este problema puede reducirse aumentando la dosis de solución activa de  $\alpha$ -amilasa (Eggleston *et al.*, 2008).

### **1.5 Hidrólisis enzimática del almidón**

Actualmente la industria azucarera emplea la tecnología de hidrólisis enzimática para la degradación del almidón, debido a que este método logra eliminar en mayor medida el almidón en cuanto a otros métodos químico-físicos aplicados.

Las reacciones de hidrólisis se basan en el rompimiento de tres tipos principales de macromoléculas que son los polipéptidos, los polisacáridos y los ácidos nucleicos (Bugg, 2004). Cuando la molécula está compuesta por almidón el polisacárido es fraccionado en unidades de menor tamaño llamadas dextrinas (oligosacáridos de bajo peso molecular) que son cuantificadas por diferentes métodos como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), azúcares reductores por 3,5-dinitrosalicílico (DNSA), número de dextrosas equivalentes (DE), entre otros (Bugg, 2004).

Para Jacobs, (1998) la hidrólisis industrial del almidón se puede realizar a través de dos procesos diferentes, uno ácido y el otro enzimático. La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre las cuales pueden mencionarse: disminución

de la corrosión, bajo consumo de enzima y baja toxicidad de los hidrolizados con un impacto favorable sobre el medio ambiente. También son menores los costos de equipamiento (debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental), los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100 % (Lizcano, 2014).

Según Wook, Kim, Jeong, y Cherl (2003), la hidrólisis enzimática de los gránulos de almidón puede verse afectada por la estructura del grano, el tipo de cristal, el tamaño del cristal, la relación amilosa/amilopectina, el peso molecular promedio de esta relación, la presencia de lípidos y condiciones de especificidad de reacción de la enzima. Las variables que más influyen en la cinética de reacción del almidón son: el tipo de catalizador, la temperatura de proceso, la relación sólido-líquido, el diámetro y cristalinidad de la partícula, las cuales involucran la relación de amilosa/amilopectina, y el contenido de lípidos y proteínas (BeMiller, 2019).

### **1.5.1 Enzimas. $\alpha$ -amilasas**

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos (Barbosa *et al.*, 2014). Por lo tanto, se han considerado catalizadores ociosos desde un punto de vista ambiental, en reacciones que implican compuestos complejos o lábiles (Barbosa *et al.*, 2014; Fatemeh, Gholamreza, y Kambiz, 2014).

Las enzimas implicadas en las bioconversiones de almidón son de gran interés industrial y se ha prestado considerable atención a la obtención de nuevas enzimas con propiedades mejoradas o nuevas aplicaciones. Las enzimas termoestables que hidrolizan el almidón, como la amilasa, la pululanasa y la glucoamilasa, desempeñan un papel importante en las industrias alimentaria, química y farmacéutica (Aguloglu, Enez, Özdemir, y Matpann, 2014; Mollania, Khajeh, Hosseinkhani, y Dabirmanesh, 2010).

El término amilasa abarca una clase de enzimas que se producen en una amplia variedad de organismos, y se refiere a  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas y glucoamilasas (GA) (Young y deMan, 2018). Aunque estas enzimas pueden derivarse de varias fuentes, que incluyen plantas, animales y microorganismos, las amilasas microbianas generalmente satisfacen la demanda industrial.

La  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa) cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos del almidón, el glucógeno y diversos polisacáridos relacionados de forma aleatoria y libera diferentes tamaños de oligosacáridos en una configuración  $\alpha$ -anomérica (Aguloglu *et al.*, 2014; Bhanja y Tapati, 2015; Gibbs, Biela, y Krause, 2015). Características tales como pH, temperatura, naturaleza del sustrato, concentración de sustrato, concentración de enzima, presencia de iones metálicos, surfactantes y otros agentes estabilizantes, deben tenerse en cuenta para la selección y aplicación de la  $\alpha$ -amilasa a escala industrial (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Nampoothiri, Soccol, y Pandey, 2016). Las características bioquímicas de la  $\alpha$ -amilasa purificada pueden variar notablemente entre las especies e incluso entre las cepas de la misma especie (Bhanja y Tapati, 2015; Dey y Banerjee, 2012). En función de su pH óptimo para la actividad, las  $\alpha$ -amilasas también se clasifican como ácidas, neutras o alcalinas.

En los últimos tiempos, la demanda de enzimas industriales ha ido en aumento debido a sus beneficios económicos y ambientales (Chandrasekaran, 2016; Kuddus, 2018), pues no son tóxicas atendiendo a que son de origen natural. Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables, no requieren condiciones costosas desde el punto de vista económico pues funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, además se inactivan fácilmente una vez alcanzado el grado de transformación deseado (Polaina y MacCabe, 2007).

Sin embargo, a pesar del amplio uso de enzimas, sus ventajas se ven limitadas por una serie de problemas prácticos que incluyen el alto costo de aislamiento y purificación, su sensibilidad a las duras condiciones ambientales que pueden limitar su vida operativa y la dificultad de recuperarlos de la mezcla de reacción en forma activa, para su posterior reutilización y reprocesamiento (Fatemeh *et al.*, 2014; Gómez, 2016).

### **1.5.2 Aplicación de la $\alpha$ -amilasa en la industria**

Las amilasas se encuentran entre las enzimas industriales más importantes que tienen impacto en los estudios biotecnológicos y representan alrededor del 25-33 % del mercado mundial de enzimas (Ashwini, Kumar, y Karthik, 2011; Kumar *et al.*, 2016). Son una de las enzimas más versátiles, con una larga historia de aplicaciones catalíticas en industrias alimentarias y farmacéuticas.

Debido a las características y funciones que presentan tienen diversas aplicaciones industriales y biotecnológicas, entre las que se encuentran: la preparación de siropes y fructosa (Porfirif, Beatriz, y Dina, 2016), en la licuefacción del alcohol (Wood *et al.*,

2016) en las fábricas de desfibrado, preparación de adhesivos (Roy y Mukherjee, 2013), tratamiento de aguas albañales, la alimentación animal (Spohner, Muller, Quirman, y Czermahk, 2015), en la industria de los detergentes (Kumar *et al.*, 2016), panadera (Patel, Singhanía, y Pandey, 2016) y en la industria azucarera (Gibbs *et al.*, 2015). Recientemente, sus papeles en la síntesis de péptidos bioactivos y como aditivo en detergentes comerciales están ganando atención (Kumar *et al.*, 2016).

Las  $\alpha$ -amilasas también encuentran aplicación en el procesamiento de caña de azúcar como auxiliares para resolver problemas relacionados con la viscosidad y la filtración de azúcar cruda que surgen por la presencia del almidón en el proceso (Eggleston *et al.*, 2013; Young y deMan, 2018). Debido a la diversa funcionalidad de las  $\alpha$ -amilasas comerciales, su aplicación óptima en la industria de la caña de azúcar requiere un conocimiento completo de sus actividades y potencial para hidrolizar diferentes formas de almidón bajo diversas condiciones industriales (Cole *et al.*, 2015).

En 1958, Nicholson y Horsley publican sobre la presencia de amilasas en el jugo de caña, y describen un método para la eliminación del almidón a partir de estas, estos reportan una descomposición de almidón del 80-90 %, a 70 °C y pH de 5.7 a 5.9 (Nicholson y Horseley, 1958). Este método de "enzima natural", fue experimentado en varias industrias azucareras y adoptado como una práctica estándar por la Compañía Azucarera Tongaat (Bruijn y Jennings, 1968). Con la aplicación de este mismo método Carter, reporta una descomposición del almidón presente del 50 al 60 % a pH de 6,5 en 8 min, para zafras posteriores se alcanza un promedio de descomposición de almidón del 70 % (Carter, 1967). En experimentos a escala de laboratorio con sirope a 65 °Brix, el máximo

de hidrólisis obtenido fue de 55 % en 30 min a 70 °C, usando la misma relación almidón-enzima que con los jugos de caña (Bruijn y Jennings, 1968).

Schoonees (2004), corrobora el uso de  $\alpha$ -amilasa en algunas de las Industrias Cañeras de Suráfrica para controlar los altos niveles de almidón en el sirope del evaporador, estas son añadidas antes o después del evaporador de cuádruple efecto y son en su mayoría efectivas en reducir los niveles de almidón en la azúcar cruda por debajo de 130 ppm (Schoonees, 2008). Dentro de la estación de evaporación Zhou *et al.* (2008), plantea la adición de  $\alpha$ -amilasa en el pre-evaporador, mientras que Penados (2004), plantea agregarla en el penúltimo o último vaso del múltiple efecto, puesto que a estas condiciones de operación se favorece la hidrólisis. También el pH, la temperatura y tiempo de retención en esta etapa propician la acción de la enzima (Eggleston *et al.*, 2006). Bruijn y Jennings (1968), investigaron el efecto de la enzima en el jugo clarificado concentrado, en los evaporadores múltiple efecto gemelos de Amatikulu, obteniendo un promedio de destrucción de almidón de 70 %.

González (2018), considera que de las etapas del proceso de obtención de azúcar crudo, la enzima pudiera ser agregada en la etapa de purificación, puesto que en la misma se realiza la alcalización. La adición de CaOH conocido como lechada de cal, aporta el cofactor  $\text{Ca}^{2+}$  que permite la estabilidad de la enzima además de mejorar su actividad catalítica (Peña, 2009).

La mayoría de la industria americana de azúcar controla el almidón con la aplicación de la enzima  $\alpha$ -amilasa producida a partir del *Bacillus subtilis* (Zhou *et al.*, 2008). En países, como: Australia y Estados Unidos, se alivian problemas por la presencia de

almidón en los jugos de caña de azúcar con la aplicación de la  $\alpha$ -amilasa, sin embargo, el tratamiento con estas enzimas es caro, complicado y a veces ineficaz (Eggleston *et al.*, 2006).

Schoonees (2008), archiva por acción de las enzimas naturales presentes en la caña un 90 % de desdoblamiento del almidón proveniente del jugo mezclado para un tratamiento preservativo y a bajas temperaturas y por acción de  $\alpha$ -amilasa un 98 % de desdoblamiento. Bruijn y Jennings (1968), reportan con la aplicación de una dosis de enzima media de 7,2 ppm de amilasa bacteriana en el jugo mezclado, la destrucción del almidón en un rango de 78 a 93 %, con un promedio del 86 %, en 15 min, las pruebas se realizaron a escala industrial. Cole *et al.* (2016), demuestran que un desdoblamiento eficiente puede ser logrado con tiempos de hidrolisis de 60 min para jugos mezclados, con un contenido de almidón insoluble mayor del 80 al 90 % y concentraciones de  $\alpha$ -amilasa de 0,5 a 500 ppm. Para una razón de 1-2,5 g de  $\alpha$ -amilasa por tonelada de caña molida (aproximadamente 2 ppm), Penados (2004), reporta una remoción de 30 a 50 % de almidón.

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

## 1.6 Conclusiones parciales del capítulo

1. La introducción mecanizada del corte provoca un incremento de las principales fuentes de entrada de almidón al proceso: cogollo y hojas.
2. La presencia de almidón en los jugos demora o inhibe la cristalización, aumenta las pérdidas de azúcar en la miel final, además de causar demoras en el proceso al incrementar las viscosidades de los jugos.
3. El método de control del almidón más recomendado en los procesos de producción de azúcar crudo, es el proceso de hidrólisis enzimática mediante la  $\alpha$ -amilasa.
4. A pesar de los múltiples estudios existentes sobre el tema, para el caso de Cuba, no existe un consenso sobre donde aplicar el proceso de hidrólisis enzimática en la industria azucarera.

## **CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS**

En este capítulo se realiza la descripción del proceso de producción de azúcar crudo objeto de estudio. Se muestran los procedimientos para determinar las propiedades estructurales y funcionales de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Así como los criterios de selección de la posible dosis y corriente de aplicación de la hidrólisis enzimática mediante  $\alpha$ -amilasa, en el central objeto de estudio.

### **2.1 Descripción del proceso objeto de estudio**

El caso de estudio lo constituye el central azucarero “Mario Muñoz”, perteneciente al municipio de Los Arabos en la provincia Matanzas, en el anexo 1 se muestra el diagrama del proceso. En el proceso de producción de azúcar crudo se definen las etapas: preparación y molienda, purificación, concentración o evaporación, cristalización y centrifugación; en las cuales se establece el estudio del contenido de almidón.

#### **2.1.1 Etapa de preparación y molienda**

La caña se recibe en camiones, se pesa y pasa al basculador, donde se troza y tritura, para facilitar la extracción del jugo, antes de pasar al tándem de molinos por medio de una estera transportadora. En el primer molino se extrae el jugo primario de mayor concentración de sacarosa, mientras que el bagazo pasa por los restantes molinos para continuar la extracción del jugo. Para mejorar la extracción de la sacarosa se le introduce a la salida del quinto molino y entrada del sexto agua caliente entre 60 – 75 °C llamada agua de imbibición (25 a 30 % por caña molida), el jugo extraído pasa por un proceso de

recirculación del quinto molino al cuarto y así, sucesivamente hasta el segundo, de este último se obtiene el jugo diluido.

Por último el jugo primario y el diluido se mezclan, formando el denominado jugo mezclado, el cual pasa por un filtro colador para separarlo de las partículas sólidas. Todo el bagazo obtenido se separa hacia a un conductor de banda que lo eleva al rastrillo repartidor que alimenta las calderas.

### **2.1.2 Etapa de purificación**

La etapa de purificación comprende varias subetapas, donde se involucra: la alcalización, calentamiento, filtración y clarificación.

El jugo mezclado proveniente de los molinos es turbio y ácido, con un pH entre 5,2 y 5,7, razón por la que se introduce en un tanque y se le añade lechada de cal diluida, con una concentración de 500 a 650 g por tonelada de caña molida, con el objetivo de aumentar el pH alrededor de 7,8 a 8,2 para evitar la inversión de la sacarosa y favorecer el proceso de coagulación. A pH mayores, se afectan los reductores que entraron inicialmente en el jugo, lo que es perjudicial porque aumenta la solubilidad de la sacarosa y disminuye el agotamiento de las mieles en el proceso de cristalización. La lechada de cal ayuda a precipitar las impurezas orgánicas e inorgánicas que vienen en el jugo, así como minimizar las posibles pérdidas de sacarosa en este.

Luego, el jugo alcalizado pasa por varios calentadores, primarios, secundarios y rectificadores, cuya función es elevar la temperatura del jugo ligeramente por encima del

punto de ebullición para favorecer el proceso de coagulación de las impurezas y su posterior eliminación en la etapa de sedimentación.

En la clarificación se eliminan la mayor cantidad de impurezas en suspensión, coloidales y solubles, mediante la sedimentación de las mismas. El jugo alcalizado y calentado se mezcla con floculante para completar la reacción de formación y sedimentación de los flóculos de fosfato tricálcico, separándose en dos corrientes: una de jugo claro y otra de sedimento. El sedimento presenta un alto contenido de sacarosa, por esta razón estos lodos pasan por un proceso de filtración en los filtros rotatorios al vacío. Los filtros separan los lodos en dos nuevas corrientes: el jugo filtrado, de calidad intermedia que se recircula al tanque de alcalizar y un residual al que comúnmente se llama cachaza.

### **2.1.3 Etapa de evaporación**

La etapa de evaporación está formada por un pre-evaporador y un múltiple efecto, en ella se evapora entre el 75 y 80 % del agua presente en el jugo clarificado, para obtener una disolución más concentrada, pero sin llegar a la saturación. El jugo comienza a concentrarse en el pre evaporador que es un equipo a simple efecto; de este es bombeado al primer vaso del cuádruple efecto. El múltiple efecto funciona bajo el principio de Rillieux (Hugot, 1968). El producto final de este proceso es la meladura la cual posee aproximadamente 65 °Brix y una pureza de 85 %.

#### **2.1.4 Etapa de cristalización**

Para cristalizar la sacarosa se requiere elevar su concentración por encima de aquella correspondiente a una solución saturada, y llevarla en forma regulada y con precisión a la concentración requerida para lograr la cristalización. Dicho proceso ocurre en los tachos, los cuales trabajan a simple efecto. El sistema de masas cocidas que se emplea es el de tres masas cocidas con doble semilla, el ingenio cuenta con dos tachos de azúcar C, dos de azúcar B y tres de azúcar A.

#### **2.1.5 Etapa de centrifugación**

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

### **2.2 Determinación de las propiedades estructurales y funcionales**

A continuación, se muestran las metodologías aplicadas para la caracterización de la enzima  $\alpha$ -amilasa, y la determinación de las propiedades estructurales y funcionales de la misma.

### **2.2.1 Caracterización de la enzima $\alpha$ -amilasa**

Para la caracterización de la enzima  $\alpha$ -amilasa, se determinan la concentración de proteínas y la actividad enzimática de la misma. La determinación de la concentración de proteínas, se realiza mediante la aplicación del método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951) (Anexo 2). La actividad de la  $\alpha$ -amilasa se determina empleando el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNSA) (Benfeld, 1955) (Anexo 3).

### **2.2.2 Determinación de las propiedades estructurales**

Para la determinación de las propiedades estructurales de la enzima, se estudia el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la enzima, y se determinan los parámetros cinéticos de la reacción.

#### ***2.2.2.1 pH óptimo***

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos), se determina a través de las reacciones de hidrólisis con almidón al 1 %, en un intervalo de pH de 3,0 a 8,5 a 30 °C, con un tiempo de incubación de 10 min, en las soluciones tampón de Acetato de sodio 0,05 mol/L (pH = 3,0- 5,5) y Fosfato de sodio 0,05 mol/L (pH = 6,0- 8,5).

#### ***2.2.2.2 Temperatura óptima***

La influencia de la temperatura sobre la enzima, se determina mediante la incubación del almidón al 1 % y su hidrólisis durante 10 min a diferentes temperaturas en un intervalo de 35 a 90 °C (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los

gráficos). Seguidamente se utiliza el método del DNSA, para determinar la actividad de la enzima.

### ***2.2.2.3 Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción***

Para definir los parámetros cinéticos de la reacción se determinan las constantes cinéticas  $K_m$  (afinidad al sustrato) y  $V_{max}$  (velocidad máxima) de la enzima  $\alpha$ -amilasa, mediante el método de la doble recíproca de Lineweaver y Burk (Rathod y Pathak, 2014). Para ello, se preparan 7 disoluciones con diferentes concentraciones de almidón (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 y 4 mg/mL). A 0,5 mL de estas disoluciones se le adiciona 0,5 mL de enzima. A diferentes tiempos (2; 4; 6; 8 y 10 min) se le adiciona 1 mL de DNSA, se incuba por 10 min a 100 °C y se mide absorbancia a 546 nm.

### **2.2.3 Determinación de las propiedades funcionales**

Para la determinación de las propiedades funcionales de la enzima, se estudia la estabilidad de la misma a la temperatura y el pH.

#### ***2.2.3.1 Termoestabilidad***

La estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa a la temperatura, se determina mediante la medición de la actividad, después de incubar la preparación enzimática durante 10 min a diferentes temperaturas entre 35 y 90 °C en una solución tampón de fosfato de sodio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mmol/L, pH 6,5. Al culminar el periodo de incubación se enfrían en un baño de hielo y se evalúa la actividad.

### 2.2.3.2 Estabilidad al pH

La estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa al pH, se determina después de incubar la solución enzimática en soluciones tampón de acetato de sodio (50 mmol/L, pH 3,0- 5,0) y fosfato de sodio (50 mmol/L, pH 6,0- 8,5), durante 30 min a 30 °C. Transcurrido este tiempo se determina la actividad de la misma.

## 2.3 Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón

A continuación, se muestran los pasos seguidos para la obtención de un modelo matemático que describa el efecto de la hidrólisis enzimática del almidón en diversos parámetros de calidad de la industria.

### 2.3.1 Diseño de experimento

Para la obtención de un modelo matemático que permita describir el efecto de la hidrólisis enzimática, se realiza un diseño de experimentos. Los factores experimentales que se analizan son: brix, temperatura, pH, concentración de enzima y concentración de almidón inicial, y como variables de respuesta: porcentaje de remoción de almidón, pH, e incremento de reductores y cenizas. En la Tabla 2.1 se muestran los intervalos de los factores que se tienen en cuenta en el diseño de experimentos:

Tabla 2.1. Condiciones para el diseño de experimentos

<i>Temperatura [°C]</i>	<i>pH</i>	<i>°Brix</i>	<i>Contenido de almidón inicial [mg/L]</i>	<i>Concentración de enzima [%]</i>
30-90	5-8	16-65	200-600	0,01-0,05

### ***2.3.1.1 Determinación del tiempo de contacto***

Para determinar el tiempo de contacto de la enzima con los jugos se simula una corriente con las siguientes condiciones: pH 8 (tampón fosfato 1 mol/L), 65 °Brix, 60 °C y contenido de almidón 600 mg/L. Posteriormente se realiza la hidrólisis enzimática de las muestras a una dosis de enzima de 0,01 % (0,1 mg/mL) durante 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min de manera independiente, para determinar el tiempo de hidrólisis a la que la remoción se mantiene constante.

### ***2.3.1.2 Simulación de los jugos***

Los jugos se simulan a escala de laboratorio con agua destilada y azúcar crudo para obtener la concentración de sólidos solubles necesarios expresados en °Brix. El pH se ajusta utilizando como tampón acetato de sodio (1 mol/L, pH 5) y fosfato de sodio (1mol/L, pH 6,5 y 8). La molaridad final de los tampones en los jugos simulados es de 100 mmol/L. El contenido de almidón se obtiene añadiendo una solución al 2 % (2 g/100 mL) de almidón de papa disuelto en agua destilada. En el contenido final de almidón de la solución se tiene en cuenta el almidón contenido en la masa de azúcar que se emplea, para lograr el brix adecuado.

### ***2.3.1.3 Hidrólisis enzimática del almidón en los jugos simulados***

Para desarrollar la hidrólisis a los jugos simulados, se toman 50 mL del sustrato, y se adiciona la solución enzimática a diferentes concentraciones: 0,01 % (0,1 mg/mL), 0,03 % (0,3 mg/mL) y 0,05 % (0,5 mg/mL) (Fadilah y Syamsiah, 2015). Se incuba durante 30 min, y se enfría a 4 °C con el objetivo de detener la reacción de hidrólisis.

### **2.3.2 Caracterización de los hidrolizados**

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

#### ***2.3.2.1 Determinación del almidón en los jugos simulados***

Para la determinación del contenido de almidón presente en los jugos, después del proceso de hidrólisis, se sigue la metodología propuesta por MACU (2008) descrita en el anexo 4.

#### ***2.3.2.2 Determinación de Reductores***

Los reductores se determina empleando el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNSA) (Benfeld, 1955), (Anexo 3).

#### ***2.3.2.3 Cenizas conductimétricas***

La determinación de cenizas se realiza mediante la técnica propuesta por la Oficina Nacional de Normalización (2017), como se muestra en el anexo 5.

#### ***2.3.2.4 Medición del pH***

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

### **2.3.3 Selección de la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis**

Para la selección de la dosis y la corriente de aplicación de la enzima  $\alpha$ -amilasa, además de considerar los resultados del diseño de experimento, se realizará un análisis económico en el que se considerará los costos de aplicación de la enzima en distintas corrientes del proceso de producción, así como la disminución del consumo de vapor en el área de evaporación, por efecto de la aplicación de la hidrólisis enzimática. No se tienen en cuenta otros efectos importantes como es el consumo de vapor en tachos y el incremento del rendimiento en azúcar por no disponer de resultados experimentales o industriales que lo avalen.

### **2.4 Herramientas estadísticas**

Para evaluar los efectos que provoca el almidón en el proceso de producción de azúcar crudo, así como su comportamiento, y la incidencia de su desdoblamiento en algunos parámetros de calidad, los resultados obtenidos son sometidos a un tratamiento estadístico para facilitar el análisis. Las técnicas estadísticas utilizadas se muestran en el anexo 6, para su aplicación se utilizó como herramienta el *software Statgraphic Centurion 16.2*.

## **CAPÍTULO 3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

En el presente capítulo se exponen los resultados de la caracterización funcional y estructural de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Además, se analiza la influencia de la enzima  $\alpha$ -amilasa en la remoción de almidón y su incidencia en el pH, las cenizas y los azúcares reductores del producto obtenido. Se obtiene el modelo matemático de optimización simultánea que describe el proceso de hidrólisis enzimática. Se determinan los costos de aplicar la enzima en distintas corrientes del proceso, y los beneficios que genera en el ahorro de vapor.

### **3.1 Propiedades estructurales y funcionales de la enzima $\alpha$ -amilasa**

La caracterización de la enzima  $\alpha$ -amilasa comercial, suministrada por la empresa LABIOFAM (Cienfuegos, Cuba), se realiza por el desconocimiento de las características funcionales y estructurales de la misma.

#### **3.1.1 Caracterización de la enzima $\alpha$ -amilasa**

La enzima estudiada presentó una actividad específica (número de unidades de enzima por mg o mL de proteína) de 86 U/ $\mu$ g.

#### **3.1.2 Propiedades estructurales de la enzima $\alpha$ -amilasa**

Los parámetros óptimos informados no responden al análisis de un diseño de experimento, sino se definen como (Lehninger, 2008): pH óptimo: pH al cual la enzima

alcanza su máxima actividad catalítica; temperatura óptima: temperatura a la cual la enzima alcanza su máxima velocidad de reacción.

### 3.1.2.1 pH óptimo

El estudio del pH óptimo de la enzima se realizó en el intervalo de 3,0 a 8,5, en la figura 3.1 se muestra la correlación existente entre el pH y la actividad de la misma.

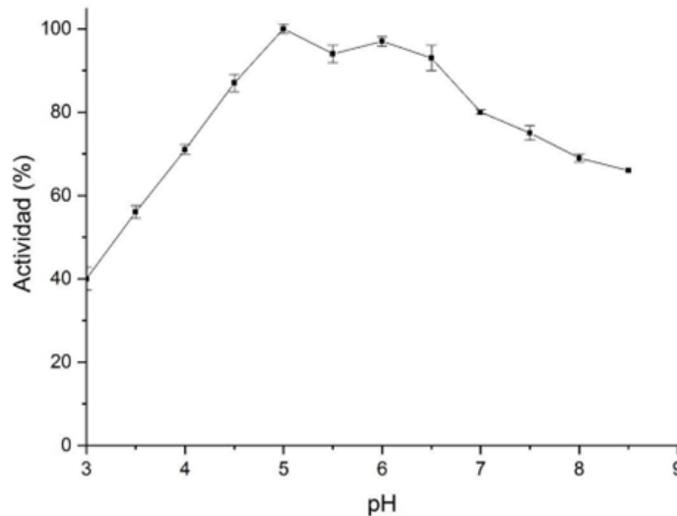


Figura 3.1. pH óptimo para la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Como se puede apreciar en la figura 3.1, con el incremento del pH, aumenta la actividad de la enzima hasta 5,0, donde la enzima alcanza el 100 % de actividad, valor definido como pH óptimo. Por encima o por debajo de este valor, la actividad de la enzima o la velocidad de la reacción catalizada por ella, disminuye (Kuddus, 2019).

Este incremento inicial es indicativo de la existencia de cambios en el entorno de la enzima, los que trae como consecuencia cambios en el grado de ionización de los residuos aminoacídicos en el sitio activo de la enzima (Lehninger, 2008). En el intervalo

de pH de 5,0 a 6,0 la enzima presentó un porcentaje de actividad superior al 95 %, para luego decrecer, sin embargo a pH 8,5 mantiene un 65 % de actividad.

Resultados similares alcanzaron Amid y Yazid. (2014), con una amilasa proveniente de la corteza de *Hiloceries polyrhizus* que retuvo más de un 84 % de actividad en el rango de pH de 4,5 a 6,0 con un pH óptimo de 5; Singh (2014), determinó este mismo valor de pH óptimo para la amilasa de *Triticum aestivum*; Torabizadeh, Mohammad, y Mohammad (2014) obtuvieron para las amilasas provenientes del *Bacillus Licheniformis* un pH óptimo de 5,5. Otros investigadores como Kikani y Singh (2015) y Xie *et al.* (2014), plantean que  $\alpha$ -amilasas provenientes de la cepa P11-2 de *Bacillus methylotrophicus* y de *Bacillus sp* TSSC-3 presentan un pH óptimo de 7,0. El pH óptimo puede variar en un rango de 2,0 a 12, la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas están activas en valores cercanos a 7 (Pandey *et al.*, 2000).

### **3.1.2.2 Temperatura óptima**

La temperatura óptima de la  $\alpha$ -amilasa fue determinada midiendo su actividad a diferentes valores de temperatura. El efecto que ejerce la temperatura sobre la actividad de la enzima caso de estudio, se muestra en la figura 3.2.

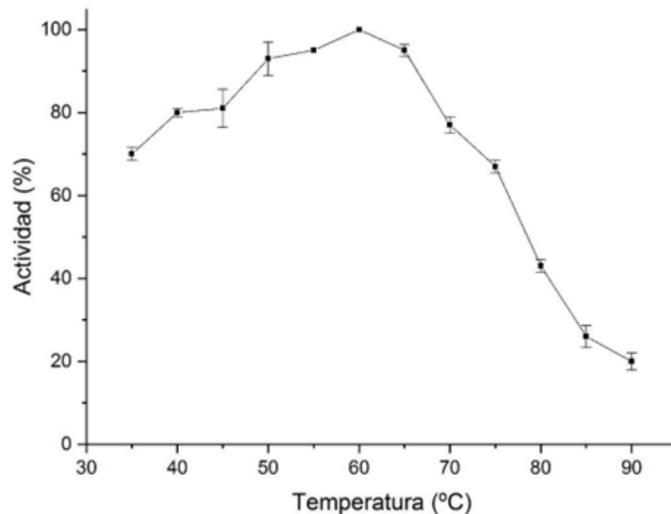


Figura 3.2. Perfil de temperatura para la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Como se observa en la figura 3.2 inicialmente hay un aumento de la actividad de la enzima, que se debe al incremento de la temperatura, el cual ocasiona el aumento de la velocidad de la reacción al existir más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar (Aldabe, Hueto, Juni, y López, 1998). Esto ocurre hasta alcanzar su máxima actividad catalítica a una temperatura de 60 °C (temperatura óptima), para luego decrecer rápidamente debido al proceso de inactivación térmica que sufren las enzimas (Shukla y Singh, 2016). La enzima en el intervalo de temperatura de 35- 70 °C muestra un porcentaje de actividad superior al 70 %, esto favorece su aplicación a escala industrial. Se observa además que a partir de 70 °C pequeños cambios de temperatura producen grandes variaciones en el porcentaje de actividad: una temperatura de 75 °C se corresponde con un 65 % de actividad, mientras que para 80 °C este valor decrece hasta 43 % y solamente un 20 % de actividad para una temperatura de 90 °C.

Gashtasbi, Ahmadian, y Noghabi (2014) coinciden con este resultado pero en este caso para la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*. Según Homaei y Saberi (2015), muchas amilasas provenientes de diferentes especies de *Bacillus* tienen una temperatura de reacción óptima alrededor de los 40- 70 °C. Fincan (2008), Sahnoun *et al.* (2012) y Srivastava, Sonam, y Kayastha (2015) determinaron en sus estudios para  $\alpha$ - amilasas obtenidas de *Bacillus subtilis*, *A. oryzae* MIBA316 y *A. oryzae* S2 temperaturas óptimas de 65 °C en el primer caso, y 50 °C en los otros. Sin embargo, la  $\alpha$ - amilasa de *Bacillus sp* TSSC-3 se mantiene activa en un rango de temperatura de 37- 100 °C, con un óptimo de 80 °C (Kikani y Singh, 2015).

### 3.1.2.3 Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción

La mejor forma de describir la cinética enzimática es mediante la ecuación de Michaelis-Menten, lo que presupone la formación de un complejo enzima-sustrato, es decir una cinética enzimática en fase homogénea (Gonzales, 2004). Como complemento se puede utilizar el método de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros cinéticos por linealización.

La constante de Michaelis - Menten se determina a partir de los datos de las velocidades iniciales de la reacción catalizada a diferentes concentraciones de almidón (0,5 g/L– 4,0 g/L) (Anexo 7), los resultados se muestran en la tabla 3.1:

Tabla 3.1. Valores de las constantes de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la  $\alpha$ -amilasa.

<i>Propiedad</i>	<i>Valores</i>
$K_m$ [g/L]	6,4
$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$ ]	28 571

Diversos autores informan valores de  $K_m$  tanto superiores como inferiores al que presenta la enzima objeto de estudio (Tabla 3.2). Mientras mayor es su valor, menor afinidad al sustrato presenta la enzima. Sin embargo, estos parámetros cinéticos son característicos para cada enzima (Bhanja y Tapati, 2015).

*Tabla 3.2. Valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para diferentes amilasas.*

<i>Amilasas Referencia</i>	<i><math>K_m</math> [g/L]</i>	<i><math>V_{max}</math> [<math>\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}</math>]</i>
Amid y Yazid (2014)	2,7	34,30
Bhanja y Tapati (2015)	0,5	1000
Xie <i>et al.</i> , (2014)	1,2	204
Fincan, Enez, Özdimir, y Matpan (2014)	0,005	3,5
Vihinen y Mantsala (1990)	14	-
Dheeran, Kumar, Jaiswal, y Adhikari (2010)	36	-
Dey, Palit, Banerjee y Maiti (2002)	11,16	68,97

### **3.1.3 Determinación de las propiedades funcionales de la enzima $\alpha$ -amilasa**

Las enzimas que se utilizan como catalizadores en diferentes procesos industriales, se someten a la acción de agentes químicos y físicos externos que provocan su desnaturalización. Esta razón motiva el estudio del efecto que ejerce el pH y la temperatura sobre la estabilidad de las mismas.

### 3.1.3.1 Estabilidad al pH

La estabilidad al pH de la enzima se estudió en un intervalo de 3,0 a 8,5. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.3:

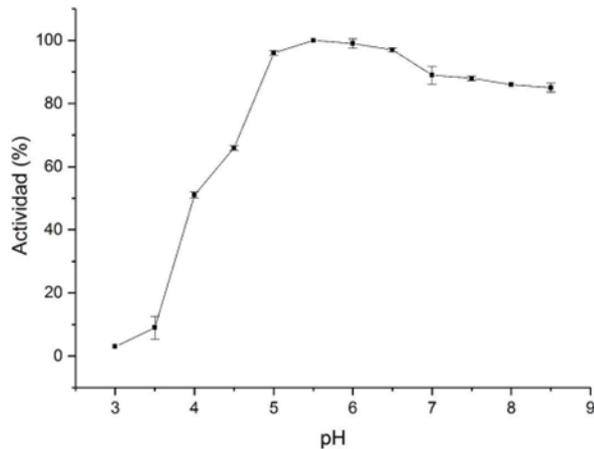


Figura 3.3. Estabilidad al pH de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Al analizar la figura se puede apreciar que la actividad de la enzima aumenta considerablemente a partir del pH 3,5, manteniéndose estable en el intervalo de 5,0 a 8,5 donde retiene más del 80 % de su actividad inicial. En la tabla 3.3 se muestra la estabilidad al pH para  $\alpha$ -amilasas de diferentes fuentes.

Tabla 3.3. Estabilidad al pH para amilasas de diferentes fuentes.

<i>Fuente</i>	<i>Estabilidad al pH</i>	<i>Referencia</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5,0-8,0	Demirkan, Mikami, Adachi, Higasa, y Utsumi (2005)
<i>Nocardiopsis sp B2</i>	7,0	Chakraborty <i>et al.</i> , (2014)
<i>Chryseobacterium toeanense TK001</i>	9,0-11,0	Wang, Liang, y Liang (2011)
<i>Streptomyces strain A3</i>	9,0	Chakraborty <i>et al.</i> , (2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	6.0 - 10.0	Monteiro y Oliveira (2010)

Al comparar los resultados mostrados en la tabla anterior con los obtenidos para la  $\alpha$ -amilasa de la presente investigación, se puede afirmar que la misma presenta una mayor estabilidad al pH que las  $\alpha$ -amilasa obtenida a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*. De igual forma se puede decir que la  $\alpha$ -amilasa caso de estudio tiene una mayor aplicación en las diferentes industrias, con respecto a las provenientes de las bacterias *Chryseobacterium toeanense* TK001 y *Streptomyces strain A3*, ya que estas solamente pueden ser utilizadas en industrias donde el pH de trabajo sea básico.

### **3.1.3.1 Termoestabilidad**

El efecto de la temperatura sobre la  $\alpha$ -amilasa fue estudiado después de la incubación de la misma durante un periodo de 10 minutos a diferentes valores de temperatura (Figura 3.4).

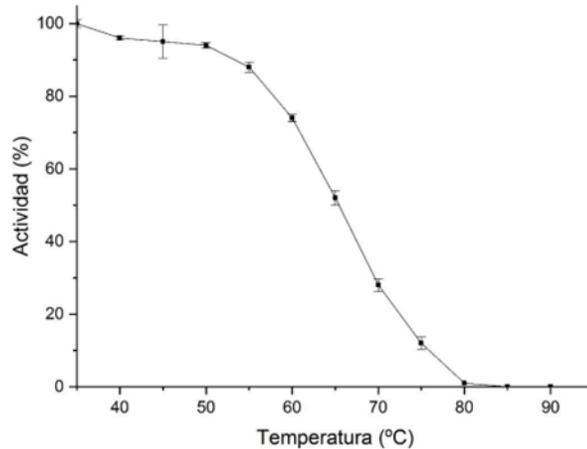


Figura 3.4. Termostabilidad de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

El análisis de la termostabilidad de la  $\alpha$ -amilasa indica que la enzima se mantiene estable en un rango de temperatura entre 35-50 °C, donde retiene más de un 90 % de su actividad. El valor de  $T_{50}$ , temperatura a la cual la enzima retiene el 50 % de su actividad inicial, es de 65 °C. A temperaturas mayores de 60 °C la actividad decrece significativamente, a 70 y 75°C los valores de actividad fueron de 30 y 15 % respectivamente. Se aprecia que a 80 °C la enzima pierde totalmente su actividad. Este fenómeno puede atribuirse a la desnaturalización térmica que sufren las enzimas por la exposición a elevadas temperaturas (Ramírez, Gómez, Ubeda, Arevalo, y Briones, 2016).

Kapfo, Smitha, Jyoti, y Jay Kant (2013), y Veesar, Imam, y Shahabuddin (2015) obtuvieron resultados similares para la  $\alpha$ -amilasa, pero en este caso a valores de 60 °C la enzima perdió totalmente su actividad. Según la bibliografía consultada se conoce que las  $\alpha$ -amilasas provenientes de plantas retienen un 90 % de su actividad en un intervalo de temperatura de 20 a 80 °C. A valores superiores hay una pérdida total de actividad (Amid

y Yazid, 2014; Kolawole, Ajele, y Sirdeshmukh, 2011; Kumari, Singh, Fitter, Polen y Kayastha, 2010).

Las enzimas que presentan su máxima actividad a bajos valores de pH y buena estabilidad a pH 5,0 son consideradas muy importantes desde el punto de vista de su aplicación industrial (Liu y Xu, 2008; Sajedi *et al.*, 2005). La  $\alpha$ -amilasa estudiada se mantiene estable en un intervalo de pH de 5 a 8,5 y en un rango de temperatura de 35 a 50 °C, donde retiene más de un 80 y 90 % de actividad respectivamente. Estas características la hacen adecuada para su aplicación industrial, específicamente en el proceso de producción de azúcar crudo.

### **3.2 Modelación del proceso de hidrólisis enzimática del almidón**

A continuación se muestran los elementos que permiten la obtención del modelo matemático que describe el proceso de hidrólisis enzimática del almidón, y el estudio de la influencia de las dosis de  $\alpha$ -amilasa en los parámetros de calidad.

#### **3.2.1 Diseño de experimento**

Se realiza un diseño de experimento de compuesto central para superficie de respuesta mediante el software *Statgraphics Centurion* 16.2. Los factores experimentales que se analizan son: brix, temperatura, pH, concentración de enzima y concentración de almidón inicial, y como variables de respuesta: porcentaje de remoción de almidón, pH, e incremento de reductores y cenizas. En el anexo 8, se definen las corridas experimentales generadas por el software, al tener en cuenta los intervalos de los factores que se muestran en la tabla 2.1 del subepígrafe 2.3.1.

### ***3.2.1.1 Determinación del tiempo de contacto***

Para determinar el tiempo de contacto de la enzima con los jugos se simula un sirope con las condiciones que se muestran en el subepígrafe 2.3.1.1, al tener en cuenta los siguientes criterios: pH=8, para un intervalo de pH de 5 a 8, el peor valor de actividad se logra a 8; 65 °Brix, según resultados obtenidos por Cole *et al.* (2015) con el aumento del Brix aumenta la viscosidad del jugo, por lo que se necesitan tiempos de hidrólisis más largos para descomponer efectivamente el almidón presente en el mismo; 60 °C, para un intervalo de 30 a 90 °C, no se selecciona 90 °C por ser una temperatura extrema, ni 30 °C por ser muy noble; 600 mg/L y dosis de 0,01 % (0,1 mg/mL) para comprobar la existencia de almidón remanente después del proceso de hidrólisis al mayor contenido de almidón y la menor dosis de enzima.

Según los criterios expuestos anteriormente estas condiciones son las más desfavorables para la actividad de la enzima en los intervalos de los factores experimentales del diseño, entonces si para estos valores la  $\alpha$ -amilasa es capaz de remover el almidón presente en el jugo, su acción será más eficaz bajo otras circunstancias. En la figura 3.5 se muestran los porcentajes de remoción de almidón después de aplicar el proceso de hidrólisis enzimática, al variar los tiempos de contacto entre la enzima y el jugo simulado.

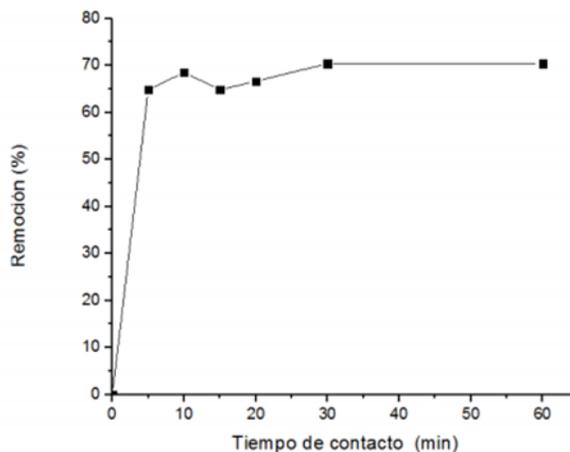


Figura 3.5. Tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato.

Como se aprecia en la figura 3.5, en solo 5 min la enzima desdobla el 63,40 % del almidón de la muestra inicial, mientras que para 30 y 60 min la remoción permanece invariable en un 70,24 %, es decir que a partir de 30 min la enzima no es capaz de desdoblar más almidón. Por lo tanto, se establece que 30 min es el tiempo de contacto a emplear para evaluar el efecto del proceso de hidrólisis enzimática en los parámetros de calidad en la industria azucarera. En el anexo 9, se presentan los porcentajes de remoción de almidón en función de los valores de absorbancia para cada tiempo, así como la caracterización estadística de la variable. El coeficiente de variación fue inferior al 12 %, en todos los casos.

### ***3.2.1.2 Proceso de hidrólisis enzimática***

Con el diseño de experimento y el tiempo de contacto del sustrato con la enzima determinados, se procede a simular los jugos para cada corrida experimental, y se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de los mismos, para luego determinar los valores de

contenido de almidón, cenizas, pH y reductores, por las metodologías descritas en el subepígrafe 2.3.2.

En el anexo 10 se muestran los resultados de la medición de estos parámetros, así como la caracterización estadística de los mismos. Como se aprecia en el anexo, los reductores, las cenizas y el pH presentan para cada experimento un coeficiente de variación inferior al 12 %. Sin embargo, el contenido de almidón presenta un coeficiente de variación superior al 12 % en 20 experimentos, la hidrólisis enzimática del almidón es un proceso biológico complejo, cualquier variación en la temperatura, el pH, la concentración de la enzima y el sustrato, afectan la actividad de la enzima y por lo tanto su capacidad de hidrolizar el sustrato.

### **3.2.2 Influencia de la dosis de $\alpha$ -amilasa en la hidrólisis enzimática**

Se estudia la influencia del proceso de hidrólisis enzimática en los porcentajes de remoción de almidón, en el incremento de los reductores y las cenizas, y en la variación del pH, en función de la dosis de enzima aplicada.

#### ***3.2.2.1 Porcentaje de Remoción de Almidón***

Para el estudio de la influencia de la enzima  $\alpha$ -amilasa en el desdoblamiento del almidón, se determinan los porcentajes de remoción de almidón en cada corrida experimental, y se agrupan en función de los niveles de enzima (Anexo 11). En la tabla 3.4, se presentan los valores mínimos y máximos de los porcentajes de remoción de almidón en correspondencia con la dosis de enzima que se aplica.

*Tabla 3.4. Valores máximos y mínimos de desdoblamiento de almidón.*

<i>Valor</i>	<i>% de remoción por nivel de <math>\alpha</math>-amilasa</i>		
	<i>0,01 %</i>	<i>0,03 %</i>	<i>0,05 %</i>
Mínimo	71,4	88,68	76,52
Máximo	96,15	97,91	96,48

La remoción del almidón en los experimentos varía entre un 71,4 y 97,91 %. El rango de remoción para 0,03 % es inferior al resto de los niveles. Para determinar la influencia de los niveles de  $\alpha$ -amilasa en el desdoblamiento de almidón y si existen diferencias significativas entre los mismos, se realizan el análisis de varianza, la prueba de múltiples rangos y las pruebas de normalidad que se muestran en el anexo 12.

Para la realización de estos análisis, primeramente se aplica la prueba de normalidad a los porcentajes de remoción por dosis, los cuales presentan una distribución normal (Anexo 12). Como se observa en el análisis de varianza, el valor de probabilidad es menor que el nivel de significación 0,05, por lo que existen diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de remoción de almidón a cada nivel de  $\alpha$ -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. La prueba de múltiples rangos del mismo anexo, indica que existen diferencias significativas entre los porcentajes de remoción a dosis de 0,01 % con respecto al resto de los niveles de  $\alpha$ -amilasa.

A partir del análisis, se establece que los niveles de  $\alpha$ -amilasa influyen en el desdoblamiento de almidón. Existen diferencias significativas entre los porcentajes de remoción, para dosis de 0,01 % se logra una remoción media de 86,37 %, mientras que para 0,03 y 0,05 % se alcanzan un 93,89 y 91,26 % respectivamente. Resulta interesante resaltar que la remoción media a 0,03 % es superior a 0,05 %.

### **3.2.2.2 Azúcares Reductores**

En el anexo 13, se presentan los azúcares reductores (mg/mL), de las muestras madres y sus correspondientes hidrolizados, agrupados por dosis de enzima. Como se aprecia en el anexo, los reductores tienden a aumentar en cada experimento, consecuencia directa del proceso de hidrólisis, pues la enzima escinde los enlaces  $\alpha$ , 1-4 glicosídicos presentes en las cadenas de amilosa o amilopectina del almidón, lo que origina glucosa y oligosacáridos de longitudes variables (Monteiro y Oliveira, 2010). Para estudiar el efecto de la  $\alpha$ -amilasa en los reductores, se determina el incremento de los mismos durante el desdoblamiento de los almidones para cada experimento.

A los datos agrupados por nivel de enzima, se les aplica las pruebas de normalidad como se muestra en el anexo 14. Se observa que para dosis de 0,01 y 0,05 % el incremento de reductores no presenta una distribución normal, por lo que se transforman los datos a todos los niveles para alcanzar la normalidad. El efecto de los niveles de  $\alpha$ -amilasa en el incremento de azúcares reductores, se verifica a partir del análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos que se muestran en el mismo anexo. El valor de probabilidad es mayor que el nivel de significación 0,05, por lo que no existen diferencias significativas entre las medias de incrementos de reductores a cada nivel de  $\alpha$ -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. Estos resultados se reafirman al realizar la prueba de múltiples rangos, pues existe un solo grupo homogéneo.

A partir del análisis se establece que no existen diferencias significativas entre los niveles de  $\alpha$ -amilasa, en cuanto al incremento del contenido de reductores, demostrándose que a estas dosis el proceso de hidrólisis no influye en este parámetro. Estos resultados son

satisfactorios, pues niveles elevados de azúcares reductores pueden tener como resultado la formación de color, cuando se someten a altas temperaturas o fuertes condiciones alcalinas. Además, como no constituyen azúcares reductores producto de la inversión de la sacarosa que se generan en el proceso no generan pérdidas, por tanto no afecta el recobrado del proceso. Sin embargo Jiménez (2017), para niveles superiores de enzima (0,05 y 0,25 g/100 mL), determina que existen diferencias significativas en el incremento de los reductores.

### ***3.2.2.3 Cenizas conductimétricas***

La influencia de la enzima  $\alpha$ -amilasa en las cenizas conductimétricas, se determina mediante el estudio del incremento de los porcentajes de cenizas por efecto de los niveles de enzima (Anexo 15).

La influencia de los niveles de  $\alpha$ -amilasa en el incremento de las cenizas y la existencia de diferencias significativas entre los mismos, se determinan mediante la realización del análisis de varianza, la prueba de múltiples rangos y las pruebas de normalidad que se muestran en el anexo 16. Para la realización de este análisis, primeramente se aplica la prueba de normalidad a los porcentajes de cenizas por dosis, los cuales presentan una distribución normal. Según el análisis de varianza, el valor de probabilidad es menor que el nivel de significación 0,05, por lo que existen diferencias significativas entre las medias del incremento de cenizas a cada nivel de  $\alpha$ -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. Según la prueba de múltiples rangos existen dos grupos homogéneos, lo que indica que existen diferencias significativas entre el incremento de cenizas a 0,05 % y el resto de los niveles de  $\alpha$ -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %.

A partir del análisis se establece que los niveles de  $\alpha$ -amilasa influyen significativamente en el incremento de las cenizas. A mayores concentraciones de  $\alpha$ -amilasa, se incrementan las cenizas. Como el incremento de las cenizas es un suceso indeseable en el proceso de producción, se debería, trabajar con los niveles más bajos posibles de  $\alpha$ -amilasa.

#### **3.2.2.4 pH**

El efecto de la acción de la enzima en el pH del jugo, se determina mediante la variación del pH en las corridas experimentales. En el anexo 17, se presentan los valores de pH iniciales y finales de los experimentos, así como su variación, agrupados por nivel de  $\alpha$ -amilasa.

A la variación del pH por dosis de enzima, se le aplica las pruebas de normalidad como se muestra en el anexo 18. Donde se aprecia que para la dosis de 0,01 % la variación de pH no presenta una distribución normal, por lo que se transforman los datos a todos los niveles para alcanzar la normalidad. El efecto de los niveles de  $\alpha$ -amilasa en la variación del pH, se verifica a partir del análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos que se muestran en el mismo anexo. El valor de probabilidad en el análisis de varianza del anexo 18, es mayor que el nivel de significación 0,05, por lo que no existen diferencias significativas entre las medias de la variación de pH a cada nivel de  $\alpha$ -amilasa, con un nivel de confianza de 95 %. Esto se reafirma mediante la prueba de múltiples rangos, al existir un solo grupo homogéneo,

A partir del análisis, se establece que no existen diferencias significativas para cada nivel de  $\alpha$ -amilasa en cuanto a la variación del pH, lo que indica que la aplicación de la misma no influye significativamente en este parámetro. Esto beneficia el proceso de producción,

pues se evita la inversión de la sacarosa a pH ácidos y afectaciones en los reductores a pH básicos.

### **3.2.3 Análisis de los resultados del diseño experimental**

Definidos los valores de las variables de respuesta del diseño de experimento, se procede a la obtención de los modelos matemáticos que describen el efecto de la hidrólisis sobre los mismos, mediante el software *Statgraphics Centurion* 16.2. Al desarrollar el modelo de superficie de respuesta en el *software*, se obtienen los análisis de varianza ANOVA, diagramas de Pareto y modelos matemáticos correspondientes a cada variable.

El análisis de varianza permite evaluar si existe relación significativa entre los factores y la respuesta medida. Mientras que la influencia en la respuesta del sistema ante cambios en los factores puede ser observada en el diagrama de Pareto.

#### ***3.2.3.1 Porcentaje de Remoción de Almidón***

Los resultados obtenidos por el *software* para el porcentaje de remoción de almidón se pueden observar en el anexo 19. Como se aprecia en el análisis de varianza 4 efectos (temperatura, Brix, concentración de  $\alpha$ -amilasa y contenido de almidón inicial) tienen un valor de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %.

Además en el diagrama de Pareto (figura 3.6), se muestran cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones en orden decreciente de magnitud sobre el

porcentaje de remoción. La línea vertical permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos.

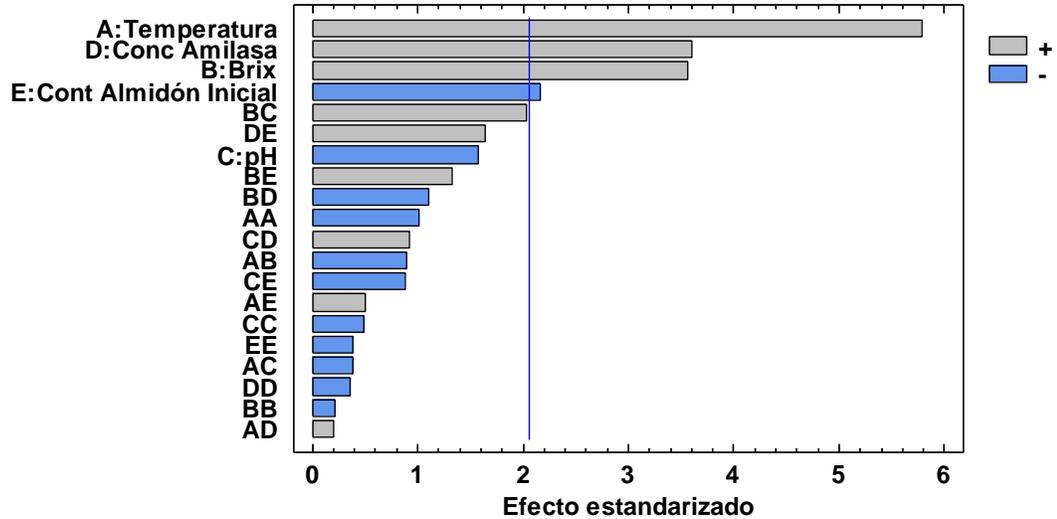


Figura 3.6. Diagrama de Pareto para % de remoción de almidón.

En dicho diagrama se confirma que la temperatura, la concentración de  $\alpha$ -amilasa y el Brix, son las variables de mayor incidencia positiva sobre la respuesta, un aumento en el valor de estas variables conlleva un incremento de la remoción del almidón, en los intervalos estudiados.

Con el aumento de la temperatura aumenta la actividad catalítica de la enzima, lo que significa que se incrementa la capacidad de la misma de desdoblar el almidón, hasta alcanzar su máxima actividad a la temperatura óptima (60 °C), para luego decrecer rápidamente debido al proceso de inactivación térmica que sufren las enzimas (Shukla y Singh, 2016; Kuddus, 2019). En la tabla 3.5, se muestra que a 90 °C la actividad de la enzima no decrece significativamente, pues alcanza altos porcentajes de remoción, esto se puede apreciar en los experimentos 7, 9, 14, 15 y 35.

Tabla 3.5. Efecto de factores en el porcentaje de remoción de almidón.

<i>Experimento</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>[°Brix]</i>	<i>pH</i>	<i>Concentración de enzima</i>	<i>% de Remoción</i>
13	30	40,5	6,5	0,03 %	88,68
19	60				95,01
14	90				96,89
9	90	16	5	0,01 %	91,25
15		65			93,86
35	90	16	5	0,05 %	95,59
7		65			96,48

Al aumentar la concentración de  $\alpha$ -amilasa, se incrementa el grado de hidrólisis, pues se favorece la cantidad de sitios activos disponibles para la interacción enzima-sustrato, para una cantidad suficiente de almidón. A elevados niveles de Brix a altas temperaturas, según Cole *et al.* (2015), la actividad de la enzima se preserva debido a la reducción de la velocidad de reacción, al reducirse la velocidad de difusión de la enzima. El aumento de los porcentajes de remoción en función de la dosis de enzima y el Brix del jugo puede apreciarse en los experimentos 7, 9, 15 y 35 de la tabla 3.5.

### 3.2.3.2 Incremento de reductores

En el anexo 20 se muestran los resultados obtenidos por el software para el incremento de reductores. Como se aprecia en el análisis de varianza la temperatura, el pH, y las interacciones del contenido de almidón con el Brix y la dosis de enzima, poseen un valor de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de

cero con un nivel de confianza del 95 %. El efecto de los factores experimentales sobre la variable respuesta se refleja en el diagrama de Pareto siguiente:

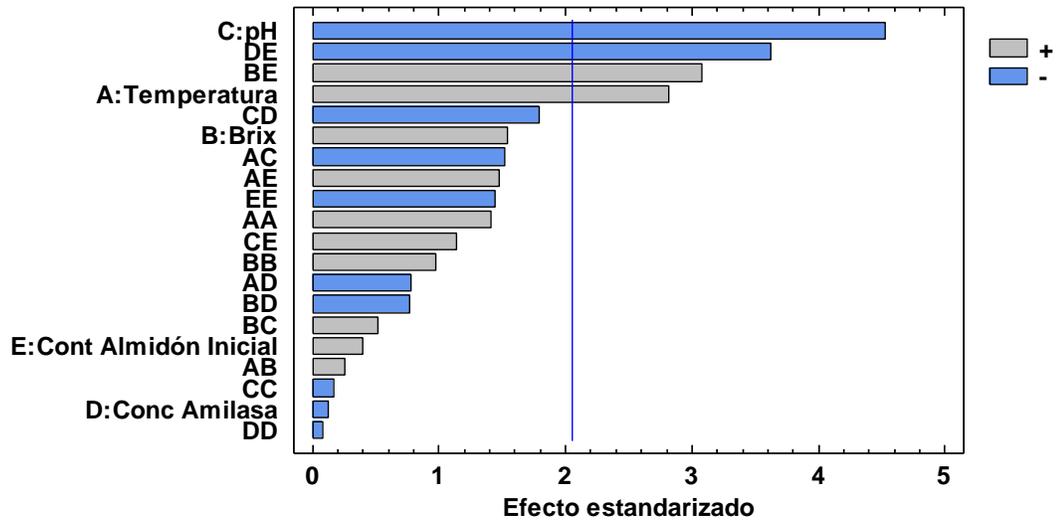


Figura 3.7. Diagrama de Pareto para incremento de reductores.

Como se observa en la figura 3.7, la mayor incidencia negativa sobre el incremento de los reductores lo tiene el pH, seguido de la interacción contenido de almidón-dosis de enzima; la temperatura y la interacción contenido de almidón-Brix inciden de manera positiva.

Con el aumento del pH hay una disminución en el incremento de los reductores, la máxima actividad catalítica de la enzima se alcanza a pH 5 (óptimo), mientras que el intervalo de estudio es de 5 a 8, la actividad de la enzima disminuye a medida que aumenta el pH, esto provoca una disminución de la capacidad de la misma de desdoblar el almidón en glucosa y oligosacáridos de longitud variables. Además a pH ácidos ocurre la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa (azúcares reductores), si se incrementa el

pH este suceso no ocurre lo que influye en la disminución de los reductores. La influencia del pH en los reductores puede observarse en los experimentos 12 y 15 de la tabla 3.6.

*Tabla 3.6. Efecto de factores en el incremento de reductores.*

<i>Experimento</i>	<i>pH</i>	<i>[°Brix]</i>	<i>Contenido de almidón inicial [mg/L]</i>	<i>Concentración de enzima</i>	<i>Incremento de reductores [mg/mL]</i>	<i>Razón sustrato-enzima</i>
15	5	65	600	0,01 %	21,91	6
20	8	16	200		1,54	2
33	8		600		2,78	6
18	8	65	200		2,85	2
12	8		600		14,12	6
26	8	16	200		0,05 %	1,19
6	8		600	0		1,2
42	8	65	200	2,38		0,4
37	8		600	0		1,2

Con el aumento del Brix y la temperatura, aumenta la actividad catalítica de la enzima, lo que significa un incremento en los reductores, esto además se favorece en cierto grado si se aumenta el contenido de almidón inicial. Con el aumento de la interacción brix-contenido de almidón se favorece la actividad de la enzima, y por lo tanto se incrementan los reductores, como se muestra en los experimentos 12, 18, 20 y 33 de la tabla 3.6.

Al analizar la interacción contenido de almidón-dosis de enzima, un factor importante a tener en cuenta es la razón concentración de sustrato y concentración de enzima, a valores bajos se obtienen pocos productos, y a valores elevados la reacción es rápida y la

actividad de la enzima alta (Mathewson, 1998). En la tabla 3.6, puede apreciarse que a valores bajos de esta relación el incremento de reductores es bajo, mientras en los experimentos 12 y 15 al ser la relación mayor el aumento es significativo.

### ***3.2.3.3 Incremento del % de Cenizas***

Los resultados obtenidos por el *software* para el incremento de porcentaje de cenizas se pueden observar en el anexo 21. Como se aprecia en el análisis de varianza, la temperatura, el brix, la concentración de enzima, los términos cuadráticos de temperatura, brix y pH, además de las interacciones Brix-Contenido de almidón inicial y pH con brix, concentración de enzima y contenido de almidón inicial, presentan valores de probabilidad (p) menores que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %, siendo los más significativos el Brix y la concentración de  $\alpha$ -amilasa ( $p=0$ ).

Además el efecto de cambios en los factores sobre el incremento de las cenizas, se puede observar en el diagrama de Pareto de la figura 3.8. Donde se aprecia que el parámetro de mayor incidencia negativa sobre el incremento de cenizas es el Brix, y el de mayor incidencia positiva es la concentración de amilasa.

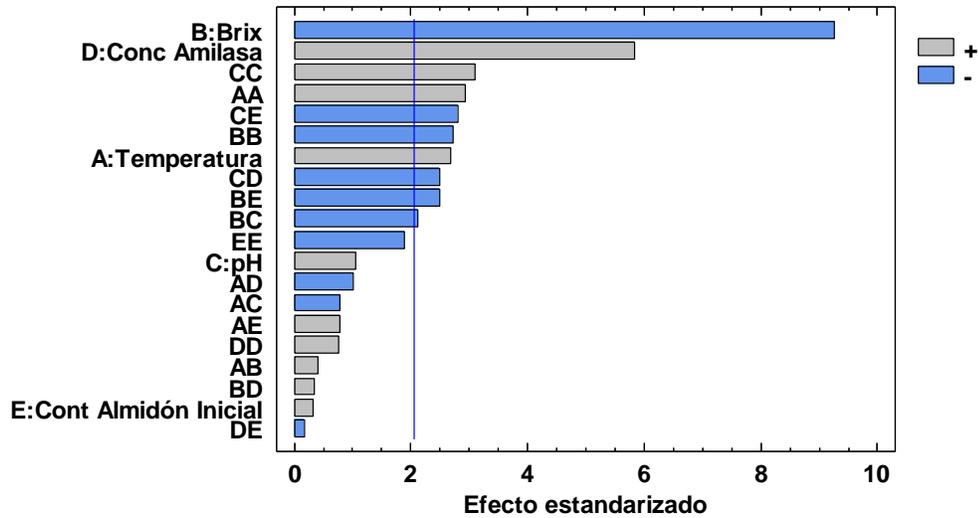


Figura 3.8. Diagrama de Pareto para incremento del % de cenizas.

Según Zossi *et al.* (2011), los principales constituyentes inorgánicos que entran al proceso de producción de azúcar son: compuestos insolubles, constituyentes de moléculas orgánicas complejas, sales, cationes (potasio y sodio) y aniones (silicatos, fosfatos y sulfatos). En la tabla 3.7, se aprecia la influencia del Brix y la concentración de enzima en el incremento de las cenizas. Al aumentar el Brix hay una disminución del incremento de cenizas, mientras lo contrario ocurre al aumentar la concentración de enzima.

Tabla 3.7. Efecto de factores en el incremento del porcentaje de cenizas.

Experimento	[°Brix]	Concentración de enzima	Incremento de % cenizas
9	16	0,01 %	0,33
35		0,05 %	0,39
15	65	0,01 %	0,09
7		0,05 %	0,26

Como se explica en el subepígrafe 3.2.3.1, con el aumento del Brix se incrementa la actividad de la enzima, y por tanto la capacidad de desdoblar oligosacáridos de longitudes variables. Esto hace posible que, en cierta medida, se degraden constituyentes de moléculas orgánicas complejas.

Al aumentar la concentración de la enzima es de esperar un incremento de las cenizas, pues las  $\alpha$ -amilasas requieren iones metálicos para su actividad, su estabilidad estructural e integridad (Kaur, Kaur, y Kumar, 2014; Sharma y Satyanarayana, 2013). Varios iones metálicos, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , se suelen añadir al medio durante la producción de las mismas (Sharma y Satyanarayana, 2013). La afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$  es más fuerte que la de otros iones (Gupta, Gigras, Mohapatra, Kumar, y Chauhan, 2003), al ser capaz de regular la estabilidad estructural y actividad catalítica de la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas (Tapati, Kumar, Banerjee, y Chandna, 2016). Por lo tanto las  $\alpha$ -amilasas son conocidas por contener al menos un  $\text{Ca}^{2+}$  por molécula (Gupta, Gigras, Mohapatra, Kumar, y Chauhan, 2003; Tapati, Kumar, Banerjee, y Chandna, 2016).

#### **3.2.3.4 pH**

En el anexo 22 se muestran los resultados obtenidos por el software para la variación de pH. Como se aprecia en el análisis de varianza el brix, pH, y la interacción Brix-pH presentan valores de probabilidad (p) menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %, siendo el más significativo el pH (p=0). La influencia de los factores experimentales sobre la variable respuesta se refleja en el diagrama de Pareto (figura 3.9), donde el parámetro de mayor

incidencia positiva en el pH luego de aplicar el proceso de hidrólisis, es el pH inicial del licor.

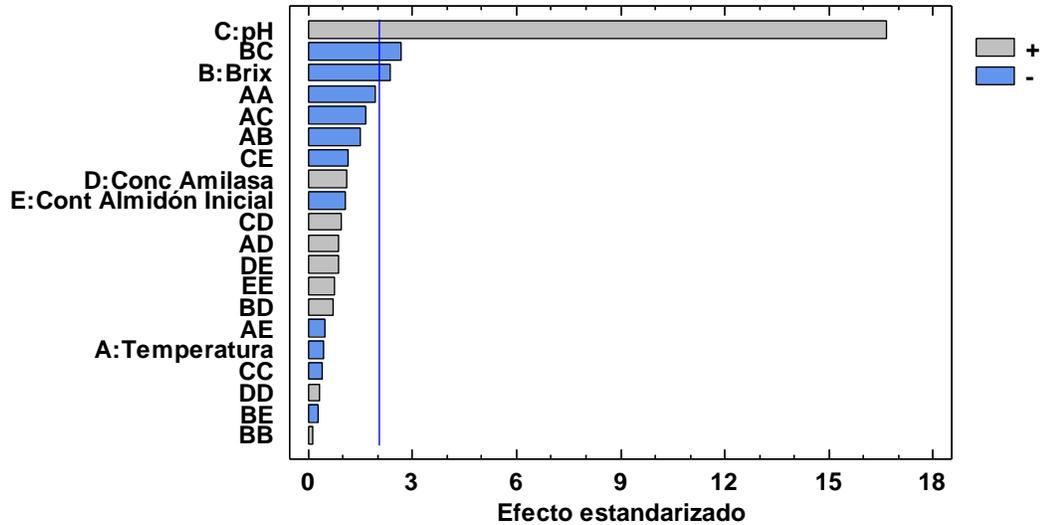


Figura 3.9. Diagrama de Pareto para pH final.

El resto de los factores no pueden considerarse significativos con respecto a este, a pesar de que el Brix y la interacción Brix-pH presentan valores de probabilidad (p) menores que 0,05.

### 3.2.3.5 Análisis de la calidad de ajuste del modelo

Se procede a validar los modelos matemáticos determinados para cada variable de respuesta, al tener en cuenta los criterios que se muestran en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Análisis de calidad de ajuste de los modelos matemáticos.

Parámetros para validar el modelo	Variables de Respuesta			
	% de remoción de Almidón	Incremento de Reductores	Incremento del % de Cenizas	pH final
R <sup>2</sup> (%)	79,10	72,80	88,18	92,25
Estadístico Durbin-Watson (P-value)	2,15 (0,67)	1,89 (0,34)	2,22 (0,76)	2,20 (0,74)
F-Fischer (P-value)	4,92 (0,00)	3,48 (0,00)	9,70 (0,00)	15,47 (0,00)

El estadígrafo R<sup>2</sup> indica en que porcentaje los modelos, así ajustados, explican la variabilidad de las variables de respuesta, encontrándose en todos los casos por encima del 70 %, valor sugerido como mínimo para fines de optimización por Gutiérrez y de la Vara (2008). Los valores de probabilidad correspondientes a la prueba de Durbin-Watson para todas las variables de respuesta son superiores a 0,05 para una confianza del 95 %, lo que significa que los errores experimentales no se encuentran correlacionados entre sí. Esto revela que todas las variables que inciden en estas, se encuentran controladas o contempladas en la modelación. Mediante la prueba de Fisher se estudia la pérdida de ajuste por un estimador interno de la varianza del error experimental. En este caso como el valor de probabilidad de los análisis de regresión múltiple son menores que 0,05 hay una relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 95 %. Al no existir evidencias de pérdida de la calidad de ajuste de los modelos, no se debe modificar o remover ningún término de estos. Al tener en consideración los criterios anteriores, se corrobora que los modelos presentan una calidad de ajuste adecuada.

### 3.2.3.6 Función de deseabilidad

El éxito de alcanzar un óptimo multi-respuesta mediante la función de deseabilidad, depende de la calidad de los modelos de estimación que se utilizan para construir las respuestas deseables individuales. Estos modelos deben ser estadísticamente significativos (Vera *et al.*, 2014).

La función de deseabilidad implica transformaciones de cada una de las variables de respuesta estimadas  $\hat{y}_i(x)$  a un valor de deseable  $d_i(x)$ , en función de los criterios de optimización adoptados. En la tabla 3.9 se presentan los criterios de optimización, así como los límites máximos y mínimos para cada variable de respuesta.

Tabla 3.9. Criterio de optimización para las variables de respuesta.

#	Variable de Respuesta	Criterio de Optimización	Valor Superior ( $U_i$ )	Valor Inferior ( $L_i$ )	Pesos ( $w_i$ )
1	Porcentaje de remoción de Almidón (%R)	Maximizar	97,91	71,39	5
2	Incremento de Reductores (IR)	Maximizar	21,91	0	4
3	Incremento de Cenizas (IC)	Minimizar	0,39	0,02	2
4	pH	7	7,67	4,8	3

Con la función de deseabilidad se persigue hallar el óptimo simultáneo donde el porcentaje de remoción de almidón y el incremento de reductores sea máximo, el incremento de cenizas mínimo, y el pH se mantenga neutro; con el objetivo de reducir los efectos negativos de la aplicación del proceso de hidrólisis enzimática en la producción de azúcar crudo. Mediante la Matriz de Saaty se determina el orden de impacto de las

variables de respuesta (Anexo 23), y se define  $w_i$  en función de los criterios del *Statgraphics Centurion* 16.2.

En función de maximizar la remoción de almidón y el incremento de reductores en el proceso, sus deseabilidades individuales quedan definidas de la manera siguiente:

$$d_1 = \left( \frac{\%R - 71,39}{97,91 - 71,39} \right). \quad (3.1)$$

$$d_2 = \left( \frac{IR}{21,91} \right). \quad (3.2)$$

Siendo %R y IR, modelos matemáticos que describen la remoción de almidón y el incremento de reductores productos del proceso de hidrólisis (Ver Anexos 19 y 20).

Para minimizar el incremento cenizas, su deseabilidad individual se define como:

$$d_3 = \left( \frac{IC - 0,39}{0,02 - 0,39} \right). \quad (3.3)$$

Donde IC, modelo matemático que describe el incremento de cenizas producto de la hidrólisis enzimática del almidón (Ver Anexo 21).

Para que el pH se mantenga en 7, la deseabilidad individual queda definida como:

$$d_4 = \left( \frac{pH - 4,8}{7 - 4,8} \right) \text{ Si } pH < 7 \quad (3.4)$$

$$d_4 = \left( \frac{pH - 7,67}{7 - 7,67} \right) \text{ Si } pH > 7 \quad (3.5)$$

Donde pH, es el modelo matemático que describe el pH del medio luego de la hidrólisis del almidón (Ver Anexo 22).

Entonces la deseabilidad global (D), se define de la manera siguiente:

$$D = (d_1^5 * d_2^4 * d_3^2 * d_4^3)^{\frac{1}{14}}. \quad (3.6)$$

### 3.3 Selección de la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis enzimática

Con la función de deseabilidad definida, se procede a evaluar el modelo de optimización simultánea para las condiciones que se muestran en la tabla 3.10, que responden a las corrientes de jugo alcalizado, clarificado y meladura.

*Tabla 3.10. Condiciones de las corrientes de jugo alcalizado, clarificado y meladura.*

<i>Corriente</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>[°Brix]</i>	<i>pH</i>	<i>Contenido de almidón inicial [mg/mL]</i>
Jugo alcalizado	40,0	16,0	7,20	600
Jugo clarificado	90,0	17,0	6,95	600
Meladura	65,0	64,7	6,80	600

En la tabla 3.11, se muestran los resultados de evaluar la función de deseabilidad en las corrientes mencionadas anteriormente, al variar la dosis de enzima entre 0,01 y 0,05 %.

Donde A: Temperatura; B: °Brix; C: pH inicial; D: Concentración de enzima; E: Contenido de Almidón Inicial; %R: Porcentaje de remoción de almidón; I.R: Incremento de Reductores; I.C: Incremento de Cenizas; pH: pH final.

Tabla 3.11. Evaluación de la función de deseabilidad.

<i>Corriente</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>% R</i>	<i>I. R</i>	<i>I.C</i>	<i>pH</i>	<i>Deseabilidad</i>
<i>Jugo alcalizado</i>	40	16	7,2	0,01	600	76,88	0,44	0,13	7,02	0,18
				0,015		78,42	0	0,13	7,00	0,06
				0,020		79,85	0	0,13	7,00	0,21
				0,025		81,16	0	0,14	7,00	0,27
				0,03		82,36	0	0,15	7,01	0,32
				0,035		83,45	0	0,16	7,04	0,35
				0,04		84,42	0	0,17	7,07	0,38
				0,045		85,28	0	0,19	7,11	0,41
				0,05		86,03	0	0,21	7,16	0,42
<i>Jugo clarificado</i>	90	17	6,95	0,01	600	84,22	7,04	0,22	6,49	0,47
				0,015		85,78	6,42	0,21	6,49	0,48
				0,020		87,23	5,78	0,21	6,51	0,48
				0,025		88,57	5,11	0,22	6,53	0,48
				0,03		89,79	4,42	0,22	6,57	0,47
				0,035		90,90	3,70	0,23	6,61	0,46
				0,04		91,90	2,96	0,24	6,67	0,44
				0,045		92,79	2,19	0,26	6,73	0,40
				0,05		93,56	1,40	0,27	6,80	0,36

Tabla 3.11. Continuación.

Corriente	A	B	C	D	E	% R	I. R	I.C	pH	Deseabilidad
Meladura	65	64,7	6,8	0,01	600	91,59	8,73	0	6,37	0,68
				0,015		92,73	8,01	0	6,38	0,67
				0,020		93,76	7,26	0	6,41	0,67
				0,025		94,67	6,49	0	6,44	0,66
				0,03		95,48	5,69	0	6,48	0,64
				0,035		96,17	4,87	0	6,54	0,62
				0,04		96,74	4,02	0	6,60	0,60
				0,045		97,21	3,14	0	6,67	0,56
				0,05		97,56	2,25	0	6,75	0,51

Como se aprecia en la tabla 3.11, en el jugo alcalizado a medida que aumenta la dosis de  $\alpha$ -amilasa aplicada se incrementa la deseabilidad, mientras lo contrario ocurre en las otras corrientes. Los mayores valores de deseabilidad se obtienen para la meladura, esto era de esperar, pues el valor óptimo de deseabilidad que se obtiene mediante el *Statgraphics Centurion 16.2* es de 0,71 para 65 °Brix y pH 7, condiciones similares a la de esta corriente.

Al tener en cuenta lo anterior, podría considerarse aplicar el proceso de hidrólisis enzimática en la meladura, a una dosis de 0,01 %. Sin embargo los costos de aislamiento y purificación de las enzimas son elevados, por lo que habría que considerar los costos de adquisición de la  $\alpha$ -amilasa y los beneficios de su aplicación en la reducción del consumo de vapor, en el análisis.

### 3.3.1 Ahorro del consumo de vapor

La reducción del consumo de vapor por efecto de la aplicación de la  $\alpha$ -amilasa en el área de purificación y evaporación, se calcula a partir de las correlaciones correspondientes determinadas por Rodríguez (2018). Para las corrientes de jugo alcalizado y clarificado, cuyas condiciones se definen en la tabla 3.10. En la tabla 3.12, se presenta el ahorro en el consumo de vapor por concepto de remoción de almidón.

*Tabla 3.12. Ahorro en el consumo de vapor.*

<i>Dosis</i>	<i>% de remoción de almidón</i>	<i>Ahorro en el consumo de vapor [kgv/TCM]</i>	<i>% de Ahorro de vapor</i>
<i>Jugo Alcalizado (JA)</i>			
<i>0,01 %</i>	76,88	80,57	21,04
<i>0,03 %</i>	82,36	86,32	22,54
<i>0,05 %</i>	86,03	90,16	23,54
<i>Jugo Clarificado (JC)</i>			
<i>0,01 %</i>	84,22	51,00	17,20
<i>0,03 %</i>	89,79	54,37	18,34
<i>0,05 %</i>	93,56	56,65	19,11

Para el cálculo del efecto económico del mismo, se tienen en cuenta los elementos de la tabla 3.13.

Tabla 3.13. Elementos para la valoración económica.

<i>Rublo</i>	<i>Valor</i>
Índice de generación en caldera [kg vapor/kg bgz]	2,2
Precio del bagazo [cup/t]	29,55
Molida horaria [t/h]	202,745
Duración de una zafra [150 día/año]	150

En la tabla 3.14 se presentan los beneficios económicos del ahorro de vapor por efecto de la hidrólisis enzimática del almidón.

Tabla 3.14. Beneficios del ahorro de vapor.

<i>Dosis de enzima</i>	<i>Ahorro de Bagazo [t<sub>bgz</sub>/h]</i>		<i>[cup/año]</i>	
	<i>JA</i>	<i>JC</i>	<i>JA</i>	<i>JC</i>
0,01 %	7,425	4,699	789 901	499 957
0,03 %	7,955	5,011	846 205	533 022
0,05 %	8,309	5,221	883 912	555 402

El aumento de las dosis de aplicación de la enzima equivale al incremento de la remoción de almidón, las toneladas de bagazo que se ahorran y el beneficio económico que representa.

### 3.3.2 Costo de aplicación de la enzima

En la tabla 3.15, se exhiben los elementos que se tuvieron en consideración para determinar los costos de aplicar la enzima  $\alpha$ -amilasa en el jugo alcalizado, clarificado y meladura, al considerar el costo de un kg de  $\alpha$ -amilasa 15 USD.

Tabla 3.15. Costos de adquisición de la  $\alpha$ -amilasa.

Corrientes	Dosis de enzima [g/L]	Flujo [L/h]	Dosis de enzima a aplicar [kg/h]	Costo de aplicación [\$/año]
Jugo Alcalizado	0,1	194 999	19,49	1 052 995
	0,3		58,49	3 158 986
	0,5		97,49	5 264 977
Jugo Clarificado	0,1	153 547	15,35	829 152
	0,3		46,06	2 487 455
	0,5		76,77	4 145 758
Meladura	0,1	28 932	2,89	156 231
	0,3		8,68	468 694
	0,5		14,47	781 156

Al ser los flujos de jugo alcalizado y clarificado a tratar grandes, era de esperarse que los costos de aplicar la  $\alpha$ -amilasa durante el periodo de zafra fueran elevados, en comparación a aplicar la hidrólisis en la meladura cuyo coste es más económico.

### 3.3.3 Dosis y corriente de aplicación de la $\alpha$ -amilasa

Según los resultados anteriores, la corriente más factible para la aplicación del proceso de hidrólisis enzimática en la industria azucarera es la meladura, donde se alcanzan los mayores índices de deseabilidad global, además que los costos de aplicación de la  $\alpha$ -amilasa son pequeños, debido al flujo de esta corriente.

Autores como Bruijn y Jennings (1968), Eggleston *et al.* (2006), Penados (2004), Schoonees (2008), Tester y Karkalas (2004) y Zhou *et al.* (2008), coinciden en que la

hidrólisis enzimática se realiza por lo regular en la estación de evaporación. Según Schoonees (2008), la  $\alpha$ -amilasa puede ser añadida antes o después del evaporador de cuádruple efecto, Zhou *et al.* (2008) prefieren su aplicación en el pre-evaporador, mientras que Penados (2004), plantea agregarla en el penúltimo o último vaso del múltiple efecto, puesto que a estas condiciones de operación se favorece la hidrólisis. El autor coincide con Penados (2004), en aplicar la enzima en el último vaso del múltiple efecto, pues de esta unidad sale la meladura a la etapa de cristalización, además el pH, la temperatura y el tiempo de retención en este equipo propician la acción de la enzima (Eggleston *et al.*, 2006).

Para la selección de la dosis de enzima a aplicar en la meladura, hay que tener en cuenta la influencia de la hidrólisis enzimática en el contenido de almidón, los reductores, las cenizas y el pH. Según se observa en la tabla 3.11, a medida que aumenta la dosis de  $\alpha$ -amilasa el incremento de cenizas permanece invariable, el incremento de reductores y la variación de pH disminuyen, y el porcentaje de remoción del almidón aumenta. Si se desea un máximo de deseabilidad, es decir, un máximo de reductores y de remoción, y un mínimo de variación de pH, la dosis a seleccionar sería 0,01 %, y el costo de aplicación sería menor. Sin embargo, dosis mayores podrían aplicarse si se considera necesario ejercer un mayor control sobre un parámetro en específico, de acuerdo a lo normado en la industria, o si se desea alcanzar un óptimo individual.

### **3.4 Conclusiones parciales del capítulo**

1. El aumento de la concentración de almidón en los equipos consumidores de vapor, dificulta la transferencia de calor, y aumenta el consumo de vapor.

2. La enzima  $\alpha$ -amilasa presenta una actividad específica de 86 U/ $\mu$ g. Las propiedades estructurales que se determinan son: pH óptimo de 5,0, temperatura óptima de 60 °C, Km de 6,4 g/L y Vmax de 28 571  $\mu$ mol/mL\*min.
3. Las propiedades funcionales reflejan que la enzima es estable de 35 a 50 °C y en un intervalo de pH de 5,0 a 8,5; donde logra una actividad superior al 80 %.
4. Los niveles de  $\alpha$ -amilasa influyen en el desdoblamiento de almidón y en el incremento de cenizas, pero no en el incremento de reductores, ni en la variación del pH.
5. Los modelos matemáticos obtenidos demostraron ser válidos dentro del dominio del experimento.
6. Los costos de aplicación de la  $\alpha$ -amilasa en las corrientes del proceso son elevados.
7. Si se desea alcanzar los valores óptimos de reductores, cenizas, pH y remoción de almidón se recomienda aplicar una dosis de 0,01 % de  $\alpha$ -amilasa.

## CONCLUSIONES

1. Se demuestra la efectividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa en el desdoblamiento de almidón en corrientes del proceso de producción azucarera simuladas a escala de laboratorio.
2. La enzima  $\alpha$ -amilasa presenta una actividad específica de 86 U/ $\mu$ g. Las propiedades estructurales que se determinan son: pH óptimo de 5,0, temperatura óptima de 60°C, Km de 6,4 g/L y Vmax de 28 571  $\mu$ mol/mL\*min.
3. La  $\alpha$ -amilasa es estable de 35 a 50 °C y en un intervalo de pH de 5,0 a 8,5, con una actividad superior al 80 %.
4. La hidrólisis enzimática del almidón no influye de manera significativa en el incremento de reductores, ni en la variación de pH, pero si en el incremento de cenizas y en la disminución del contenido de almidón.
5. Se determinó que la corriente de aplicación del proceso de hidrólisis enzimática más factible tanto técnica como económicamente es la meladura.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática del almidón en la velocidad de sedimentación durante la etapa de clarificación, y en la formación de color en el proceso.
2. Validar los resultados del modelo de optimización simultánea, con su aplicación a escala industrial.
3. Estudiar el efecto del contenido de almidón en el consumo de vapor, durante la etapa de cristalización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguloglu, B., Enez, S., Özdemir, F., y Matpam B. (2014). Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxy bacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers* 102, p. 144–150.
- Aldabe, J., Hueto, A., Juni, J., y López, P. (1998). Biología. Edición Erein.
- Alencar, J., Hoffmann, P., y Harumi, H. (2011). Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (3), p. 806-815.
- Alonso La Rosa, I. (2017). *Influencia del contenido de almidón durante el proceso de producción de azúcar crudo* (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Alves, F.V., Polesi, L.F., y Aguiar, C.L. (2014). Structural and physicochemical characteristics of starch from sugar cane and sweet sorghum stalks. *Carbohydrate Polymers*, 111, p. 592-597.
- Amid, M., y Yazid, M.A. (2014). Purification and characterization of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereuspolyrhizus*) peel. *Food Chemistry* 165, 412-418.
- Ashwini, K., Kumar, G., y Karthik, L. (2011). Optimization, production and partial purification of extracellular  $\alpha$ - amylase from *Bacillus sp.* Marini 3. *Scholars Research Library, Archives of Applied Science Research* 3, p 32-42.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berengue-Murcia, A., Torres, R., Rodriguez, R. y Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: useful crosslinker and

- versatile tool in enzyme immobilization. Royal Society of Chemistry (UK), *RSC Advances* 4, p. 1583-1600.
- BeMiller, J.N. (2019). Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. 3rd Edition, London  
WP: *AACC International Press*, p. 427.
- Benfeld, P. (1955). Amylases alpha and beta. *Methods Enzymology*, Chapter 1, p. 149-158. Available on: [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)
- Bhanja, D., y Tapati, R.B. (2015). Purification, biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, p. 483-90.
- Bruijn, J., y Jennings, R.P., (1968). Enzymatic hydrolysis of starch in cane juice. *Proceedings of The South African Sugar Technologists Association*.
- Brumovsky, L. (2014). *Química del almidón*. Universidad nacional de misiones. Argentina. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales.
- Bugg, T. (2004). Introduction to enzyme and coenzyme chemistry 2º ed. Oxford UK ; Malden MA USA: *Blackwell Publication*. DOI:10.1002/9781444305364.
- Bukhari, M., Salem, E., Abdalmoneim, O., y Hegazi, F. (2015). Investigations of the influence of dextran on sugar cane quality and sugar cane processing in Kenana sugar factory. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (4), p. 381-392.
- Carter, G.G. (1967). *Proceedings of The South African Sugar Technologists Association*, 41, p.37.

- Castro, N. (2015). *Determinación de la concentración de almidón por caracterización espectrofotométrica en el jugo de caña de azúcar de las variedades: cp72-2086, cp88-1165 y cp73-1547 utilizadas en el ingenio Trinidad Guatemala* (Tesis de pregrado). Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Chakraborty, S., Sougata, J., Arijit, G., Kalyan, K.S., Wang, Z., y Chandrakant, K. (2014). Gellan gum microspheres containing a novel  $\alpha$ -amylase from marine *Nocardiopsis* strain B2 from immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, p. 292-299.
- Chandrasekaran, M. (2016). *Enzymes in Food and Beverage Processing*. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN-13: 978-1-4822-2128-2 (Hardback).
- Chen, G., Zhou, J., Liu, Y., Lu, X., Han, C.; Zhang, W., Xu, Y., y MingYan, Y. (2016). Biosynthesis and Regulation of Wheat Amylose and Amylopectin from Proteomic and Phosphoproteomic Characterization of Granulebinding Proteins. *Scientific Reports*, 6. DOI: 10.1038/srep33111.
- Chiu, C. y Solarek, D. (2009). *Starch: Chemistry and Technology*, Third Edition, p. 629-655. ISBN: 978-0-12-746275-2.
- Cole, M.R., Rose, I., Chung, Y.J., y Eggleston, G. (2015). A structured approach to target starch solubilisation and hydrolysis for the sugarcane industry. *Food Chemistry* 166, 165–172.

- Cole, M.R., Eggleston, G., Gilbert, A., y Chung, Y.J. (2016). Development of an Analytical Method to Measure Insoluble and Soluble Starch in Sugarcane and Sweet Sorghum Products. *Food Chemistry* 190, 50–59.
- Coultale, T. P. (1997). *Manual de Química y Bioquímica de los alimentos*. 2d Edición ACRIBIA, Zaragoza p. 29-36.
- Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., y Utsumi, S. (2005).  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40, 2629-2636.
- Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y.K., y Adhikari, D.K. (2010). Characterization of hyperthermostable alpha-amylase from *Geobacillus* sp. IPTN, *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, p.1857–1866.
- Derringer, G.C. y R. Suich. (1980). Simultaneous optimization of several responses. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- Dey, G., Palit, S., Banerjee, R., y Maiti, BR. (2002). Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, p.193–200.
- Dey, T.B., y Banerjee, R. (2012). Hyperactive  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* IFO 30103 in a new bioreactor. *Letters in Applied Microbiology* 54, p. 102–107.

- Eggleston, G., Monge, A., y Ogier, B. (2003). Sugarcane factory performance of cold, intermediate, and hot lime clarification systems. *Journal Food Process and Preservation*, 26 (6), p. 433-454.
- Eggleston, G., Montes, B., Monge, A., y Guidry, D. (2006). Optimization of  $\alpha$ -amylase application in raw sugar manufacture. *Processing of Sugar. Process. Res. Conf. Brazil*, vol., p. 319-340.
- Eggleston, G., Viator, R., y Grisham, M. (2007). Glyphosphateripener effects on the processing quality of different sugarcane tissues. *Process ISSCT Congress. South Africa*, vol. 26, p. 1460-1467.
- Eggleston, G., Antoine, A., Montes, B., Stewart, D., Kimbeng, C., y Zhou, M. (2008). Further optimization of  $\alpha$ -amylase application in Louisiana factories. *ASSCT Louisiana Division meeting. Baton Rouge*, vol., pp.
- Eggleston, G., Cole, M., y Andrzejewski, B. (2013). New Commercially Viable Processing Technologies for the Production of Sugar Feedstocks from Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) for Manufacture of Biofuel and Bioproducts. *Sugar Technology*, 15, p. 232-249.
- Eggleston, G., Wartelle, L., Triplett, A., Montes, B., Pontif, K., Cole M., y Cyr, E.S. (2015). Insoluble and Soluble Starch: Changes Across Sugarcane Factories and How They Are Controlled by Amylase Applications. *International Sugar Journal. Southern Regional Research Center, New Orleans, LA.*

- Fadilah, S., y Syamsiah, H.(2015). Hydrolysis of starch in porang flour using alpha amylase. *Journal of Engineering Science and Technology*, 6, p.1-8.
- Fatemeh, G.,Gholamreza, A., y Kambiz, A. (2014). New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilisspore* surface by adsorption and covalent immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 64–65. p. 17–23.
- Fincan, S. (2008). Insolation and characterization of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase isolated from termic hot water springs. In 11th-33rd. *FEBS Congress JUBMB*. Conference Athens, Grece, p 275.
- Fincan, A.S., Enez, S., Özdimir, F., y Matpan, B. (2014). Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxy bacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*, 102, 144-150.
- Gashtasbi, F., Ahmadian, G., y Noghabi, K.A. (2014).New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 64–65, 17–23.
- Gibbs, M. J., Biela, A., y Krause, S. (2015).  $\alpha$ -Amylase sensor based on the degradation of oligosaccharide hydrogel films monitored with a quartz crystal sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 67, p. 540-545.
- Gómez, L. B. (2016). *Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial* (Tesis doctoral). Universidad de Matanzas, Cuba.

- Gonzales Salcedo, C. (2004). *Evaluación de la actividad amilásica como indicador del grado de biotransformación de residuos orgánicos procedentes de la industrialización de papa congelada* (Tesis de pregrado). Universidad de la Sabana, Facultad de Ingeniería, Colombia.
- González, L. (2018). *Estudio de las propiedades estructurales y funcionales de la enzima  $\alpha$ -amilasa en el proceso de desdoblamiento de almidón para su aplicación industrial* (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Guerra, C., Menéndez, E., Barrera, R., y Egaña, E., (2004). *Estadística*. La Habana, Cuba, ISBN 959-258-621-7.
- Guerra, J. y Sevilla, E., 1986. *Introducción al análisis estadístico de procesos*. Cuba.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Kumar, V., y Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38, p. 1599- 1616.
- Gutiérrez Pulido, H., y de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Segunda edición. MCGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. ISBN-10: 970-10-6526-3
- Harrington, E. (1965). The desirability function. *Industrial Quality Control* 21, p. 494-498.
- Hidalgo, A., y Delgado, L. (2018). *Comparación de técnicas de optimización en procesos multirespuesta para el mejoramiento de la calidad de agua potable mediante la*

- tecnología de oxidación avanzada PCFH en el departamento de Nariño* (Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Homaei, A., y Saberi, D. (2015). Immobilization of  $\alpha$ -amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. *Process Biochemistry*, 50, 1394-1399.
- Hugot, E. (1986). Handbook of cane sugar engineering. Elsevier, ISBN 0-444-42438-5.
- Jacobs, H. (1998). Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches—DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydrate Research*, 308(3-4), 359-371.
- Jiménez, A., Lugo, R., Ramírez, H., Gómez, L., y Orozco, L. (2016). *Influencia del almidón y tecnologías de control en el proceso de producción de azúcar crudo y refinado* (Monografía). Universidad de Matanzas, Cuba
- Jiménez, A. (2017). *Evaluación del comportamiento del contenido de almidón y su desdoblamiento con alfa amilasa en el proceso de producción de azúcar crudo* (Tesis de Maestría). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Kapfo Wethroe, S.R., Smitha, G., Jyoti Bala, C., y Jay Kant, Y. (2013). Effect of non-aqueous solvent on structural stability of  $\alpha$ -amylase A cost-effective prospective for protein stabilization. *Process Biochemistry*, 48, 1025-1030.
- Kaur, R., Kaur, N., y Kumar Gupta, A. (2014). Structural features, substrate specificity, kinetic properties of insect  $\alpha$ -amylase and specificity of plant  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 116, 83–93.

- Kikani, B.A., y Singh, S.P. (2015). Enzyme stability, thermodynamic and secondary structures of  $\alpha$ -amylase as probed by the CD spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 450-460.
- Kolawole, A.O., Ajele, J.O. y Sirdeshmukh, R. (2011). Purification and characterization of alkaline-stable  $\beta$ -amylase in malted African finger millet (*Eleusinecoracana*) seed. *Journal of Process Biochemistry*, 46, 2178-2186.
- Kuddus, M. (2018). Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations. *Springer Nature Singapore Pte.* ISBN 978-981-13-1932-7.
- Kuddus, M. (2019). Chapter 1: Introduction to Food Enzymes. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biochemistry, University of Hail, Saudi Arabia.
- Kumar, A.J., Partha, B., Pradeep, D.M., y Sangeeta, R. (2016). Thermostables amylase production from hot spring isolate *Exiguo bacterium sp*: A promising for natural detergents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 3, p. 59-68.
- Kumar, A. P., Rani, R. S.,y Pandey, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the industry. *Current Opinion in Food Science*, 7, p. 64- 72.
- Kumari, A., Singh, V.K., Fitter, J., Polen, T. y Kayastha, A.M. (2010).  $\alpha$ -amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds. Purifications, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Journal of Phitochemistry*, 71, p. 1657-1666.

- Larrahondo, J. E. (1995). *Calidad de la caña de azúcar*. In: Cassalet, C.; Torres, J.; Isaacs, C. (Eds). *El cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia*, p. 337-354.
- Larrahondo, J.E. (2013). *Definición y alcances de la alcoquímica: la calidad de las materias primas y su impacto en el proceso alcoquímico*. III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador.
- Lehninger, A. (2008). Principles of biochemistry, 5th Edition. New York, W. H. Freeman and Company.
- León Alonso, P. (2018). *Estudio de las propiedades funcionales y operacionales de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en el proceso de desdoblamiento de almidón* (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Liu, X.D., y Xu, Y. (2008). A novel raw starch digesting alpha-amylase from a newly isolate *Bacillus sp.* YX-1: Purification and characterization. *Bioresource Technology* 99, 4315-4320.
- Lizcano, Y. (2014). *Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca*. Medellín (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Área de biotecnología, Colombia.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

- MACU (Manual de métodos analíticos para azúcar crudo). (2008). Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. División de Aseguramiento de la Calidad.
- Martínez, E. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. Real centro universitario «Escorial-María Cristina» San Lorenzo del Escorial anuario jurídico y económico escorialense, XXXVIII, p. 315-332.
- Mathewson, P. R. (1998). Enzymes Handbook (Eagan Press Handbook Series). American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota 55121-2097, USA. ISBN: 0-913250-96-1.
- Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S., y Dabirmanesh, B. (2010). Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus sp.* LH8. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 27–36.
- Monteiro, P., y Oliveira, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry- A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: p. 850-861. ISSN 1517-8382.
- Montgomery, C. (2017). Design and Analysis of Experiments. Novena Edición. Arizona State University. p. 1-21.
- Namer, I., Rosa Pérez, J., Dávila, H., y Rivas, E. (1988). *Caracterización de la producción y aplicación de enzimas en la industria azucarera cubana* (1ra. Parte). ICIDCA.

- Nicholson, R.I., y Horseley, M., (1958). The removal of starch from cane juices. *International Sugar Journal*, 60, p. 260-267.
- Oficina Nacional de Normalización. (2017). NC 79: *Determinación de cenizas conductimétricas en azúcar crudo, azúcar moreno, jugo, jarabe y melaza*. III Edición. La Habana, Cuba.
- Páez, C.A. (2013). *Determinación de las condiciones óptimas para la producción de azúcar turbinado en los parámetros color y tamaño de grano en la empresa Ingenio Risaralda S.A.* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira.
- Palacios Hernández, O. (2017). *Procedimiento para la evaluación de la Disciplina Tecnológica en el proceso de obtención de queso de la Pasteurizadora “Germán Hernández Salas” de Cárdenas* (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.Y., Singh, D., y Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31, 135–152.
- Patel, A. K., Singhania, R. R. y Pandey, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 7, p. 64-72.
- Penados, M. (2004). *Evaluación del impacto de adicionar la enzima alfa amilasa durante el proceso de evaporación en los niveles de almidón de azúcar crudo producido en un ingenio azucarero* (Tesis de pregrado). Escuela de Ingeniería Química: Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Peña, A.A. (2009). *Hidrólisis del almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa* (Tesis de pregrado). Universidad industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Polaina, J., y MacCabe, A.P. (2007). Industrial enzymes: structure, function and applications. Chapter 1, 12th edition. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Popper, L., Schafer, W., y Freund, W. (2006). Sugazym- dextranase and amylase in the sugar industry. Published by Agrimedia GmbH.
- Porfirif, J., Beatriz, F.M., y Dina, R. (2016). Production of alpha-amylase from *Aspergillusoryzae* for several industrial applications in a single step. *Journal of Chromatography B* 1022, p. 87-92.
- Ramírez, R. (2012). Universidad nacional abierta y a distancia (UNAD). Escuela de ciencias básicas, tecnología e ingeniería. Programa de ingeniería de alimentos. Duitama.
- Ramírez, H.L, Gomez, B.L., Ubeda, I.J, Arevalo, V.M., y Briones, P.A. (2016). Pectinase immobilization on a chitosan-coated chitin support. *Journal of Food Process Engineering* 39, 97-104.
- Rathod, M. G. y Pathak, A. P. (2014). Wealth from waste: Optimized alkaline. *Journal of Taibah University for Science*, Volume 8, Issue 4, p. 307-314.
- Rein, P. (2007). Cane Sugar Engineering. Berlin, Germany. ISBN 978-3-87040-110-8. Available in: [www.canesugarengineering.com](http://www.canesugarengineering.com)

- Rodríguez Pino, D.E. (2018). *Evaluación del contenido de almidón durante el proceso de producción del azúcar crudo* (Tesis de pregrado). Universidad de Matanzas, Cuba.
- Roy, J.K. y Mukherjee, A.K. (2013). Applications of a high maltose forming, thermostable alpha-amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal* 77, p. 220-230.
- Ruiz-Falcó, A. (2009). *Herramientas de Calidad Módulo 7*. Universidad Pontificia Comillas Madrid.
- Sahnoun, M., Bejar, S., Sayari, A., Triki, M.A., Kriaa, M., y Kammoun, R. (2012). Production, purification and characterization of two  $\alpha$ -amylase isoform from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. *Process Biochemistry* 47, 18-25
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B.A., Asoodeh, A., y Moradian, F. (2005). A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology* 36, p. 666-671.
- Sargent, R.G. (2009). Verification and validation of simulation models. Proceedings of the 2009 Winter Simulation Conference. Syracuse University, USA Estados Unidos, vol., pp.
- Schoonees, B.M. (2004). Starch hydrolysis using  $\alpha$ -amylase: A laboratory evaluation using response surface methodology. *Proceedings of The South African Sugar Technologists Association* 78, p. 427-439.

- Schoonees-Muir, B.M.(2008). Dosing of Starch Hydrolysing Enzymes into a Diffuser. *Proceedings of The South African Sugar Technologists Association* 81, p. 145-153.
- Sharma, A., y Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry* 48, p. 201–211.
- Shukla, R.J., y Singh, S.P. (2016). Structural and catalytic properties of immobilized  $\alpha$ -amylase from *Laceyellasacchari* TSI-2. *International Journal of Biological Macromolecules* 85, 208–216.
- Singh Kritika, A. (2014). Optimal immobilization of  $\alpha$ -amylase from wheat (*Triticumaestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 104, p.75-81
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., y Pandey, A. (2016).  $\alpha$ -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology* 44, p. 173–184.
- Spohner, S. C., Muller, H., Quirman, H. y Czermahk P. (2015). Expression of enzyme for the usage in food and feed industry with *Pichiapastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, p. 118-134.
- Srivastava, G., Sonam Roy, A., y Kayastha, M. (2015). Immobilization of Fenugruk  $\beta$ -amylase on chitosan/PVP blend and chitosan collated PVC beads: A comparative study. *Food Chemistry*, 172, 844-851.

- Tapati, D., Kumar, A., Banerjee, R., y Chandna, P. (2016). Improvement of microbial - amylase stability: Strategic approaches. *Process Biochemistry*, available on: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.021>.
- Tester, R.F., y Karkalas, Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal* 60: 186-195.
- Torabizadeh, H., Mohammad, T., y Mohammad, S. (2014). Immobilization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, 108, 13-20.
- Veesar, I.A., Imam, B.S., y Shahabuddin, M. (2015). Immobilization of  $\alpha$ -amylase onto a calex (4) arenderivative: Evaluation of its enzymatic activity. *Bioorganic Chemistry*, 60, 58-63.
- Vera, L.C. *et al.* (2014). Experimental design and multiple response optimizations. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, p. 123-138.
- Viginotti, F., Polesi, L., Lima, C., y Silveira, S. (2014). Structural and physicochemical characteristics of starch from sugar cane and sweet sorghum stalks. *Carbohydrate Polymers* () 111, pp. 592–597.
- Vihinen, M. y Mäntsälä, P. (1990). Characterization of a thermostable *Bacillus stearo* thermophilus  $\alpha$ -amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 12 , p.427–435.

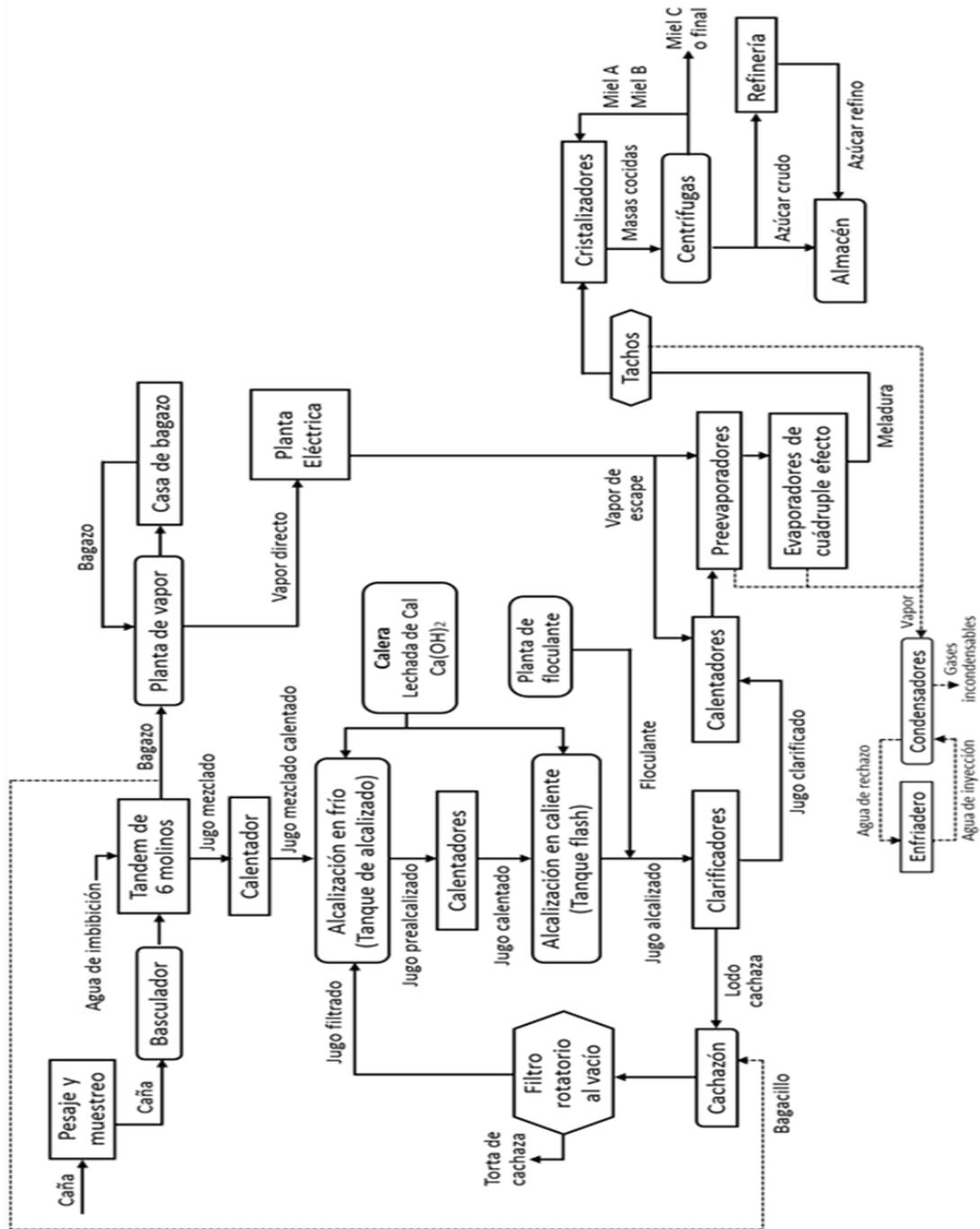
- Wang, S.L., Liang, Y.C., y Liang, T.W. (2011). Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. *Process Biochemistry* 46, 745-750.
- Wood, I.P., Cook, N.M., Wilson, D.R., Ryden, P., Robertson, J. A. y Waldron, K. W. (2016). Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. *Food Chemistry*, 198, p. 125-131.
- WookKong, B., Kim,J.,Jeong Kim, M., y Cherl Kim, J. (2003). Porcine Pancreatic.Amylase Hydrolysis of native starch granules as a Function of Granule Surface Area. *Biotechnology Progress* 19(4), 1162 – 1166.
- Xie, F.,Shujing, Q., Dehai, L., Huan, M., Feng, L., Fuzhong, Z., y Guocan, C. (2014). Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry*, 49, 47-53.
- Young, L.C. y deMan, J.M. (2018). Enzymes. Principles of Food Chemistry. *Food Science Text Series*. Chapter 10, p. 397-433.
- Zhou, M.,Kimbeng, C., Eggleston, G.,Viator, R., Hale, A., y Gravois, K. (2008). Issues of starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content in sugarcane. *SUGAR CANE INTERNATIONAL*, 26 (3).
- Zossi, B., Navarro, M., Sorol, N., Sastre, M., y Marcelo, R. (2008). Validación de una metodología para determinar el contenido de almidón en azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 85 (2).

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

Zossi, B., Cárdenas, G., Sorol, N., y Sastre, M. (2011). Influencia de compuestos azúcares y no azúcares en la calidad industrial de caña de azúcar en Tucumán, R. Argentina: caña verde y quemada (Parte 2). *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 88 (1), pp. 13-21.

# ANEXOS

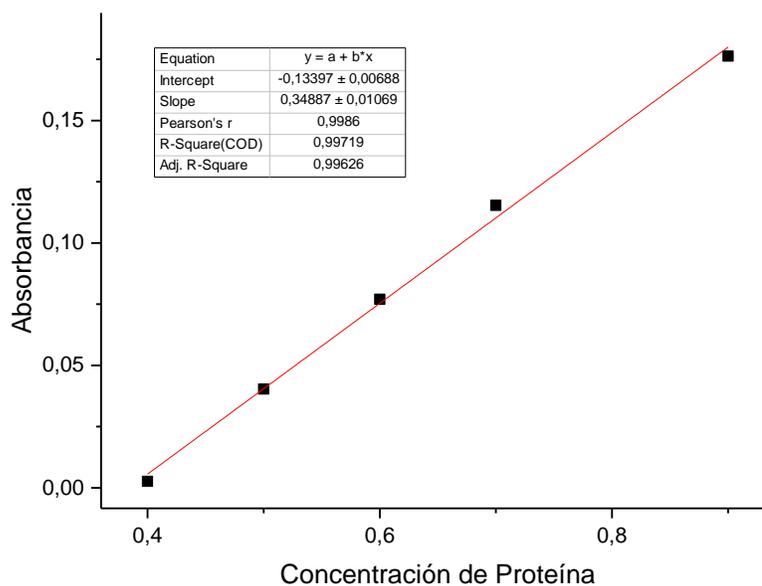
**Anexo 1:** Diagrama de producción de azúcar crudo en la UEB Central "Mario Muñoz Monroy".



## Anexo 2: Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas de la enzima se realiza mediante la aplicación del método de Lowry *et al.* (1951). El mismo consiste en la adición de 0,4 mL de reactivo de Folin 1 a 0,4 mL de disolución enzimática, se incuba durante 10 min, se adicionan 0,2 mL de reactivo de Folin 2 transcurrido 30 min se determina la absorbancia a 750 nm.

La determinación final de la concentración se realiza mediante el uso de la curva de calibración que utiliza como patrón albumina de suero bovino (BSA), que se muestra a continuación:



*Figura A.1: Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas.*

Para la preparación de la mezcla conocida como Lowry, se disuelven: 10 g de NaOH en 100 mL de agua destilada y 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en los mismos 100 mL anteriores; 1 g de

Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 100 mL de agua destilada; 2 g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O en 100 mL de agua destilada (este reactivo es necesario conservarlo en frío) y por último se mezclan de las soluciones preparadas anteriormente en las siguientes proporciones 10 mL, 200 µL y 200 µL respectivamente.

### **Anexo 3:** Determinación de la actividad enzimática de la α-amilasa.

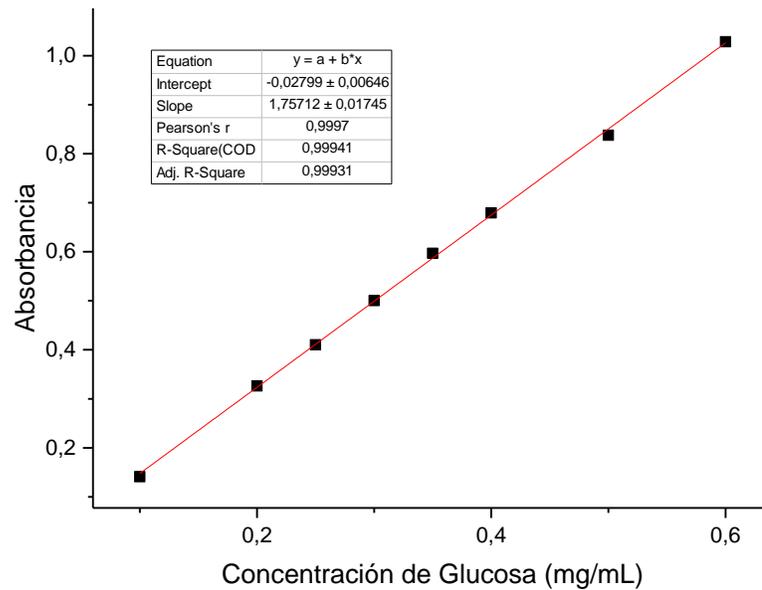
La actividad de la enzima α-amilasa se determina empleando el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNSA) (Benfeld, 1955).

La actividad enzimática de la α-amilasa fue determinada mediante la adición de 0,5 mL de disolución de enzima a 0,5 mL de disolución de almidón al 1 % (m/v) en disolución tampón de fosfato de sodio 20 mmol/L, pH 6,9 a 6 mmol/L en cloruro de sodio (NaCl). Se mantiene con agitación a 30 °C durante 10 min, se adiciona 1 mL de DNSA, y se introduce en baño maría por 10 min a 100 °C. Una vez que finaliza esta etapa del experimento, se mide la absorbancia a 546 nm. La actividad de la enzima se evalúa a través de la ecuación A.1:

$$AE = \frac{A_{546}}{t} * \frac{1}{m} * \frac{D_{enz}}{V_{enz}} . \quad \text{Ec. A.1}$$

Donde, AE: actividad específica [U/mL]; A<sub>546</sub>: valor de absorbancia; t: tiempo que se encuentra en baño maría (10 min); m: pendiente de la curva del ácido 3,5-dinitrosalicílico; D<sub>enz</sub>: dilución de la enzima; V<sub>enz</sub>: volumen de la enzima [0,5 mL].

La curva del ácido 3,5-dinitrosalisílico se determina por el método DNSA con solución patrón de glucosa (Benfeld, 1955), la curva aplicada durante la investigación se muestra a continuación:



*Figura A.2: Curva de calibración para la determinación de la concentración de glucosa.*

**Anexo 4:** Determinación espectrofotométrica de almidón en jugos (C28) (MACU, 2008).

En un beaker de 100 mL, se agregan 20 g del jugo y se adicionan 80 mL de etanol y 2 g de tierras infusorias activada. Se agita, se deja en reposo por 15 min y se filtra a presión reducida. El precipitado obtenido se trasvasa a un beaker de 200 mL y se le adiciona 40 mL de disolución cloruro de calcio-ácido acético (la disolución de cloruro de calcio se prepara a una concentración de 40 % m/m y se ajusta su pH a 3 con solución de ácido acético 0,033 mol/L) se cubre con un vidrio reloj y se mantiene a ebullición suave durante 15 min. Se enfría la solución y se enraza a un volumen de 100 mL. Se homogeniza, se filtra, se desechan los primeros 10 mL. Se toma 20 mL del filtrado y se

adicionan: 2,5 mL de solución de ácido acético 2 mol/L, 0,5 mL de yoduro de potasio 10 % (m/v) (solución que se debe preparar inmediatamente antes de utilizar) y 5 mL de yodato de potasio 0,00167 mol/L. Se enraza a un volumen de 50 mL y se determina la absorbancia a 600 nm en una celda de 1 cm. Para la preparación del blanco se adicionan 8 mL de la disolución cloruro de calcio-ácido acético y los mismos volúmenes de la solución de ácido acético, yoduro de potasio, yodato de potasio, enunciadas anteriormente y se enraza a un volumen de 50 mL con agua destilada.

Para preparar la tierra de infusorios activada se pesan 50 g de tierra de infusorios, se añade aprox. 1 000 mL de agua y 50 mL (ó 59,0 g) de ácido clorhídrico ( $d_{20}=1,18$  g/ml), se agita 5 min, se filtra mediante vacío y se lava con agua hasta que el filtrado adquiera el pH del agua utilizada. Seque la tierra infusoria activada a temperatura ambiente.

#### Curvas de calibración para determinar almidón en jugo

Mida alícuotas de una solución de referencia de almidón de 0,8 g/L, de 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 mL y deposítelas en matraces de 50 mL. Adicione a cada matraz, agua destilada hasta aproximadamente 20 mL, 2,5 ml de solución de ácido acético (2 mol/L), 0,5 mL de solución de yoduro de potasio (10 % m/v) solución que se debe preparar inmediatamente antes de utilizar) y 5,0 mL de solución de yodato de potasio (0,00167 mol/L). Enrase con agua destilada y mida la absorbancia a 600 nm en una celda de 1 cm, utilice como blanco la solución que no contiene almidón. Estos puntos equivalen a 0,0, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 y 4.0 mg de almidón por cada 50 mL de solución.

Una vez trazada la curva, con la absorbancia de la muestra y la misma se puede determinar la concentración de almidón de la muestra. Para el caso de la determinación de almidón en jugo, se calcula el contenido de almidón, mediante la ecuación A.2:

$$CA = \frac{1000 * m}{m_j * Bx} \quad \text{Ec. A.2}$$

Donde, CA: concentración de almidón (mg/kg); m: es la masa, en mg, de almidón obtenido a través de la curva de referencia; Bx; sólidos disueltos, en % m/m, presentes en la masa ( $m_i$ ) de jugo original;  $m_j$ : masa, en g, contenida en los 50 mL de solución a la que se le desarrolla color.

Para determinar la masa de la muestra a la que se le desarrolla color se utiliza la ecuación A.3:

$$m_j = \frac{m_i * V_A}{100} \quad \text{Ec. A.3}$$

Siendo  $V_A$ : Volumen que se toma de la muestra una vez filtrada (mL).

**Anexo 5:** Determinación de cenizas conductimétricas en azúcar crudo, azúcar moreno, jugo, jarabe y melaza (Oficina Nacional de Normalización, 2017).

Se pesan 5 g de la muestra y se disuelven en agua destilada en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa a 20 °C. En caso de que la conductividad sea mayor de 500  $\mu\text{S/cm}$ , reducir el contenido en sólidos de la disolución (para melaza: emplear 0,25 g/100 mL). Después de mezclar cuidadosamente, se lleva la disolución a la celda de lectura y se mide

La conductividad a  $20 \pm 0,2$  °C. Se controla la medida empleando como disolución de referencia cloruro potásico, 0,0025 mol/L.

La conductividad corregida se determina mediante la siguiente ecuación:

$$C = C_1 - C_2 \quad \text{Ec. A.4}$$

Dónde,  $C_1$  es la conductividad medida en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 20 °C;  $C_2$  es la conductividad del agua a 20 °C; y por tanto:

$$\%Ceniza = (16,2 + 0,36 * D) * 10^{-4} * C * f \quad \text{Ec. A.5}$$

Siendo,  $C$  (concentración de materia seca de la solución de ensayo, expresada en g/100 mL);  $S$  (peso de la muestra (g) en 100 mL);  $f$  (factor de dilución de la solución con respecto a 5 g/100 mL,  $f=5/S$ ).

Si no es posible llevar a cabo el ensayo a la temperatura estándar de 20 °C, es necesario efectuar una corrección de temperatura en el resultado final de la siguiente manera, siempre que no se exceda el rango de  $\pm 5$  °C. La corrección es:

$$C_{20^\circ\text{C}} = \frac{C_T}{[1 + 0,023 * (T - 20)]} \quad \text{Ec. A.6}$$

Dónde,  $C_T$ : es la conductividad de la solución de azúcar a la temperatura  $T$  (°C).

Reactivos empleados:

- Agua destilada, se emplea para la preparación de todas las soluciones (azúcar y cloruro potásico) agua bidestilada o desionizada con una conductividad menor de 2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .
- Cloruro potásico, 0,01 mol/L, se pesan 745,5 mg de cloruro potásico previamente deshidratado y se calienta a 500 °C (color rojo sombra); luego se disuelve en agua en un matraz aforado de 1 L y se enrasa.
- Cloruro potásico, 0,0025 mol/L, se diluyen 250 mL de disolución de cloruro potásico de 0,01 mol/L y se enrasa en un matraz aforado de 1 L. Esta disolución tiene una conductividad de 328  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 20 °C (después de deducir la conductividad específica del agua empleada).

**Anexo 6:** Herramientas estadísticas aplicadas para el procesamiento de la información.

#### Caracterización estadística de los datos

La caracterización estadística se emplea para analizar los datos recogidos de los experimentos, además de analizar los parámetros de calidad del azúcar crudo una vez ocurra el desdoblamiento del almidón. Dentro de los parámetros de interés están: los de medidas de tendencia central, medidas de dispersión y medidas de simetría, entre cada uno de ellos hay una gran variedad de parámetros, solamente se estudian los más significativos para la investigación. Los parámetros de medidas de tendencia central caracterizan el centro de la distribución de los datos experimentales, entre ellos la media. Según Guerra y Sevilla (1986), la media se acerca al valor verdadero único de lo que se

mide, teniendo en cuenta que en la medición siempre hay errores. Los parámetros de medidas de dispersión reflejan cuan alejados están los valores experimentales del valor central, entre ellos está: el coeficiente de variación, indicador del grado de dispersión de la muestra (Guerra *et al.*, 2004).

### Análisis de regresión

En la presente investigación, para determinar el contenido de almidón en jugo y azúcar crudo, es necesario establecer una relación entre la absorbancia de las muestras y la concentración de almidón en las mismas; además se necesita conocer el efecto del contenido de almidón en el consumo de vapor en el proceso de producción.

El análisis de regresión tiene como objetivo modelar en forma matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes (factores). Si mediante un modelo matemático es posible describir tal relación, entonces este modelo puede aplicarse con propósitos de predicción, optimización o control (Gutiérrez y de la Vara, 2008). Para estimar los parámetros de un modelo de regresión son necesarios los datos, los cuales pueden obtenerse de experimentos planeados, de observaciones de fenómenos no controlados o de registros históricos.

Si se quiere explicar el comportamiento de una variable Y (concentración de almidón o consumo de vapor en el proceso) en función de los valores que toma X (absorbancia de la muestra o contenido de almidón), el análisis de regresión lineal simple permite determinar el modelo que mejor se ajusta a los datos, a partir de una relación funcional de forma lineal (Gutiérrez y de la Vara, 2008). Para confirmar la validez del modelo

obtenido y hasta qué punto este modelo representa fielmente el fenómeno que se estudia, es necesario verificar la calidad de ajuste del modelo y el grado de correlación entre las variables.

El coeficiente de correlación expresa el grado de alineación entre las variables x, y; este puede tomar valores desde -1 hasta +1; donde los valores extremos señalan que existe dependencia lineal perfecta entre las variables, en tanto el valor cero señala que no hay dependencia lineal alguna.

La calidad de la regresión puede determinarse mediante la realización de un análisis de varianza, prueba ANOVA. El *P-value* (valor de la probabilidad) indica la probabilidad de que la relación entre las variables sea significativa, este debe ser menor de un nivel de significación igual a 0,05.

Otro indicador de la calidad de ajuste es el error relativo de predicción del modelo, este se estima por la diferencia entre los resultados obtenidos por el modelo con respecto a los datos de referencia que se utilizan para su determinación, y define la calidad de predicción del modelo. Según Sargent (2009), el cálculo del error relativo permite validar el modelo si este es menor que 10 % y se determina por la ecuación A.7.

$$E_{rel} = \frac{x_{ref} - x_{cal}}{x_{ref}} * 100 \quad . \quad \text{Ec. A.7}$$

Dónde,  $E_{rel}$ : error relativo;  $x_{ref}$ : valor de concentración de almidón de referencia (mg/L o mg/kg);  $x_{cal}$ : valor de concentración de almidón calculado por el modelo (mg/L o mg/kg).

### Análisis de varianza

Entre las tareas de la investigación se encuentra, determinar el efecto de las dosis de aplicación de la enzima, en el porcentaje de remoción de almidón u otros parámetros de calidad a controlar como el pH, las cenizas y los reductores. Para poder estudiar como incide la aplicación de la enzima en estos parámetros, se propone la realización de los correspondientes análisis de varianza, para saber si existen diferencias significativas entre las dosis de alfa amilasa adicionadas en los experimentos.

La información del análisis de varianza se brinda en la tabla ANOVA, el objetivo del análisis es comparar una población con otra (Guerra y Sevilla, 1986). La varianza existe entre cada grupo individual y también existe la varianza entre los grupos, la relación entre ambas varianzas debe ser aproximadamente igual a uno para que las varianzas se acerquen a una misma población (Guerra *et al.*, 2004). Esta relación es conocida como F de Fisher, generalmente el valor de dicha relación se compara con un valor de F tabulado (Guerra y Sevilla, 1986); la F de Fisher está relacionado con el *P-value* que indica la probabilidad de si existen o no diferencias entre las poblaciones. Si el valor del *P-value* es menor que el nivel de significación 0,05 % existen diferencias significativas entre las poblaciones con un nivel de confianza del 95 %.

Además con la realización de la prueba de múltiples rangos, se pueden identificar cuáles son los grupos homogéneos y los que presentan diferencias significativas.

Para aplicar los procedimientos anteriores es necesario realizar las pruebas de normalidad, y verificar que los datos experimentales tengan una distribución normal. Por lo tanto, se requiere del análisis de tres pruebas a desarrollar, de las cuales dos como mínimo deben realizarse para justificar el resultado. En la demostración de la distribución normal se establecen las siguientes pruebas a realizar:

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

### Diseño de experimentos

Gutiérrez y de la Vara (2008), expresan que el diseño estadístico de experimentos es precisamente la forma más eficaz de hacer pruebas. El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que,

al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.

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

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

#### *Coefficiente de determinación ( $R^2$ )*

Medida adimensional, de fácil cálculo e interpretación, debido a su recorrido acotado entre cero y uno, lo que conduce a una profusa utilización de la misma, con interpretaciones abusivas en unos casos y erróneas en otros. Sin tratar de mermar la importancia de este coeficiente,  $R^2$  debe tomarse, como una primera medida, a completar

con otras, para evaluar el modelo lineal de regresión ajustado y obtener conclusiones válidas sobre su grado de ajuste al conjunto de observaciones. Su exclusiva consideración puede, en muchas ocasiones, conducir a errores importantes en los análisis de regresión (Martínez, 2005).

### *Diagrama de Pareto*

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

### *Estadístico de Durbin Watson*

El estadístico de Durbin Watson (DW) es una prueba de autocorrelación en los residuos de un análisis de regresión estadística. La estadística de Durbin-Watson siempre tendrá un valor entre 0 y 4. Un valor de 2,0 significa que no se detecta autocorrelación en la muestra. Los valores de 0 a menos de 2 indican autocorrelación positiva y los valores de 2 a 4 indican autocorrelación negativa.

### Optimización simultánea. Función de deseabilidad

En el epígrafe anterior se hace énfasis en encontrar el punto óptimo considerando sólo una variable de respuesta. Sin embargo, es típico considerar diversas características para

lograr productos con mejor calidad y propiedades (Gutiérrez y de la Vara, 2008). En el proceso de producción de azúcar crudo existen varios indicadores de calidad como son pH, Brix, color, cenizas, reductores y contenido de almidón, y todos son importantes para que el azúcar crudo tenga la calidad requerida. Si la optimización sólo se hace para uno de estos parámetros podrían resultar condiciones inadecuadas para los otros. Por ello es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

Esto hace necesario buscar una solución compromiso, donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio. A esa solución compromiso la llamaremos óptimo simultáneo (Gutiérrez y de la Vara, 2008). Uno de los métodos de optimización simultánea es el basado en una función de deseabilidad. Este método provee soluciones consistentes tanto con los datos observados en el experimento, como con la información que se les provee. Asimismo, es intuitivo y flexible, en el sentido de que permite balancear de diversas formas la importancia relativa de las respuestas.

Esta técnica de optimización multi-respuesta fue propuesta inicialmente por Harrington (1965) y posteriormente modificada por Derringer y Suich (1980). El método consiste en definir una función de deseabilidad para cada una de las variables de respuesta y, a partir de estas últimas, se define una deseabilidad global, con lo que el problema de optimización multivariado se convierte en un problema de optimización univariado ya que se desea maximizar la deseabilidad global para obtener un punto óptimo.

La función de deseabilidad implica transformaciones de cada una de las variables de respuesta estimadas  $\hat{y}_i(x)$  a un valor de deseable  $d_i(x)$ , donde  $0 \leq d_i(x) \leq 1$ . Si  $d_i(x) = 1$ ,

significa que la correspondiente respuesta estimada  $\hat{y}_i(x)$  alcanza su máximo valor deseable; si  $d_i(x) = 0$ , la respuesta toma un valor no deseado. Las deseabilidades individuales son combinadas usando la media geométrica para obtener una deseabilidad global.

$$D(x) = [d_1(x)^{w_1} * d_2(x)^{w_2} * \dots * d_i(x)^{w_i}]^{\frac{1}{\sum w_i}}. \quad \text{Ec. A.8}$$

Donde los pesos ( $w_i$ ) son constantes que balancean la importancia relativa de cada variable. Los pesos de los criterios se determinan mediante la Matriz de Saaty, basada en la comparación cuantitativa de pares de criterios, en la que se expresa mediante una escala establecida: “cuanto más un criterio es superior a otro” (Palacios, 2017).

Dependiendo de los criterios de optimización adoptados, se pueden construir diferentes funciones dentro de un intervalo aceptable de valores de respuesta dado por  $(U_i, L_i)$ , donde  $U_i$  es el valor superior aceptable para la respuesta y  $L_i$  es la más baja (Vera *et al.*, 2014). Por lo tanto, si la respuesta tiene que ser maximizada,  $d_i[\hat{y}_i(x)]$  se describe por la siguiente ecuación (Hidalgo y Delgado, 2018):

$$d_i[\hat{y}_i(x)] = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i}\right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{si } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases}. \quad \text{Ec. A.9}$$

Donde,  $s$  es un valor de potencia denominado "peso", establecido por el analista para determinar la importancia de que  $\hat{y}_i$  esté cerca del máximo. Para valores pequeños de  $s$  se

alcanza niveles satisfactorios de deseabilidad y para valores grandes la deseabilidad disminuye.

La ecuación para  $d_i[\hat{y}_i(x)]$ , cuando tiene que ser minimizada (Hidalgo y Delgado, 2018), es:

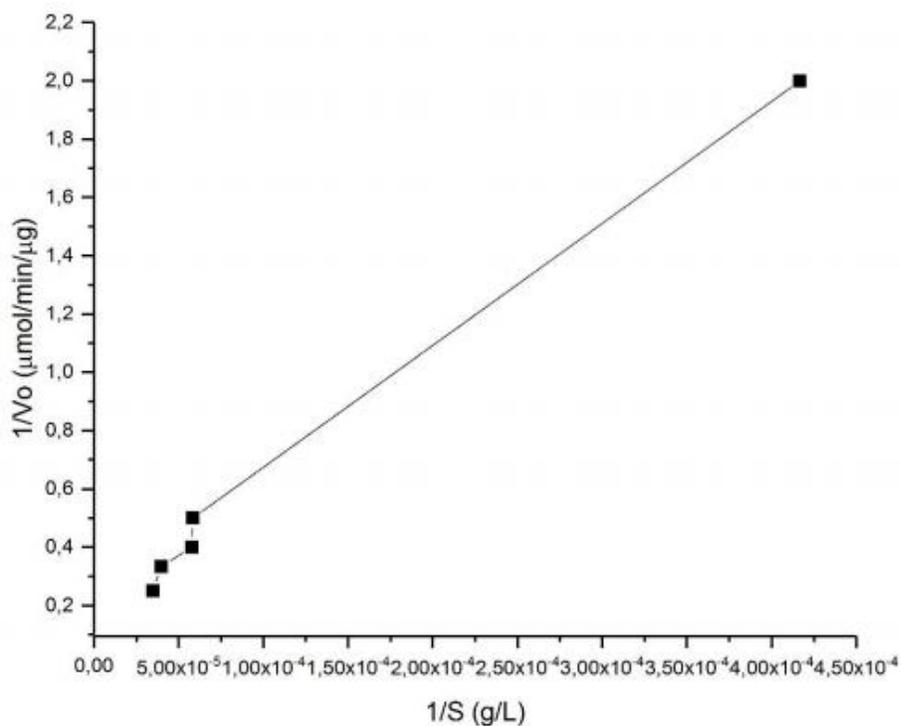
$$d_i[\hat{y}_i(x)] = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x)-U_i}{L_i-U_i}\right)^t & \text{si } L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad \text{Ec. A.10}$$

Donde,  $t$  es un valor de potencia denominado "peso", establecido por el analista para determinar la importancia de que  $\hat{y}_i$  esté cerca del mínimo. Para valores pequeños de  $t$  se alcanza niveles satisfactorios de deseabilidad y para valores grandes la deseabilidad disminuye.

Cuando un valor objetivo  $\theta_i$  es la respuesta más deseable, la ecuación viene dada por (Hidalgo y Delgado, 2018):

$$d_i[\hat{y}_i(x)] = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x)-L_i}{\theta_i-L_i}\right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{y}_i(x) < \theta_i \\ 1 & \text{si } \hat{y}_i(x) = \theta_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x)-U_i}{\theta_i-U_i}\right)^t & \text{si } \theta_i < \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad \text{Ec. A.11}$$

**Anexo 7:** Gráfico de la doble recíproca de Lineweaver y Burk.



*Anexo 8: Diseño de experimento.*

<i>Corridas</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Brix</i>	<i>pH</i>	<i>Concentración Amilasa</i>	<i>Contenido de Almidón Inicial</i>
1	30	16	8	0,05	200
2	90	65	5	0,01	200
3	60	16	6,5	0,03	400
4	60	40,5	6,5	0,03	400
5	60	40,5	6,5	0,03	200
6	90	16	8	0,05	600
7	90	65	5	0,05	600
8	60	40,5	8	0,03	400

*Anexo 8. Continuación.*

9	90	16	5	0,01	600
10	30	65	8	0,01	600
11	60	65	6,5	0,03	400
12	90	65	8	0,01	600
13	30	40,5	6,5	0,03	400
14	90	40,5	6,5	0,03	400
15	90	65	5	0,01	600
16	60	40,5	5	0,03	400
17	30	16	5	0,01	200
18	90	65	8	0,01	200
19	60	40,5	6,5	0,03	400
20	90	16	8	0,01	200
21	30	65	5	0,05	200
22	90	16	5	0,05	200
23	30	65	8	0,01	200
24	30	16	8	0,05	600
25	30	65	5	0,01	200
26	90	16	8	0,05	200
27	60	40,5	6,5	0,01	400
28	60	40,5	6,5	0,03	400
29	60	40,5	6,5	0,03	400
30	30	16	5	0,05	200
31	90	16	5	0,01	200

*Anexo 8. Continuación.*

32	60	40,5	6,5	0,03	600
33	90	16	8	0,01	600
34	90	65	5	0,05	200
35	90	16	5	0,05	600
36	30	65	8	0,05	200
37	90	65	8	0,05	600
38	30	16	5	0,05	600
39	30	65	5	0,01	600
40	60	40,5	6,5	0,03	400
41	60	40,5	6,5	0,05	400
42	90	65	8	0,05	200
43	30	16	5	0,01	600
44	30	16	8	0,01	200
45	30	65	5	0,05	600
46	30	16	8	0,01	600
47	30	65	8	0,05	600

**Anexo 9:** Caracterización de los resultados de la determinación del tiempo de contacto.

Tiempo	A <sub>600</sub>			Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación (%)	% de Remoción
0	0,59	0,492	0,54	0,541	0,049	9,06	0
5	0,198	0,195	0,2	0,198	0,003	1,27	63,40
10	0,2	0,164	0,172	0,179	0,019	10,58	66,91
15	0,177	0,219	0,198	0,198	0,021	10,60	63,40
20	0,19	0,184	0,192	0,189	0,004	2,21	65,06
30	0,161	0,162	0,16	0,161	0,001	0,62	70,24
60	0,16	0,164	0,16	0,161	0,002	1,43	70,24

El porcentaje de remoción se calcula en función de la absorbancia promedio para 0 min.

**Anexo 10:** Resultados de las variables de respuesta del diseño de experimento.

Corridas	Contenido de almidón final			Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación (%)
1	29,60	45,42	26,81	33,95	10,03	29,56
2	14,30	15,92	14,70	14,97	0,84	5,61
3	4,49	3,56	4,49	4,18	0,54	12,86
4	11,92	12,61	9,87	11,47	1,43	12,43
5	9,87	11,58	10,21	10,55	0,91	8,58
6	11,00	7,28	7,28	8,52	2,15	25,23
7	6,63	7,84	6,63	7,03	0,70	9,95
8	15,00	12,26	15,69	14,32	1,81	12,65
9	19,37	15,65	17,51	17,51	1,86	10,63
10	34,69	31,67	18,14	28,17	8,82	31,30
11	16,12	17,93	15,71	16,59	1,18	7,13

Anexo 10. Continuación.

12	18,74	19,95	18,54	19,08	0,76	4,01
13	22,19	22,19	23,56	22,65	0,79	3,49
14	7,81	5,76	5,07	6,22	1,43	22,93
15	14,10	9,66	13,09	12,28	2,33	18,96
16	7,81	9,87	10,21	9,30	1,30	13,94
17	47,28	33,32	35,19	38,60	7,58	19,63
18	6,63	7,23	9,25	7,70	1,37	17,84
19	9,18	10,21	10,55	9,98	0,71	7,14
20	18,44	21,23	24,02	21,23	2,79	13,15
21	15,92	18,34	21,17	18,47	2,63	14,22
22	11,93	15,65	17,51	15,03	2,84	18,91
23	33,68	28,03	32,47	31,40	2,98	9,48
24	48,21	49,14	43,56	46,97	2,99	6,37
25	20,16	20,76	21,17	20,69	0,51	2,46
26	14,72	10,07	9,14	11,31	2,99	26,45
27	10,21	9,87	9,53	9,87	0,34	3,47
28	13,98	15,35	13,98	14,43	0,79	5,48
29	11,58	16,03	16,72	14,78	2,79	18,87
30	16,58	16,58	26,81	19,99	5,91	29,56
31	14,72	18,44	17,51	16,89	1,94	11,47
32	11,58	10,89	13,29	11,92	1,23	10,35
33	52,86	52,86	64,96	56,89	6,98	12,27
34	8,65	8,04	8,24	8,31	0,31	3,71

Anexo 10. Continuación.

35	8,21	10,07	8,21	8,83	1,07	12,17
36	21,97	20,96	21,37	21,43	0,51	2,37
37	10,06	11,47	11,07	10,87	0,73	6,70
38	32,39	26,81	29,60	29,60	2,79	9,43
39	34,09	36,71	37,32	36,04	1,72	4,76
40	13,63	11,92	11,92	12,49	0,99	7,91
41	11,92	11,92	13,29	12,38	0,79	6,39
42	6,83	8,04	8,24	7,70	0,76	9,92
43	44,49	40,77	42,63	42,63	1,86	4,36
44	33,32	34,26	29,60	32,39	2,46	7,60
45	26,01	29,04	30,25	28,43	2,18	7,68
46	59,37	55,65	56,58	57,20	1,94	3,39
47	10,26	7,23	7,64	8,38	1,64	19,63
<i>Corridas</i>	<i>Reductores</i>			<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación (%)</i>
1	3,11	3,23	3,34	3,23	0,12	3,57
2	5,68	5,96	6,10	5,91	0,21	3,62
3	6,70	6,98	6,52	6,73	0,23	3,44
4	15,78	16,24	16,10	16,04	0,24	1,47
5	10,11	11,08	10,82	10,67	0,50	4,71
6	2,92	3,17	3,17	3,09	0,14	4,68
7	32,34	32,51	31,81	32,22	0,37	1,13
8	14,52	14,73	13,99	14,41	0,38	2,65
9	20,04	20,04	19,07	19,72	0,56	2,84

Anexo 10. Continuación.

10	22,15	24,25	21,62	22,67	1,39	6,13
11	19,69	19,86	18,89	19,48	0,52	2,66
12	34,09	35,32	34,44	34,62	0,63	1,83
13	20,88	20,81	20,42	20,70	0,25	1,20
14	16,90	16,41	17,81	17,04	0,71	4,17
15	49,55	45,33	46,12	47,00	2,24	4,77
16	16,41	15,11	16,13	15,88	0,68	4,31
17	11,52	12,12	11,80	11,81	0,30	2,54
18	18,63	19,86	19,68	19,39	0,66	3,43
19	15,60	15,21	15,32	15,38	0,20	1,31
20	7,45	7,10	7,62	7,39	0,27	3,59
21	43,40	43,75	43,31	43,49	0,23	0,53
22	27,18	27,27	27,13	27,19	0,07	0,26
23	18,54	18,89	18,27	18,57	0,31	1,67
24	2,83	2,97	3,00	2,93	0,09	3,09
25	31,36	32,59	32,07	32,01	0,62	1,93
26	5,83	6,08	6,39	6,10	0,28	4,56
27	15,00	14,86	14,55	14,80	0,23	1,56
28	13,11	13,46	13,56	13,38	0,24	1,77
29	15,78	15,74	15,04	15,52	0,42	2,68
30	18,19	18,19	19,68	18,69	0,86	4,60
31	10,54	10,72	11,60	10,95	0,57	5,18
32	9,84	10,10	10,19	10,04	0,18	1,81

Anexo 10. Continuación.

33	7,71	7,83	7,53	7,69	0,15	1,96
34	19,68	21,35	19,86	20,30	0,92	4,52
35	9,64	9,84	9,98	9,82	0,17	1,74
36	17,48	18,80	17,84	18,04	0,68	3,78
37	15,20	14,85	14,32	14,79	0,44	3,00
38	2,31	2,18	2,31	2,27	0,08	3,31
39	26,71	26,01	26,71	26,48	0,40	1,53
40	16,58	16,58	16,80	16,65	0,13	0,76
41	16,34	15,92	15,46	15,91	0,44	2,77
42	18,80	18,63	19,33	18,92	0,37	1,93
43	4,67	4,25	4,69	4,54	0,25	5,48
44	3,56	3,74	3,74	3,68	0,10	2,82
45	39,10	40,85	40,41	40,12	0,91	2,27
46	5,48	5,95	5,46	5,63	0,28	4,93
47	21,96	22,84	23,37	22,72	0,71	3,13
<i>Corridas</i>	<i>% Cenizas</i>			<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación (%)</i>
1	0,91	0,90	1,07	0,96	0,10	9,94
2	0,48	0,55	0,57	0,53	0,05	8,95
3	0,79	0,83	0,85	0,82	0,03	3,76
4	0,87	0,92	0,84	0,88	0,04	4,62
5	0,78	0,81	0,86	0,82	0,04	4,95
6	0,83	0,90	0,99	0,91	0,08	8,83
7	0,65	0,67	0,74	0,69	0,05	6,87

Anexo 10. Continuación.

8	0,94	0,97	0,99	0,97	0,03	2,63
9	0,52	0,56	0,50	0,53	0,03	5,82
10	0,80	0,90	0,94	0,88	0,07	8,19
11	0,35	0,33	0,30	0,33	0,03	7,73
12	0,81	0,89	0,97	0,18	0,08	8,99
13	0,79	0,85	0,83	0,82	0,03	3,76
14	0,83	0,97	0,99	0,93	0,09	9,37
15	0,57	0,50	0,48	0,52	0,05	9,12
16	0,44	0,55	0,49	0,49	0,06	11,27
17	0,36	0,44	0,43	0,41	0,04	10,63
18	0,81	0,95	0,99	0,92	0,09	10,28
19	0,87	0,82	0,85	0,85	0,03	3,00
20	0,84	0,95	0,98	0,92	0,07	8,02
21	0,55	0,62	0,69	0,62	0,07	11,29
22	0,55	0,62	0,68	0,62	0,07	10,51
23	0,96	0,92	0,97	0,95	0,03	2,79
24	0,99	0,97	0,95	0,97	0,02	2,06
25	0,47	0,44	0,48	0,46	0,02	4,61
26	0,83	0,99	0,96	0,93	0,09	9,16
27	0,80	0,73	0,77	0,77	0,04	4,59
28	0,82	0,86	0,86	0,85	0,02	2,76
29	0,85	0,75	0,89	0,83	0,07	8,69
30	0,61	0,69	0,77	0,69	0,08	11,59

Anexo 10. Continuación.

31	0,51	0,57	0,53	0,54	0,03	5,71
32	0,75	0,83	0,78	0,79	0,04	5,14
33	0,98	0,93	0,95	0,95	0,03	2,68
34	0,61	0,53	0,59	0,58	0,04	7,21
35	0,57	0,59	0,62	0,59	0,03	4,32
36	0,90	0,94	0,94	0,93	0,02	2,52
37	0,99	1,01	0,98	0,99	0,02	1,60
38	0,48	0,52	0,47	0,49	0,03	5,40
39	0,45	0,43	0,44	0,44	0,01	2,27
40	0,77	0,82	0,84	0,81	0,04	4,45
41	0,86	0,87	0,83	0,85	0,02	2,50
42	1,05	1,08	1,10	1,08	0,03	2,36
43	0,31	0,33	0,36	0,33	0,03	7,73
44	0,86	0,90	0,91	0,89	0,03	2,97
45	0,60	0,57	0,58	0,58	0,02	2,73
46	0,85	0,86	0,89	0,87	0,02	2,44
47	0,84	0,97	0,98	0,93	0,08	8,40
<i>Corridas</i>	<i>pH final</i>			<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación (%)</i>
1	7,00	7,58	7,80	7,57	0,43	5,74
2	5,04	5,02	5,01	5,02	0,02	0,31
3	6,80	6,83	6,90	6,84	0,05	0,75
4	6,66	6,83	6,66	6,72	0,10	1,46
5	6,47	6,56	6,65	6,56	0,09	1,37

Anexo 10. Continuación.

6	7,32	7,81	7,89	7,67	0,31	4,02
7	5,28	5,40	5,36	5,35	0,06	1,14
8	7,37	7,50	7,34	7,4	0,09	1,15
9	5,10	5,07	5,25	5,14	0,10	1,88
10	6,97	7,18	7,55	7,23	0,29	4,06
11	5,80	5,90	5,97	5,89	0,09	1,45
12	5,06	5,23	5,02	5,1	0,11	2,19
13	6,19	6,40	6,34	6,31	0,11	1,71
14	5,19	5,70	5,49	5,46	0,26	4,69
15	5,25	5,42	5,75	5,47	0,25	4,65
16	4,90	5,01	5,33	5,08	0,22	4,40
17	4,81	5,10	5,25	5,05	0,22	4,43
18	7,01	6,75	7,32	7,03	0,29	4,06
19	6,45	6,62	6,59	6,55	0,09	1,39
20	7,15	7,78	7,99	7,64	0,44	5,72
21	4,96	4,84	5,25	5,02	0,21	4,20
22	5,01	5,17	5,45	5,21	0,22	4,27
23	7,05	7,21	7,22	7,16	0,10	1,33
24	7,29	7,20	7,33	7,27	0,07	0,92
25	5,01	5,11	5,05	5,06	0,05	1,00
26	7,08	7,59	7,86	7,51	0,40	5,27
27	6,45	6,60	6,53	6,53	0,08	1,15
28	6,44	6,31	6,39	6,38	0,07	1,03

Anexo 10. Continuación.

29	6,13	6,53	6,70	6,45	0,29	4,54
30	4,80	4,98	5,33	5,04	0,27	5,35
31	5,08	5,25	5,22	5,18	0,09	1,75
32	6,33	6,47	6,56	6,45	0,12	1,80
33	7,30	7,43	7,51	7,41	0,11	1,43
34	5,28	5,21	5,34	5,28	0,07	1,23
35	5,03	5,16	5,05	5,08	0,07	1,38
36	7,08	7,20	7,35	7,21	0,14	1,88
37	6,95	7,05	7,23	7,08	0,14	2,00
38	5,00	5,10	5,03	5,04	0,05	1,02
39	5,03	5,00	5,05	5,03	0,03	0,51
40	6,19	6,29	6,56	6,35	0,19	3,01
41	6,42	6,27	6,15	6,28	0,14	2,15
42	7,10	7,01	6,90	7	0,10	1,43
43	4,81	4,97	4,63	4,8	0,17	3,54
44	7,10	7,38	7,43	7,3	0,18	2,44
45	4,89	5,18	5,12	5,06	0,15	3,03
46	7,15	7,41	7,35	7,3	0,14	1,87
47	6,87	7,07	7,43	7,12	0,35	4,96

*Anexo II: Porcentaje de remoción de almidón en función de la dosis de enzima.*

<i>% de remoción por dosis de enzima aplicada</i>					
Exp.	0,01 %	Exp.	0,03 %	Exp.	0,05 %
2	92,51	3	97,91	1	83,03
9	91,25	4	94,27	6	95,74
10	85,92	5	94,72	7	96,48
12	90,46	8	92,84	21	90,76
15	93,86	11	91,71	22	92,49
17	80,70	13	88,68	24	76,52
18	96,15	14	96,89	26	94,35
20	89,38	16	95,35	30	90,00
23	84,30	19	95,01	34	95,85
25	89,65	28	92,78	35	95,59
27	95,07	29	92,61	36	89,28
31	91,56	32	94,04	37	94,57
33	71,55	40	93,75	38	85,20
39	81,98			41	93,81
43	78,69			42	96,15
44	83,80			45	85,78
46	71,40			47	95,81

El porcentaje de remoción se determina en función del contenido de almidón inicial de cada experimento.

**Anexo 12:** Pruebas de normalidad (a), análisis de varianza (b) y prueba de múltiples rangos (c) para % de remoción por nivel de  $\alpha$ -amilasa.

*Anexo 12a*

<i>Parámetros</i>	<i>Dosis o niveles de enzima</i>		
	<i>0,01 %</i>	<i>0,03 %</i>	<i>0,05 %</i>
<i>% de Remoción de Almidón</i>			
<i>P- value</i>	0,61	0,98	0,50
<i>skewness</i>	-1,29	-0,68	-2,03
<i>kurtosis</i>	-0,18	0,93	1,11

*Anexo 12b*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	445,833	2	222,917	6,54	0,0033
<i>Intra grupos</i>	1500,74	44	34,1077		
<i>Total (Corr.)</i>	1946,57	46			

*Anexo 12c*

<i>Dosis de <math>\alpha</math>-amilasa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>0,01 %</i>	17	86,37	X
<i>0,05 %</i>	17	91,26	X
<i>0,03 %</i>	13	93,89	X

**Anexo 13: Reductores en función de la dosis de enzima aplicada.**

<i>Incremento de Reductores (mg/mL) por dosis de enzima aplicada</i>											
<i>Exp.</i>	<i>0,01 %</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,03%</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,05%</i>		
	<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
2	5,91	5,91	0	3	5,16	6,73	1,57	1	3,23	3,23	0
9	7,23	19,72	12,49	4	12,84	16,04	3,2	6	3,09	3,09	0
10	19,59	22,67	3,08	5	10,67	10,67	0	7	20,15	32,22	12,07
12	20,5	34,62	14,12	8	10,94	14,41	3,47	21	34,96	43,49	8,53
15	25,09	47	21,91	11	9,73	19,48	9,75	22	5,49	27,19	21,7
17	5,49	11,81	6,32	13	11,51	20,7	9,19	24	2,93	2,93	0
18	16,54	19,39	2,85	14	12,84	17,04	4,2	26	4,91	6,1	1,19
20	5,85	7,39	1,54	16	13,36	15,88	2,52	30	7,23	18,69	11,46
23	18,56	18,57	0,01	19	10,76	15,38	4,62	34	8,76	20,3	11,54
25	28,54	32,01	3,47	28	10,76	13,38	2,62	35	6,11	9,82	3,71
27	11,51	14,8	3,29	29	12,84	15,52	2,68	36	17,79	18,04	0,25
31	4,67	10,95	6,28	32	10,04	10,04	0	37	14,79	14,79	0
33	4,91	7,69	2,78	40	11,51	16,65	5,14	38	2,27	2,27	0
39	20,15	26,48	6,33					41	12,84	15,91	3,07
43	4,54	4,54	0					42	16,54	18,92	2,38
44	3,56	3,68	0,12					45	34,96	40,12	5,16
46	3,79	5,63	1,84					47	20,06	22,72	2,66

Los términos M, H y I, se refieren a los reductores de las muestras madres, los hidrolizados y el incremento de los mismos.

**Anexo 14:** Pruebas de normalidad (a), análisis de varianza (b) y prueba de múltiples rangos (c) para incremento de reductores por nivel de  $\alpha$ -amilasa.

Anexo 14a

Parámetros	Dosis o niveles de enzima		
	0,01 %	0,03 %	0,05 %
<i>Incremento de Reductores</i>			
<i>P- value</i>	0,22	0,86	0,35
<i>skewness</i>	2,96	1,41	2,52
<i>kurtosis</i>	2,54	0,49	1,71
<i>Incremento de Reductores transformado (Raíz cubica)</i>			
<i>P- value</i>	0,78	0,27	0,55
<i>skewness</i>	-0,53	-1,97	-0,18
<i>kurtosis</i>	-0,36	1,06	-1,13

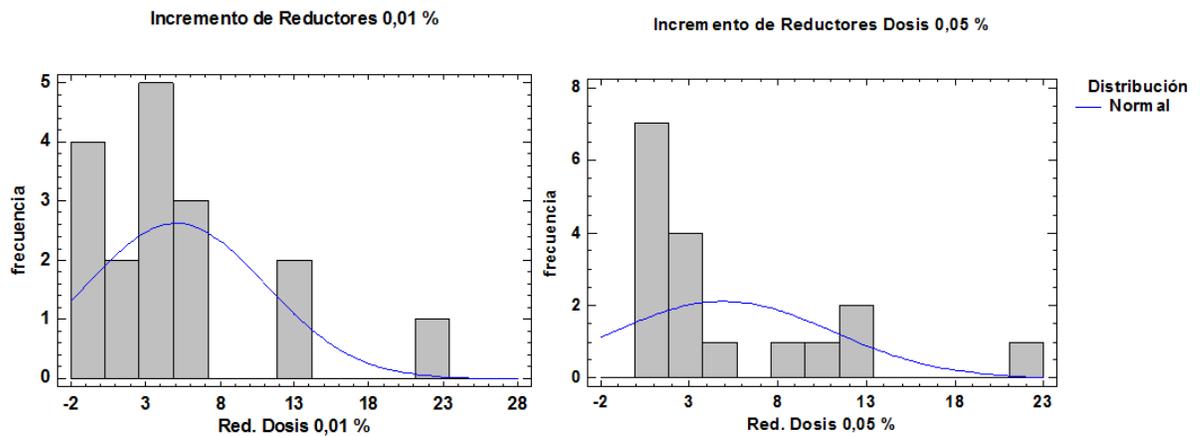


Figura A.3. Histogramas de frecuencia para reductores.

Anexo 14b

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	0,229514	2	0,114757	0,16	0,8485
<i>Intra grupos</i>	30,6198	44	0,695903		
<i>Total (Corr.)</i>	30,8493	46			

Anexo 14c

<i>Dosis de <math>\alpha</math>-amilasa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>0,05 %</i>	17	1,22238	X
<i>0,03 %</i>	13	1,34722	X
<i>0,01%</i>	17	1,3793	X

**Anexo 15: Cenizas en función de la dosis de enzima aplicada.**

<i>Incremento del % de Cenizas por dosis de enzima aplicada</i>											
<i>Exp.</i>	<i>0,01 %</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,03%</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,05%</i>		
	<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
2	0,41	0,53	0,12	3	0,77	0,82	0,05	1	0,61	0,96	0,35
9	0,20	0,53	0,33	4	0,67	0,88	0,21	6	0,62	0,91	0,29
10	0,84	0,88	0,04	5	0,74	0,82	0,08	7	0,43	0,69	0,26
12	0,84	0,89	0,05	8	0,73	0,97	0,24	21	0,41	0,62	0,21
15	0,43	0,52	0,09	11	0,31	0,33	0,02	22	0,34	0,62	0,28
17	0,34	0,41	0,07	13	0,67	0,82	0,15	24	0,62	0,97	0,35
18	0,82	0,92	0,10	14	0,67	0,93	0,26	26	0,61	0,93	0,32
20	0,61	0,92	0,31	16	0,31	0,49	0,18	30	0,38	0,69	0,31
23	0,82	0,95	0,13	19	0,67	0,85	0,18	34	0,41	0,58	0,17
25	0,41	0,46	0,05	28	0,67	0,85	0,18	35	0,20	0,59	0,39
27	0,67	0,77	0,10	29	0,67	0,83	0,16	36	0,82	0,93	0,11
31	0,38	0,54	0,16	32	0,75	0,79	0,04	37	0,84	0,99	0,15
33	0,62	0,95	0,33	40	0,67	0,81	0,14	38	0,14	0,49	0,35
39	0,41	0,44	0,03					41	0,67	0,85	0,18
43	0,14	0,33	0,19					42	0,82	1,08	0,26
44	0,61	0,89	0,28					45	0,41	0,58	0,17
46	0,62	0,87	0,25					47	0,84	0,93	0,09

Los términos M, H y I, se refieren a los % de cenizas de las muestras madres, los hidrolizados y el incremento de los mismos.

**Anexo 16:** Pruebas de normalidad (a), análisis de varianza (b) y prueba de múltiples rangos (c) para incremento de cenizas por nivel de  $\alpha$ -amilasa.

*Anexo 16a*

<i>Parámetros</i>	<i>Dosis o niveles de enzima</i>		
	<i>0,01 %</i>	<i>0,03 %</i>	<i>0,05 %</i>
<i>Incremento de % de Cenizas</i>			
<i>P- value</i>	0,64	0,87	0,92
<i>skewness</i>	1,02	-0,50	-0,40
<i>kurtosis</i>	-0,96	-0,69	-0,97

*Anexo 16b*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	0,106444	2	0,0532222	6,05	0,0048
<i>Intra grupos</i>	0,387041	44	0,00879638		
<i>Total (Corr.)</i>	0,493485	46			

*Anexo 16c*

<i>Dosis de <math>\alpha</math>-amilasa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>0,03 %</i>	13	0,145385	X
<i>0,01 %</i>	17	0,154706	X
<i>0,05 %</i>	17	0,249412	X

*Anexo 17: pH en función de la dosis de enzima aplicada.*

<i>Variación de pH por dosis de enzima aplicada</i>											
<i>Exp.</i>	<i>0,01 %</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,03%</i>			<i>Exp.</i>	<i>0,05%</i>		
	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>V</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>		<i>M</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
2	5	5,02	0,02	3	6,5	6,84	0,34	1	8	7,57	-0,43
9	5	5,14	0,14	4	6,5	6,72	0,22	6	8	7,67	-0,33
10	8	7,23	-0,77	5	6,5	6,56	0,06	7	5	5,35	0,35
12	8	5,1	-2,9	8	8	7,4	-0,6	21	5	5,02	0,02
15	5	5,47	0,47	11	6,5	5,89	-0,61	22	5	5,21	0,21
17	5	5,05	0,05	13	6,5	6,31	-0,19	24	8	7,27	-0,73
18	8	7,03	-0,97	14	6,5	5,46	-1,04	26	8	7,51	-0,49
20	8	7,64	-0,36	16	5	5,08	0,08	30	5	5,04	0,04
23	8	7,16	-0,84	19	6,5	6,55	0,05	34	5	5,28	0,28
25	5	5,06	0,06	28	6,5	6,38	-0,12	35	5	5,08	0,08
27	6,5	6,53	0,03	29	6,5	6,45	-0,05	36	8	7,21	-0,79
31	5	5,18	0,18	32	6,5	6,45	-0,05	37	8	7,08	-0,92
33	8	7,41	-0,59	40	6,5	6,35	-0,15	38	5	5,04	0,04
39	5	5,03	0,03					41	6,5	6,28	-0,22
43	5	4,8	-0,2					42	8	7	-1
44	8	7,3	-0,7					45	5	5,06	0,06
46	8	7,3	-0,7					47	8	7,12	-0,88

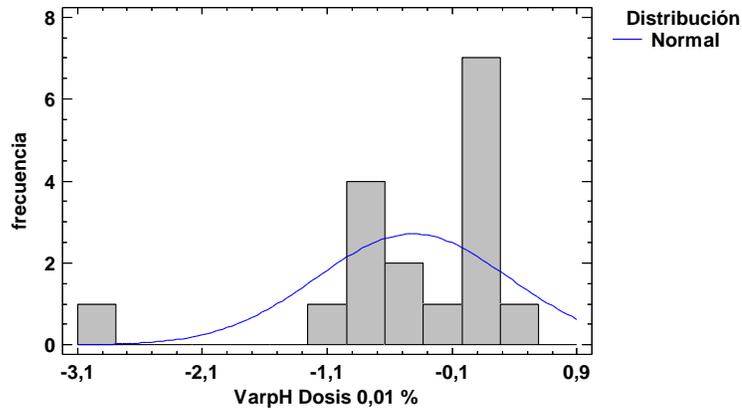
Los términos I, F y V, se refieren a los valores de pH iniciales, finales y la variación de los mismos.

**Anexo 18:** Pruebas de normalidad (a), análisis de varianza (b) y prueba de múltiples rangos (c) para variación de pH.

*Anexo 18a*

<i>Parámetros</i>	<i>Dosis o niveles de enzima</i>		
	<i>0,01 %</i>	<i>0,03 %</i>	<i>0,05 %</i>
<i>Variación de pH</i>			
<i>P- value</i>	0,611125	0,471661	0,425805
<i>skewness</i>	-3,68402	-1,70271	-0,499853
<i>kurtosis</i>	5,47024	0,834836	-1,19371
<i>Variación de pH transformado (ATAN)</i>			
<i>P- value</i>	0,39781	0,671245	0,449782
<i>skewness</i>	-0,720733	-1,2055	-0,200914
<i>kurtosis</i>	-0,396705	0,131765	-1,30662

Variación de pH Dosis 0,01 %



*Figura A.4. Histogramas de frecuencia para pH.*

Anexo 18b

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	518,814	2	259,407	0,51	0,6053
<i>Intra grupos</i>	22478,1	44	510,865		
<i>Total (Corr.)</i>	22996,9	46			

Anexo 18c

<i>Dosis de <math>\alpha</math>-amilasa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>0,01 %</i>	17	-15,8904	X
<i>0,05 %</i>	17	-13,1127	X
<i>0,03 %</i>	13	-7,55932	X

**Anexo 19:** Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para porcentaje de remoción de almidón.

Anexo 19a

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:Temperatura</i>	522,715	1	522,7150	33,41	0,0000
<i>B:Brix</i>	198,138	1	198,1380	12,66	0,0015
<i>C:pH</i>	39,0743	1	39,0743	2,50	0,1261
<i>D:Conc Amilasa</i>	203,461	1	203,4610	13,00	0,0013
<i>E:Cont Almidón Inicial</i>	73,1198	1	73,1198	4,67	0,0400

*Anexo 19a. Continuación.*

<i>AA</i>	16,1633	1	16,1633	1,03	0,3188
<i>AB</i>	12,5389	1	12,5389	0,80	0,3789
<i>AC</i>	2,26537	1	2,26537	0,14	0,7067
<i>AD</i>	0,643798	1	0,643798	0,04	0,8408
<i>AE</i>	4,00438	1	4,00438	0,26	0,6172
<i>BB</i>	0,702596	1	0,702596	0,04	0,8338
<i>BC</i>	64,5461	1	64,5461	4,13	0,0526
<i>BD</i>	19,1077	1	19,1077	1,22	0,2792
<i>BE</i>	27,361	1	27,3610	1,75	0,1975
<i>CC</i>	3,83526	1	3,83526	0,25	0,6247
<i>CD</i>	13,1513	1	13,1513	0,84	0,3677
<i>CE</i>	12,223	1	12,2230	0,78	0,3849
<i>DD</i>	2,01774	1	2,01774	0,13	0,7224
<i>DE</i>	42,1887	1	42,1887	2,70	0,1126
<i>EE</i>	2,28048	1	2,28048	0,15	0,7057
<i>Error total</i>	406,786	26	15,6456		
<i>Total (corr.)</i>	1946,59	46			

Anexo 19b

$$\begin{aligned} \% \text{ de Remoción de Almidón} = & 56,8374 + 0,514141*A - 0,0577451*B + 5,45989*C + \\ & 53,8947*D + 0,00549024*E - 0,00284327*A^2 - 0,000851663*A*B - 0,00591265*A*C \\ & + 0,236401*A*D + 0,0000589578*A*E - 0,000888823*B^2 + 0,0386458*B*C - \\ & 1,577*B*D + 0,00018871*B*E - 0,554*C^2 + 21,3692*C*D - 0,00206012*C*E - \\ & 2260,31*D^2 + 0,287054*D*E - 0,0000240297*E^2 \end{aligned}$$

**Anexo 20:** Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para incremento de reductores.

Anexo 20a

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:Temperatura</i>	107,086	1	107,0860	7,90	0,0093
<i>B:Brix</i>	32,2433	1	32,2433	2,38	0,1350
<i>C:pH</i>	277,878	1	277,8780	20,51	0,0001
<i>D:Conc Amilasa</i>	0,216003	1	0,216003	0,02	0,9005
<i>E:Cont Almidón Inicial</i>	2,13	1	2,130	0,16	0,6950
<i>AA</i>	27,1154	1	27,1154	2,00	0,1690
<i>AB</i>	0,921403	1	0,921403	0,07	0,7963
<i>AC</i>	31,0669	1	31,0669	2,29	0,1420
<i>AD</i>	8,27228	1	8,27228	0,61	0,4417
<i>AE</i>	29,4336	1	29,4336	2,17	0,1525

Anexo 20a. Continuación.

<i>BB</i>	12,8246	1	12,8246	0,95	0,3396
<i>BC</i>	3,66528	1	3,66528	0,27	0,6074
<i>BD</i>	7,87053	1	7,87053	0,58	0,4528
<i>BE</i>	128,36	1	128,36	9,47	0,0049
<i>CC</i>	0,367046	1	0,367046	0,03	0,8705
<i>CD</i>	43,3148	1	43,3148	3,20	0,0854
<i>CE</i>	17,6567	1	17,6567	1,30	0,2641
<i>DD</i>	0,0993441	1	0,0993441	0,01	0,9324
<i>DE</i>	177,708	1	177,708	13,12	0,0012
<i>EE</i>	28,2099	1	28,2099	2,08	0,1610
<i>Error total</i>	352,295	26	13,5498		
<i>Total (corr.)</i>	1295,31	46			

Anexo 20b

$$\begin{aligned}
 \text{Incremento de Reductores} = & 2,55873 - 0,288304*A - 0,474684*B + 1,43592*C + \\
 & 605,676*D + 0,0442993*E + 0,00368265*A^2 + 0,000230867*A*B - 0,0218958*A*C - \\
 & 0,847396*A*D + 0,000159844*A*E + 0,00379739*B^2 + 0,00920918*B*C - \\
 & 1,01212*B*D + 0,000408737*B*E - 0,171385*C^2 - 38,7813*C*D + 0,00247604*C*E \\
 & - 501,54*D^2 - 0,589141*D*E - 0,0000845154*E^2
 \end{aligned}$$

**Anexo 21:** Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para el incremento del % de cenizas.

*Anexo 21a*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:Temperatura</i>	0,0161059	1	0,0161059	7,18	0,0126
<i>B:Brix</i>	0,192753	1	0,192753	85,92	0,0000
<i>C:pH</i>	0,00247353	1	0,00247353	1,10	0,3034
<i>D:Conc Amilasa</i>	0,0762382	1	0,0762382	33,98	0,0000
<i>E:Cont Almidón Inicial</i>	0,000238235	1	0,000238235	0,11	0,7471
<i>AA</i>	0,0191786	1	0,0191786	8,55	0,0071
<i>AB</i>	0,000378125	1	0,000378125	0,17	0,6848
<i>AC</i>	0,00137813	1	0,00137813	0,61	0,4402
<i>AD</i>	0,00227812	1	0,00227812	1,02	0,3229
<i>AE</i>	0,00137813	1	0,00137813	0,61	0,4402
<i>BB</i>	0,0165382	1	0,0165382	7,37	0,0116
<i>BC</i>	0,0101531	1	0,0101531	4,53	0,0430
<i>BD</i>	0,000253125	1	0,000253125	0,11	0,7396
<i>BE</i>	0,0140281	1	0,0140281	6,25	0,0190
<i>CC</i>	0,0214161	1	0,0214161	9,55	0,0047
<i>CD</i>	0,0140281	1	0,0140281	6,25	0,0190
<i>CE</i>	0,0175781	1	0,0175781	7,84	0,0095

*Anexo 21a. Continuación.*

<i>DD</i>	0,00132241	1	0,00132241	0,59	0,4495
<i>DE</i>	0,000078125	1	0,000078125	0,03	0,8534
<i>EE</i>	0,00797867	1	0,00797867	3,56	0,0705
<i>Error total</i>	0,0583266	26	0,00224333		
<i>Total (corr.)</i>	0,493485	46			

*Anexo 21b*

$$\begin{aligned} \text{Incremento \% de Cenizas} = & 1,23081 - 0,0102844*A + 0,0123793*B - 0,451924*C + \\ & 4,19972*D + 0,00177727*E + 0,0000979401*A^2 + 0,00000467687*A*B - \\ & 0,000145833*A*C - 0,0140625*A*D + 0,00000109375*A*E - 0,000136366*B^2 - \\ & 0,000484694*B*C + 0,0057398*B*D - 0,00000427296*B*E + 0,0413983*C^2 - \\ & 0,697917*C*D - 0,000078125*C*E + 57,8653*D^2 - 0,000390625*D*E - \\ & 0,00000142135*E^2 \end{aligned}$$

**Anexo 22:** Análisis de varianza ANOVA (a) y modelo matemático (b) para pH final.

*Anexo 22a*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:Temperatura</i>	0,0259882	1	0,0259882	0,20	0,6593
<i>B:Brix</i>	0,717753	1	0,717753	5,49	0,0270
<i>C:pH</i>	36,2149	1	36,2149	277,16	0,0000
<i>D:Conc Amilasa</i>	0,161047	1	0,161047	1,23	0,2771

Anexo 22a. Continuación.

<i>E:Cont Almidón Inicial</i>	0,147576	1	0,147576	1,13	0,2977
<i>AA</i>	0,492267	1	0,492267	3,77	0,0632
<i>AB</i>	0,286903	1	0,286903	2,20	0,1504
<i>AC</i>	0,350703	1	0,350703	2,68	0,1134
<i>AD</i>	0,100128	1	0,100128	0,77	0,3894
<i>AE</i>	0,0318781	1	0,0318781	0,24	0,6255
<i>BB</i>	0,00275761	1	0,00275761	0,02	0,8856
<i>BC</i>	0,941878	1	0,941878	7,21	0,0125
<i>BD</i>	0,0657031	1	0,0657031	0,50	0,4846
<i>BE</i>	0,00945312	1	0,00945312	0,07	0,7901
<i>CC</i>	0,0207001	1	0,0207001	0,16	0,6939
<i>CD</i>	0,116403	1	0,116403	0,89	0,3539
<i>CE</i>	0,172578	1	0,172578	1,32	0,2609
<i>DD</i>	0,0133073	1	0,0133073	0,10	0,7522
<i>DE</i>	0,100128	1	0,100128	0,77	0,3894
<i>EE</i>	0,0742386	1	0,0742386	0,57	0,4578
<i>Error total</i>	3,39727	26	0,130664		
<i>Total (corr.)</i>	43,8215	46			

Anexo 22b

$$\begin{aligned} \text{pH final} = & -2,74021 + 0,0782682*A + 0,026262*B + 1,5834*C - 35,5729*D - \\ & 0,0021686*E - 0,000496195*A^2 - 0,000128827*A*B - 0,00232639*A*C + \\ & 0,0932292*A*D - 0,00000526042*A*E + 0,0000556838*B^2 - 0,00466837*B*C + \\ & 0,0924745*B*D - 0,00000350765*B*E - 0,0407004*C^2 + 2,01042*C*D - \\ & 0,000244792*C*E + 183,561*D^2 + 0,0139844*D*E + 0,00000433561*E^2 \end{aligned}$$

**Anexo 23: Matriz de Saaty.**

<i>Parámetros</i>	<i>% Remoción</i>	<i>I.Reductores</i>	<i>I.Cenizas</i>	<i>pH</i>	<i>Max</i>	<i>v<sub>j</sub></i>
<i>% Remoción</i>	1	5	4	4	5	0,417
<i>I.Reductores</i>	0,2	1	4	2	4	0,333
<i>I.Cenizas</i>	0,25	0,25	1	0,5	1	0,083
<i>pH</i>	0,25	0,5	2	1	2	0,167
<i>Total</i>					12	