

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Facultad de Industrias Alimentarias

**Departamento Académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los
Alimentos**



Obtención de jarabe de glucosa del almidón de arroz

**(Oryza sativa) por acción de la α - amilasa y
amiloglucosidasa**

Tesis para optar el Título de

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Aurella Isabel León Arévalo

Tingo María - Perú

1997



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
TINGO MARIA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

"AÑO DE LA REFORESTACION: CIENTO MILLONES DE ARBOLES"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el Sábado 12 de Abril de 1997, a horas 5.00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentada por la Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **AURELIA ISABEL LEON AREVALO**, con el título:

"OBTENCION DE JARABE DE GLUCOSA DEL ALMIDON DE ARROZ (*Oryza sativa*) POR ACCION DE LA α - AMILASA Y AMILOGLUCOSIDASA"

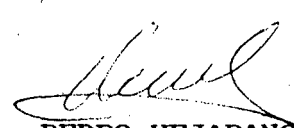
Después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las preguntas formuladas, la declaran aprobada con el Calificativo de BUENO, en consecuencia la Bachiller **AURELIA ISABEL LEON AREVALO**, queda apta para recibir el Título de INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22 de la Ley Orgánica de la Universidad Peruana 23733; con los artículos 43º y 45º del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva; con los artículos 95º y 96º del Reglamento General de la UNAS.

Tingo María, 19 de Mayo de 1997.


Ing. EDUARDO CACERES ALMENDRA
Presidente




Ing. JULIO GIRALDO HUAYTA
Vocal


Ing. PEDRO VEJARANO JARA
Vocal


Ing. ALFREDO CARMONA RUIZ
Patrocinador

DEDICATORIA

**CON ETERNA GRATITUD PARA
MIS PADRES**

A la memoria de mi Papá:
MANUEL, por su dedicación
constante y consejos para
con nosotros.

GRACIAS PAPA

Para mi querida Mamá:

ERMA que con su
paciencia y cariño
hizo de mi
una profesional.

Con aprecio a mis hermanos
Manuel, Angélica, Rosario
y **Hernán** por sus consejos
y apoyo para culminación
de mi profesión.

A mis queridos sobrinos
Piero Renato y Ana Isabel.

MI AGRADECIMIENTO

- Al Ing. ALFREDO A. CARMONA RUIZ, patrocinador de la presente tesis, por su valioso apoyo brindado para la culminación de éste trabajo.
- Al Ing. EDUARDO CACERES ALMENARA, por sus consejos para seguir y culminar satisfactoriamente.
- Al Ing. JOEL TORRES SUAREZ, por su valiosa colaboración y donación de las enzimas.
- Al Ing. M. sc. RAUL NATIVIDAD FERRER, co - patrocinador del presente trabajo.
- Al Ing. ESTEBAN HUAMAN FELIX por su conocimiento brindado en la ejecución del presente trabajo de Investigación.
- AL Ing. WILLIAMS ROLDAN CARBAJAL, por su colaboración y el acceso al Laboratorio de Ingeniería de los Alimentos.
- A JULIO VASQUEZ HORNA, por brindarme la ayuda incondicional en la culminación de mi trabajo.
- A las demás personas por el apoyo técnico y la facilidad brindada en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, Laboratorio de Nutrición y el Laboratorio de Suelos.
- A mis amigos quienes me alentaron y colaboraron desinteresadamente durante mi carrera profesional.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	01
II.	REVISION DE LITERATURA.....	03
A.	Arroz.....	03
1.	Generalidades.....	03
2.	Clasificación botánica.....	04
3.	Estructura y composición química.....	04
4.	Disponibilidad a nivel nacional.....	10
5.	Formas de usos.....	12
B.	Aspectos generales de almidón.....	14
1.	Estructura molecular.....	14
2.	Componentes de almidón.....	14
3.	Propiedades físicas y químicas.....	16
4.	Gelificación del almidón.....	17
C.	Enzimas.....	19
1.	Definición.....	19
2.	Las enzimas en los alimentos.....	19
3.	Enzimas depolimerizantes del almidón.....	24
4.	Glucosa - isomerasa.....	35
D.	Edulcorantes de almidón producidos con enzimas.....	38
1.	Definición.....	38
2.	Jarabe de glucosa.....	39
3.	Clasificación de los jarabes de glucosa.....	39
4.	Métodos de obtención.....	41
5.	Usos y aplicaciones.....	46

III.	MATERIALES Y METODOS.....	52
A.	Materiales.....	52
1.	Materia prima.....	52
2.	Insumos.....	52
3.	Equipos y materiales.....	53
4.	Reactivos.....	54
B.	Métodos de análisis.....	55
1.	Composición químico proximal de la materia prima	55
2.	Característica físico - químico.....	56
3.	Análisis microbiológico.....	56
4.	Análisis en el jarabe de glucosa.....	57
5.	Purificación del jarabe crudo y cristalización parcial de la glucosa.....	57
C.	Metodología experimental.....	58
1.	Obtención del sustrato de harina de arroz.....	58
2.	Hidrólisis enzimática del almidón de arroz y/o arroclillo y fielén.....	60
D.	Diseño experimental.....	66
E.	Diseño estadístico.....	66
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	69
A.	Análisis de la materia prima.....	69
1.	Composición químico proximal.....	69
2.	Características físico - química.....	71
3.	Análisis microbiológico.....	71
B.	Obtención de la harina de arroz (arroclillo y fielén).....	73
1.	Acoplo.....	73

2.	Molenda.....	73
3.	Temizado.....	74
4.	Pesado y empaçado.....	77
C.	Hidrólisis enzimática del almidón de arrozillo y ñelén.....	78
1.	Cinética de la hidrólisis de la harina de arroz con enzima α -amilasa y <i>B. subtilis</i> (CANALPHA 345 P) y amiloglicosidasa de <i>A. niger</i> (AMYLO 300 L).....	78
2.	Obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón de harina de arrozillo y ñelén.....	86
3.	Diagrama de flujo definitivo para la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón de harina de arrozillo y ñelén.....	108
4.	Balace de materia prima para la obtención del jarabe de glucosa.....	112
5.	Características físicoquímicas del jarabe de glucosa obtenida del almidón de harina de arrozillo y ñelén.....	112
V.	CONCLUSIONES.....	115
VI.	RECOMENDACIONES.....	117
VII.	RESUME.....	118
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	120
IX.	ANEXOS.....	125

I. INTRODUCCION

La industrialización del arroz siempre obtuvo como uno de los subproductos, el arrocillo y el ñelén, que son separados después de las operaciones de pulido y tamizado, estos subproductos no son utilizados para el consumo humano a pesar, que su composición química es la misma que la del arroz pulido, ya que son los mismos endospermas pero quebrados y se le comercializa para ser empleado sobre todo en la alimentación del ganado, en la producción de alcohol solamente es utilizado en países desarrollados y como materia prima auxiliar en la industria cervecera a una bajísima escala. Estos subproductos en una empresa de gran producción, genera volúmenes considerables que si lo cuantificamos, en unidades monetarias, van a significar grandes pérdidas de materia prima.

Como ya manifestamos, la inadecuada utilización del arrocillo y ñelén generará problemas de índole económico, dado que representa fuertes sumas de dinero en pérdidas y de índole técnico, ya que hasta la actualidad a estos subproductos no se le ha dado un mejor uso tecnológico que aumente las ganancias de la empresa.

Por otra parte, la actual industria nacional, no se abastece en forma adecuada de los requerimientos de sacarosa y de productos edulcorantes que presenta, y desde la década de los 80 se vio precisado a importar diversos niveles de estos productos para satisfacer la demanda generada.

Teniendo en cuenta esta problemática se consideró realizar el presente trabajo de investigación, planteándonos los siguientes objetivos:

- Elaborar un jarabe con alto contenido en glucosa por licuefacción y sacarificación del almidón de arrozillo y ñelén y/o mediante α - amilasa y amiloglucosidasa.
- Determinar los parámetros óptimos para la obtención de jarabe de glucosa mediante la α - amilasa y amiloglucosidasa.
- Evaluación fisicoquímica y químico proximal del jarabe de glucosa de almidón.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Arroz

1. Generalidades

El arroz es una gramínea semiacuática, que prospera bajo condiciones de suelos húmedos, no necesariamente anegados, existiendo variedades que crecen en terrenos húmedos y variedades que crecen en terrenos inundados, siendo estos últimos los de mayor importancia y mayor área de cultivo en el mundo. Es una planta de tallos redondos, huecos y con juntas, sus hojas son bastante planas y posee una panaja terminal, en donde se encuentran alojados precisamente los granos de arroz, alcanzando una altura que varía de 0,60 a 1,80 m., esto según lo reporta AID (2).

TOPOLANSKI (55) , afirma que el origen del arroz es del sudeste de Asia y que por lo general desarrolla mejor en climas tropicales.

INIPA (28), manifiesta que este cereal constituye una de las más viejas e importantes fuentes de alimentación en el mundo, siendo sobre todo en la dieta del poblador peruano uno de sus elementos básicos alcanzando un consumo per cápita de 27 kg./año y que a pesar de ello es bajo comparado con el nivel de consumo que

muestran otros países de América Latina. En Asia dicho consumo alcanza niveles de 90 a 180 Kg./año per capita.

2. Clasificación botánica

SUCCAR (54) , nos dice que el arroz se encuentra incluido en la siguiente clasificación botánica:

División	:	Tracheophyta
Sub división	:	Pterósida
Clase	:	Angiospermae
Sub clase	:	Monocotiledonea
Orden	:	Graminales
Familia	:	Graminae
Género	:	Oryza
Especie	:	<u>Oryza sativa</u>

A su vez, existen dos sub especies, la Indica y la Japónica, siendo el que más se siembra en el Perú la segunda, siendo los más empleados las variedades Nay Lamp, Radón china, Minabir N° 2 y otras variedades mejoradas del grupo Filipinas.

3. Estructura y composición química

En la Figura 1, se observa que el grano de arroz posee una cáscara exterior constituido por la lema, la palea y otras

estructuras asociadas, luego se presenta una capa de color oscuro que constituye el pericarpio del grano, con alto contenido de vitamina B₁ o tiamina. A continuación se observa un tegumento exterior y una capa de aleuronas que anteceden al endospermo blanco, el cual se constituye principalmente de gránulos de almidón cerrados en una matriz proteica y que contienen igualmente grasa, fibra cruda y materia inorgánica o cenizas. Finalmente en el lado ventral de la espiguilla junto al lema, se halla el embrión, constituido por la glúmula u hojas embrionarias y radícula o raíz embrionaria AID (2).

Al grano de arroz cáscara, se le conoce como arroz palay y mediante una operación aplicando presiones giratorias puede descascararse para obtener el llamado arroz moreno o cariósido, el que finalmente tras someterse al pulido brinda el arroz blanco.

La composición química del arroz pulido puede apreciarse en el Cuadro 1, donde se puede observar el alto contenido de carbohidratos presentes en forma de almidón y los bajos niveles de grasa, fibra y ceniza, existentes sobretudo en la capa de aleurona y germen del grano, AID (2).

El contenido húmedo del grano de pulido llega en promedio al 13 % aunque en oportunidades fluctúa pudiendo alcanzar hasta el 14 %.

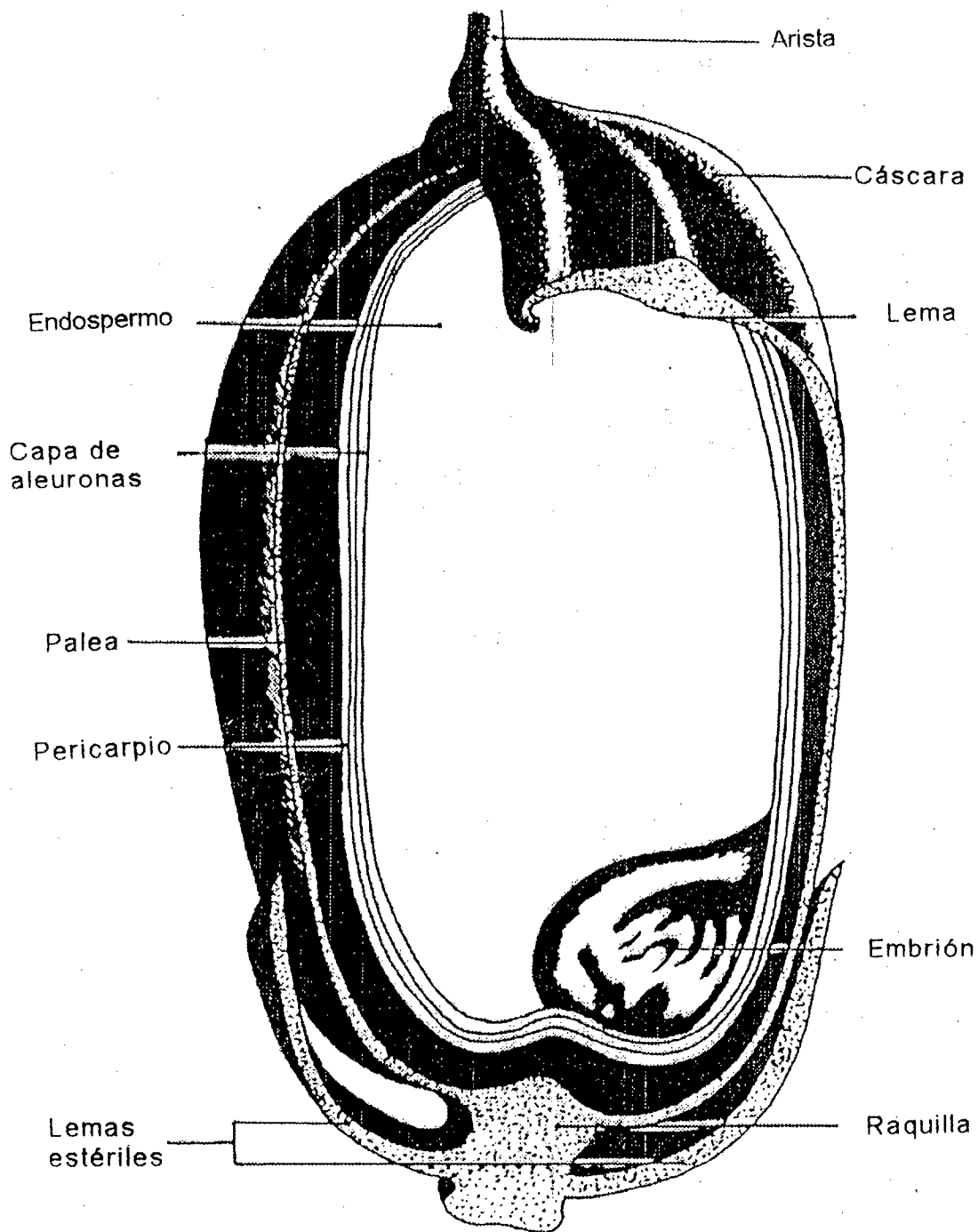


Figura 1 : ESTRUCTURA DEL GRANO DE ARROZ

FUENTE: AID (2)

Cuadro 1: Composición química proximal del Arroz pulido.

Componente	1	2	3	4	5
Humedad	13,0	13,0	11,7	12,0	12,9
Proteína	6,5	6,7	6,5	7,2	6,5
Grasa	0,7	0,7	1,0	0,6	0,5
Carbohidratos	78,7	78,9	86,8	79,7	79,5
Fibras	1,6	0,4	2,4	0,6	0,3
Ceniza	0,7	0,7	--	0,5	0,5

FUENTE:	1.	COLLAZOS	(16)
	2.	FAO-ONU	(19)
	3.	McCANCE	(41)
	4.	Instituto de Nutrición de centro América y Panamá E.I.UU	(18)
	5.	KENT	(32)

Este contenido húmedo al momento de la cosecha alcanza del 20 al 27 %, pero durante el secado previo a la molienda y pulido se ve reducido hasta alcanzar las cifras ya mencionadas. ARAULLO (4).

En el arroz el almidón se halla presente en forma granular con tamaños que varían entre 3 a 5 micras, siendo estos gránulos los más pequeños entre los diversos tipos de almidones. Tienen forma poligonal y se encuentran muchas veces aglomerados en racimos llamados "gránulos compuestos"; debido a su pequeño tamaño los rasgos característicos como núcleo, estrilaciones y líneas de luz polarizada son poco distinguibles, y dada su alta higroscópicidad (captan o ceden humedad) pueden hacer variar el contenido húmedo del grano de arroz durante su almacenaje SUCCAR (54).

Este almidón se constituye de dos fracciones de polisacáridos, una de naturaleza lineal llamada amilosa y otra de naturaleza ramificada denominada amilopectina, las cuales se hallan formadas por unidades glucosa susceptibles de despolimerizar mediante tratamientos hidrolíticos empleando ácidos, enzimas o tratamientos combinados. BRAVERMAN (10).

Asimismo, el almidón puede clasificarse como céreo o glutinoso cuando se halla formado mayormente por amilopectina con contenido menores a 12 % de amilosa; o almidón no céreo o no glutinoso cuando el contenido de amilosa en éste es mayor al 15 %. El almidón céreo da una coloración rojiza marrón con el yodo, mientras, el no céreo brinda una coloración azul púrpura dado que la amilosa con el yodo forma un complejo de color azul. ARAULLO (4).

El almidón de arroz de las variedades Indicas posee un mayor contenido de fracción lineal (amilosa) en su composición que el que muestran las variedades Japónicas, teniendo de 21 a 33 % mientras que las segundas sólo alcanzan del 17 al 19 % de amilosa. SUCCAR (54).

Las proteínas del arroz se hallan en forma de partículas en el endospermo, alcanzando entre 1 a 4 micras de tamaño. Su contenido varía según la variedad y tipo de arroz, entre el 6 al 10 % y tal como se aprecia en el Cuadro 2, están constituidas

mayormente por glutelinas, aunque también se hallan presentes albúminas, globulinas y prolaminas en menor proporción.

SUCCAR (54).

Cuadro 2: Composición proteica del arroz pulido.

PROTEÍNAS	%
Albúminas	5
Globulinas	9
Prolaminas	3
Glutelinas	83

FUENTE: CAGAMPANG, citado por SUCCAR (54).

El Cuadro 3, muestra la composición aminoácida de la proteína de arroz, donde se puede apreciar las deficiencias en triptofano y cisteína, así como el mayor contenido de aminoácidos en naturaleza acídica que los de naturaleza básica, predominando el ácido glutámico y el ácido aspártico.

Finalmente, los niveles de grasa, fibra y cenizas se hallan en la cutícula del grano y en el germen, siendo altos los niveles de fósforo, pero bajos los contenidos de calcio y fierro.

Cuadro 3: Composición aminoácidos de la proteína de arroz mg/gr. N.

AMINOACIDOS	%
Isoleucina	240
Leucina	510
Lisina	230
Metionina	130
Cisteina	100
Fenilalanina	300
Tirosina	250
Treonina	210
Triptofano	80
Valina	360
Arginina	470
Histidina	150
Alanina	360
Acido aspártico	600
Acido	1,200
Glicina	270
Prolina	2,900
Serina	290

FUENTE: Mc CANCE AND WIDDOWSONS (41).

4. Disponibilidad a nivel nacional

En el Cuadro 4 se aprecia la producción de arroz a nivel nacional; en la cual la mayor concentrada esta en la Costa, aportando casi el 70% de la producción nacional, mientras los volúmenes restantes proceden de la Selva norte, siendo sus principales zonas de producción Jaen, Bagua, Alto Mayo Y Huallega principalmente.

Cuadro 4 : Producción Nacional de Arroz 1989 - 1993

Año	Producción		
	Volumen (TM)	Rendimiento (TM/Ha)	Per cápita (Kg./Ha)
1989	1091430	5,1	51,7
1990	966101	5,2	48,8
1991	814168	5,1	37,0
1992	829373	5,0	36,9
1993	949971	5,5	42,9

FUENTE: INEI. (27)

El principal centro arrocero del país lo constituye el departamento de Lambayeque seguido por Piura, La Libertad, San Martín, Amazonas y el valle de Camaná en Arequipa.

El grano de arroz es un elemento vivo que posee respiración y que se traduce en una disminución de peso, utilización de oxígeno, liberación de CO₂ y liberación de energía en forma de calor durante el almacenaje, ARAULLO (4).

Asimismo, durante el período de postcosecha el arroz es susceptible al ataque de insectos y roedores así como a la infestación de mohos, principalmente de los géneros Mucor, Aspergillus y Penicillium que se ven favorecidos por las condiciones de temperatura y humedad relativa, las cuales aceleran su desarrollo, teniendo, la Selva Peruana condiciones propicias para que se derive dicho problema, con temperatura superior a los 25 a 30°C y HR mayor a 75%.

La acción micótica sobre el arroz se traduce en una decoloración y disminución del brillo o lustre del grano, mal olor y sabor, dificultad en la separación de la proteína y almidón en el grano molido mojado y en ciertos casos origina la producción de sustancias tóxicas denominadas micotoxinas.

Frente a estos problemas se recomienda reducir el contenido de humedad del grano de arroz cáscara o palay mediante una operación de secado, así como controlar las condiciones de los silos de almacenaje mediante una adecuada ventilación, ausencia de insectos y roedores, así como adecuados controles de HR y temperatura, FERNANDEZ (21).

Otro problema que se suscita durante el manejo postcosecha del grano de arroz es, el porcentaje de granos partidos durante el pulido y que se ve favorecido si la cosecha del grano se realiza cuando éste no posee un 20% de humedad como mínimo.

5. Formas de usos

El procesamiento de arroz en los molinos es canalizado para la obtención ya sea de arroz pulido blanco o arroz moreno, y brinda a su vez una serie de subproductos que incluyen a la pajilla, polvillo, arrocillo y fielen. SUCCAR (54).

El arroz pulido blanco es la forma más común como se consume este cereal, sometiéndose a una cocción o sancochado previo, mientras el arroz moreno pese a su alto contenido de tiamina se consume en menores proporciones, dado a que presenta un alto contenido graso, el cual es susceptible a la oxidación y enranciamiento.

La pajilla está constituida por las cáscaras del grano que provienen del proceso de molienda del mismo y se emplea para la fabricación de detergentes y como combustible en ciertos tipos de calderos; mientras el polvillo está compuesto de partículas que se originan en el proceso de blanqueado y pulido del grano y proceden por lo general de la cutícula de éstos.

El arrocillo es el producto formado por granos quebrados libres de ñelén y de polvillo. Su composición química es la misma que la del arroz pulido ya que son los mismos endospermos pero quebrados, y se emplea sobre todo para la alimentación del ganado y en la producción del alcohol etílico en países desarrollados.

Finalmente, el ñelén es el conjunto formado por los granos partidos menores a $1/4$ de su longitud normal y que atraviesan los tamices de 2 mm de apertura. Se emplea como materia prima auxiliar en la industria cervecera y también en la alimentación del ganado.

B. Aspectos generales del almidón

1. Estructura Molecular

COULTATE (17), define el almidón como un hidrato de carbono complejo compuesto de átomo de C, H y O, organizados dentro de una simple molécula de D - glucosa, enlazadas unas a otras para formar grandes polímeros según la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, en la que "n" es probablemente mayor que un millar.

2. Componentes del almidón

BRUCHMANN (11), menciona que el almidón está constituido por dos polímeros de glucosa: la amilosa lineal con uniones α - (1,4) - glucano y la amilopectina también con uniones α - (1,4) - glucano pero ramificado con enlaces α - (1,6) - glucano (ver Figura 2), pudiéndose conocer también que la amilosa está formado por moléculas de maltosa y la amilopectina por maltosa e isomaltosa.

COULTATE (17), afirma que los puntos de ramificación se dan cada 20 a 25 unidades de glucosa, dando lugar a que se dispongan radicalmente en capas concéntricas en el interior del gránulo.

Según FENNEMA (20) los almidones normales contienen alrededor de 25 % de amilosa, pero variedades seleccionadas de

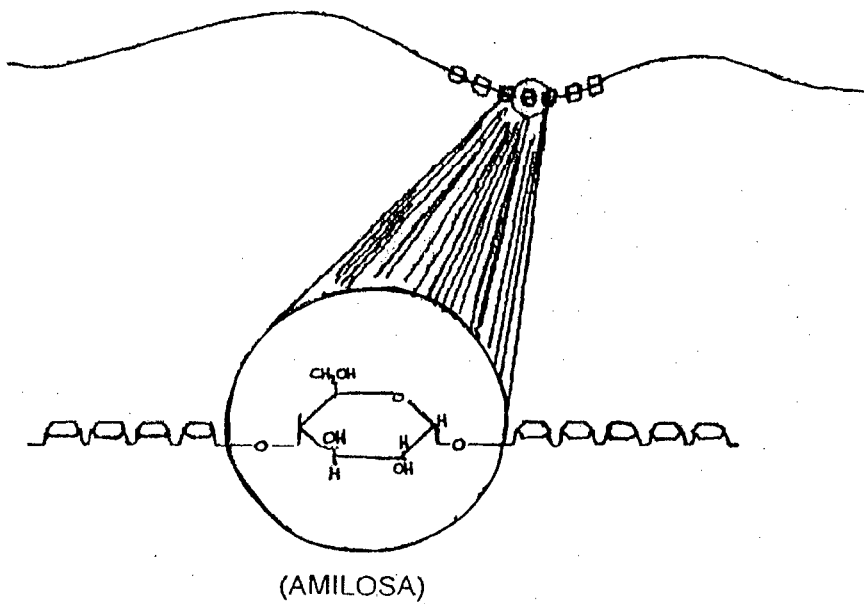
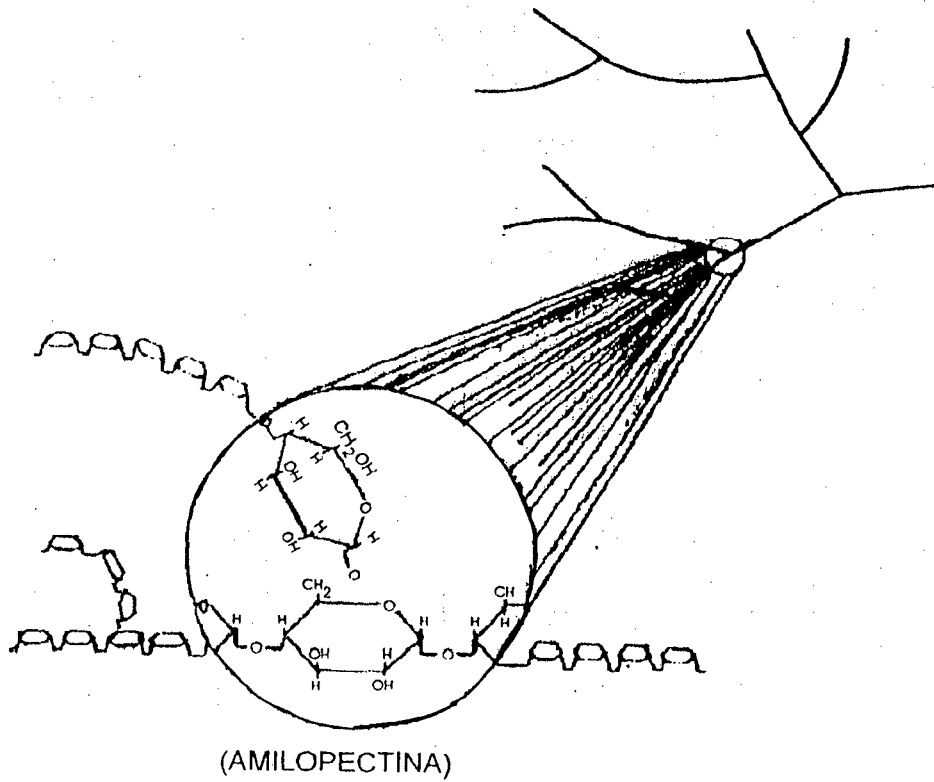


FIGURA 2. Estructura molecular del almidón en su fracción lineal y ramificada.

FUENTE: GREENWOOD CITADO POR GONZALES (25).

malz ricos en amilosa llegan a contener hasta un 85 % y son difíciles de gelatinizar algunos requieren temperaturas superiores de 100 °C, en contraste a los almidones de variedades de malz, arroz y cebada, denominados céreos o glutinosos que están constituidos exclusivamente por amilopectina.

GEORGING (23) reporta un 25 % de amilosa para la pituca, siendo similar al encontrado en el malz y los tubérculos de papa y tapioca.

3. Propiedades Físicas y Químicas

En conjunto, el almidón aparece de un color blanco, pero individualmente los gránulos son cristalinos cuyos tamaños varía según su origen de 2 a 100 micras y de forma esféricas e elipsoidal. FENNEMA (20).

COULTATE (17), menciona que las disoluciones de almidón presentan una serie de propiedades características cuando reacciona con el yodo la superficie de los gránulos se tiñe de un color oscuro.

BRUCHMANN (11), explica éste fenómeno afirmando que la estructura del almidón se dispone en forma de hélice o espiral, de modo que cada vuelta del espiral contiene de 5 a 7 unidades de glucosa, y sobre la base de ésta disposición se explica la típica

reacción coloreada con el yodo, ya que éste se coloca en el interior de la espiral, formando un compuesto fuertemente coloreado, cuya intensidad depende de la longitud de la cadena al cual es definido por el grado de polimerización (G.P.) de la molécula.

SCHOCH, citado por BRUCHMANN (11), menciona que el poder reductor de los productos de la degradación del almidón (dextrinas), va aumentando a medida que disminuye su peso molecular, mientras que la reacción con el yodo disminuye con el grado de polimerización de las dextrinas según se aprecia en el Cuadro 5.

Cuadro 5 : Relación entre el grado de polimerización del almidón y su reacción con el yodo.

MOLECULA LIMITE	GRADO DE POLIMERIZACION	COLOR
Almidón nativo	Superior a 45	Azul
Amilodextrina	35 - 40	Púrpura
Eritrodextrinas	20 - 30	Rojo
Acrodextrinas	12 - 15	Pardo
Maltodextrinas	Inferior a 12	Amarillo (1)

FUENTE: SCHOCH, citado por BRUCHMANN (11)
(1) Color original del yodo.

4. Gelificación del Almidón

Los gránulos de almidón íntegros son insolubles en agua fría, debido a la fuerza del conjunto de enlaces de hidrógeno que

mantiene unidas a las cadenas; pero, cuando la temperatura aumenta hasta el inicio de la gelificación, éstos comienzan a embeber agua logrando hincharse con una gradual pérdida de la birrefringencia y su aumento de la viscosidad. COULTATE (17).

GODFREY y REICHEL (24), afirman que la temperatura de gelatinización depende de la fuente de almidón y está directamente relacionada con la proporción de amilosa y amilopectina, como se indica en el Cuadro 6. Indica además que deben ser gelatinizados por encima de su temperatura de gelatinización para asegurar el rompimiento de los gránulos y hacerlo susceptible al ataque de las α -amilasas. Los almidones deben ser gelatinizados a temperaturas de 105° a 110 °C para su completa gelatinización.

Cuadro 6: Temperatura de gelatinización de algunos almidones de cereales y tubérculos.

ALMIDONES	TEMPERATURA DE GELATINIZACION (°C)		
	INICIO	PUNTO MEDIO	FINAL
Maíz	65	69	76
Sorgo	68	73,5	78
Cebada	51,5	57	59,5
Arroz	68	74,5	78
Centeno	57	61	70
Trigo	59,5	62,5	64
Papa	58	62	66
Yuca	64	69	80
Pituca	68	75	78

FUENTE: FENNEMA, Citado por AGUIRRE (1)

C. Enzimas

1. Definición

SCHMIDT y PENNACCHIOTTI (51) definen a las enzimas como biocatalizadores complejos de naturaleza proteica de gran especificidad y eficiencia, producidos por células de organismos vivos, y que aumentan la velocidad de las reacciones biológicas a través de vías bien definidas.

2. Las enzimas en los alimentos

Desde la antigüedad han sido utilizados en muchos procesos alimentarios en forma empírica o indirecta, mediante el empleo de microorganismos enteros o extractos de tejidos vegetales de animales.

En las últimas décadas, con el conocimiento de su naturaleza y propiedades y con la disponibilidad industrial de los mismos, se han extendido en muchos campos de aplicación como: industria alimentaria, medicina y sanidad, industria química, detergentes, tecnología del medio ambiente, e industria textil; siendo la industria alimentaria la que hoy en día constituye el campo más amplio de aplicación de procesos enzimáticos. El desarrollo de las técnicas de inmovilización potencia aún más sus aplicaciones

al reducir notablemente los costos, ya que permiten recuperarlos después de su uso. BARRUETA, LABAJOS y COCA (7).

BARRUETA, LABAJOS y COCA (7), afirma que las razones más importantes para la utilización de enzimas en los alimentos, son los efectos fisicoquímicos u organolépticos de su acción, y según la naturaleza de la enzima y el sustrato cumplen los siguientes efectos:

- Disminución de la viscosidad.
- Mejora la filtrabilidad.
- Aumento del poder edulcorante.
- Disminución de la tendencia a la cristalización.
- Clarificación y estabilización de líquidos.
- Insolubilización de macromoléculas por formación de coágulos.
- Mejora la fermentabilidad.
- Mejora la estabilidad bacteriológica.
- Corrección de las deficiencias enzimáticas de origen natural.
- Mejora la digestibilidad.
- Mejora la textura y características organolépticas.

En el Cuadro 7 se presentan algunos ejemplos de utilización de enzimas en la industria de alimentos. De manera general, el incremento de su empleo en la industria ha tenido lugar en el mejoramiento de los procesos tradicionales y en el desarrollo de

Cuadro 7: Aplicación de los enzima en la Industria de alimentos

INDUSTRIA	ENZIMAS	INCIDENCIA TECNOLÓGICA
Cervecería	Amilasas papaina	Mejoran los procesos de liquefacción y sacarificación. Evitan la turbidez durante la conservación de ciertos productos.
Vinificación	Papaina Ficaina Bromelina Glucosa - oxidasa Enzimas pécticas	Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables. Mejoran la clarificación y extracción de jugos.
Bebidas no alcohólicas	Glucosa - isomerasa Enzimas pécticas Tannasa	Utilización de jarabes con alto contenido de fructosa. Mejoran la clarificación y extracción de jugos. Aumenta la solubilidad y disminuye la turbidez del té.
Lechería	Glucosa - oxidasa Tripsina Lactasa lactosada.	Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables. Enmascara el gusto a ácido. Fabricación de leche de evita la cristalización de la leche concentrada.
Quesería	Cuajo Lactasa Lipasa	Precipitación de la caseína. Influencia el sabor de los quesos. Influencia el sabor de los quesos.
Helados	Lactasa Glucosa - isomerasa	Evita la cristalización. Permite la utilización de jarabes de alta concentración de fructosa.
Industrias	Papaina, Ficaina, Bromelina.	Ablandamiento de la carne. Producción de hidrolizados.
Panificación	Amilasa Lactasa Proteasa	Mejora la calidad del pan. Mejora coloración de la superficie, debido a la reacción de Maillard. Disminuye la viscosidad de la pasta.
Confitería	Lipoxidasa Amilasas, Pululanasa, Isomilasas, Invertasa y Glucosa - isomerasa	Produce una miga muy blanca. Hidrólisis del almidón y productos de jarabes con alto contenido de fructosa.
Ind. Azucarera	Lipasa α - galactosidasa	Acentúa el sabor en chocolate. Hidroliza la rafinosa y permite la cristalización normal del azúcar.

FUENTE: THONART *et al*, citado por CAMPOS D. (12).

caminos totalmente nuevos, basados en sus propiedades GACESA y HUBBLE (22).

GODFREY and REICHELT (24), reportan que más del 80 % de las enzimas industriales son de acción hidrolítica, y son usadas para la despolimerización de sustancias naturales; y dentro de éste grupo, cerca del 60 % son de acción proteolítica, 30 % de carbohidrasas, 3 % lipasas y el resto otras enzimas.

SCHMIDT y PENNACCHIOTTI (51), mencionan las principales enzimas industriales de uso alimentario según su origen, agrupando a las producidas de plantas tales como proteasas de papaina (papaya), bromelina (piña), ficina (higo), las amilolíticas de cereales, la lipasa y pectino - esterasa de soya y frutas cítricas. Las enzimas producidas de animales, incluyen a las tripsinas, renina y lipasas pancreática; siendo las de origen microbiano la fuente más potencial de enzimas industriales, y que agrupan a muchas amilasas producidos a partir del cultivo de microorganismos seleccionados.

HOLLAND et al, citado por GACESA y HUBBLE (22), comentan que los microorganismos producen una enorme gama de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son segregadas al exterior de la célula y presentan las ventajas de que no requieren de técnicas de ruptura celular, son de estructura más compacta y

menos susceptibles a la desnaturalización que las correspondientes intracelulares.

GODFREY y REICHEL (24), mencionan que las enzimas destinadas a la elaboración de alimentos deben cumplir con las exigencias de inocuidad y pureza de los aditivos alimentarios indicado por la FAO/OMS; como ausencia de microorganismos patógenos, metales tóxicos y restos de reactivos de aislamiento y purificación, su típica composición se presenta en el Cuadro 8.

Cuadro 8: Composición típica de las enzimas industriales.

CONSTITUYENTES	POLVO % (W/W)	LIQUIDAS % (V/W)
Proteína inactiva	1 - 5	2 - 5
Enzima - activa	1 - 8 ⁽¹⁾	0.5 - 5 ⁽³⁾
Diluyentes	Superior a 90 ⁽²⁾	-----
Preservativos	---	0.2 - 1 ⁽⁴⁾
Colorantes	---	0.05 - 0.1 ⁽⁵⁾
Electrolitos	2 - 5	16 - 18 ⁽⁶⁾
Agua	3 - 5	Superior a 90

FUENTE:	GODFREY y REICHEL (24).
(1)	Indica la alta potencia de las enzimas en polvo sobre las líquidas.
(2)	Almidón de maíz, lactosa, dextrinas, cloruro de sodio y potasio.
(3)	Proteína activa de la enzima.
(4)	Acido benzoico y sus ésteres.
(5)	Color caramelo o annato.
(6)	16 - 18 % de NaCl en el cuajo.

REED (48), menciona que los polvos secos concentrados de enzimas pueden ocasionalmente producir alergias por inhalación y no se consumen en su forma activa; aunque SCHMIDT y PENNACCHIOTTI (51) afirman que existen excepciones como la parcial supervivencia de proteasa bacteriana en alimentos

horneados o la parcial supervivencia de papaína en cerveza. No obstante, la mayoría se inactivan durante los procesos tecnológicos y la cantidad presente en alimentos es muy pequeña.

3. Enzimas depolimerizantes del Almidón

Alfa - amilasa

La α - amilasa, cuyo nombre sistemático α - (1,4) - glucano - 4 - glucanohidrolasa (E.C.3.2.1.1) cataliza la hidrólisis de las cadenas lineal y ramificada encontrados en el almidón, rompiendo los enlaces α - (1,4) interiores para formar una mezcla de dextrinas (amilodextrina, eritrodextrina, acrodextrina y maltodextrina) con poca producción de maltosa, por el cual se conoce también como enzima "dextrigénica". SCHMIDT y PENNACCHIOTTI (51); KULP (34).

Mecanismo de acción de la α - amilasa

BRUCHMANN (11), afirma que el mecanismo de acción de la α - amilasa se hace aleatoriamente en forma no selectiva desde el interior de la molécula, y simultáneamente sobre varios puntos de la cadena. Aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5 a 7 unidades de glucosa o número múltiplo, esto representa un ataque preferentemente sobre

cada paso de la hélice o múltiplo de la cadena espiral de la amilosa y amilopectina, de acuerdo a la Figura 3.

KULP (34), afirma que inicialmente se presenta una rápida degradación de amilosa en maltosa y maltotriosa, cuya α -amilólisis implica una rápida disminución de la viscosidad; luego, la acción se hace mucho más lenta que la anterior, involucrando una hidrólisis no aleatoria de los oligosacáridos con formación de glucosa y maltosa como productos finales. BRUCHMANN (11), menciona que por acción de la α -amilasa sobre la amilosa se obtienen teóricamente 87% de maltosa y 13% de glucosa; mientras que con la amilopectina se logra 73% de maltosa y 19% de glucosa y 8% de isomaltosa.

Actividad de las α -amilasas

KULP (34), menciona que la actividad de las α -amilasas es usualmente determinado midiendo la degradación del sustrato (almidón o dextrina), con una concentración suficientemente alta para saturar la enzima. La desaparición del sustrato puede ser estimado por su habilidad de reducir la coloración del yodo (SANDSTEDT, KNEEN y BLISH, citado por KULP (34)); por la disminución de la viscosidad del sustrato (GREENWOOD, citado por ROBYT (49)); por la desaparición del sustrato o cantidad de producto formado por unidad de tiempo, y por disminución de la densidad óptica (GODFREY y REICHEL (24)).

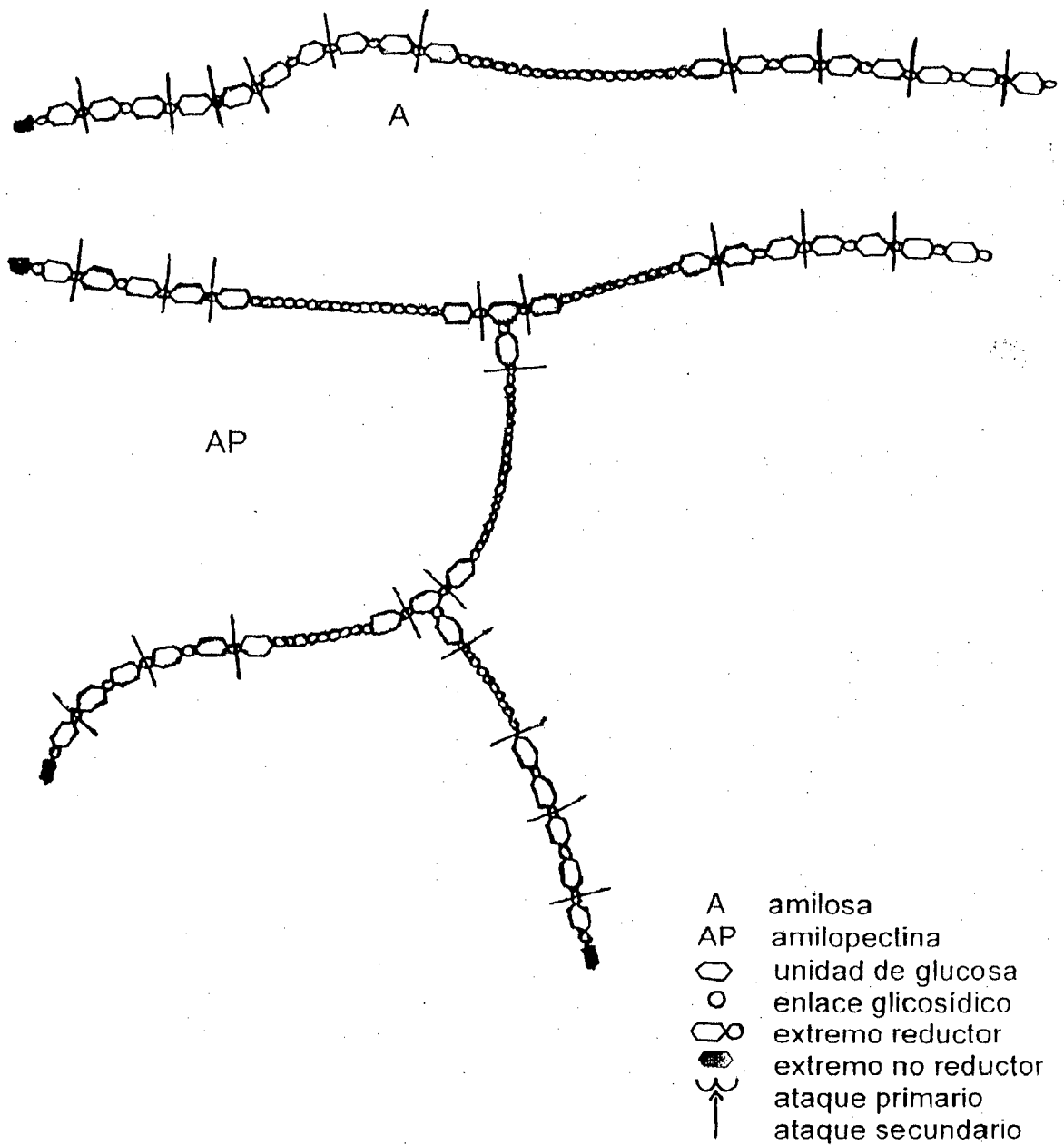


FIGURA 3. Mecanismo de acción de la α - amilasa durante la hidrólisis de la amilosa y amilopectina.
 FUENTE: BRUCHMANN (11)

Todas las α - amilasas investigadas son hasta ahora son metaloenzimas de calcio. Los iones de calcio aparentemente están quelados por varios grupos sobre la enzima y contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria contra efectos extremos de pH y temperatura. En adición al calcio, las α - amilasas de mamíferos, pancreática y salival, requieren también de iones de cloro para su máxima estabilidad. ROBYT (49).

BARRET (6) y BRUCHMANN (11), coinciden en remarcar que existen diferencias de actividad entre las α - amilasas de distinto origen en cuanto a su estabilidad térmica frente al calor, tal como se aprecia en la Figura 4. Indican que a 80°C la de origen fúngico conserva únicamente el 1% de su actividad primitiva; la de malta el 25%; la bacteriana convencional (Bacillus subtilis) después del mismo tratamiento presenta del 80 al 92% de actividad residual. GODFREY y REICHEL (24) indica que en los últimos tiempos la Novo ha desarrollado la bacteriana termoestable (Bacillus licheniformes) que es 100% estable por encima de 90°C. Siendo por lo tanto ventajosas las α - amilasas microbianas cuando la degradación de almidón se realizan a altas temperaturas para liberarlo de gérmenes patógenos.

Según los reportes técnicos de NOVO (44), la estabilidad frente a la temperatura se puede corregir fácilmente con cambios de la sustancia seca, pH y iones de calcio, pero depende sobre todo de la fuente de α - amilasa.

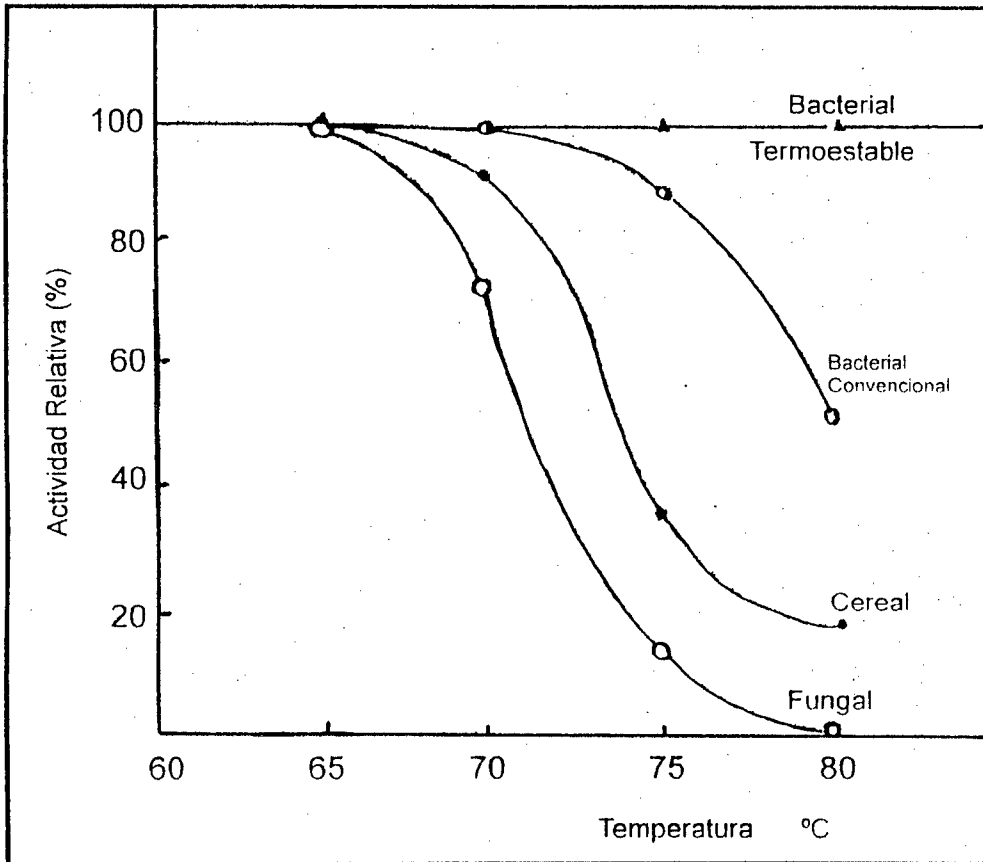


FIGURA 4. Estabilidad Térmica de las α - amilasas de distinto origen.

FUENTE: BARRET (6)

WITAKER, citado por KULP (34) menciona un peso molecular de 50,000 para la α -amilasa y cada molécula contiene un átomo de Ca^{2+} . Aunque el calcio no participa directamente en la formación del complejo enzima sustrato, sin embargo, mantiene a la molécula en óptima conformación para su máxima actividad y estabilidad frente a los pH y temperaturas extremos.

BRUCHMANN (11) menciona que las trazas de calcio presentes en el almidón son generalmente suficientes para compensar las enzimas libres de calcio, aunque por regla general su adición es recomendable para proteger de la desnaturalización por pH y temperatura.

GODFREY y REICHEL (24) afirma que es preferible añadir calcio en las concentraciones reportadas por sus fabricantes, y mencionan que las máximas actividades de las amilasas se encuentran en la región ligeramente ácida entre 4.5 a 7.0 según muestra el Cuadro 9; y las curvas de actividad difieren con la fuente de enzima.

Cuadro 9: Características típicas de operación de las α - amilasas de distinto origen

α - amilasa	Temp. (°C)	pH	Activadores
Malla	55 - 65	4,5 - 5,5	calcio
Páncreas	40 - 55	6,5 - 7,0	-----
Fungal	50 - 55	4,5 - 5,5	calcio
Bacterial (1)	60 - 75	5,5 - 7,0	calcio
Bacterial (2)	85 - 110	5,0 - 7,5	calcio

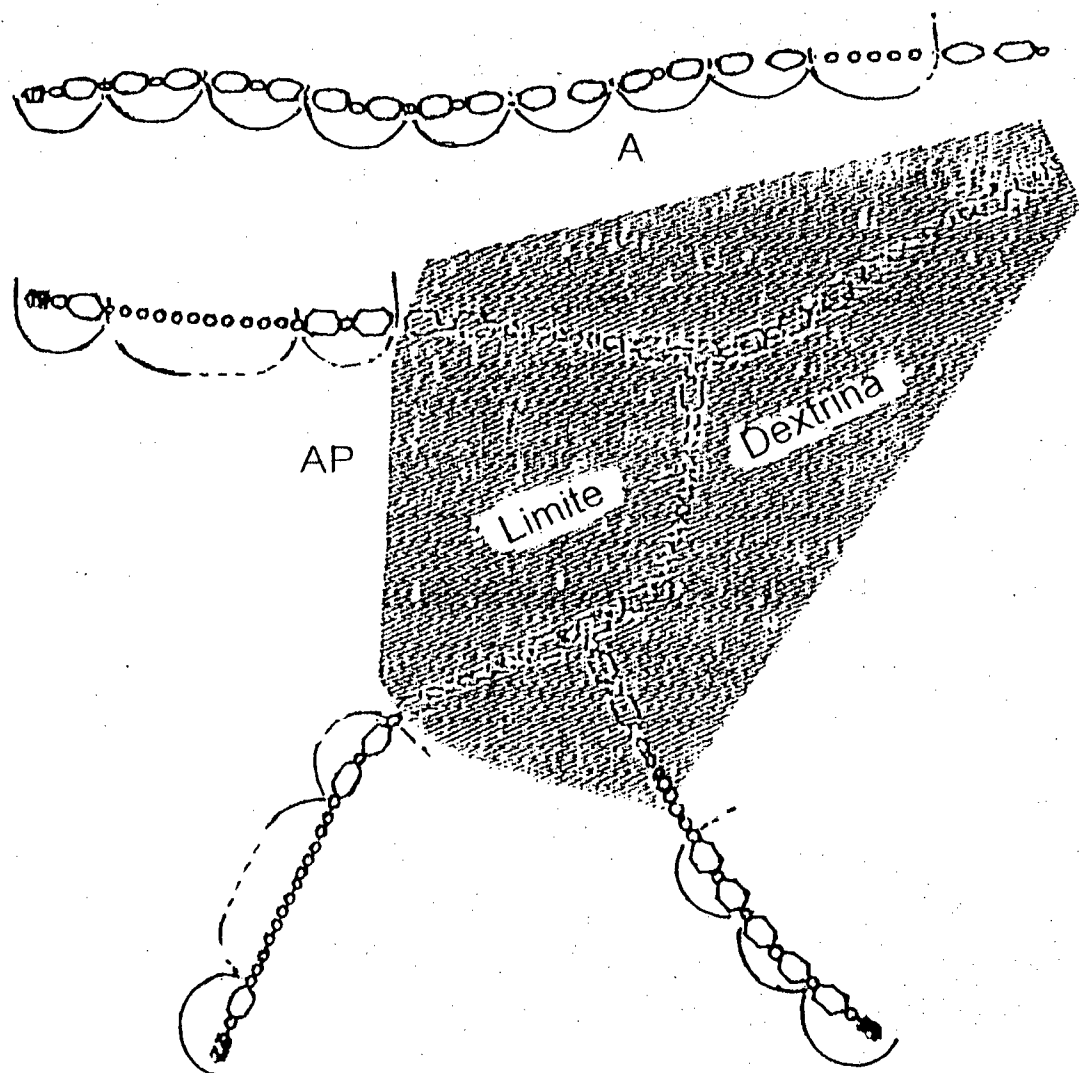
FUENTE :GODFREY y REICHELT (24)
 (1) B. subtilis
 (2) B. licheniformes

Beta Amilasa

La β - amilasa α - (1,4) - glucano - maltohidrolasa (E.C.3.2.1.2), cadena, por que se le conoce también como amilasa "sacarógena" BRUCHMANN (11).

Este agente catalítico trata de una exo - amilasa que actúa sobre el terminal de la molécula; mientras la amilosa es teóricamente transformada en un 100% de maltoosa, la amilopectina se conserva en un 40-45% sin hidrolizar, cuya porción toma el nombre de "dextrina límite", (ver Figura 5) que se originan al interrumpirse la actividad varias unidades de glucosa antes de llegar a los puntos de ramificación, inhibiendo competitivamente a la enzima; siendo la maltotriosa la molécula atacada con mayor facilidad. BRUCHMANN (11).

La β - amilasa se encuentra exclusivamente en plantas superiores. Además de la cebada, existe en abundancia en el



- A amilosa
- AP amilopectina
- ⬡ unidad de glucosa
- enlace glicosídico
- ⬡○ extremo reductor
- extremo no reductor
- ⌋ ataque de la β -amilasa

FIGURA 5. Mecanismo de acción de la β - amilasa durante la hidrólisis de la amilosa y amilopectina
 FUENTE: BRUCHMANN (11)

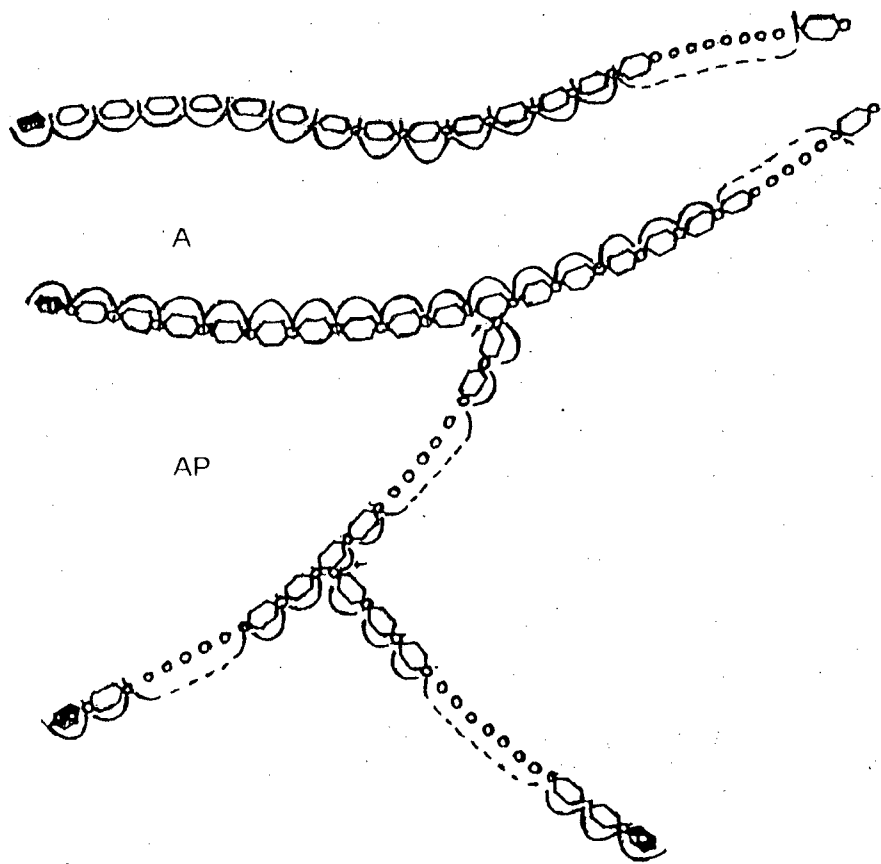
centeno, trigo, camote y semillas de soya. El peso molecular de la β - amilasa de camote se encuentra en el orden de 152,000, y cada molécula puede hidrolizar hasta 252,000 enlaces por minuto a 30°C y pH 4,8. KULP (34).

Amiloglucosidasa

Es una amilasa conocida también como glucoamilasa [α - (1,4) - glucano - hidrolasa E.C.3.2.1.3] que hidroliza los enlaces glucosídicos α - (1,4) y α - (1,6) separando unidades de glucosa consecutivamente a partir del extremo no reductor de las cadenas de amilosa y amilopectina, según muestra la Figura 6; y no presenta inhibición por dextrinas.

BRUCHMANN (11). La velocidad de hidrólisis de la enzima depende de la estructura y tamaño molecular del sustrato y tiene la capacidad de atacar también a los enlaces α - (1,3) encontrados en otros homopolisacáridos como dextrano, laminarano y arabanos. Presenta un peso molecular de 58,000 y es obtenida a partir de mohos de Aspergillus niger y Aspergillus oryzae, KULP (34).

WHISTLER (58) afirma que la velocidad de hidrólisis de los enlaces α - (1,6) es de aproximadamente 3-5% de los enlaces α - (1,4); mientras que la velocidad de hidrólisis de los enlaces α -



- A amilosa
- AP amilopectina
- ◻ unidad de glucosa
- enlace glucosídico
- ◻◻ extremo reductor
- ◻◻◻ extremo no reductor
- ⌋ ataque de la glucoamilasa

Figura 6. Mecanismo de Acción de la amiloglucosidasa durante la hidrólisis de la amilosa y amilopectina.
 FUENTE: BRUCHMANN (11)

(1,3) es de 5-10% que para los α - (1,4). KULP (34) afirma lo mismo en términos de velocidad relativa, y expresa también en miligramos de glucosa por unidad de enzima y tiempo de conservación según muestra el Cuadro 10. La Glucoamilasa se utiliza en forma libre o inmovilizada en el proceso de sacarificación enzimática para obtener jarabes de glucosa y dextrosa a partir de almidón licuado, y puede ser inactivada según MILES (42) a intervalos de pH y temperatura variables como ilustra el Cuadro 11. En el campo analítico tiene aplicación en la determinación cuantitativa de almidón y poliglucósidos de los alimentos.

Cuadro 10: Velocidad de hidrólisis de disacáridos con amiloglicosidasa de Aspergillus niger

Disacárido	α - enlace	Velocidad de hidrólisis(1)	Velocidad relativa(2)
Maltosa	α - (1,4)	2.3×10^{-1}	100,0
Nigerosa	α - (1,3)	2.3×10^{-2}	6,6
Isomaltosa	α - (1,6)	$0,8 \times 10^{-2}$	3,6

FUENTE : KULP (34)
 (1)En mg de glucosa/unidad de enzima/hr.
 (2)En porcentaje de actividad.

Cuadro 11: Efecto del pH y la temperatura durante la inactivación de la amiloglicosidasa

Temperatura °C	pH	Inactivación (min.)
100	0 - 14	2 - 3
95	4 - 5	10
90	4 - 5	30
85	4 - 5	60
80	4 - 5	120
71	3	180

FUENTE : MILES (42)

Otras enzimas amilolíticas

KAINUMA (31) reporta la existencia de otras amilasas específicas para producir oligosacáridos lineales, ramificados y cíclicos con grado de polimerización de 2 a 6. Entre ellas se menciona a la pululanasa que hidroliza el polisacárido lineal pululano (polímero de α -maltotriosa unido por enlaces α -(1,6) de la amilopectina, al que descompone en maltosa y maltotriosa.

GACESA y HUBBLE (22) definen la pululanasa como una α -dextrin - endo 1,6-glucohidrolasa (E.C.3.2.1.41). NOVO (44) menciona a la pululanasa de Bacilos acidopullulyticus (PROMOZYME), que se utiliza en combinación con la amiloglucosidasa para la fabricación de jarabe con alto contenido de dextrosa y con enzimas mallogénicas para producir jarabe con alto contenido de maltosa.

4. Glucosa - Isomerasa

La glucosa - isomerasa es una enzima intracelular clasificada como E.C.5.3.1.5, que cataliza la isomerización de la glucosa en fructosa en una reacción reversible. Por su naturaleza intracelular presenta un alto costo de producción por lo que comercialmente se presenta en forma inmovilizada para ser reutilizable en procesos de isomerización continua o discontinua, GÓDFREY y REICHELT (24).

FENNEMA (20) menciona que, normalmente las enzimas añadidas en forma libre son inactivadas por calentamiento una vez concluido el tratamiento del alimento, como ocurre con la hidrólisis del almidón. No obstante, los recientes avances de la tecnología han conducido a la preparación de enzimas o células inmovilizadas que pueden ser usados repetidamente en los procesos continuo y discontinuo. Esto implica que la célula o enzima se encuentra física y químicamente restringida en sus movimientos, de tal modo que pueden ser físicamente recuperados del medio de reacción.

CARASIK y CARROLL (14), menciona que la mayor aplicación de la tecnología de enzimas inmovilizadas ha sido para la producción de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, y la primera glucosa - isomerasa comercial fue introducida por el año 1973 y vendida con el nombre de SWEETZYME R, cuya presentación fue un polvo soluble de alto costo de producción y comercialmente usado para periodos de tiempos cortos. En 1974 recién es introducido el primer inmovilizado de esta enzima dando ventajas para trabajar en continuo. A la fecha se han desarrollado varios tipos de glucosa - isomerasa inmovilizadas y las etapas de producción se presenta en la Figura 7.

La glucosa - isomerasa tipo A, utiliza como agente de inmovilización glutaraldehido. En la etapa inicial la proteína

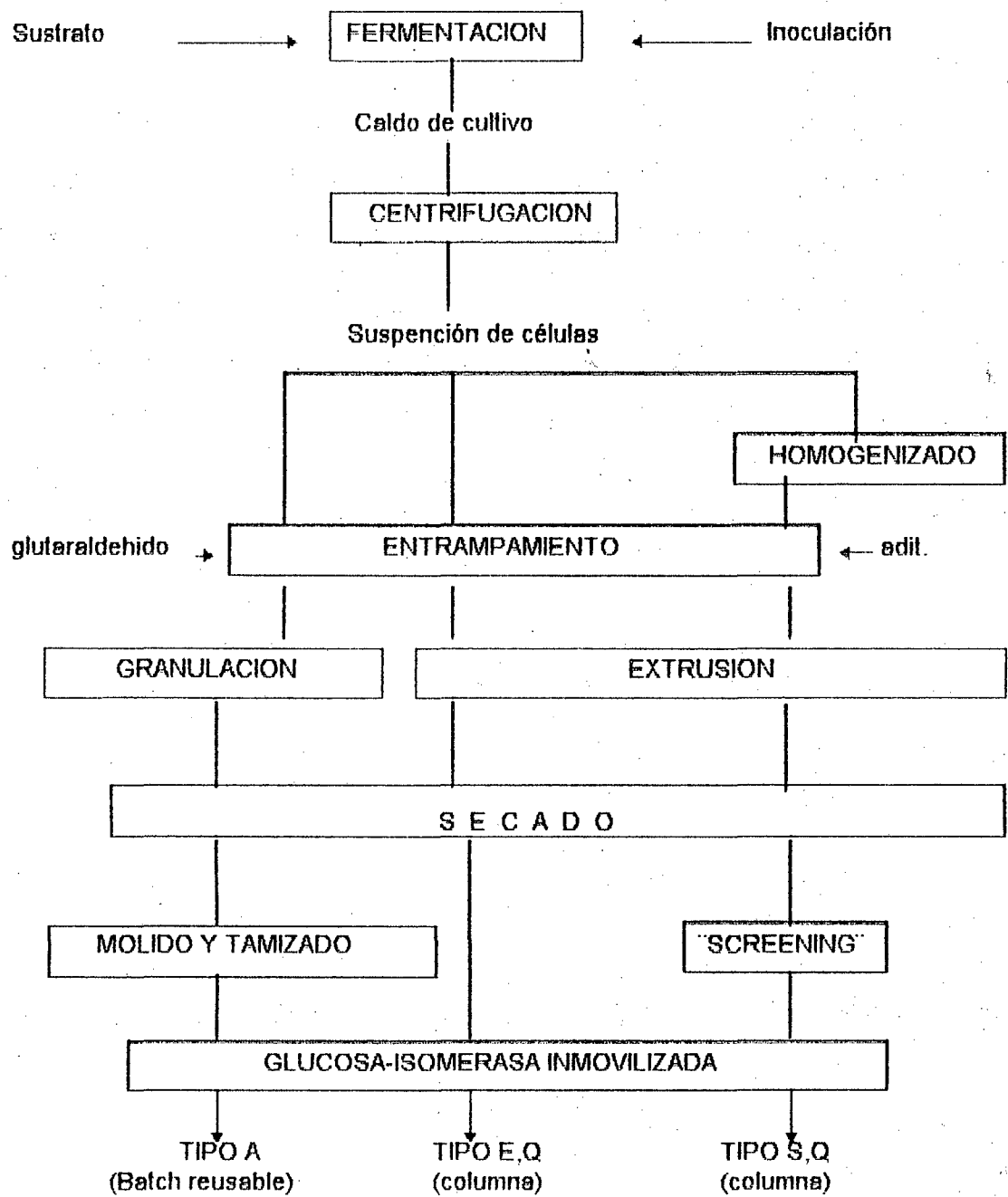
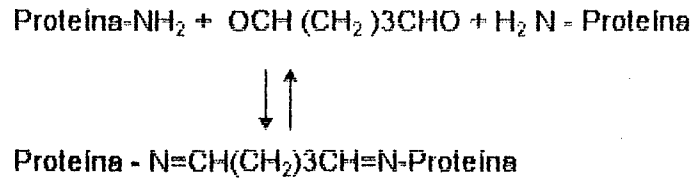


Figura 7: Etapas para la producción de tipos de glucosa - isomerasa inmovilizada para diferentes tipos de reactores

Fuente: CARASIK y CARROLL (14)

interactúa con el agente inmovilizante por formación de una base de Schiff como se describe continuación:



El producto inicial del entrecruzamiento es una masa gelatinosa de color claro que oscurece durante el secado a café o castaño oscuro. El producto final es sometido a molienda y tamizado hasta un tamaño de partícula de 100 - 350 micras, habiéndose sido desarrollado exclusivamente para ser rehusado en reactores de tanque (en batch o continuo) con agitación y en un tiempo de 20-40 horas, NOVO (44).

D. Edulcorantes de Almidón producidos con enzimas

1. Definición

WITTIG Y WEINACKER (57), afirma que los agentes que proporcionan el gusto se denomina genéricamente "edulcorantes", habiéndose hecho diferentes intentos de clasificar según su origen en naturales y sintéticos, según su estructura en carbohidratos y no carbohidratos, en nutritivos y no nutritivos, en potenciales y comerciales, y en edulcorantes de alto poder endulzante. Definen además que los edulcorantes derivados de

carbohidratos son los jarabes de maíz de 42 y 64 dextrosa equivalente (DE), y los de alto contenido en glucosa y fructosa con 95 - 97 DE, agrupándose también a la miel, la isoglucosa y el azúcar invertido.

Según SCHWARTZ (52), la industria alimentaria consume diferentes tipos de edulcorantes, entre ellos, los más importantes son los azúcares. Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los que son de consumo humano directo, obtenidos de la remolacha o caña de azúcar; y los que son estrictamente de uso industrial, provenientes del maíz, y otras amiláceas.

2. Jarabe de glucosa

SCHWARTZ (52) menciona que los jarabes de maíz o de glucosa (en inglés con syrups o starch syrups) son soluciones concentradas de almidón parcialmente hidrolizado que contienen dextrosa maltosa y sacáridos de alto peso molecular. Generalmente se comercializan en forma líquida, con distinta viscosidad, dulzor, higroscopicidad y fermentabilidad.

3. Clasificación de los jarabes de glucosa

LLOYD y NELSON (37) y SCHWARTZ (52) clasifican los jarabes de glucosa en base al contenido de azúcares reductores expresado como Dextrosa Equivalente (D.E) en cuatro tipos,

según se aprecia en el Cuadro 12. La Dextrosa Equivalente será mayor cuando el almidón haya sufrido una mayor despolimerización (ruptura de las cadenas de amilosa y amilopectina). Es decir, el almidón nativo tiene una D.E igual a cero, mientras que la D.E de la glucosa anhidra está definida como valor 100. Dentro de las clasificación se tienen:

Jarabes de glucosa Tipo I, que consisten principalmente de ramificaciones de alto peso molecular y dextrinas lineales.

Jarabes de glucosa Tipo II, que consta de 50-75% de sacáridos de bajo peso molecular, incluyendo D - glucosa, maltosa y maltotriosa.

Jarabes de glucosa Tipo III, algunas veces definidos como jarabes de glucosa de alta conversión o altamente fermentables y contienen de 75-85% de D - glucosa, maltosa y maltotriosa.

Jarabes de glucosa Tipo IV, son los jarabes de glucosa pura convencional y consisten principalmente de D - glucosa.

Por otro lado se tienen a los hidrolizados de almidón cuya DE se encuentra entre los valores de 13-20 llamados Maltodextrinas y por debajo de 13 son comúnmente conocidos como Dextrinas.

Cuadro 12: Clasificación de los jarabes de glucosa

Tipo de Jarabe	Dextrosa Equivalente (DE)
Dextrinas	inferior a 13
Maltodextrinas	13 - 20
Jarabes de Glucosa:	
Jarabe Tipo I	20 - 38
Jarabe Tipo II	38 - 55
Jarabe Tipo III	55 - 73
Jarabe Tipo IV	73 - 99,4
Dextrosa	Superior a 99,4

FUENTE : SCHWARTZ (52)

Con respecto a la Dextrosa, la comisión del CODEX ALIMENTARIUS (15), hace una distinción en base al contenido de sólidos y menciona a los siguientes productos:

Dextrosa anhidra; viene a ser la D - glucosa purificada y cristalizada sin agua de cristalización y con un 98% de sólido.

Dextrosa monohidrato; es el mismo producto anterior pero con una molécula de agua de cristalización al 90% de sólidos.

Dextros en polvo (glasé); viene a ser la dextrosa anhidra o dextrosa monohidrato finamente pulverizado con o sin adición de agentes antiaglutinantes.

4. Métodos de obtención

GRACE (26) menciona que los jarabes de glucosa son también identificados por el método de hidrólisis utilizado en su preparación, pudiendo ser:

Por conversión ácida, que es el método convencional directo y simple.

Por conversión mixta ácido - enzimática, que consiste de una hidrólisis ácida parcial, seguido de una conversión enzimática.

Por conversión exclusivamente enzimática con α - amilasa y glucoamilasa o método enzima - enzima.

En la Figura 8, se esquematiza los diferentes etapas utilizadas para la producción de edulcorantes de almidón de baja y alta conversión.

MERMELSTEIN (40) y GRACE (26) mencionan las desventajas de la hidrólisis ácida debido a los siguientes defectos:

- Bajos rendimientos de glucosa, lográndose únicamente jarabes de baja conversión.
- Costos de purificación elevados por efecto del ácido y agentes neutralizantes.
- Riesgo de corrosión de los sistemas usados por efecto de los ácidos fuertes.
- Peligro de recondensación de la glucosa para formar polímeros y productos coloreados.

Sin embargo, estos defectos pueden ser reducidos completamente cuando la hidrólisis se efectúa mediante el proceso biocatalítico enzima - enzima con α - amilasa y

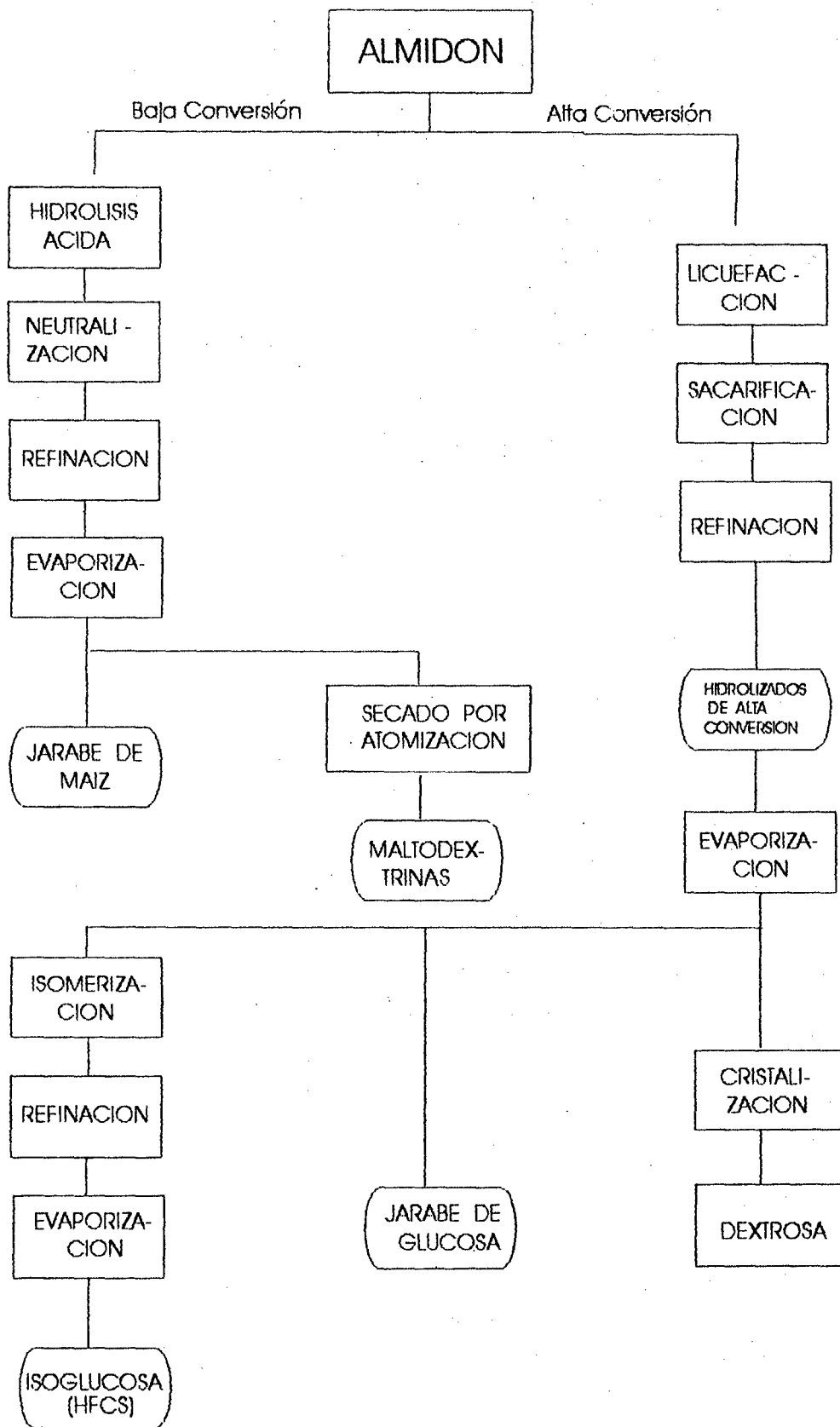


FIGURA 8 : Esquema para la producción de edulcorantes de almidón de baja y alta conversión.
 FUENTE : GRACE (26)

amiloglucosidasa, lográndose valores en D.E superiores a 96, lo que implica un aumento considerable en los rendimientos en dextrosa o conversión casi completa del almidón. Esto ha sido demostrado en las investigaciones realizados por LAGES Y TANNENBAUM (35), y por PARK y PAPINI (45) en la producción de glucosa a partir de almidón de yuca, así como en los estudios realizados por BERGHOFER y SARHADDAR (9); y por KHALID y MARKAKIS (33) al obtener jarabe de glucosa con alto contenido en fructosa utilizando la misma materia prima.

GODFREY y REICHELT (24) y BADUI (5) describen el proceso de conversión enzimática del almidón para obtener jarabes con un contenido de 97-98% de glucosa y que son utilizados luego para su isomerización parcial en jarabe de fructosa. El proceso consta de tres etapas:

Etapas licuefacción

La suspensión de almidón es hidrolizado mediante α -amilasa bacteriana termoestable (*B. licheniformes*) ó bacteriana termolábil (*B. subtilis*), añadiendo al mismo tiempo sales de calcio. Estas enzimas descomponen el almidón gelatinizado en dextrinas y sacáridos de distinto grado de polimerización, dando como resultado una disminución rápida de la viscosidad en un tiempo que fluctúa de 1 a 2 horas, hasta alcanzar la DE deseada.

Etapa sacarificación

El almidón licuado que contiene dextrinas y otros sacáridos son descompuestos en glucosa, mallosa y oligosacáridos más pequeños mediante la enzima amiloglicosidasa en un tiempo que fluctúa entre 24 a 96 horas, y según la DE deseada se obtienen jarabes de distinta composición y usos como los mostrados en los Cuadro 13 y 14; incluidos la isoglucosa después de isomerización.

Cuadro 13: Composición típica en sacáridos de los jarabes de glucosa de conversión variable

Tipo de	DE ⁽¹⁾	Oligosacáridos (%)						
		Mono	DI	Tri	Tetra	Penta	Hexa	Sup.
Acida	27	9	9	8	7	7	6	54
Acida	36	14	12	10	9	8	7	40
Acida	42	20	14	12	9	8	7	30
Acida	55	31	18	12	10	7	5	17
Ac - Enz.	43 ⁽²⁾	8	40	15	7	2	2	26
Ac - Enz.	49 ⁽²⁾	9	52	15	1	2	2	19
Ac - Enz.	65	39	31	7	5	4	3	11
Ac - Enz.	70	47	27	5	5	4	3	9
Ac - Enz.	95	93	3	1	1	-	-	2

FUENTE : LLOYD y NELSON (37)
 (1) Dextrosa equivalente
 (2) Jarabes con alto contenido de mallosa

Cuadro 14: Composición de los jarabes de almidón de alta conversión enzimática

Contenido (%)	Tipo de Jarabe				
	Glucosa	Maltosa	Maltosa ⁽¹⁾	Alta conv.	Isoglucosa
D.E	96-98	40-45	48-55	56-58	98
Glucosa	95-97	16-20	2-9	22-35	52
Maltosa	1-2	41-44	48-55	40-48	--
Fructosa	--	--	--	--	42
Isomaltosa	0,5-2	--	--	--	--
Maltotriosa	--	--	15-16	--	--

FUENTE :GODFREY y REICHEL (24)

(1) Jarabe con alto contenido de maltosa

Etapa de Isomerización

Esta etapa no forma parte del proceso de obtención del jarabe de glucosa, sino una aplicación de la misma para su transformación en jarabe de fructosa de mayor poder edulcorante, mediante la enzima glucosa - isomerasa inmovilizada.

5. Usos y Aplicaciones

Dependiendo del grado de conversión enzimática y de las propiedades funcionales que cumplan en particular, los jarabes de glucosa tienen diferentes aplicaciones en la industria de alimentos. Sus propiedades higroscópicas y humectantes son de gran importancia en numerosos productos, existiendo una estrecha relación entre una mayor dextrosa equivalente y la capacidad de absorber humedad del aire.

En cuanto al dulzor de los jarabes. LLOYD y NELSON (37) indica que éste aumenta con la D.E cada vez más altos, lo que se explica por el contenido cada vez mayor de glucosa, que naturalmente es más dulce que el almidón o fracciones de éste, según muestra el cuadro siguiente:

Cuadro 15: Dulzura relativa de los jarabes de maíz⁽¹⁾

Edulcorante	DE	Dulzura relativa
Jarabe de maíz	36	35 - 40
Jarabe de maíz	42	45 - 40
Jarabe de maíz	54	50 - 55
Jarabe de maíz	62	60 - 70
Dextrosa ⁽²⁾		70 - 80
Sacarosa		100

FUENTE : LLOYD y NELSON (37)

(1) Otra forma de nombrar a los jarabes de glucosa

(2) Jarabe de glucosa cristalizado

NOVO (44) afirma que los jarabes de glucosa y su forma cristalina (dextrosa) por su propiedades y aplicaciones comunes compiten con la sacarosa, como sustituto parcial o completo en productos alimenticios como los presentados en el Cuadro 16.

Otras aplicaciones de la glucosa se da en la industria farmacéutica, en la fabricación biotecnológica de ácido cítrico, láctico, enzimas, aminoácidos, etanol, y en otros procesos para obtener sorbitol y polidextrosa, GRACE (26).

Cuadro 16: Aplicación de los hidrolizados de almidón de alta conversión enzimática

Aplicación	Producto de Almidón	Funciones
Confitería y Pastelería	Jarabe con alto poder de conversión.	Hace posible alcanzar alto niveles de sustitución de la sacarosa. Productos finales menos higroscópicos. Mejora el nivel de viscosidad.
	Jarabe con alto contenido de maltosa.	Control de humedad y textura en pastelería.
Bebidas refresco	Jarabe con alto contenido de fructosa.	Valor edulcorante similar a la sacarosa. Estabilización del sabor en almacenamiento.
Frutas en Conserva	Maltodextrinas y jarabe con bajo poder de conversión.	Mejora el nivel de viscosidad en almibares enlatados o productos similares (consistencia) Mejora la consistencia y dulzor de la frutas en conserva.
	Jarabe con alto contenido de fructosa	Equilibra el dulzor.
Panadería y Bollería	Jarabe con alto contenido de maltosa y alto poder de conversión.	Conserva la humedad y controla el color en el producto final.

Continuación del cuadro 16:

Aplicación	Producto de Almidón	Funciones
	Azúcar total y glucosa cristalina (dextrosa).	Mejora las propiedades de la masa y favorece la caramelización de la corteza.
	Jarabe con alto contenido de fructosa.	Glaseado, rellenos, canapés.
Mermeladas y	Jarabe con alto poder de conversión y alto contenido de maltosa.	Influye en la viscosidad y los perfiles osmóticos.
Gelatina		Equilibra el dulzor y el color.
Fabricación de cerveza, cidra y vino	Jarabe con alto poder de conversión y alto contenido de maltosa.	Control de la Fermentación mediante un espectro equilibrado de azúcar fermentables.
	Jarabe con alto contenido de glucosa (dextrosa)	Alto contenido de azúcares fermentables.
Helados	Jarabe con alto poder de conversión y alto contenido maltosa.	Controla las características de congelación y suavidad.
	Jarabe con alto contenido de Fructosa.	Controla el dulzor.
Alimentos infantiles y dietéticos	Maltodextrina.	Fermentabilidad baja, pero con un elevado contenido en carbohidratos digestibles.
	Glucosa cristalina (dextrosa).	Fuente de energía instantánea.

SCHWARTZ (52) indica que la aplicación más afortunada del jarabe de glucosa a nivel industrial se viene dando en la producción de isoglucosa, llamado también jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (High Fructose Corn

Syrup: (HFCS), de poder edulcorante similar o veces superior a la sacarosa. Este jarabe que contiene un 45% de fructosa puede fraccionarse para separar la glucosa, obteniéndose un jarabe de 80-90% de fructosa si éste último se mezcla con aquel que tiene 45% se logra un tercer producto con 55% de fructosa como se aprecia en el Cuadro 17.

SCHWARTZ (52), menciona además que en los últimos años, la isoglucosa ha alterado radicalmente el sistema productivo y de distribución de edulcorantes, llegando a la reformulación de muchos productos alimenticios y bebidas. Tal es así que por el año 1972 en EE.UU, estos jarabes han sustituido progresivamente a la sacarosa de caña y remolacha en productos como: refrescos, productos horneados, lácteos, jaleas y mermeladas, etc. Por el año 1982, tenía el 55% del mercado de edulcorantes nutritivos de las bebidas refrescantes, el 64% de las conservas; el 48% de alimentos procesados, el 31% de los productos lácteos y el 24% de los horneados. Por el año 1980, la Coca - Cola incorporó el 50% de este producto novel en sus formulaciones, haciendo lo propio la Pepsi - Cola en 1983; y por el año 1984 ambas empresas lo incorporaron en un 100 por ciento.

Cuadro 17: Composición de los jarabes de isoglucosa

Composición (%)	Isoglucosa de 42%	Isoglucosa de 55%	Isoglucosa de 80-90%
Fructosa	42	55	80-90
Dextrosa	52	40	7-9
Sacáridos	6	5	1-3
Sólidos	71	77	77

FUENTE : SCHWARTZ (52)

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de análisis de alimentos, Bioquímica General, Química, Análisis sensorial, Microbiología de los alimentos y de Ingeniería de los alimentos, de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicada en Tingo María a 640 m.s.n.m durante los meses de Julio de 1996 a Marzo de 1997.

A. Materiales

1. Materia prima

Se utiliza arroz simulando sub-productos como el arrochillo y fielén, los que tienen la misma composición físico-química y química proximal del arroz comercial, a diferencia que son granos rotos, este arroz es de la variedad "Ucayali 91", procedente del fundo agrícola de la UNAS y de zonas productoras de arroz como Aguaytía y Nuevo Progreso y Uchiza.

2. Insumos

Se utiliza enzimas de origen microbiano, empleados en la industria del almidón, conocidos principalmente como:

CANALPHA 345 P. Es una α -amilasa soluble de color blanco cremoso, obtenido de cepas seleccionadas de Bacillus subtilis y comercializada por la Cia. QUEST INTERNATIONAL-BIOCON, para la licuefacción del

almidón. Su actividad reportada es de 345,000 USB/G siendo una unidad de α - amilasa la cantidad de enzimas que hidroliza 5,26 g de almidón (amylum soluble merk) por hora a 40°C y pH 5,6.

AMYLO 300 L. Es una amiloglucosidasa obtenida a partir de cepas seleccionadas de Aspergillus niger y comercializada por QUEST INTERNATIONAL - BIOCON. Su actividad reportada es de 300,000 USB/g, siendo una unidad la cantidad de enzimas que hidroliza un micromol de maltosa por minuto. La enzima es una preparación líquida soluble de color marrón oscuro, con una densidad de 1,2 g/cm³.

Todas las enzimas se mantienen a temperatura de refrigeración.

3. Equipos y materiales

- Balanza de precisión, modelo sartorius, cap. 0 - 600 g, Alemania.
- Balanza analítica, marca OHAUS, modelo AP210S, cap 0 - 210 g, USA.
- pH metro, marca Orion Research, modelo 301, USA.
- Espectrofotometro, marca Bausch y Lomb USA.
- Centrifuga, marca Baudapesti Begyipari Gépgyár, 3000 r.p.m., Hungría.
- Refractómetro, marca CARLZEISS JENA, modell I, Hungría.
- Estufa, marca Lab - Line, modelo 3510.
- Mufla, marca Labor Muszeripari Muvek Esztergom, T° 0 - 1200 ° C, Hungría.

- Juego de tamices, marca Analysensieb Eckhardt 5657 HAAN. Germany. 40, 60, 120.
- Bomba de vacío, marca Labor Muszeripari Muek Esztergom, Hungría.
- Molino eléctrico, marca Thomas - Willy. Laboratory Mill, modelo 4, Thomas Scientific. USA.
- Licuadora eléctrica, marca National, 2 velocidades, modelo CS - 40, Perú.
- Termómetro, marca Chem, cap. 10° - 150° C, Alemania.
- Vibrotherm, marca Labor Muszeripari Muek Esztergom, con termómetro, vibrador y baño maría incorporado, Hungría.
- Material de vidrio: balones pìrex de 500 ml, pipetas, fioles, matraces, vasos de precipitado, tubos de prueba y otros.

4. Reactivos

- Acido 2,4 - Dinitrofenol p .a.
- Tartrato de sodio y potasio p .a.
- Cloruro de calcio. q .p.
- Acido cítrico. q .p.
- Hidróxido de sodio. p .a.
- Glucosa anhidra. p .a.
- Acido clorhídrico p .a.
- Bisulfito de sodio.
- Fosfato monosódico.

- Fosfato disódico.
- Carbón activado. p .a.
- Acetato de sodio. p .a.
- Cloruro de sodio. p .a.

B. Métodos de Análisis

1. Composición química proximal de la materia prima

- **Humedad**
A través del método de la estufa a 105 ° C AOAC (3).
- **Ceniza**
A través del método por calcinación a 600 °C AOAC (3).
- **Proteína**
Empleando el método semi micro kjeldahl, considerando 5,95 como factor de conversión del nitrógeno a proteína AOAC (3) y ARAULLO (4).
- **Fibra**
Aplicando el método de hidrólisis e ignición posterior AOAC (3).
- **Grasa**
Empleando el método Soxhlet AOAC (3).
- **Carbohidratos**
Por diferencia de los análisis anteriores.

2. Características Físico-químicas.

- pH

Se utilizó el método para muestras sólidas diluyendo 10 g. de muestra molida en 90 ml. de agua bidestilada, midiendo la fase líquida en el potenciómetro. AOAC (3).

- Acidez total

Diluyendo 10 g. de muestra molida en 90 ml. de agua bidestilada y titulando 10 ml. de fase líquida con NaOH 0,1 N empleando fenolftaleína como indicador. AOAC (3).

- Sólidos solubles

Empleando el método refractométrico. AOAC (3).

3. Análisis microbiológico

- Determinación de bacterias aerobias mesófilas viables (gérmenes viables) mediante el recuento de placas, utilizando agar plate count (PCA) y siguiendo la técnica de MOSSEL y QUEVEDO (43).

- Determinación de coliformes, empleando el recuento de placas, utilizando como medio de cultivo el rojo violeta bilis agar (VRBA) empleando la técnica de MOSSEL y QUEVEDO (43).

- Determinación de hongos (mohos y levaduras), por el método de recuento de placas empleando oxitetraciclina glucosa agar (OGA) y realizando posteriormente microcultivos en cámaras humedad a fin de identificar mejor el tipo de hongos presentes en la muestra, mediante la técnica de MOSSEL y QUEVEDO (43).

4. Análisis en el jarabe de glucosa

- Humedad
A través del método de Refractómetro AOAC (3).
- Sólidos solubles (°Bx)
Por el refractómetro manual. AOAC (3).
- Dextrosa equivalente
Por determinación de azúcares reductores. AOAC (3).
- pH
Mediante el pH - metro a temperatura ambiente. AOAC (3).
- Cenizas
Mediante la norma 209.208 ITINTEC (29).

5. Purificación de jarabe crudo y cristalización parcial de la glucosas.

La materia prima harina de arroz y/o arrocillo y ñelén después de someterse al hidrólisis enzimática se somete a un proceso de centrifugación para retirar el material sólido y así obtener el jarabe crudo y del subproducto se hace los siguientes determinaciones: Humedad, proteína, fibra, grasa y otros.

Este jarabe concentrado se deja reposar hasta la cristalización espontánea.

C. Metodología Experimental

La parte experimental de la investigación realizado a nivel de laboratorio, comprenden dos etapas: la primera es de la obtención del sustrato de harina de arroz y la segunda de hidrólisis enzimática, mediante licuefacción y sacarificación del almidón obtenido; habiendo una etapa complementaria opcional de purificación e isomerización y cristalización de la glucosa obtenida.

1. Obtención del sustrato de harina de arroz

La harina de arroz obtenida a nivel de laboratorio, de acuerdo al flujo de procesamiento de la Figura 9, las operaciones se describen a continuación:

a. Acopio

El arrocillo y ñelén, es acopiado del molino del Fundo Agrícola de la UNAS y de zonas productoras, como Aguaytia, Progreso y Uchiza, teniendo cuidado que sean de la misma variedad y estén en buen estado sanitario y con una humedad de 12% - 14%, es necesario en esta operación hacer controles de peso, para el posterior balance de materia.

b. Molienda

Se realizó en un molino de cuchillas para evitar las partículas muy gruesas, mediante análisis granulométrico.

c. Tamizado

Esta operación se realiza en un sistema de tamices para analizar el grado de molienda al que será sometido el arroz, teniendo en cuenta que este grado de molienda es fino para la cual el módulo de finura (MF) debe estar entre 2 - 4. Las partículas se tendrán que recircular pasando nuevamente por el molino para ser triturados.

d. Pesado y empaçado

El producto final que es obtenido es empaçado en bolsas de polietileno, sellados herméticamente previa pesada para calcular rendimientos.

Finalmente, la harina obtenida es caracterizado en el aspecto físico-químico y químico proximal para lo cual se realizan los análisis descritos en R.B.

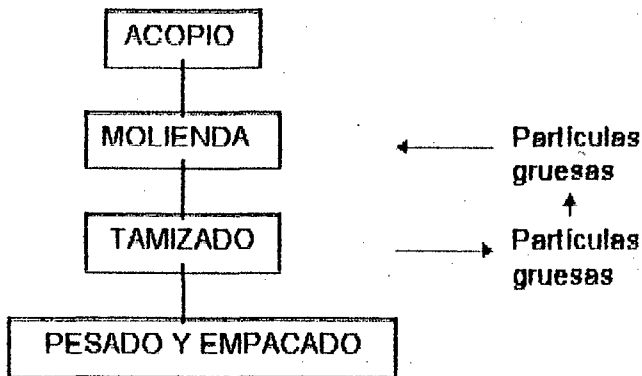


Figura 9: Flujograma de obtención de harina de arroz

2. Hidrólisis enzimática del almidón de arroz y/o arrocillo y ñelén

Para la conversión del almidón de la harina de arroz se utiliza el proceso enzimático de hidrolizados de alta conversión, en el cual el almidón atravesará dos etapas conocidas como: Licuefacción con α - amilasa y sacarificación con amiloglucosidasa o método enzima - enzima. Ambas etapas se realiza en condiciones de hidrólisis específicas, cuyos parámetros (temperatura, pH, activadores de calcio y dosis de enzima) son tomados de la información técnica concedida por las empresas Deltagen del Perú y Novo Industri.

Para realizar esta hidrólisis enzimática es necesario hacer una prueba adicional que a continuación describiremos:

a. **Cinética de hidrólisis de harina de arroz por la enzima Amiloglucosidasa de la enzima**

Se realiza con la finalidad de establecer la cinética de hidrólisis de la enzima amiloglucosidasa, se emplea como sustrato el almidón presente en la harina de arroz, lo que fue modificado con la α -amilasa bajo las siguientes condiciones:

Relación Enzima/Sustrato :	2,1 mg/g
Temperatura de hidrólisis:	70°C
Tiempo de hidrólisis:	30 min.
pH de hidrólisis:	7,0.

Los productos hidrolizados que se obtiene deben presentar un contenido de azúcares reductores entre 10 a 30% los que serán sometidos a la acción hidrolítica de la enzima Amiloglucosidasa bajo las siguientes condiciones:

Temperatura de hidrólisis:	65°C.
pH de hidrólisis:	4,5 ajustado con ácido cítrico 1 N.
Tiempo de hidrólisis:	10 min. a 10 horas.

Se efectúa la hidrólisis durante el tiempo establecido. Para detener la hidrólisis se utiliza una solución de hidróxido de sodio 4

N. La que se agrega en la mezcla de reacción con la finalidad de neutralizarla.

Para determinar la cinética de hidrólisis se toman muestras de la masa en reacción, cada hora. A cada muestra se le determina el contenido de azúcares reductores.

La cinética de hidrólisis del almidón en la harina de arroz se estudia empleando dos concentraciones de sustrato 20 y 40% (P/V) durante un tiempo que varía entre 10 minutos a 10 horas y en dos relaciones enzima/sustrato 3,74 y 1,87 mg/g.

- b. Obtención del jarabe de glucosa a partir del almidón de arroz.

Una vez estudiada la cinética de hidrólisis del almidón presente en la harina de arroz con las enzimas mencionadas, se diseña un ensayo de hidrólisis a nivel de laboratorio.

La Figura 10, nos muestra el flujograma experimental para la licuefacción y sacarificación del almidón de arroz, a continuación se describe cada operación.

Dispersión

Esta operación consiste en preparar la suspensión (aproximadamente 100 g de harina) en concentraciones de 200 g/L y 300 g/L y 400 g/L en una solución de sales de NaCl y CaCl₂

de una concentración de 3,0 y 0,5 g/L respectivamente, para ajustar el pH a 7,0.

Acondicionamiento

La suspensión de almidón es acondicionado en un balón de boca ancha, que hace las veces de reactor enzimático, en el se hará controles de la temperatura del medio reaccionante, agitación y para alimentación y muestra durante la hidrólisis.

Calentamiento

La suspensión se lleva a una temperatura de 70 °C, manteniendo una agitación constante, hasta que se gelatinice el almidón.

Licuefacción

Antes de adicionar la α -amilasa en polvo esta es preparada de la siguiente manera: Se prepara una solución de 1 g de enzima de 100 ml de Buffer fosfato 0,1 M pH 6,0 y a partir del cual se toman alícuotas, conteniendo las dosis correspondientes que será de 1,6 mg/g, 2,1 mg/g y 2,6 mg/g. Las que se agregan a la suspensión de almidón gelatinizado. La suspensión de almidón para la α -amilasa se continúa con la temperatura a 70°C durante tiempos de 30, 60 y 90 minutos.

Inactivación y ajuste de pH

Transcurrido el tiempo de 1 hora se detiene la acción enzimática mediante la adición de una solución de ácido clorhídrico (HCl) en un porcentaje de 5 % (P/V) para bajar el pH de la suspensión a 4,5, obteniéndose almidón dextrinizado.

Ajuste de temperatura

El almidón dextrinizado con pH 4,5 se deja enfriar ligeramente hasta temperatura de 65°C que es la temperatura de hidrólisis para la amiloglucosidasa.

Sacarificación

Teniendo la temperatura de 65°C se adiciona la segunda enzima que es la amiloglucosidasa en relaciones de 3,25 mg/g, 3,75 mg/g y 4,25 mg/g. enzima/sustrato, realizando la hidrólisis entre 6, 12 y 24 horas.

Inactivación

Terminado el tiempo de hidrólisis, se suspende la acción enzimática por neutralización de la masa reaccionante con una solución de NAOH al 4 % (P/M).

Centrifugación

El producto de hidrólisis que se obtiene es sometido a centrifugación para separar el sólido del líquido (o jarabe) que contendrá los azúcares en solución.

Clarificación

El líquido que se obtiene es sometido a un tratamiento con carbón activado al 5% (P/M) a 50 °C.

Filtración

Se realiza con la finalidad de separar el material decolorante (carbón activado) donde estarán adheridos los colores y aromas que interfieren en la buena calidad del producto final.

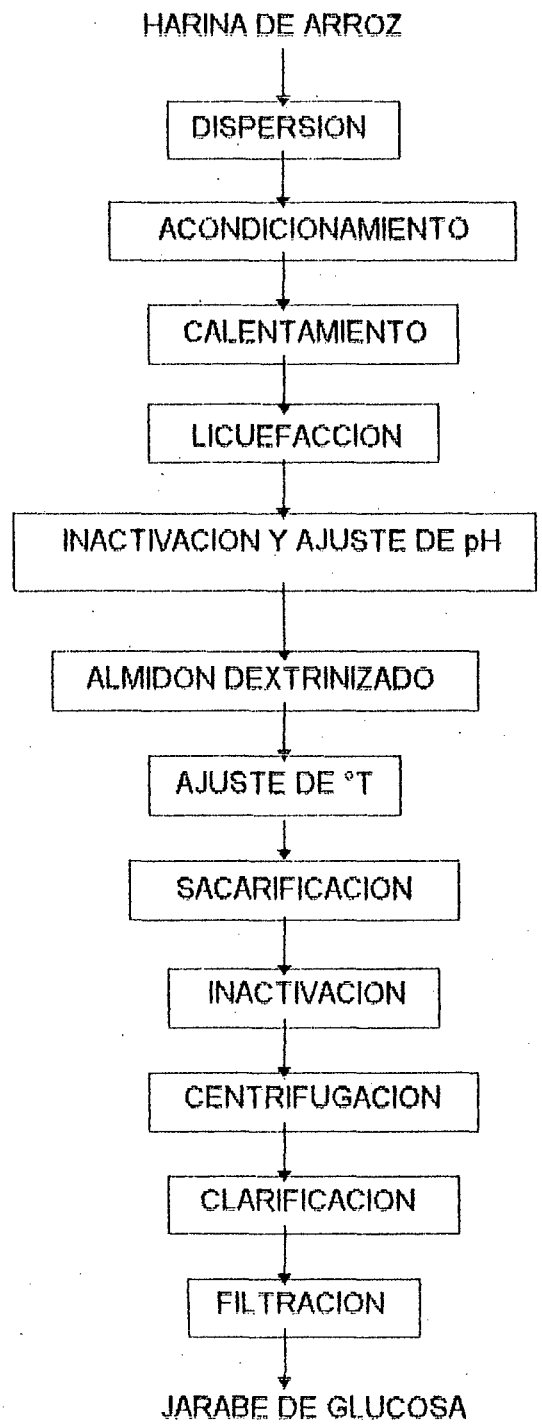


Figura 10: Flujograma tentativo de obtención de jarabe de glucosa a partir de la harina de arroz.

D. Diseño Experimental

El experimento se lleva a nivel de laboratorio, de acuerdo a la Figura 11, donde se observa que a lo largo del proceso de hidrólisis, se evalúa la influencia que sobre los azúcares reductores tiene las siguientes variables:

- Concentración de sustrato.
- Concentración de enzima
- Tiempo de reacción

Se evalúa el efecto del pH y la temperatura, puesto que en las enzimas comerciales estos parámetros ya vienen establecidos y son tomados de las curvas de máxima actividad y estabilidad.

E. Diseño Estadístico.

El diseño estadístico es independiente para cada etapa de hidrólisis.

Durante la licuefacción se utiliza tres concentraciones de sustrato de 200, 300 y 400 g/L y tres dosis de α -amilasa, cuya relación enzima/sustrato (E/S) son de 1,6, 2,1 y 2,6 mg/g., evaluándose a la vez en los tiempos de 30, 60 y 90 minutos respectivamente. Los resultados son evaluados estadísticamente mediante un arreglo factorial de 3 x 3 x 3 con dos repeticiones en diseño completo al azar.

La variable respuesta son los azúcares reductores expresados como dextrosa equivalente.

El modelo matemático será:

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + C_k + A^*B_{ij} + A^*C_{ik} + B^*C_{jk} + A^*B^*C_{ijk} + E_{ijk}$$

Donde: A = Concentración de sustrato.

B = Dosis del α - amilasa.
C = Tiempo de hidrólisis.

Durante la sacarificación se trabaja con el mejor tratamiento de la licuefacción (almidón dextrinizado), lo que se hace reaccionar con tres dosis de amiloglucosidasa 3,25 , 3,75 y 4,25 mg/g evaluándose a su vez los períodos de 6,12 y 24 horas de reacción respectivamente. Los resultados son analizados estadísticamente mediante arreglo factorial 3 x 3 con dos repeticiones. La variable respuesta son los azúcares reductores expresados como DE.

El modelo matemático será:

$$Y_{ij} = U + A_i + B_j + A \cdot B_{ij} + E_{ijk}$$

Donde: A = Dosis de amiloglucosidasa
 B = Tiempo de hidrólisis.

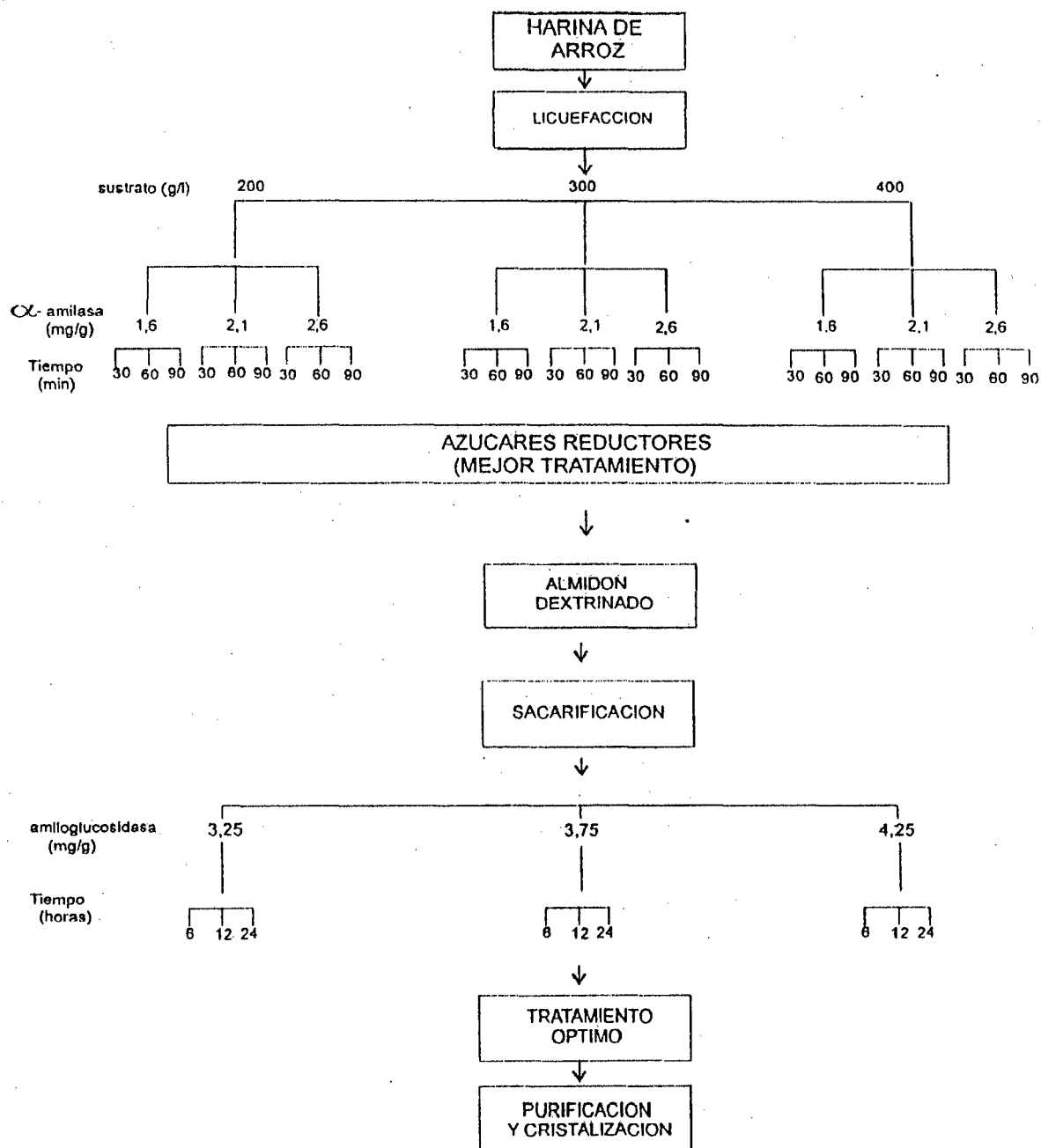


FIGURA 11 : Diseño experimental seguido en la Investigación para la licuefacción y sacarificación del almidón de harina de arrocillo y ñelén y/o arroz.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Análisis de la Materia prima

1. Composición química proximal

El Cuadro 18 , muestra la composición química proximal que presenta el arrocillo y ñelén (arroz desecho), empleado como materia prima en la presente trabajo de investigación. El contenido de humedad que posee este producto que es 13.65% se considera como humedad normal, pues si bien el arroz pulido fluctúa entre 11.5 a 13% de humedad de acuerdo al Cuadro 1, el producto que empleamos en el presente trabajo es aquel que fue descartado para su comercialización y se mantuvo por varios días en recipientes donde ganaron humedad del medio ambiente debido a su alto higroscopicidad que posee tal como lo menciona SUCCAR (54).

El contenido proteico de 6.95% también se encuentra en los límites normales para el arrocillo y ñelén que varía entre 6,5 y 7,2% por lo general, pero que si vamos a la variedad pueden alcanzar hasta el 10% como máximo.

El contenido de grasa de 0,71 está dentro del margen que indica Mc CANCE and WIDDOWSONS (41) que da un valor de 1,0% y no muestra valores diferentes con los datos que brindan los otros autores, tal como se aprecia en el Cuadro 1 del presente trabajo.

En lo que respecta a los componentes fibra y ceniza se puede apreciar que el arroz empleado en este trabajo de investigación posee 1,15 y 0,58% respectivamente de fibra y ceniza; valores que se encuentran dentro de los límites citados en el Cuadro 1.

La bibliografía nos da valores en lo que a carbohidratos se refiere de 78,7% hasta 86,8% estos valores no concuerdan con lo que obtuvimos que es de 76,96% es debido a que la variedad que trabajamos es un arroz con mayor contenido en proteínas, grasas y fibras que otras variedades, lo que proporcionalmente al aumentar el porcentaje de estos componentes hará que disminuya el porcentaje de carbohidratos.

El contenido de almidón de 74,01% determinado en el presente trabajo constituye el 96,2% del total de carbohidratos presentes, siendo un valor que está próximo a lo que brinda la técnica empleada para su determinación.

Cuadro 18: Composición química proximal y características físico químicas de la materia prima empleada

Componentes	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	13,65	----
Proteína(Nx6,25)	6,95	8,048
Grasa	0,71	0,822
Fibra	1,15	1,332
Ceniza	0,58	0,671
Carbohidratos	76,968	9,125
Almidón	74,01	85,709
Acidez (% H ₂ SO ₄)	0,1104	----
pH	6,4	----
Sólidos solubles	0,0	----

2. Características Físico - químicas

Estos resultados también se aprecian en el Cuadro 18; donde se hace notoria una considerable acidez de la materia prima, con niveles de 0,1104%, expresado como ácido sulfúrico y que excede los niveles de 0,039 y 0,064% que reporta SUCCAR (54). Esta cierta muestra de acidez sería explicada debido al deterioro sufrido por el producto al haberse dejado sin empacar los subproductos durante algún tiempo, que habrían originado la oxidación de los niveles grasos, elevando por consiguiente la acidez en el producto. También la presencia de un incremento en la humedad, favorece la hidrólisis a rancidez hidrolítica de los niveles grasos provocando acidez grasos libres, tal como lo afirma POTTER (47).

El pH del arroz empleado en la presente investigación fue de 6,4 por debajo al valor citado por SUCCAR (54) de 6,5 y que confirma el hecho de que este producto, sea considerado como no ácido.

3. Análisis microbiológico

El Cuadro 19 muestra el resultado de los recuentos microbianos realizados por grano de arroz, empleado como materia prima en la presente investigación.

Cuadro 19: Recuento microbiológico poblacional en los sub productos de arroz (arrocillo y fielén)

Clases de Microorganismos	Unidad formadoras de colonia
NMAV	$2,00 \times 10^2$
N. de Coliformes	$1,2 \times 10^2$
Mohos	$2,15 \times 10^2$

Según el Cuadro 19 para gérmenes viables tenemos una población de $2,0 \times 10^2$ unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de muestra, lo que indica una moderada contaminación bacteriana presente en el arroz de desecho, sin llegar a niveles mayores de 10^6 a 10^9 que son comunes en productos que han sufrido una descomposición bacteriana grave de sus componentes. Este bajo desarrollo microbiano se debe también a la baja actividad de agua que presenta la materia prima.

En lo que respecta a la presencia de microorganismos que indican contaminación fecal, se aprecia una población de 120 ufc. por gramo, la que está dentro de los estándares que cita JAY (30) de 0 a 200 ufc. por gramo como máximo tolerable en algunos alimentos, para reflejar la calidad sanitaria de los mismos.

En cuanto a la presencia de hongos en la materia prima se aprecia una población de $2,15 \times 10^2$ ufc por gramo predominando en su totalidad colonias de mohos pertenecientes al género Mucor tal como lo afirma PELCZAR (46) que abundan en féculas, harinas y cereales.

B. Obtención de la harina de arroz (arrocillo y ñelén)

La harina de arroz se obtuvo a nivel de Laboratorio de acuerdo al flujo de procesamiento de la Figura 9 las operaciones se describen a continuación.

1. Acopio

El arrocillo y ñelén, se acopio del molino del fundo agrícola de la UNAS y de molinos ubicados en la zonas de Aguaytia y Pucallpa, teniendo en cuenta que la variedad sea la "Ucayali 91" con las características descritas en el estudio de la materia prima (Cuadro 18 y 19).

2. Molienda

Esta variable fue estudiada para determinar el grado de molienda al que se sometió el arroz para ello se utilizó un molino de cuchillos, los resultados obtenidos se ilustran en el Cuadro 20.

Cuadro 20: Análisis granulométrico del grano de molienda obtenido del arrocillo y ñelén

Diámetro tamiz		% Retención	↓ — X	Factor de retardo	Modulo de finura parcial
Micra	mm.				
1000	1,00	20,90	0,21	5	104,50
800	0,80	20,34	0,16	4	81,36
630	0,63	15,41	0,09	3	46,23
500	0,50	10,03	0,05	2	20,06
400	0,40	8,42	0,03	1	8,42
Plato	Plato	24,90		0	00,00
TOTAL		100,00	0,54		260,57

$$\text{Módulo de Finura} = \frac{260,57}{100} = 260,57$$

Según el Cuadro 20 se determinó que el grado de molienda de la materia prima, fue del grado medio, dado que el módulo de finura (MF) que reporta este valor de 2,6057; esta dentro de los márgenes que cita CANDIOTT (13) para clasificar el grado de molienda en función al módulo de finura de las partículas obtenidas y que es como se muestra en el Cuadro 21.

Cuadro 21: Grado de Molienda en función del módulo de finura

Grado de Mollenda	Módulo de Finura M.F.
Fino	0 - 2
Medio	2 - 4
Grueso	> 4

FUENTE : CANDIOTT (13)

A su vez el tamaño promedio de partículas fue de 0,54 mm. la que es considerado como un producto granulométricamente de una gran superficie de contacto donde podrán actuar con mayor incidencia en el sustrato las enzimas.

3. Tamizado

Se realizó en un sistema de tamices al igual que se hizo para la molienda para poder establecer el índice de uniformidad de las partículas del arroz

y consiguientemente la proporción relativa de partículas. En el Cuadro 22 se tiene estos resultados.

Según el Cuadro 22 el índice de uniformidad obtenido de acuerdo a partículas gruesas, medias y finas fue de 6:2:2 pudiéndose apreciar una alta incidencia de partículas gruesas en el producto, tal como muestra la Figura 12, debido a que el arroz fue sometido a molienda únicamente en el molino de cuchillos, cuando se debiera emplear cuando menos dos tipos de molinos: uno de cuchillo y otro de disco para uniformizar el tamaño de las partículas y así obtener una harina fina y homogénea a partir de cereales, tal como sostiene MARIN (39) y LAZO (36).

Cuadro 22: Índice de uniformidad para el tamizado de la materia prima que fue sometida a la molienda

Clasificación	↓ Tamiz Micra	% Retención	Total 10	Proporción Relativa de Partículas
Partículas gruesas	1000	20,90		
	800	20,34		
	630	15,41		
	Total	56,65	5,665	6
Partículas medias	500	10,03		
	400	8,42		
	Total	18,45	1,845	2
Partículas finas	Plato	24,90		
	Total	24,90	2,490	2

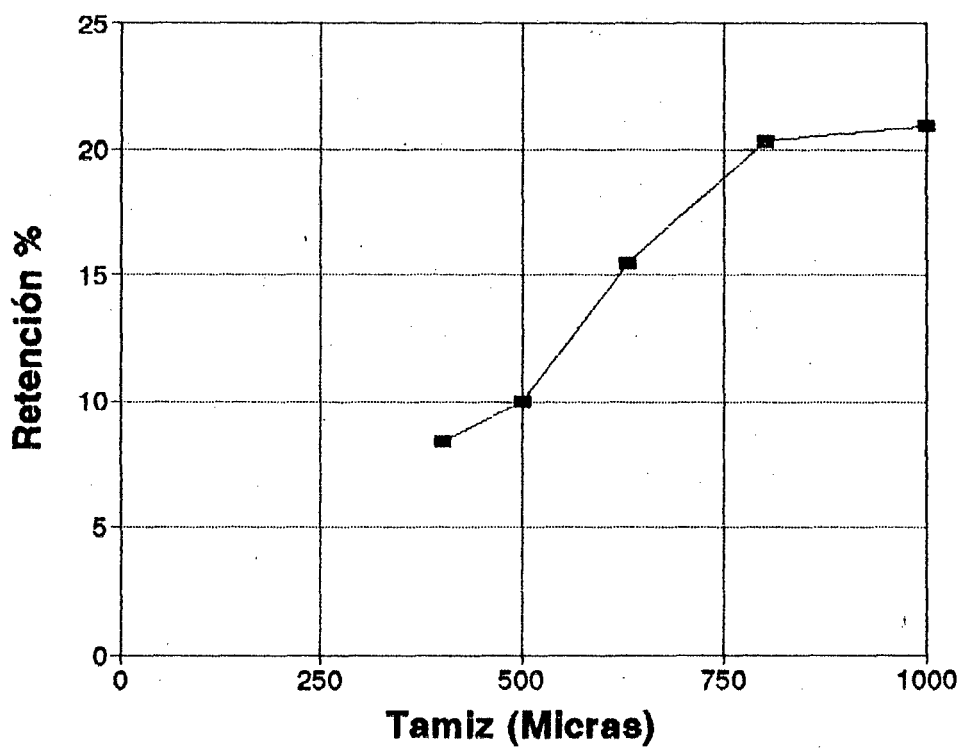


Figura 12: Distribución del tamaño de partícula de arrocillo y ñelén y/o arroz molido.

Este efecto se explica debido a que la finalidad de la molienda en el flujo de proceso empleado, no era obtener una harina fina de arroz, sino tan sólo reducir el tamaño de los granos a fin de facilitar la posterior hidrólisis enzimática, incrementando la superficie de contacto entre las enzimas y los gránulos de almidón contenidos en la materia prima.

Finalmente queremos mencionar que los rangos para delimitar el tamaño de partículas gruesas, medias y finas dentro de un grado de molienda no se hallan reglamentadas puesto que el tamaño de partículas, depende de la variedad de la materia prima empleada, del tamaño de sus gránulos de almidón y del método de molienda y equipos empleados.

4. Pesado y empaçado

El producto final que se obtuvo se pesó y se empacó en bolsas de polietileno sellado herméticamente para poder al final calcular rendimientos. Cada bolsa con producto contenía un peso de 1 Kilogramo.

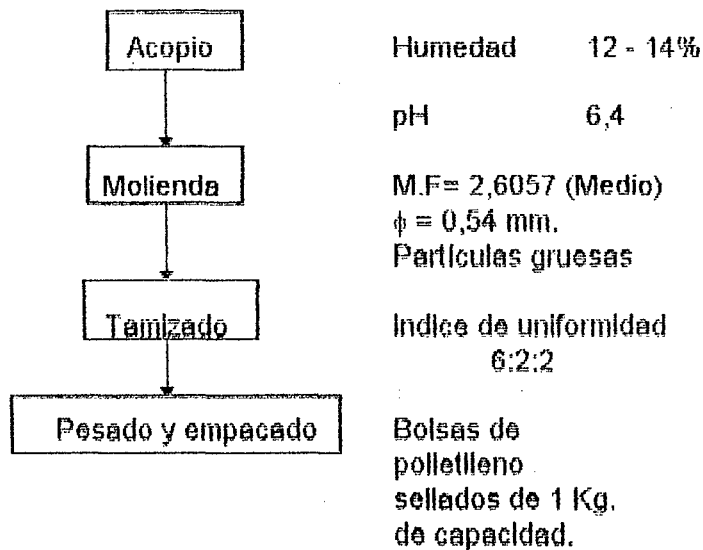


Figura 13: Flujograma para la obtención de harina de arroz a partir del arrocillo y el ñelén.

C. Hidrólisis enzimática del almidón de arrocillo y ñelén

1. Cinética de la hidrólisis de la harina de arroz con enzima α - amilasa de *B. subtilis* (CANALPHA 345 P) y amiloglucosidasa de *A. niger* (AMYLO 300 L)

Para establecer la cinética de hidrólisis de la enzima amiloglucosidasa de *A. niger* (AMYLO 300 L) se utilizó como sustrato el almidón presente en la harina de arrocillo y ñelén previamente modificado con α - amilasa de *B. subtilis* según la metodología descrita por BENAVIDES y CABRERA (8) y por TORRES (56), considerando dos concentraciones de sustrato 20 y 40% (P/V) evaluados desde los 10 minutos hasta las 10 horas y en dos relaciones enzima/sustrato 3.74 mg/g y 1.87 mg/g. En el Cuadro 23 se muestran estos resultados en función del contenido de azúcares reductores.

La cinética de la hidrólisis del almidón presente en la harina de arrocillo y fielén, con la enzima amiloglucosidasa (AMYLO 300 L) se estudió, como manifestamos anteriormente sobre el sustrato previamente modificado por la acción de la enzima α - amilasa (CANALPHA 345 P) durante una hora de hidrólisis con una relación E/S igual 2.1 mg/g. Las condiciones de hidrólisis de la enzima amiloglucosidasa (AMYLO 300 L), así como los resultados en función del tiempo de hidrólisis y expresados como porcentajes de azúcares reductores (AR) se representa en el Cuadro 23 y Figura 14. La concentración de azúcares reductores del sustrato en el tiempo cero ($t=0$) hasta los 60 ($t=60$) es la obtenida durante la primera hidrólisis con α - amilasa (CANALPHA 345 P) dependiendo del grado de modificación del almidón en esta primera reacción. Estos resultados se ilustra en el Cuadro 24 y Figura 15.

En las Figuras 14 y 15 se aprecia no solamente la cinética de reacción de hidrólisis en función del tiempo, sino también el efecto de la concentración del sustrato y de la proporción de enzima empleada.

Igualmente se observa que las dos primeras horas de hidrólisis se efectúa rápidamente. En éste tiempo se obtiene un 42,4 a 58,4% de azúcares reductores la cual corresponde a un 57,29 y 78,91% respectivamente, de conversión con respecto al peso de almidón presente en la harina de arrocillo y fielén. A partir de éste momento la acción enzimática se vuelve más lenta, de tal forma que para llevar a la hidrólisis casi total del almidón se requiere un tiempo mayor de 10 horas. Sin embargo la hidrólisis puede complementarse antes si se aumenta la

relación E/S como puede verse en la Figura 14, cuando se duplica la relación E/S empleando una concentración del 20% PV.

Cuadro 23: Cinética de la hidrólisis de harina de arrocillo y ñelén con enzima amiloglucosidasa de *A. niger* (AMYLO 300 L) previamente modificado con α -amilasa de *B. subtilis* (CANALPHA 345 P) a las 10 horas

Porcentaje de Azúcares Reductores				
Concentración de Sustrato (% P/V)				
Tiempo (horas)	20 %		40 %	
	Relación E/S (mg/g)		Relación E/S (mg/g)	
	3,74	1,87	3,74	1,87
1	56,2	46,2	46,5	39,5
2	58,4	50,1	50,0	42,4
3	59,6	55,6	55,0	45,0
4	60,9	55,8	55,5	45,1
5	62,8	55,9	56,4	45,2
6	63,6	60,0	57,2	45,2
7	64,4	60,1	58,4	45,3
8	65,3	60,2	59,0	45,3
9	66,5	60,2	59,7	45,4
10	68,2	60,3	60,9	45,6
11	69,9	60,3	61,7	45,6

(*) Resultados promedios de dos repeticiones

Cuadro 24: Cinética de la hidrólisis de harina de arrocillo y ñelén con enzima α -amilasa (CANALPHA 345 P) dentro de los primeros 60 minutos

Concentración de Sustrato (%P/V)				
Tiempo min.	20 %		40 %	
	Relación E/S		Relación E/S	
	3,74	1,87	3,74	1,87
	% AR	% AR	% AR	%AR
15	46,8	38,0	30,9	30,0
30	51,9	40,4	38,2	35,4
45	54,2	42,8	42,8	37,2
60	56,2	46,2	46,5	39,5

(*) Resultados promedios de dos repeticiones

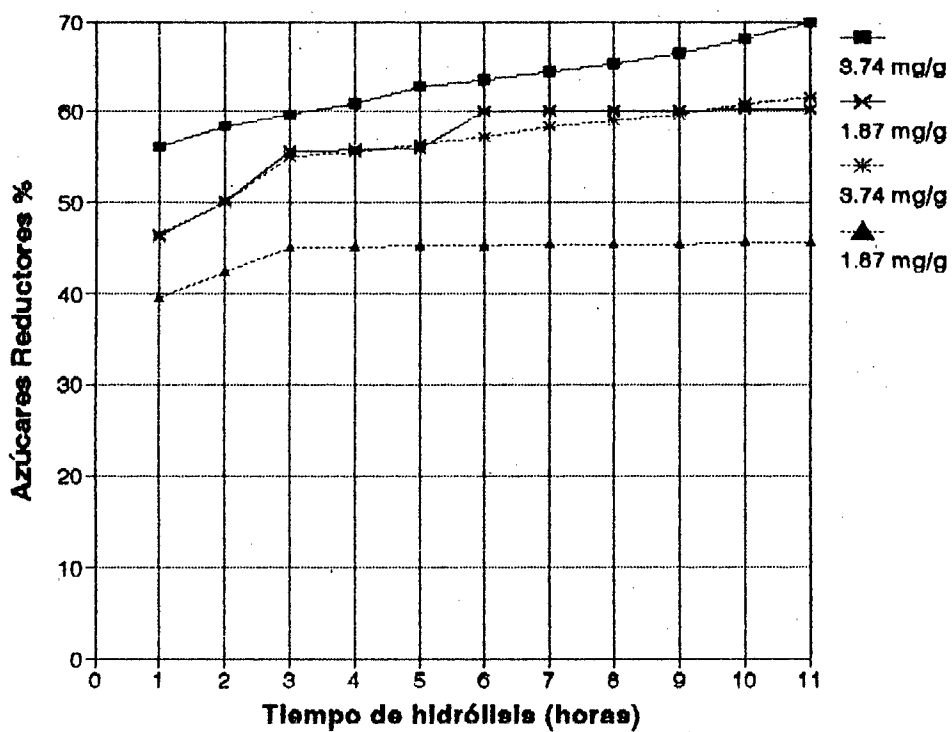


Figura 14: Cinética de la hidrólisis de harina de arroz con enzima amiloglucosidasa (AMYLO 300 L) a temperatura de 65°C, pH de 4,5 en función de la concentración de sustrato y relación Enzima/Sustrato.

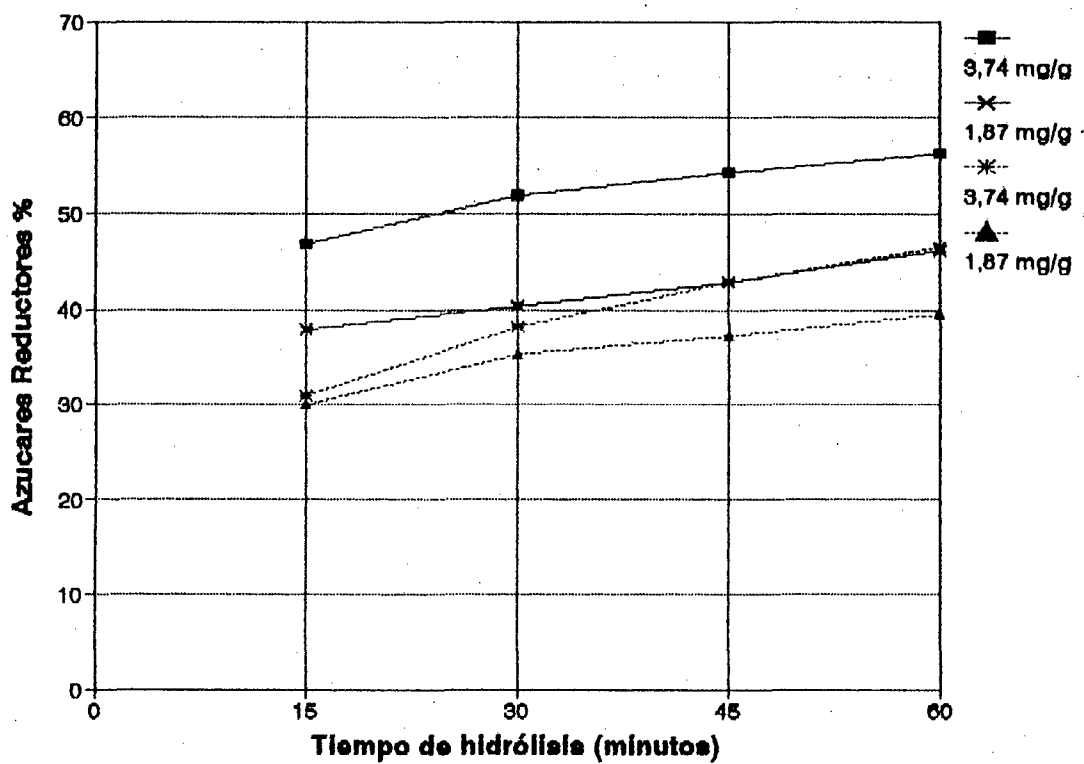


Figura 15: Cinética de la hidrólisis de harina de arrozillo y flén con la enzima α -amilasa (CANALPHA 345 P) a temperatura de 70°C pH de 7,0 en función de la concentración de sustrato y relación Enzima/Sustrato.

Por otro lado, se confirma como en casos anteriores que al aumentar la concentración del sustrato, manteniendo la misma relación E/S, el nivel de azúcares reductores obtenidos, es inferior debido a la mayor cantidad de masa reaccionante. Este efecto se nota muy bien con el α - amilasa (CANALPHA 345 P) en el tiempo cero hasta el punto de partida con la amiloglucosidasa (AMYLO 300 L) donde los niveles de azúcares reductores obtenidos durante una hora de hidrólisis varían, a los 15 minutos entre 30 y 46,8% cuando la concentración de sustrato varía entre el 40 y el 20% PV respectivamente, siendo a los 60 minutos concentraciones de azúcares reductores entre 39,5 a 56,2% para las dos concentraciones de sustrato siendo siempre mayor para el 20% PV.

Así mismo, durante la hidrólisis subsiguiente con amiloglucosidasa (AMYLO 300 L) se nota una diferencia en el nivel de azúcares reductores el cual oscila notoriamente cuando establecemos diferencias entre concentraciones de sustrato y relaciones de enzima/sustrato, para confirmar esta variabilidad se realiza el análisis de variancia utilizando un análisis completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 2 \times 10$ como se muestra en el Cuadro 25.

Se aprecia que para la Concentración (A), Relación E/S (B) y Tiempo (C), a demás para la interacción A x B la diferencia estadística es altamente significativa lo que confirma lo que discutimos anteriormente al referirnos que la acción enzimática de la α -amilasa (CANALPHA 345 P) va a variar en función a la concentración del sustrato, a la relación enzima/sustrato y al tiempo.

Cuadro 25: Análisis de variancia de la hidrólisis de harina de almidón de arrochillo y felén expresado en D.E. en función de la concentración de sustrato, relación E/S y el tiempo 10 horas.

Fac. Var.	G.L.	S.C.	F.c.	Slg.
Concentración(A)	1	1008.00818182	265.06	0.0001**
Relación E/S (B)	1	925.52818182	243.37	0.0001**
Tiempo (C)	10	563.43181818	14.82	0.0001**
A*B	1	80.73090909	21.23	0.0010
A*C	10	21.32181818	0.56	0.8123
B*C	10	31.55181818	0.83	0.6132
Modelo Gral.	33	2630.57272727	20.96	0.0001
Error	10	38.02909091		
TOTAL	43	2668.60181818		
	R - Square	C.V.	Y Mean	
	0.985749	3.530473	55.23636364	

Para confirmar esta variabilidad estadística realizamos la prueba de Tukey tal como se muestra en el Cuadro 26 donde se aprecia que existe variabilidad en lo que a concentración de sustrato se refiere, como también de la dosis de enzima y del tiempo; lo mismo sucede en la reacción inicial es decir en la primera hora tal como se muestra en los Cuadros 27 y 28 del análisis de variancia y prueba de Tukey respectivamente.

Cuadro 26: Prueba de Tukey de la hidrólisis de almidón de harina de arrocillo y ñelén expresado en D.E. en función de la concentración de sustrato, dosis de enzima y tiempo.

Variable	Diferencia Tukey		Prom.	N	Trat
Concentración (A)	A		60.023	22	1
	B		50.450	22	2
Relación E/S (B)	A		59.823	22	1
	B		50.650	22	2
Tiempo (C)		A	59.375	4	11
		A	58.750	4	10
		A	57.950	4	9
		A	57.450	4	8
		A	57.050	4	7
		A	56.500	4	6
	B	A	55.075	4	5
	B	A	54.325	4	4
	B	A	53.800	4	3
	B	C	50.225	4	2
	C	47.100	4	1	

Cuadro 27: Análisis de variancia de la hidrólisis de almidón de harina de arrocillo y ñelén expresado en D.E. en función de la concentración de sustrato, relación E/S y el tiempo durante los primeros 60 minutos.

Fac. Var.	G.L.	S.C.	Fc	Pr > F
Concentración (A)	1	295.53337302	36.43	0.0038
Relación E/S (B)	1	75.00015263	9.25	0.0384
Tiempo (C)	3	413.39508547	16.99	0.0097
A*B	1	41.81333333	5.15	0.0857
A*C	3	17.19555556	0.71	0.5963
B*C	2	6.81166667	0.42	0.6831
Modelo Gral.	11	849.74916667	9.52	0.0216
Error	4	32.44833333		
TOTAL	15	882.19750000		
	R - Square	C.V.	Mean	
	0.963219	6.731278	42.31250000	

Cuadro 28: Prueba de Tukey de la cinética de la hidrólisis de almidón de arrochillo y ñelén expresado en D.E. en función de la concentración de sustrato, dosis de enzima y tiempo.

Variable	Diferencia Tukey		Prom.	N	Trat.
Concentración (A)	A		47.186	9	1
	B		38.522	9	2
Relación E/S(B)	A		45.857	9	1
	B		39.556	9	2
Tiempo (C)		A	47.100	4	4
	B	A	44.250	4	3
	B	A	41.475	4	2
	B		36.425	4	1

2. Obtención de Jarabe de glucosa a partir del almidón de harina de arrochillo y ñelén.

Para la obtención del Jarabe de glucosa utilizando como materia prima el almidón de arrochillo y ñelén el trabajo se dividió en tres sub etapas que son como sigue:

- a. Cinética de la Licuefacción con α - amilasa (CANALPHA 345 P)

En el Cuadro 29 presentamos los resultados promedios de la dextrosa equivalente (DE), obtenidos durante la licuefacción del almidón de la harina de arrochillo y ñelén con la α - amilasa (CANALPHA 345 P) cuando variamos las concentraciones del sustrato y enzima.

Cuadro 29: Dextrosa equivalente promedio de los hidrolizados producidos durante la licuefacción del almidón de harina de arrozillo y félen con dosis variadas de sustrato y enzima (*).

Tiempo (min.)	200 g/l			300 g/l			400 g/l		
	1,6	2,1	2,6	1,6	2,1	2,6	1,6	2,1	2,6
15	11,5	22,4	22,4	12,3	23,6	24,5	10,9	12,2	14,3
30	12,3	25,3	30,2	13,3	27,6	31,7	11,4	14,0	14,8
45	14,6	30,7	33,6	15,4	31,6	34,9	13,7	14,6	15,4
60	16,3	31,5	34,0	17,2	32,3	35,4	15,2	15,4	16,3
75	16,8	32,0	34,2	17,3	32,4	35,9	16,9	16,5	18,8
90	16,8	32,0	34,2	17,5	32,4	35,9	17,0	18,2	19,2

(*) α -amilasa de *B. subtilis* (CANALPHA 345 P) a 70°C pH 7,0 y 3,0 g/l y 0,5 g/l de NaCl y CaCl₂ respectivamente.

La hidrólisis del almidón de harina de arrozillo y félen alcanzado durante la licuefacción que se ilustra en el Cuadro 29 y según el Cuadro 12 se constituirá en maltodextrinas y jarabes Tipo I para los sustratos de 200 g/l y 300 g/l y maltodextrinas para el sustrato de 400 g/l.

Con referencia a esta clasificación según la dextrosa equivalente (DE) BENAVIDES Y CABRERA (8) y TORRES (56) manifiestan que la DE es una medida aproximada del grado de modificación del almidón, siendo los azúcares de composición variada y existiendo además polisacáridos de bajo y alto peso molecular entre uno y otro producto hidrolizado.

LLOYD Y NELSON (37) y TORRES (56) mencionan que es más evidente lo anteriormente indicado cuando la hidrólisis es por vía ácida y enzimática de un mismo grado de hidrólisis.

1. Evaluación de la concentración de sustrato

En el Cuadro 30 se puede apreciar claramente las diferencias que existen en el grado de hidrólisis de las suspensiones de 200, 300 y 400 g/l. Podemos apreciar además como los azúcares reductores (g/l) se incrementan con la concentración del sustrato pero cuando este no satura el solvente como el caso del sustrato de 400 g/l donde la reacción enzimática es lenta.

Cuadro 30: Influencia del tiempo a concentración del almidón de harina de arrozillo y fielen con la dosis de α -amilasa (CANALPHA 345 P) de 2,1 mg/g.

Tiempo (min.)	200 g/l		300 g/l		400 g/l	
	D.E.(*)	g/l(**)	D.E.(*)	g/l(**)	D.E.(*)	g/l(**)
15	22,4	44,8	23,6	70,8	12,2	24,4
30	25,3	50,6	27,6	82,8	14,0	28,0
45	30,7	61,4	31,6	94,8	14,6	29,2
60	31,5	63,0	32,3	96,9	15,4	30,8
75	32,0	64,0	32,4	97,2	16,5	33,0
90	32,0	64,0	32,4	97,2	18,2	36,4

(*) Dextrosa Equivalente

(**) Azúcar Reductor

Según el Cuadro 30 se tiene la Dextrosa Equivalente y el azúcar reductor, en cuanto al primero diremos, que en el sustrato de 300 g/l la DE es mayor que en la de 200 g/l, pero no sucede así en el sustrato de 400 g/l donde disminuye considerablemente esto debido a la saturación de sustrato en el solvente que va a requerir de mayor tiempo y una agitación más rápida de arrozillo y fielen, entre el sustrato de 300 g/l y 400 g/l. Se cumple la afirmación de

que existe una relación inversa en el grado de hidrólisis cuando se baja la concentración de sustrato (Figura 16) resultados parecidos a los obtenidos por RODRIGUEZ (50), AGUIRRE (1) y TORRES (56).

En lo que respecta los azúcares reductores, si comparamos en los sustratos de 200 g/l y 300 g/l vemos que se incrementan con el tiempo siendo mayor en el segundo esto se debe a que existe una relación directa con el aumento del sustrato llegando a valores de 64,0% y 97,2% respectivamente, pero si comparamos los azúcares reductores en los sustratos de 300 y 400 g/l no se cumple esta relación directa por que se ve un descenso notorio de los azúcares reductores a medida que se aumenta la concentración de sustrato, esto debido a que existe una saturación de la suspensión que impide la acción enzimática y tal como lo manifiestan SIM y CHERYAN (53) y TORRES(56).

Por lo tanto la mejor concentración de sustrato es de 300 g/l.

2. Evaluación de la concentración de enzima

En el Cuadro 31 y la Figura 17 observamos las D.E después de 60 minutos que es el tiempo después del cual la DE empieza a ser constante y observamos una relación directa entre la cantidad de enzima y la DE en forma general diremos que a mayor concentración de enzima existe mayor conversión de sustrato.

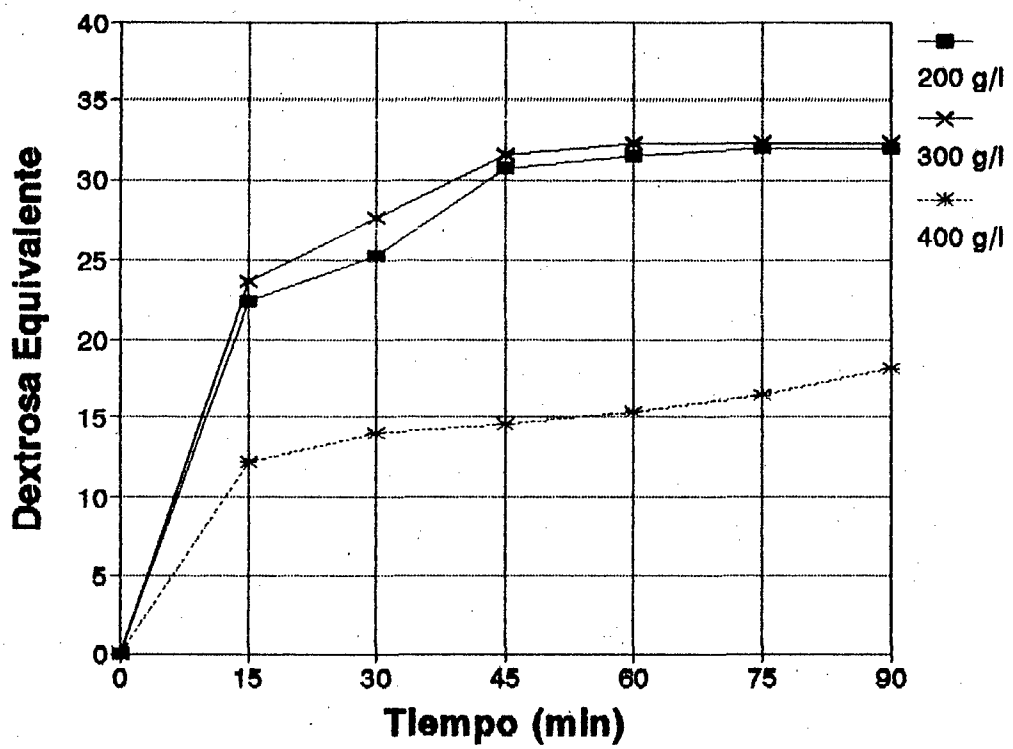


Figura 16: Influencia de la concentración de sustrato y tiempo en el grado de Licuefacción del almidón de harina de atrocillo y flén.

En el Cuadro 31 se tiene para el sustrato de 300 g/l que es el más óptimo, para la dosis 1,6 de 17,2 DE al aumentar a 2,1 mg/g se incrementa a 32,3 DE y al incrementar la dosis a 2,6 mg/g se tiene que aumentar la DE a 35,4, todo esto bajo las mismas condiciones de reacción.

También es notorio que al aumentar la concentración de 1,6 a 2,1 mg/g aumenta la DE en 15,1 puntos mientras que la aumentar de 2,1 a 2,6 mg/g solamente aumenta 3,1 punto lo que indica que un incremento proporcional de la enzima no necesariamente va a significar que la hidrólisis se incrementa aritméticamente.

Cuadro 31: Influencia de la concentración de enzima en el grado de licuefacción (DE) del almidón de harina de arrozillo y féculen a 60 minutos.

α - amilasa (mg/g)	Concentración de Sustrato		
	200 g/l	300 g/l	400 g/l
1,6	16,3	17,2	15,2
2,1	31,5	32,3	15,4
2,6	34,0	35,4	16,3

Al observarse el sustrato de 400 g/l se ve muy claramente que el incremento es mínimo y menor con las demás concentraciones esto se debe a que la enzima se encuentra en un medio saturado por el sustrato y según su actividad solamente logra licuar el almidón hasta cierto grado de polimerización definida, además no todo el almidón debido a la saturación entra en contacto con la enzima.

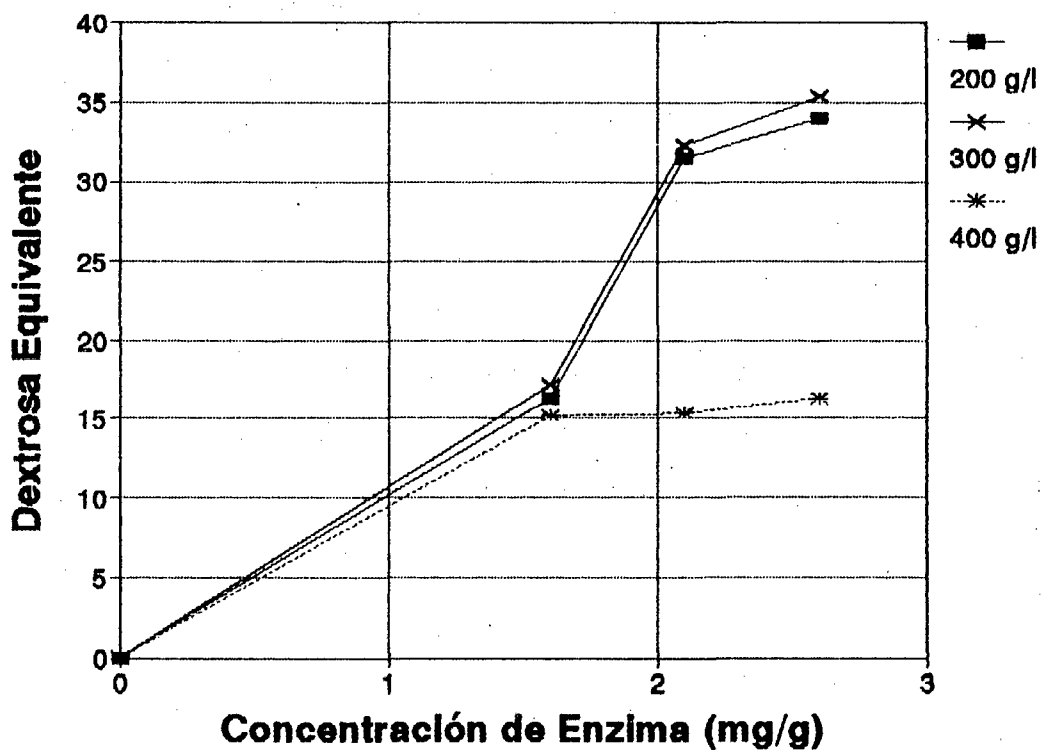


Figura 17: Influencia de la concentración de enzima en el grado de Licuefacción de almidón de harina de arrozillo y fielén.

El grado de polimerización definida produce dextrinas lineales y ramificadas que disminuye la velocidad de acción de la molécula enzimática del manera similar a las "dextrinas limites" producidos por la β - amilasa. También la maltosa producida inhibe a la α - amilasa en su acción hidrolítica tal como la manifiesta BRUCHMANN (11).

Por lo tanto la mejor concentración de enzima es de 2,6 mg/g.

3. Evaluación del tiempo de licuefacción

En el Cuadro 32 y Figura 18 tenemos el grado de hidrólisis en función del tiempo para las concentraciones de enzima de 1,6 mg/g, 2,1 mg/g y 2,6 en un sustrato de 300 g/l. Si analizamos los resultados vemos que el incremento de la DE es notoria de 15 a 30 minutos y de 45 a 60 minutos, después del cual el valor de la DE empieza a ser casi constante a incrementarse muy lentamente hasta los 90 minutos; el cual va en forma paralela acompañado como menciona TORRES (56) por una rápida disminución de la viscosidad y un aumento de la solubilidad del hidrolizado.

Cuadro 32: Influencia del tiempo en el grado de licuefacción (DE) con dosis variable de enzima sustrato al sustrato de 300 g/l.

Tiempo (min.)	Concentración de α - amilasa (mg/g)		
	1,6	2,1	2,6
15	12,3	23,6	24,5
30	13,3	27,6	31,7
45	15,4	31,6	34,9
60	17,2	32,3	35,4
75	17,3	32,4	35,9
90	17,3	32,4	35,9

Así mismo podemos apreciar que hasta los 60 minutos para una dosis de enzima de 1,6 mg/g solo se alcanza valores de la DE de 17,2 minutos que para la dosis de 2,1 mg/g se alcanza hasta 32,3 DE y para la dosis de 2,6 mg/g se tiene un valor de la DE de 35,4. Por lo tanto el mejor tiempo es de 60 minutos.

En el Cuadro 33 se presenta el análisis de variancia para el grado de hidrólisis (DE) producido durante la licuefacción del almidón de harina de arrozillo y fiolén con la α - amilasa CANALPHA 345 P.

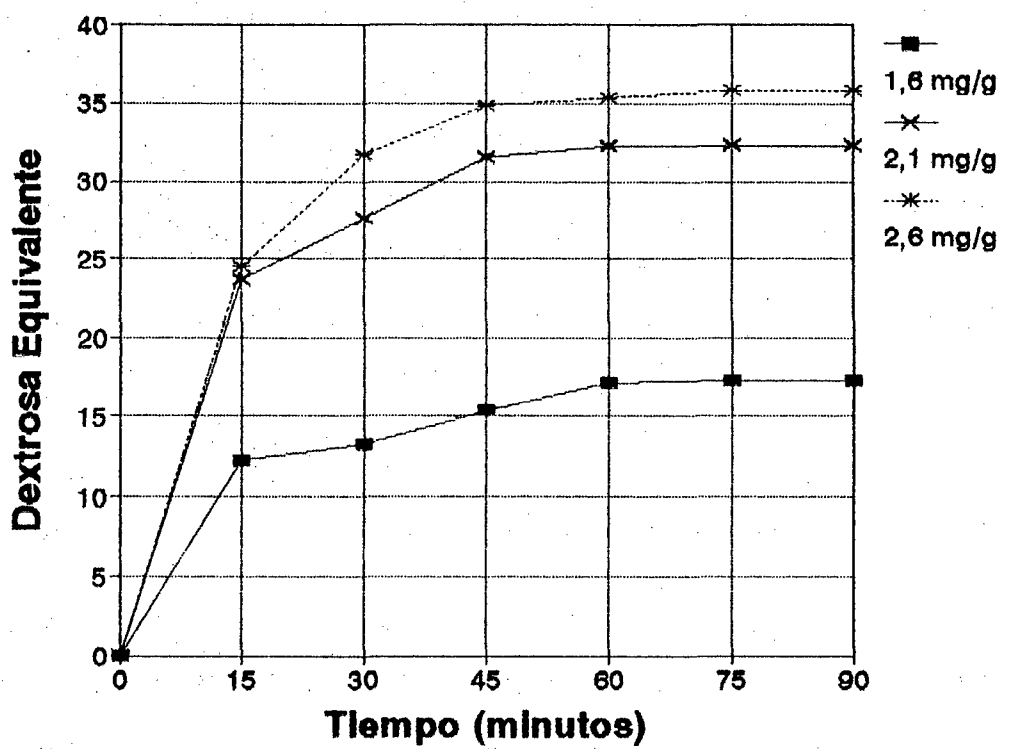


Figura 18: Influencia del tiempo a concentración variable de enzima en el grado de Licuefacción del almidón de harina de arrozillo y ñelén.

Cuadro 33: Análisis de variancia para la dextrosa equivalente (DE) producida durante la licuefacción del almidón de la harina de arrocillo y félen.

Fac. Var.	G.L	S.C.	F.c.	Slg.
Concentración (A)	2	1295.65037037	538.47	0.0001**
Relación E/S (B)	2	1510.45148148	627.75	0.0001**
Tiempo (C)	5	406.39481481	67.56	0.0001**
A*B	4	537.63407407	111.72	0.0001
A*C	10	37.59407407	3.12	0.0144
B*C	10	23.03962963	1.92	0.1038
Modelo Gral.	33	3810.76444444	95.99	0.0001
Error	20	24.06148148		
Total	53	3834.82592593		
	R - Square	C.V.	Y Mean	
	0.993726	4.949010	22.16292696	

En el Cuadro 33 se establece diferencia altamente significativas entre factores simples y las interacciones para la concentración de sustrato, dosis de enzima y tiempo de reacción.

En el Cuadro 34 se tiene la prueba de Tukey para establecer estas diferencias y agrupar por el mejor promedio de DE de cada tratamiento.

En el Cuadro 34 se aprecia que el mejor tratamiento con respecto a la concentración de sustrato es el que corresponde a 300 g/l de sustrato y la mejor relación de 2,1 mg/g habiendo optado por el segundo debido a la mayor proporción de azúcares reductores que posee.

Cuadro 34: Prueba de Tukey para la dextrosa equivalente (DE) producida durante la licuefacción del almidón de la harina de arrocillo y fielén.

Variable	Diferencia Tukey	Prom.	N	Trat.
Concentración (A)	A	26.178	18	2
	B	25.044	18	1
	C	15.267	18	3
Relación E/S (B)	A	26.983	18	3
	B	24.706	18	2
	C	14.800	18	1
Tiempo (C)	A	24.800	9	6
	A	24.533	9	5
	B A	23.733	9	4
	B B	22.722	9	3
	C	20.067	9	2
	D	17.122	9	1

b. Cinética de la sacarificación del almidón hidrolizado
(Licuado)

Para esta sub etapa solamente se considera el tratamiento más óptimo que es el de la suspensión de 300 g/l y que corresponde además a una licuefacción con 2,1 mg/g de α - amilasa de B. subtilis (CANALPHA 345 P) durante 60 minutos de reacción a una temperatura de 70 °C y un pH de 7,0 ajustando mediante la adición de NaCl y CaCl₂.

Escogimos la dosis 2,1 mg/g como la más indicada por cuestiones económicas sin considerar que debemos utilizar la DE máxima obtenida durante la dextrinación para reducir el tiempo de

sacarificación, el cual se consigue con la dosis de enzima de 2,6 mg/g. Pero esta diferencia es mínima al utilizar esta dosis se tendría que invertir más en la compra de la enzima que si lo llevamos a valores a nivel de planta piloto e industrial reportarían valores considerables. Además se considera este tratamiento teniendo en cuenta la concentración promedio que oscila entre 30 y 35 recomendado por GODFREY y REICHEL (24) para la sacarificación a nivel Industrial y los utilizados por LAGES y TANNEBAUN (35); PARK y PAPINI (45) para la hidrólisis del almidón y yuca y TORRES (55) para la hidrólisis del almidón de piluca.

Cuadro 35: Dextrosa Equivalente promedio producido durante la sacarificación del almidón de harina de arrozillo y féculen dextrinado (Sustrato de 300 g/l y dosis de 2,1 mg/g de α -amilasa).

Tiempo (horas)	Amiloglucosidasa (mg/g)		
	3,25	3,75	4,25
1(*)	32,4	32,4	32,4
6	44,5	57,9	77,4
12	60,5	95,4	94,7
24	60,7	95,4	94,7

(*) Almidón dextrinado con α -amilasa de *B. subtilis* (CANALPHA 345 P), E/S = 2,1 mg/g tiempo = 60 minutos temperatura = 70°C y pH = 7,0.

El Cuadro 35 muestra el grado de hidrólisis alcanzado en esta etapa donde se distingue jarabe con DE muy variable y de acuerdo a la clarificación de SCHWARTZ (52) y el Cuadro 12

estos se clasifican del modo siguiente para la dosis de 3,25 mg/g jarabe Tipo III y para 3,75 mg/g y 4,25 mg/g el jarabe Tipo IV.

1. Evaluación de la concentración de enzima

Según la Figura 19 apreciamos que hasta la 6 horas el grado de hidrólisis aumenta con la dosis de enzima observamos además que a partir de las 6 horas hasta las 12 horas los resultados son muy variados sin compararnos la dosis de 3,25 mg/g con las de 3,75 mg/g y 4,25 mg/g los que tienen valores muy próximos. Pasado de las 12 horas se tiene valores casi constantes especialmente en estos dos últimos tratamientos que son valores de 95,4 y 94,7 respectivamente. En tal sentido según la dosis de enzima y el tiempo de la sacarificación utilizados la conversión máxima es alcanzada con la dosis de 3,75 mg/g de amiloglucosidasa (AMYLO 300 L).

2. Efecto del tiempo de sacarificación

En la Figura 20 se observa la influencia del tiempo de sacarificación para la máxima conversión del almidón de harina de arrozillo y ñelén, donde apreciamos que hasta las 6 horas la sacarificación es muy rápida, pasado las 6 horas hasta las 12 horas disminuye la velocidad de reacción pero se incrementa notoriamente la D.E pero después de las 12 horas la sacarificación se paraliza y la conversión es casi nula.

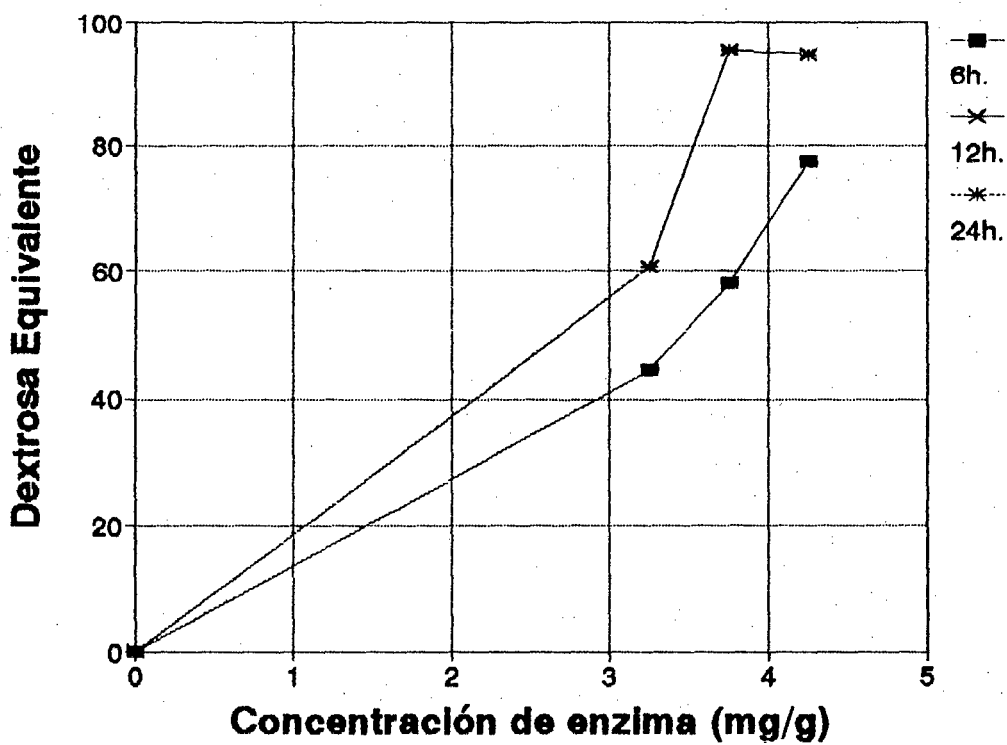


Figura 19: Influencia de la concentración de enzima en el grado de sacarificación del almidón de harina de arrocillo y fielen.

Esto concuerda con lo que manifiesta LLOYD y NELSON (37) quienes afirman que las dextrinas lineales son más rápidamente convertidos por la amiloglucosidasa que los dextrinas ramificadas y que los polímeros de maltosa son más rápidamente hidrolizados que los polímeros que contienen isomaltosa, pudiendo ser estos últimos los puntos críticos en donde la acción enzimática se vuelve más lenta.

En la Figura 20 podemos notar que para producir una DE de 60,5, con la dosis de enzima de 3,25 mg/g se requiere de 12 horas tiempo que concuerda con las otras dos dosis que alcanzan valores de 95,4 y 94,7 para 3,75 y 4,25 mg/g respectivamente, pasado éste tiempo en los tres casos la conversión con la dosis de 3,75mg/g es mayor debido a que las 6 primeras horas de conversión no es muy rápida evitando que se forme de esta manera dextrinas ramificadas y polímeros de isomaltosa que hacen que la acción enzimática sea muy lenta, estos resultados no concuerdan con TORRES (56) al obtener glucosa del almidón de pituca pero si con LAGES y TANNEMBAUN (35) quienes emplearon tiempos de 12 horas y 24 horas para la máxima conversión del almidón y harina de yuca respectivamente.

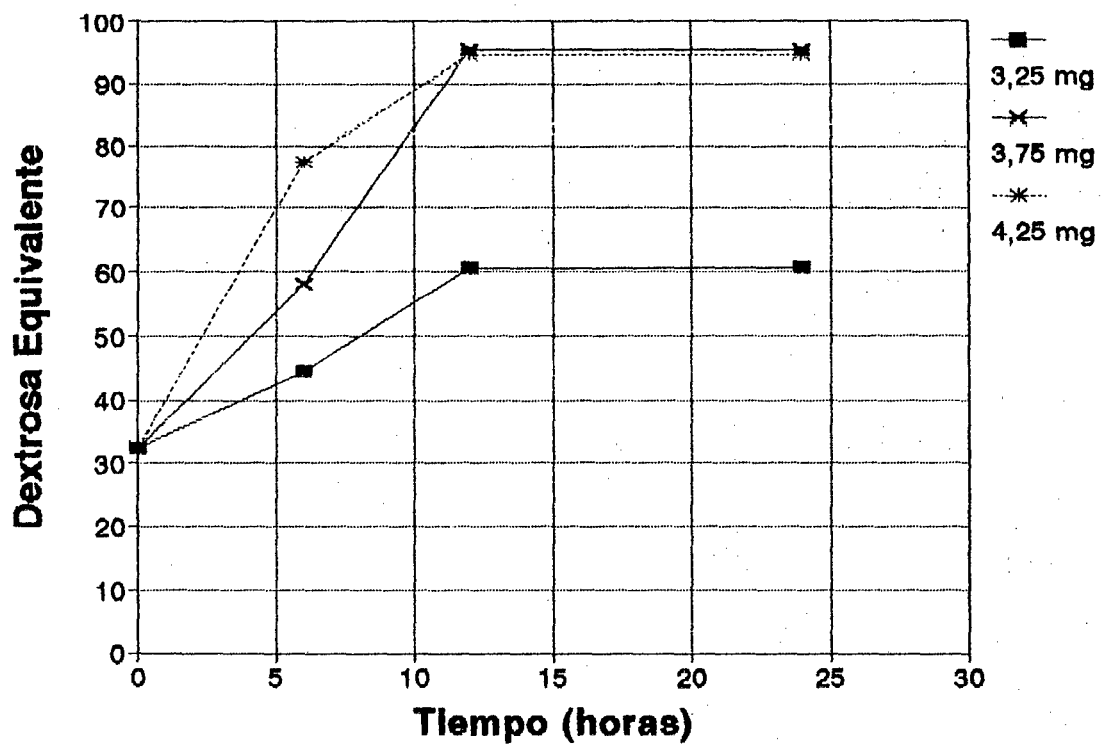


Figura 20: Influencia del tiempo de sacarificación para la máxima conversión del almidón de harina de arrocillo y ñelén.

En el Cuadro 36 se ve que la reacción de hidrólisis no fue completo debido a muchos factores especialmente relacionados a los equipos, pues según SIN y CHERYAN (53); MACALLISTER, WARDRIP y SHNYDER (38) toda reacción de hidrólisis es completa, es decir de 100 partes de almidón resultarán 111 partes de glucosa debido a la adición de agua en la unidad de almidón.

Cuadro 36: Porcentaje de conversión promedio de los hidrolizados producidos durante la sacarificación con sustrato de 300 g/l.

Tiempo (horas)	Amiloglucosidasa (mg/g)		
	3,25	3,75	4,25
6	40,05	52,11	69,66
12	54,45	85,86	85,23
24	54,63	85,86	85,23

(*) Conversión : DE x 0,9

$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{P.M del polímero del almidón}}{\text{P.M molécula de glucosa}}$$

$$\text{Factor de conversión} = \frac{162}{180} = 0,9$$

En el Cuadro 37 se muestra el análisis de varianza para la DE producida durante la sacarificación, resultando significativo la diferencia para la concentración y el tiempo tal como se

Cuadro 37: Análisis de variancia para la dextrosa equivalente producida durante la sacarificación del almidón de harina de arrocillo y féculen dextrinizado.

Fac. Var.	G.L.	S.C.	F.c.	Sig.
Concentración (A)	2	1453.15166667	6.44	0.0321
Tiempo (B)	3	5333.41333333	15.75	0.0030
Modelo Gral.	5	6786.56500000	12.03	0.0044
Error	6	677.16166667		
TOTAL	11	7463.72666667		

confirma en el Cuadro 38 de la prueba de Tukey donde la concentración de 4,25 mg/g y la de 3,75 mg/g no tiene diferencia estadística ni la tienen la 3,25 mg/g con la 3,75 mg/g pero si existe entre la 4,25 mg/g y la 3,25 mg/g por esta razón nosotros tomamos el valor medio que es de 3,75 mg/g como la mejor concentración; en lo que respecta al tiempo podemos decir que estadísticamente los tiempos de 12 y 24 son iguales pero difieren de los tiempos de 0 y 6 horas donde la enzima actúa con su mayor reacción.

Cuadro 38: Prueba de Tukey para la dextrosa equivalente producida durante la sacarificación del almidón de harina de arrocillo y féculen dextrinizado en función de la concentración y el tiempo.

Variable	Diferencia Tukey	Prom. N	Trat.
Concentración (A)	A	74.800 4	2
	B A	70.275 4	3
	B	49.525 4	1
Tiempo (B)	A	83.600 3	4
	A	83.533 3	3
	A	59.933 3	2
	B	32.400 3	1

Para complementar este análisis afirmamos que desde el punto de vista de rendimiento de la operación es más ventajoso utilizar concentraciones altas de enzimas porque disminuye el tiempo de hidrólisis originando un ahorro de energía; pero no podemos ignorar que la utilización de mayores dosis de enzima aumenta significativamente el costo de producción que originará un mayor valor en el costo de las unidades producidas.

c. Purificación del jarabe crudo y cristalización parcial de la glucosa

Puesto que la materia prima utilizada fue harina de arrocillo y ñelén, al producto de las dos hidrólisis enzimática se le sometió a un proceso de centrifugación para retirarle el material sólido consistente en proteína y fibra esencialmente y así tener el líquido o jarabe crudo que contiene la glucosa con sales en solución.

El residuo sólido obtenido pesa aproximadamente 357 g. y tiene una humedad de 74.3% y al ser secado pesó aproximadamente 60 g. de un sub producto de color crema que presenta la composición que se ilustra en el Cuadro 39.

Como se observa en el Cuadro 39 el sub - producto obtenido tiene un alto % de proteínas y tiene precipitados de sales minerales como consecuencias del NaCl y CaCl₂ agregado en la hidrólisis inicial.

Cuadro 39: Composición básica del Sub - producto secado obtenido después de la centrifugación del Sub - producto obtenido de las dos hidrólisis del almidón de harina de arrozillo y ñelén.

Componente	Peso	
	g.	%
Humedad	4,80	8,00
Proteína (N x 6,25)	10,20	17,00
Fibra	3,30	5,50
Grasa	2,10	3,50
Otros (Minerales y sales precipitados)	39,60	66,00
TOTAL	60,00	100,00

El líquido o jarabe crudo obtenido con 19 °Brix contenía aproximadamente 47,5% de materia seca constituida esencialmente por la glucosa y las sales disueltas. El rendimiento con respecto al peso de almidón inicial (74,01 Kg.) está en el orden del 64,18 % el cual sin duda alguna puede ser mejorado al pasar de un proceso en batch a nivel de Laboratorio y planta piloto a un proceso continuo como ocurre a nivel industrial.

El jarabe crudo se somete a un tratamiento con carbón activado y posterior filtración múltiple usando papel filtro fino se obtuvo así un líquido claro y translúcido con 18,6 °Bx. El cual se evaporó hasta una concentración de 84 °Bx.

Este jarabe concentrado se dejó reposar a temperatura ambiente hasta cuando cristalizó espontáneamente lográndose un producto sólido que tenía una humedad del 14,3 % y una dextrosa equivalente (DE) de 98,6.

Este valor de la DE está dentro del intervalo de valores de 96 a 99 reportados por BENAVIDES y CABRERA (8) GONZALES (25) y TORRES (56).

Lo anterior permitió suponer que el producto obtenido en este trabajo con glucosa, para lo cual se encargaron realizar análisis cualitativo de carbohidratos por cromatografía de capa delgada y determinación, de la rotación específica en el producto y en un patrón de glucosa, tal como se ilustra en el Cuadro 40 y Cuadro 41 respectivamente.

Cuadro 40: Análisis cualitativo de carbohidratos por cromatografía de capa delgada para glucosa maltosa y el producto obtenido.

Azúcar	Rf. Teórico	Rf. Experimental
Glucosa	0,55	0,50
Maltosa	0,30	0,30
Producto obtenido	----	0,50

Cuadro 41: Determinación de la rotación específica en el producto obtenido y en un patrón de glucosa

Azúcar	Rotación a 20 ° C
Patrón de monohidrato de glucosa (Merck R.A.)	48,6 °
Producto obtenido	48,6 °

Según los Cuadros 40 y 41 se puede afirmar después de los análisis que el producto obtenido corresponde a monohidrato de glucosa.

El aspecto del producto fue el de un polvo blanco. Este aspecto de la glucosa es similar al descrito por BENAVIDES Y CABRERA (8).

3. Diagrama de flujo definitivo para la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón de harina de arrocillo y ñelén.

La Figura 21 nos muestra el flujo de procesamiento definitivo para la hidrólisis enzimática del almidón de la harina de arrocillo y ñelén tratado con α -amilasa (CANALPHA 345 P) y amiloglicosidasa (AMYLO 300 L) para la licuefacción y sacarificación respectivamente, también se indica en su purificación del jarabe crudo y su cristalización parcial en glucosa monohidratada, como producto final parcial, pues el jarabe de glucosa siempre complementa el producto final. Los parámetros óptimos de cada operación se describen a continuación.

Dispersión

La harina de arrozillo y féculen a la concentración de 300 g/l se dispersa en agua tratada.

Acondicionamiento

La dispersión se adiciona NaCl en una proporción de 3,0 g/l y CaCl₂ en una proporción de 0,5 g/l para ajustar el pH a 7,0.

Pre - calentamiento

La suspensión de harina se calienta a 70 ° C para producir la gelatinización del almidón.

Gelatinización

Se mantiene la temperatura de 70 ° C durante 3 minutos hasta que se produzca la gelatinización.

Licuefacción

Se mantiene la temperatura anterior agregando inmediatamente en que se produce la gelatinización la α - amilasa CANALPHA 345 P en dosis de 2,1 mg/g y se mantiene en estas condiciones durante 60 minutos hasta una DE aproximada de 32,3; pudiendo variar de acuerdo a como se varia la dosis de enzima, el tiempo de dextrinización.

Inactivación y ajuste de pH

Transcurrido los 60 minutos de licuefacción se inactivan las enzimas agregando ácido clorhídrico (HCl) en un porcentaje de 5% PV, bajando al mismo tiempo el pH a 4,5 que va a facilitar el accionar de la amiloglucosidasa.

Sacarificación

Después de haber ajustando el pH se bajó la temperatura a 65°C y se agrega la amiloglucosidasa AMYLO 300 L en dosis de 3,75 mg/g. Esta

operación tiene un tiempo de duración de 12 horas a una agitación constante y lenta para obtener una DE de 85,86.

Inactivación

Después de la sacarificación se inactivan las enzimas agregando hidróxido de sodio (NaOH) en porcentaje de 4% PV para neutralizar el medio; la temperatura continua siendo 65°C.

Centrifugación

La suspensión obtenida se centrifugo con la finalidad de separar el jarabe crudo de glucosa y un residuo sólido y facilitar de esta manera la operación de clarificación. Después del centrifugado se consiguió un jugo con 19°Bx.

Clarificación

El jarabe crudo hidrolizado se clarifica con carbón activado en polvo en un porcentaje de 5% (PV) a la temperatura de 40 a 50°C por un tiempo aproximado de 30 minutos.

Filtración

En esta operación se separa los trazos de grasa folículos de proteína. La proteína enzimática que son el material que le dan cierta turbidez al jarabe. También se separa ciertas sales y restos de materia insoluble, teniéndose un líquido claro y translúcido con 18,6°Bx.

Concentración

El líquido purificado con 18,6 °Bx se concentró por evaporación hasta 84°Bx, obteniéndose el jarabe de glucosa muy viscosa y clara, éste jarabe al dejarse en reposo se cristaliza parcialmente obteniéndose un producto con una dextrosa equivalente de 98,6.

HARINA DE ARROZ (Arrocillo y ñelen)

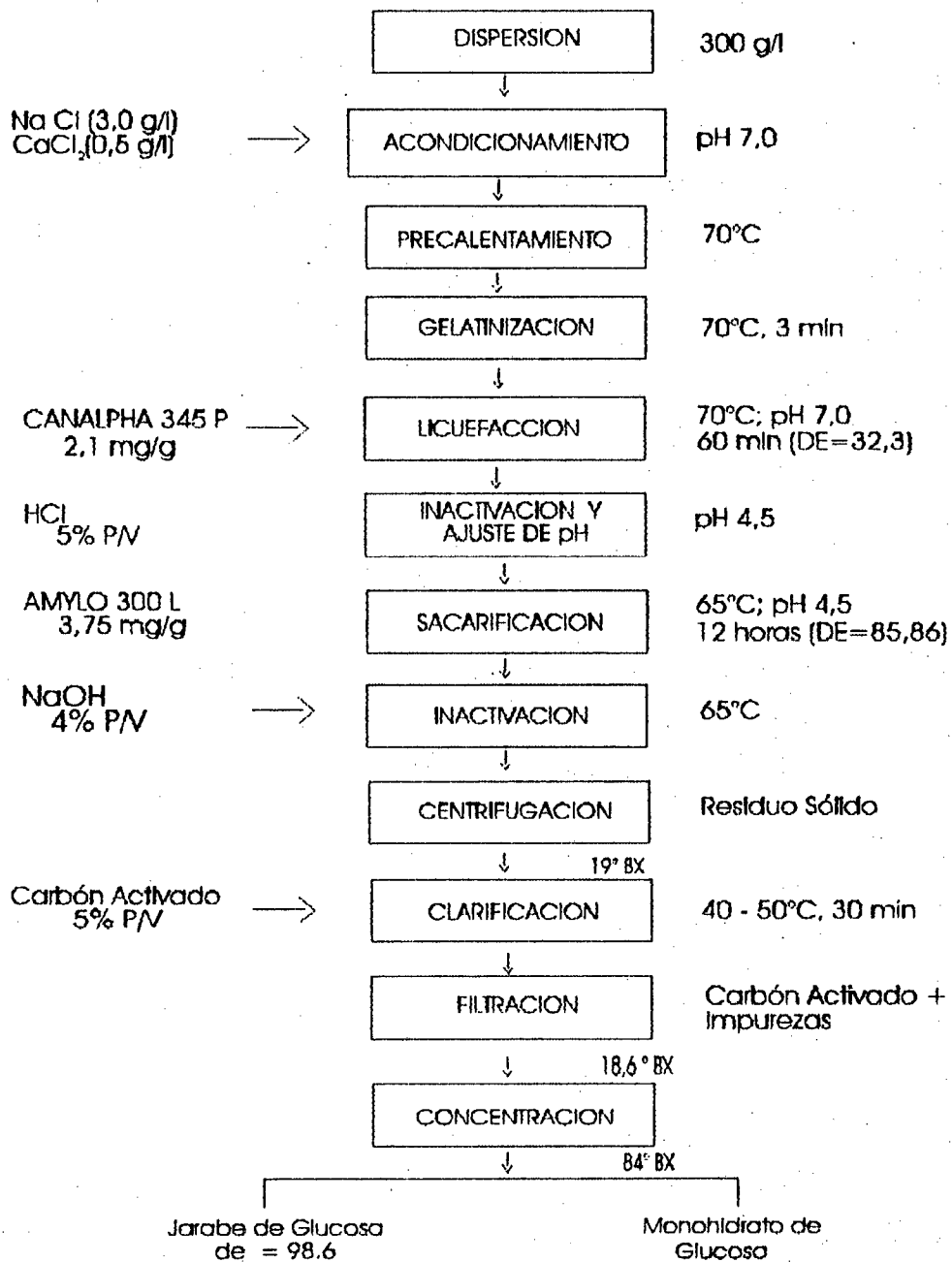


FIGURA 21 : Flujograma definitivo para la obtención de jarabe de glucosa alta conversión del almidón de harina de arrocillo y ñelén.

4. Balance de materia prima para la obtención del jarabe de glucosa

En la Figura 22 se muestra el balance de materia del proceso de hidrólisis enzimática para 300 g de materia en base seca donde se aprecia que inicialmente se incrementa éste valor en más de 3 veces, debido a la incorporación de 1000 g. de agua para preparar la dispersión teniéndose 1300 g., éste valor se incrementa para la licuefacción y sacarificación debido a que agregamos las enzimas y algunos compuestos químicos para ajustar el pH y para inactivación llegando a un valor de 1610.35 g. después de la segunda desactivación. En la centrifugación se pierde 356 g. en residuo sólido.

En la filtración también se elimina el carbón activado más impurezas que suman juntos 67,81 g. y finalmente en la concentración se elimina 927,91 g. de agua, quedando un jarabe concentrado de 263.89 g. que equivale a un rendimiento de 87,96 %.

5. Características físico-químicas del jarabe de glucosa obtenido del almidón de harina de arrozillo y ñelón.

En el Cuadro 42, se tiene algunas características físico - químicas del jarabe de glucosa concentrado.

HARINA DE ARROZ (Arrocillo y ñelen)

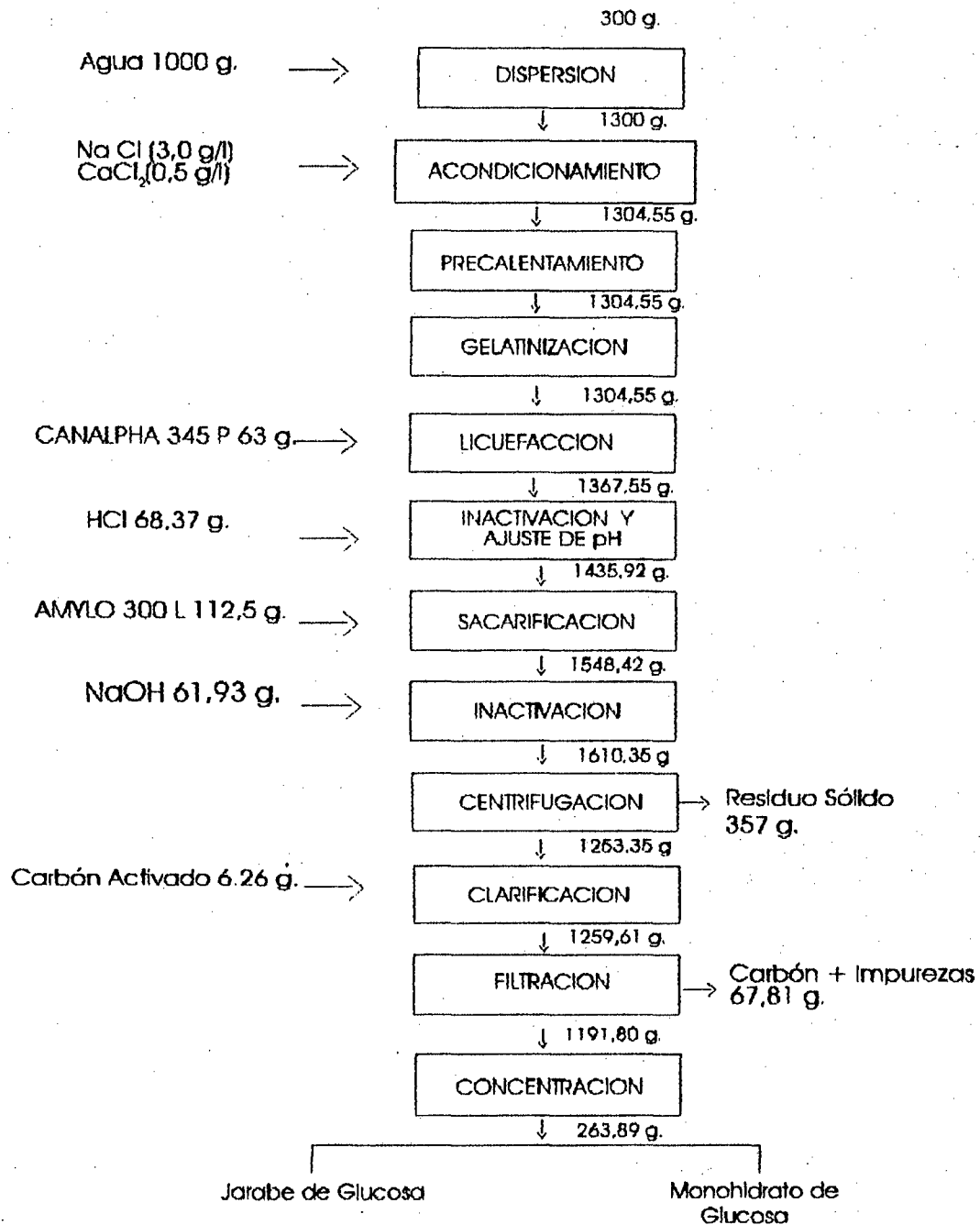


FIGURA 22 : Balance de Materia para la obtención de Jarabe de glucosa del almidón de arrocillo y ñelén.

Cuadro 42: Características Físico - química del jarabe de glucosa de arrocillo y fielen concentrado.

Componentes	% ó Contenido
DE	98,6
Humedad	16,0
SS(°Bx)	84,0
pH	4,5
Densidad (g/ml)	1,22
Rendimiento	87,96 %
Apariencia	Claro, translúcido viscoso
Estabilidad	Inestable (cristaliza)

Como se observa en el Cuadro 42 la DE obtenida es de 98,6 que es superior a la DE de glucosa de pituca y glucosa comercial que reporta TORRES (56) y lo que establece el ITINTEC (28).

La humedad es inferior a lo reportado por TORRES (56) y los sólidos solubles superior, teniendo el jarabe concentrado una densidad de 1,22 g/ml y un rendimiento de 87,96 %.

En lo que concierne a la apariencia y estabilidad el producto obtenido es claro, translúcido, viscoso e inestable respectivamente coincidiendo con las características que reporta TORRES (56).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en la presente investigación se establece las siguiente conclusiones.

1. Es factible tecnológicamente elaborar un jarabe de glucosa por licuefacción y sacarificación del almidón de harina de arrocillo y ñelén, el que puede ser concentrado para que luego se cristalice la glucosa espontáneamente.
2. Los parámetros óptimos para la obtención de jarabe de glucosa mediante α -amilasa (CANALPHA 345 P) y amiloglucosidasa (AMYLO 300 L) es como sigue.
 - a. Para la cinética de la hidrólisis de la harina de arrocillo y ñelén (arroz)
 - Las enzimas hidrolíticas durante la licuefacción (α -amilasa) y sacarificación (amiloglucosidasa) actúan más rápidamente a menores concentraciones de sustrato.
 - La reacción enzimática es mayor a mayores dosis de enzima en la relación enzima sustrato.
 - El tiempo es un factor muy importante en la cinética de la hidrólisis, especialmente a los primeros 60 minutos.

- b. Para la hidrólisis enzimática del almidón de harina de arrozillo y ñelen
- Para la dispersión utilizar 300 g/l de sustrato, acondicionar a un pH de 7,0 agregando NaCl y CaCl₂ en dosis de 3,0 g/l y 0,5 g/l respectivamente.
 - En la licuefacción utilizar α-amilasa CANALPHA 345 P en dosis de 2,1 mg/g a 70°C y un pH de 7,0 durante 60 minutos.
 - La sacarificación hacerlo con amiloglucosidasa AMYLO 300 L en dosis de 3,75 mg/g. a 65°C y un pH de 4,5 durante doce horas.
 - El producto sólido que cristaliza se trata de un monohidrato de glucosa.
3. Físico-químicamente el jarabe de glucosa concentrado tiene 98,6 de DE; 16,0 % de humedad; 84 °Bx; pH 4,5; densidad 1,22 g/ml; un rendimiento de 87,96 % siendo su apariencia claro - translúcido viscoso y muy inestable porque cristaliza con facilidad.

VI. RECOMENDACIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede recomendar a la harina de arrocillo y ñelén como materia prima para producir jarabe de glucosa y glucosa monohídrica.
2. Realizar estudios para utilizar el residuo sólido como materia prima para usarse en la elaboración de concentrados para alimentación animal y eventualmente en la preparación de alimentos para consumo humano.
3. Realizar estudios de isomerización con jarabes de glucosa de harina de arrocillo y ñelén para obtener fructosa y consiguientemente sacarosa.
4. Dada la importancia económica que tendría para el país la producción de glucosa usando harina de arrocillo y ñelén y/o de arroz se recomienda efectuar los estudios técnico - económicos correspondientes a la aplicación del dicho proceso a nivel de planta piloto y a nivel industrial.

VII. RESUMEN

El presente trabajo fue ejecutado a nivel de laboratorio en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, tiene como finalidad primordial utilizar el almidón de la harina de arrocillo y ñelén (arroz). La variedad utilizada fue la Ucayali 91.

Inicialmente estudiamos la materia prima en lo referente a su composición química proximal, características fisicoquímicas y análisis microbiológico.

El segundo paso a seguir fue obtener la harina de arrocillo y ñelén para reducir las partículas y de esta manera aumentar la superficie de contacto del sustrato para una mejor acción de la α -amilasa (CANALPHA 345 P) y de la amiloglucosidasa (AMYLO 300 L).

En el estudio de la cinética de la hidrólisis de la harina de arrocillo y ñelén (arroz) se trabajó con dos concentraciones de sustrato (20 y 40%); α -amilasa (CANALPHA 345 P a 2,1 mg/l a 70°C, por 30 minutos, a pH de 7,0); obteniéndose mejores resultados en el primer sustrato. Los productos hidrolizados así obtenidos se sometió a la acción hidrolítica de la enzima amiloglucosidas (AMYLO 300 L a 65°C y a un pH de 4,5 ajustado con ácido cítrico 1M, empleándose dosis de 3,74 y 1,87 mg/g, durante 10 horas); obteniéndose resultados mejores para la menor concentración de sustrato y para la mayor dosis de amiloglucosidasa; también se determinó que el tiempo es un factor muy importante en la cinética de la hidrólisis.

Para la hidrólisis enzimática del almidón de harina de arrocillo y ñelén, se trabajó con tres concentraciones de sustrato: 200, 300 y 400 g/l; con dos tipos de enzima: la α -amilasa (CANALPHA 345P en dosis de 1.6, 2.1, 2.6 mg/g) y la amiloglucosidasa (AMYLO

300L en dosis de 3.25, 3.75, 4.25 mg/g); se evaluaron los tiempos de hidrólisis. Después de la experimentación se determinó los parámetros óptimos para obtener un jarabe de glucosa a partir del almidón de arrochillo y ñelén. Estos parámetros óptimos se indican en el diagrama definitivo y en las conclusiones.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUIRRE, V. 1992. Obtención de jarabe de glucosa por vía enzimática a partir del almidón de umari. Tesis Ms. Sc. UNALM. Perú. pp. 95.
2. AID. 1976. Manual de Producción de cultivo de Arroz. Limusa. México. D.F. México. pp. 85.
3. AOAC. 1960. Official Methods of analysis of the association of agriculture chemistry. Ninth Edit. Washington. USA. pp. 585.
4. ARAULLO, E.V. 1976. Rice Postharvest Technology. Internacional Development Research Centre. Oltawa - Canadá.
5. BADUI, D. 1995. Química de los alimentos. 3 ed. Alhambra Mexicana. México. pp. 648.
6. BARRET, T. 1975. Enzymes uses in the milling and baking industries. In enzymes in food processing. 2 edic. Academic press. New York, USA. pp. 312.
7. BARRUETA, J.; LABAJOS, B. y COCA, J. 1992. Utilización de enzimas en la industria de los alimentos. alimentación, equipos y tecnología. España. 11 (10): 79 - 86.
8. BENAVIDES, M. y CABRERA, J. 1984. Elaboración de productos alimenticios de baja viscosidad a base de harina de arroz mediante hidrólisis enzimática. Tecnología N°151. Colombia. pp. 9 -36
9. BERGHOFER, E y SARHADDAR, S. 1988. Production of glucose and high - fructose syrup by enzymatic direct hydrolysis of cassava roots. Process Biochemistry. USA. pp. 188 - 194.
10. BRAVERMAN, J.B.S. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Omega S.A. Barcelona, España. pp. 240.
11. BRUCHMANN, E. 1980. Bioquímica Técnica. Acribia. Zaragoza - España. pp. 233.

12. CAMPOS, D. 1993. Aplicaciones Biotecnológicas en el Procesamiento de Frutas y Vegetales. Programa de desarrollo empresarial. INDDA - UNALM. Lima, Perú. pp. 40.
13. CANDIOTT, I; FEIJOO, M. 1977. Estudio Técnico para la elaboración de harina precocidas a partir de frijoles. Tesis UNALM. Lima, Perú. pp. 121.
14. CARASIK, K y CARROLL, J. 1983. Development of immobilized enzymes for the production high - fructose corn syrup. Food technology, Chicago, USA. 37 (10): 85 - 91.
15. CODEX ALIMENTARIUS. 1995. Azúcares, productos del cacao y el chocolate y productos diversos. 2 ed. FAO/OMS. Roma, Italia. Vol. II. 9 - 13.
16. COLLAZOS CHIRIBOGA, C. 1962. La composición de los alimentos Peruanos. Ministerio de Agricultura Lima, Perú. pp. 43.
17. COULTATE, T. 1984. Alimentos. Acribia. Zaragoza - España. pp. 199.
18. E.I.U.U. 1961. Tabla de Composición de Alimentos para América Latina U.S. Government Printing Office - USA. pp. 57.
19. FAO - ONU. 1949. Tabla de Composición de Alimentos. FAO - ONU. Washington, USA. pp. 68.
20. FENNEMA, O.R. 1993. Química de los Alimentos. Acribia. Zaragoza - España. pp 133 - 134.
21. FERNANDEZ, G. 1969. Consideraciones para el diseño de plantas de procesamiento de arroz. Ministerio de agricultura. Lima. Perú. pp. 32.
22. GACESA, P. Y HUBBLE, J. 1980. Tecnología de las Enzimas. Acribia. Zaragoza, España. pp. 199.
23. GEORGING, K. 1972. New Starches III. Propiedades de los gránulos de Almidón de Pituca. Cereal Chemistry. USA. 49: 712 - 719.

24. GODFREY, T. AND REICHELT, J. 1983. Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. The Nature Press. Gran Bretaña, England. pp. 582.
25. GONZALES, C. 1977. Obtención de dextrinas a partir de almidones de papa y yuca. Tesis UNALM. Lima, Perú. pp. 230.
26. GRACE, O. 1997. Elaboración de la yuca. Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y Alimentación Roma, Italia. Colección FAO: Producción y Protección vegetal nº3. pp. 162.
27. INEI. 1994. Instituto Nacional de Estadística e informática. Dirección Técnica de indicadores Económicos. Tomo 2. Lima, Perú. pp. 235.
28. INIPA. 1983. Programa Nacional de Arroz. Documento Base. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú. pp. 115.
29. ITINTEC. 1974. Almidón de maíz no modificado, uso alimentario y farmacéutico. Norma 209.064. ITINTEC. Lima, Perú.
30. JAY J.M. 1978. Microbiología moderna de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, España. p 491.
31. KAINUMA, K. 1984. Starch: Oligosacarides: Lineal, branched and cyclic. In Starch: Chemistry and technology. 2 ed. Academic press. London, England. pp. 125 - 154.
32. KENT, J. y AMOS, A.J. 1967. Química Moderna de los Cereales. Aguilar. Madrid - España. pp. 12,130.
33. KHALIN, N y MARKAKIS, P. 1981. Production of high - fructose syrup from cassava starch. M. Sc. Thesis East Lansing. Michigan State University. USA. 15 (3): 85.
34. KULP, K. 1975. Carbohydrases. In Enzymes in food processing. 2 Ed. Academic press. New York, USA. pp. 54 - 113.

35. LAGES, A. and TANNENBAUM, R. S. 1978. Production of glucose from tapioca (cassava starch) and farinha de mandioca (cassava meal) *Journal of food science*. USA. 43 (4): 1012 - 1014, 1018.
36. LAZO M. 1983. Características de dos variedades de centeno de sus harinas y empleo en Panificación. Tesis UNALM. Lima, Perú. pp. 126.
37. LLOYD, N. and NELSON, W. 1984. Glucose and fructose containing sweeteners from starch. In *starch: Chemistry and technology*. 2 ed. Academic press. London, England. pp. 611 - 656.
38. MACALLISTER, E; WARDRIP, K y SCHNYDER, J. 1975. Modified starchs, corn syrups containing glucose and maltosa, corn syrup containing glucose and fructose, and crystalline dextrosa. In *Enzymes in food processing*. 2 ed. Academic press. New York, USA. pp. 331 - 359.
39. MARIN BARATTA, M. 1976. Estudio tecnológico y nutricional de harina de maíz opaco 2 y maíz amarillo vitreo en panificación. Tesis UNALM. Lima, Perú. pp. 110.
40. MERMELSTEIN, N. 1975. Immobilized enzymes produce high - fructose corn syrup. *Food technology*. Chicago, USA. 29 (6): 20 - 21.
41. Mc CANCE AND WIDDOWSON. 1978. *The Composition of Foods*. Elsevier Press. London - England. pp. 89.
42. MILES. 1978. Diazyme. Glucoamilase fungica para hidrolise do almidon. *Informacao técnica*. Lab. Miles. Brasil. pp. 9.
43. MOSSEL Y QUEVEDO. 1967. *Control Microbiológico de los alimentos*. UNMSM. Lima, Perú. pp. 67.
44. NOVO. 1977. Sweetzymes R Tipo A. *Boletín de información técnica*. Novo Industri. a/s. pp. 12.

45. PARK, Y. PAPINI, R. 1970. Producaõ de xarope de glicose do amido do mandioca pelo método enzimo - enzimo. Instituto de tecnologia de alimentos. Brasil. 3: 65 - 74.
46. PELCZAR, M. J y REID, R. D. 1977. Microbiología. Mc Gaw Hill. México. DF México. pp. 199.
47. POTTER R. N. 1973. La ciencia de los alimentos. Edutex S. A. México. DF México. pp. 238.
48. REED, G. 1975. Enzymes in Food Processing. 2 ed. Academic Press. New York, USA. pp. 550.
49. ROBYT, F. 1984. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In starch: Chemistry and technology. 2 ed. Academic press. London, England. pp. 87 - 123.
50. RODRIGUEZ, P. 1992. Estudio de la modificación de las propiedades fisicoquímicas del almidón de quinua por acción de alfa - amilasa. Tesis M. Sc. UNALM. Lima, Perú. pp. 124.
51. SCHMIDT HEBBEL, H. Y PENNACCHIOTTI, I. 1982. Las Enzimas en los Alimentos: Su importancia en la Química y Tecnología de los Alimentos. Santiago de Chile, Chile. pp. 91.
52. SCHWARTZ, M. M. 1990. El maíz. Fuente de jarabe de glucosa y alto contenido de fructosa. Alimentos. Chile. 15 (1): 17 - 21.
53. SIM, K y CHERYAN, M. 1992. Continuous production of glucose syrup in an ultrafiltration reactor. Journal of food science. USA. 57 (1): 163 - 166.
54. SUCCAR KNUDSEN, J. 1979. Investigación Tecnológica y Nutricionales sobre el uso de arroz en la Elaboración de Fideos y su Enriquecimiento con Soya. Tesis U.N.A.L.M. Lima, Perú. pp. 124.

55. TOPOLANSKI, E. 1975. Arroz y Riesgo. Hemisferio Sur. Buenos Aires - Argentina.
pp. 25 - 28.
56. TORRES, S. W. J. 1996. Obtención de jarabe de glucosa de almidón de Pituca (Colocasia esculenta schott) por acción de alfa amilasa y amiloglucosidasa.
Tesis UNAS, Tingo María. Perú. pp. 147.
57. WITTIG, E y WEINACKER, R. 1990. Aspectos tecnológicos de los edulcorantes.
Alimentos. Chile. 15 (2): 49 - 57.
58. WHISTLER, R. 1964. Methods in carbohydrate chemistry. Edit Academic press.
New York, USA. Vol IV. pp. 246 - 257.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Método espectrofotométrico para la determinación de azúcares reductores

Para éste método se utiliza los siguientes reactivos:

- 2,4 dinitrofenol
- Fenol
- Tartrato de sodio y potasio
- Hidróxido de sodio
- Solución patrón de glucosa al 0,11 %

1. Reactivo de Ross

Se prepara teniendo en cuenta las siguientes soluciones.

Solución A:

Disolver 7,145 g. de 2-4 dinitrofenol en 230 ml. de hidróxido sodio al 5 %, calentar en agua hirviendo hasta que el 2-4 dinitrofenol se disuelva. Luego adicionar 2,5 g. de fenol, calentar de 2-4 minutos más o menos hasta que la solución tenga trazas de color claro o transparente.

Solución B:

Disolver 100 g. de tartrato de sodio y potasio en 500 ml. de agua destilada aproximadamente. Luego se procede a mezclar las soluciones A y B, completando a 1000 ml. en una flota cuidando que el líquido esté frío.

Seguidamente se procede a determinar la curva patrón, a partir de las diferentes concentraciones, a partir de ésta. Las concentraciones se deben preparar utilizando 0,1 ml. a 0,1 ml. de solución madre o patrón, completándose a 2 ml. con agua destilada. Las concentraciones preparadas se tratan como a una muestra adicionándoseles 6 ml. del reactivo de Ross, se calienta por 6 min., se enfrían y se realiza la lectura de transmitancia en el espectrofotómetro L & B - 20, a una longitud de onda de 620 nm.

Se construye la curva ploteando en el ordenada la absorbancia (previa transformación de la lectura en transmitancia), versus la concentración de glucosa en mg/ml., la curva debe ser inspeccionada de vez en cuando; y cada vez que se hace uso del espectrofotómetro, se debe chequear el blanco (8 ml. de agua destilada), la lectura del blanco debe ser 0,0 % de transmitancia y si no coincide, hay que regular la lectura al 0,0 % de transmitancia.

La transmitancia puede ser transformada a absorbancia, en función de la ley de BEER:

$$\frac{P}{P_0} = T = 10^{-\epsilon dc} \quad \delta$$

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{100}{\%T} = abc$$

Donde:

T = Transmittancia

A = Absorbancia

Además indica que las lecturas de las soluciones no debe ser mayor a 0,8 de absorbancia, cuando se utiliza el espectrofotómetro L & B.

2. Determinación de Azúcares Reductores

Se puede tomar muestra desde 0,5 hasta 2 g. de muestra secas finamente molidas, se colocan en una erlemeyer y se agrega 0.5 g. de bisulfito de sodio. Agitar bien filtrar con papel watman N° 40 - 41, del filtrado se toma 1 a 2 ml. al cual se agrega 6 ml. de reactivo de Ross. Se calienta en agua hirviendo por 6 minutos, enfriar con agua de caño que corra por las paredes exteriores del tubo, luego se coloca la solución problema en los recipientes de lectura del espectrofotómetro y se realiza la lectura a 620 nm, procurar hacer las lecturas en menor tiempo.

ANEXO 2

Determinación de Almidones

Se toma 0,5 g. de muestra en un frasco de boca ancha de 50 ml. luego se adiciona 10 ml. de ácido clorhídrico al 5% y poner en la autoclave por 3/4 de h. a 15 lb/pulg de presión manométrica y 121 °C.

Luego de ésta hidrólisis se neutraliza con 6 ml. de NaOH se enrasa con agua destilada y se mezcla bien. Se puede tomar de 0,5 a 1 ml. de solución problema con una pipeta volumétrica, luego se coloca en un tubo de prueba (Identificado), adiciona agua destilada hasta completar 2 ml. agregar 6 ml. de reactivo de Ross, se hace hervir por 6 minutos luego se enfría y se realiza la lectura en el espectrofotómetro a 620 nm.