

## Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de dextrano en jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) utilizando la metodología de superficie de respuesta.

## Optimization of the dextrane enzymatic hydrolysis process in sugar cane juice (*Saccharum officinarum*) using surface response methodology.

Chia Concepción, C.<sup>1</sup> , Sotelo Ganoza, K.<sup>1</sup> , Castillo Calderón, A.<sup>1\*</sup> , Diestra-Balta, J.<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Departamento Académico de Agroindustria y Agronomía. Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria, s/n, Urb. Bellamar, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú.

<sup>2</sup> Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología. Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria, s/n, Urb. Bellamar, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Chia Concepción, C., Sotelo Ganoza, K., Castillo Calderón, A., Diestra-Balta, J. (2023). Optimization of the dextrane enzymatic hydrolysis process in sugar cane juice (*Saccharum officinarum*) using surface response methodology. *Revista Bio Ciencias*, 10 e1421. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1421>

### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 26<sup>th</sup> 2022.

Accepted/Aceptado: February 27<sup>th</sup> 2023.

Available on line/Publicado: March 22<sup>th</sup> 2023.

### RESUMEN

El dextrano es un homopolisacárido de glucosa, formado en el jugo de caña de azúcar durante la postcosecha y es responsable de los bajos rendimientos de la evaporación y cristalización en la industria azucarera. La sacarificación enzimática del dextrano se ha destacado por sus rendimientos satisfactorios; sin embargo, dicho proceso enzimático requiere de una adecuada selección de la enzima y su concentración, así como el control de las condiciones ambientales de la biocatálisis. El objetivo de la presente investigación fue optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de dextrano del jugo de caña de azúcar mediante la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño central compuesto rotacional con tres factores independientes de cinco niveles: concentración de enzima, tiempo y temperatura de reacción y como variable respuesta: la reducción de la concentración de dextrano. Se utilizó la enzima comercial Dextranfree Xe la cual fue caracterizada cinéticamente. El experimento consistió en dos etapas, primero se utilizó un medio simulado de jugo de caña para determinar las condiciones óptimas y éstas aplicarlas después al jugo real de caña de azúcar. Las condiciones ambientales óptimas de hidrólisis del dextrano en el simulado de jugo de caña resultaron ser: concentración de enzima 224 ppm, tiempo de reacción 32 minutos y temperatura de reacción 36 °C, para alcanzar un 70 % de reducción de dextrano. Finalmente, las condiciones optimizadas fueron validadas aplicándolas al jugo de caña de azúcar, obteniéndose una reducción del 69.2 % de concentración de dextrano; siendo dicho proceso efectivo para su aplicación en la industria.

**PALABRAS CLAVE:** Hidrólisis, Dextranfree Xe; condiciones óptimas; reducción de dextrano.

### \*Corresponding Author:

Augusto Castillo Calderón. Departamento Académico de Agroindustria y Agronomía. Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria, s/n, Urb. Bellamar, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú. Teléfono: (+51) 949138172. E-mail: [acastillo@uns.edu.pe](mailto:acastillo@uns.edu.pe)

---

## ABSTRACT

---

Dextran is a homopolysaccharide of glucose, formed in sugarcane juice during post-harvest and is responsible for the low yields of evaporation and crystallization in the sugar industry. The enzymatic saccharification of dextran has been noted for its satisfactory yields; However, this enzymatic process requires an adequate selection of the enzyme and its concentration, as well as the control of the environmental conditions of the biocatalysis. The objective of the present investigation was to optimize the process of enzymatic hydrolysis of dextran from sugarcane juice using the response surface methodology. A central composite rotational design with three independent factors of five levels was used: enzyme concentration, reaction time and temperature, and as a response variable: reducing dextran concentration. The commercial enzyme Dextranfree Xe was used which was kinetically characterized. The experiment consisted of two stages, first a simulated cane juice medium was used to determine the optimal conditions and these were then applied to the real sugar cane juice. The optimal environmental conditions for dextran hydrolysis in the simulated cane juice turned out to be: enzyme concentration 224 ppm, reaction time 32 minutes and reaction temperature 36 °C, to achieve 70 % dextran reduction. Finally, the optimized conditions were validated by applying them to the sugarcane juice, obtaining a reduction of 69.2 % in dextran concentration; said process being effective for its application in the industry.

---

**KEY WORDS:** Hydrolysis, Dextranfree Xe; optimal conditions; dextran reduction.

---

## Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una de las materias primas de relevancia mundial para la producción de azúcar (sacarosa) (Lu *et al.*, 2017). Sin embargo, durante el período postcosecha y el procesamiento de los tallos de caña de azúcar, dicha materia prima sufre la reducción de su contenido de sacarosa debido a diversos factores tales como las condiciones climáticas, tiempos de espera entre cosecha y procesamiento, variedad de caña de azúcar, microorganismos presentes, entre otros (Misra *et al.*, 2020a), dándose pérdidas irreparables según cada etapa donde se origina influencias por deterioro químico (16 %), deterioro enzimático (22 %) y deterioro microbiológico (62 %). Siendo de esta última, el *Leuconostoc mesenteroide* la especie microbiológica que se desarrolla con mayor velocidad en la caña de azúcar, rompiendo la molécula de sacarosa a través de la enzima dextransacarasa, dándose así origen a la dextrana uno de los problemas más perjudiciales, ocasionando además daños mecánicos en los equipos, tuberías, bombas, entre otros (Petit, 2021).

El dextrano es un homopolisacárido extracelular conformado por unidades de glucosa unidas predominantemente por enlaces glucosídicos  $\alpha$ - (1,6) y también conteniendo enlaces del

tipo  $\alpha$ - (1,2)  $\alpha$ - (1,3) y  $\alpha$ - (1,4) (Khalikova et al., 2005). La estructura del dextrano, su grado de ramificación y propiedades estructurales varía ampliamente según la cepa microbiana productora de dextrano específica y el tipo de enzima dextransucrasa (Ninchan et al., 2017). El dextrano es responsable de muchos de los problemas en la industria azucarera, tales como el incremento de la viscosidad del jugo de caña de azúcar, deficiencias en la transferencia de calor, reducción en la cristalización de sacarosa, entre otros (Khalikova et al., 2005; Ninchan et al., 2017); por ello la importancia de la reducción del contenido del mismo en el jugo de caña de azúcar.

Entre las alternativas estudiadas, se ha reportado la utilización de tratamientos químicos para reducir la concentración microbiana (Misra et al., 2020a; Misra et al., 2020b), procesos de membrana (Li et al., 2020; Lu et al., 2017), y procesos de hidrólisis enzimática con dextransasas, los cuales se han destacado por sus rendimientos satisfactorios (Eggleston & Monge, 2005; Sufiate et al., 2018). En relación con lo anterior, las dextransasas (EC 3.2.1.11; 1,6- $\alpha$ -D-glucan-6-glucanohidrolasa) son enzimas producidas por microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Los hongos filamentosos son las fuentes comerciales más importantes de dextransasas nativa y recombinante (Martínez et al., 2021; Liu et al. 2019; Li et al., 2016). Las dextransasas hidrolizan el enlace  $\alpha$ -D-1,6-glucosídico de la cadena lineal de la estructura del dextrano en sitios endógenos aleatorios, logrando romper la estructura de alto peso molecular en moléculas de menor tamaño y más manejables y eventualmente en oligosacáridos, tales como isomaltotriosa, isomaltosa y glucosa como productos finales (Ninchan et al., 2017).

Sin embargo, dichos procesos enzimáticos requieren de una adecuada selección de la enzima y su concentración, así como el control de las condiciones ambientales de la biocatálisis, incluyendo el pH, temperatura, tiempos de residencia, agitación y concentración de sustrato (Eggleston & Monge, 2005; Sufiate et al., 2018). Asimismo, la aplicación de dextransasa en el proceso productivo del azúcar aún también requiere determinar el tipo de enzima a utilizar, y en qué etapa del proceso proceder con la hidrólisis enzimática, dado que cada paso del proceso productivo del azúcar requiere diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de sacarosa, entre otros, las cuales afectan la actividad enzimática y la capacidad de hidrolizar las moléculas de dextrano (Ninchan et al., 2017). Se ha reportado que reducir el contenido de dextrano en etapas tempranas del proceso es la opción más eficiente, por ello se ha estudiado la hidrólisis del dextrano presente en el jugo de caña de azúcar mediante procesos enzimáticos (Oropeza et al., 2019).

La presente investigación tuvo por objetivo optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de dextrano en jugo de caña de azúcar mediante la metodología de superficie de respuesta.

## Material y Métodos

### Materia prima, enzima y dextrano

Se utilizó caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) de la variedad México-73 cosechada en Caylan, distrito de Nepeña, provincia del Santa, región Áncash, Perú. En todos los experimentos se utilizó la enzima comercial Dextranfree Xe (en forma líquida no viscosa, color ámbar o ligeramente

amarillo, es 100 % soluble en agua, con actividad enzimática de 25,000 UD/g. Producida y comercializada por la empresa Enmex S.A. en la ciudad de México, su presentación es de 25 kg), es una dextranasa (1,6- $\alpha$ -D-glucano-6-glucanohidrolasa) proveniente de *Chaetonium erraticum*, con la cual se prepararon diluciones enzimáticas según las condiciones establecidas en los experimentos. Asimismo, se utilizó dextrano (T-2000 Sigma Aldrich) procedente de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, el cual según información del proveedor tiene una masa molecular promedio de 2,000,000 g/mol.

## Caracterización enzimática

### Rango de linealidad

Para determinar el rango de linealidad de la enzima se midió la velocidad de reacción de diluciones de la enzima (1:2, 1:4, 1:5 y 1:10) en una solución tampón acetato 0.1M a pH 5.5 actuando sobre una solución de dextrano de 500 ppm. Para ello, en un baño maría se incubaron tubos de ensayo conteniendo 2.7 mL de la solución de dextrano a 45 °C por 3 min, se añadieron 0.3 mL de dilución enzimática y se dejaron reaccionar por 0, 10, 20 y 30 min. Para detener la reacción, se introdujeron los tubos en un baño maría a 100 °C por 3 min. Se retiraron los tubos del baño maría y se colocaron en hielo. También se emplearon un blanco enzima y un blanco sustrato. La generación de azúcares reductores se determinó mediante el método del ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller, 1959).

### Actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó midiendo la velocidad inicial de reacción por triplicado, tomando como referencia la dilución y el tiempo de reacción definidos en la evaluación del rango de linealidad. Para ello, se incubaron muestras de 2.7 mL de una solución de dextrano (500 ppm) con 0.3 mL de una disolución enzimática a 45 °C, tomando muestras en tiempos predeterminados, y con el objetivo de detener la reacción enzimática, se introdujeron las muestras en un baño maría a 100 °C por 3 minutos. Posteriormente, se retiraron las muestras del baño maría y se colocaron en hielo. También se preparó un blanco enzima y un blanco sustrato. Finalmente, se midió la generación de azúcares reductores mediante el método del ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller, 1959). En el presente estudio se midieron la actividad volumétrica (UD/mL de solución enzimática) y la actividad específica (UD/ mg proteína), donde UD (unidad de dextranasa) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por minuto, asimismo, la concentración de proteína fue determinada por el método Bradford (Bradford, 1976).

### Determinación de parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos, la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), se evaluaron las velocidades iniciales de reacción enzimática actuando sobre diferentes diluciones de dextrano (200, 300, 400, 500 y 600 ppm) a 45 °C, tomando como referencia la dilución enzimática y el tiempo de reacción definidos en la evaluación

del rango de linealidad. Las constantes  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se determinaron por el método de Lineweaver-Burk (Lira & Jasso, 2013).

## Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de dextrano

### Simulado de jugo de caña de azúcar

Se prepararon 3 L de una solución simulada en composición de jugo de caña de azúcar, a partir de una solución tampón acetato 0.1 M a pH 5.5, en la cual se disolvió dextrano y sacarosa hasta lograr una concentración de 500 ppm y 15 °Brix, respectivamente. La solución simulada se colocó en un envase de vidrio esterilizado y se almacenó en refrigeración hasta su uso posterior. El simulado obtenido fue caracterizado, determinándose el °Brix (CNM, 2011), el pH (ICUMSA 2007), la viscosidad mediante un viscosímetro capilar de Ostwald (SI Analytics) y azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller, 1959).

### Diseño experimental

Para la optimización del proceso de hidrólisis enzimática se utilizó la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto rotacional (RCCD) (Balakrishnan et al., 2022) con tres variables independientes: concentración de enzima (ppm), tiempo de reacción (min) y temperatura de reacción (°C); y como variable respuesta la reducción en el contenido de dextrano (RDC) (%). Se tuvo un diseño de 17 experimentos en total, con 8 puntos correspondientes a un diseño factorial  $2^3$ , 3 puntos centrales y 6 puntos axiales, con  $\alpha = \pm 1.68$ . Los rangos de las variables independientes fueron determinados según pruebas preliminares. Los niveles de las variables independientes y el diseño experimental con las variables codificadas se muestran en la Tabla 1. Los resultados de la variable dependiente fueron ajustados a un modelo cuadrático completo, el cual se muestra en la ecuación (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde Y es la respuesta predicha por el modelo,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ , y  $\beta_{ij}$  representan los coeficientes del modelo para el intercepto y los términos lineales, cuadráticos y de interacción entre las variables, y donde  $X$  y  $X_j$  representan a las variables independientes. Los términos significativos en el modelo fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia del 5 %. El ajuste del modelo fue determinado por los valores del coeficiente de determinación múltiple ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación múltiple ajustado ( $R^2_{adj}$ ). Asimismo, se determinó el valor de la desviación media absoluta siguiendo la metodología de Baş & Boyacı (2007).

Todos los cálculos y gráficos fueron realizados con el software estadístico Statgraphics Centurion XIX y el software Microsoft Excel 2016.

**Tabla 1. Valores codificados y no codificados para los niveles de las variables independientes del diseño experimental**

Variables independientes	Niveles codificados				
	$-\alpha^*$	-1	0	1	$\alpha$
Concentración de enzima (ppm) ( $X_1$ )	120	165	230	295	340
Tiempo de reacción (min) ( $X_2$ )	15	21	30	39	45
Temperatura de reacción ( $^{\circ}$ C) ( $X_3$ )	30	36	45	54	60

### Hidrólisis enzimática de dextrano en simulado de jugo de caña de azúcar

Para los 17 experimentos del RCCD se utilizó un sistema de mini reactores de 250 mL de volumen total y 100 mL de volumen de trabajo, conteniendo el simulado, los cuales fueron mantenidos en agitación constante y control de la temperatura. Asimismo, el proceso se realizó a un pH constante de 5.5. El procedimiento consistió en que, una vez puesto el volumen de simulado y alcanzado el valor de temperatura de cada corrida, se adicionó la cantidad de enzima correspondiente y se dejó reaccionar por el tiempo estipulado para cada experimento. Al cumplir el tiempo de reacción, se inactivó la enzima colocando los mini reactores en un baño a ebullición durante 5 min, posteriormente los mini reactores se colocaron en agua helada por 3 min. Los mini reactores y su contenido fueron mantenidos en refrigeración hasta los análisis posteriores.

### Determinación de la reducción del contenido de dextrano

El contenido de dextrano antes y después de la hidrólisis enzimática fue determinado mediante espectrofotometría (ICUMSA, 2011), en la que se tomaron 8 mL de la muestra, se añadieron 1.6 mL de ácido tricloroacético (10 %) y se filtraron. Del filtrado se tomaron dos muestras de 2 mL, a una se le añadieron 2 mL de agua destilada (usado como blanco) y a la otra 2 mL de etanol, se dejaron reposar 20 min y luego se leyó la absorbancia (ABS) a 720 nm, una vez realizada la medida se calculó el dextrano empleando la fórmula de la curva de calibrado mostrada en la ecuación 2:

$$Dextrana (ppm) = \left( \frac{ABS + 0.039}{0.0019} \right) * 1.2 * 2 * (\text{Factor de dilución}) \quad (2)$$

La reducción en el contenido de dextrano (RDC) (%) fue calculada mediante la fórmula mostrada en la ecuación 3 (Ninchan, *et al.*, 2017):

$$RDC (\%) = \left( \frac{Dextrano inicial (ppm) - Dextrano final (ppm)}{Dextrano inicial (ppm)} \right) * 100\% \quad (3)$$

## Validación de los parámetros de optimización en jugo de caña de azúcar

Para la validación de los parámetros de optimización se determinaron los niveles de las variables independientes óptimos que afectaron significativamente las respuestas del diseño factorial y el análisis de superficie de respuesta. Para ello se extrajo jugo de caña después de 60 horas de la cosecha a través de un trapiche del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa. El jugo de caña de azúcar obtenido fue filtrado y caracterizado determinándose el contenido de sólidos solubles (ICUMSA, 2011), el pH (ICUMSA, 2007) la viscosidad mediante un viscosímetro capilar de Ostwald (SI Analytics) y azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller, 1959). Posteriormente, se cargaron en un mini reactor, 100 mL del jugo de caña de azúcar para la hidrólisis enzimática según las condiciones optimizadas. Esta experimentación se realizó por duplicado.

## Resultados y Discusión

### Caracterización enzimática

#### Rango de linealidad

En la Figura 1 se muestra la curva de formación de azúcares reductores (producto) en función del tiempo para las 4 diluciones ensayadas de DEXTRAFREE XE. Se conoce que, la hidrólisis enzimática de dextrano también se ve influenciada por el número de ramificaciones presentes en el mismo; por ello, en una primera fase del proceso enzimático se tiene una liberación irregular de azúcares reductores, por ello, los resultados de la evaluación del rango de linealidad se muestran a partir del minuto 25.

Es necesario destacar que en una reacción enzimática se pueden diferenciar tres fases; la fase de retardo, fase lineal y fase de agotamiento de sustrato. La fase de retardo tiene lugar inmediatamente después de mezclar los reactivos con la muestra, es una fase de encuentro y acoplamiento de sustrato y enzima, en el caso de la dextranasa además de su adaptación sufre variaciones con respecto al rompimiento de los enlaces del sustrato, esto se debe a la estructura de la dextrana, como es de origen *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F, tiene mayor porcentajes de enlaces 1-6, 95 % y de 1-3, 5 % (Bourne *et al.*, 1962) siendo los enlaces 1-6 más débiles, fáciles de romper, pero los enlaces 1-3, tardan mayor tiempo en romperse, es por ello la desestabilización en producción de azúcares reductores en el inicio, hasta encontrar el rompimiento progresivo que indica la fase lineal, en la cual la formación de productos permanece constante; por último, a medida que transcurre la reacción, el sustrato se va agotando (fase de agotamiento) y la velocidad de reacción disminuye (Tena & Jorin, 2000).

En la Figura 1 se observa que la dilución 1:5 muestra mayor linealidad en mayor tiempo, determinándose así que es la más favorable al mantener el rango de linealidad por 25 min, siendo elegida esta dilución para la realización de la investigación. Con ello se pudo constatar lo indicado por el proveedor, quien señala dicha dilución como recomendada. Oropeza *et al.* (2019), en su

trabajo de investigación de hidrólisis de dextrano empleó también la dilución 1:5 de la misma enzima Dextranfree (ENMEX), obteniendo resultados favorables según su objetivo.

Por otra parte, para la determinación de la actividad enzimática es necesario que se realice en la fase lineal, donde el único factor limitante es la concentración de la propia enzima y las condiciones de reacción sean las óptimas.

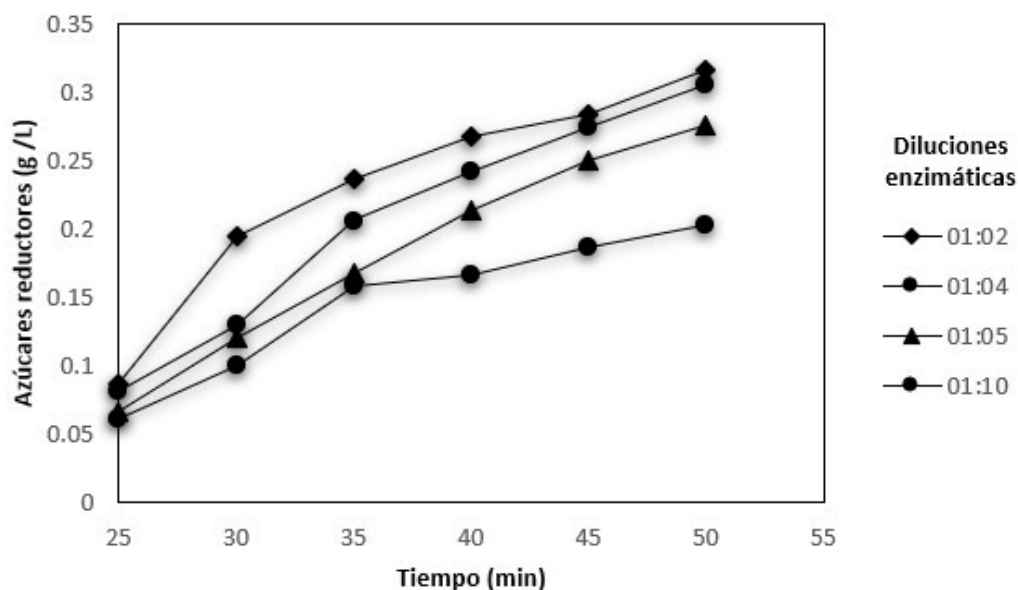


Figura 1. Formación de azúcares reductores por la enzima Dextranfree Xe a diferentes diluciones enzimáticas.

### Actividad enzimática

La enzima DEXTRAFREE XE presentó una actividad de  $0.42 \pm 0.04$  (UD/mL) y  $4.7 \pm 0.47$  (UD/mg). Eggleston & Monge (2005) reportaron que la dextranasa producida por *Chaetomium erraticum* presentó actividades enzimáticas de 4783.2 (UD/mL) y 6.4 (UD/mg), sin embargo, dichos valores fueron calculados en base a la liberación de azúcares reductores equivalentes 1 mg de maltosa por hora a 40 °C, por lo que, difieren de los resultados obtenidos en el presente estudio.

### Valores de los parámetros cinéticos

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la dextranasa fueron: la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) de 0.215 (g/L) y velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de 0.007 (g/L $\cdot$ min) para una



dilución enzimática 1:5 y un tiempo de reacción de 15 min.

### Optimización del proceso de hidrólisis enzimática

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para la RDC (%) para los 17 experimentos del RDCC del presente estudio en función de las variables codificadas y no codificadas. Como puede observarse, los valores de RDC (%) oscilaron entre 40 % y 80 %, los cuales corresponden a los experimentos con las niveles bajos y altos para cada variable dependiente, respectivamente, resaltándose que los puntos centrales presentaron un coeficiente de variación del 0.8 %, indicando la buena reproducibilidad del proceso.

En el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 3) del diseño experimental del presente estudio los datos fueron ajustados a un modelo cuadrático. Se observó que los efectos lineales de las 3 variables independientes ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) y el efecto cuadrático de la temperatura de reacción ( $X_3$ ) fueron significativos ( $p < 0.05$ ).

Asimismo, en la Figura 2 se muestra el diagrama de Pareto para efectos estandarizados, en el cual se verifican los efectos significativos y además se establece que el efecto lineal de las variables tiempo de reacción (min) y concentración de enzima (ppm) fueron más significativos que el de la variable temperatura de reacción ( $^{\circ}\text{C}$ ).

**Tabla 2. Reducción del contenido de dextrano (RDC) (%) de los experimentos como una función de los niveles codificados de las variables independientes**

Experimento	$X_1$	$X_2$	$X_3$	RDC (%)
1	-1	-1	-1	40
2	-1	-1	1	46
3	-1	1	-1	52
4	-1	1	1	60
5	1	-1	-1	48
6	1	-1	1	59
7	1	1	-1	68
8	1	1	1	80
9	-1.68	0	0	42
10	1.68	0	0	75
11	0	-1.68	0	46
12	0	1.68	0	77
13	0	0	-1.68	46
14	0	0	1.68	51
15	0	0	0	59
16	0	0	0	59
17	0	0	0	59

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 97.51$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj} = 94.30$ ) indicaron que el modelo matemático se ajusta adecuadamente a los datos experimentales. Asimismo, el valor de la desviación media absoluta, fue de 2.81 %, el cual unido al valor del  $R^2$  definen el comportamiento verdadero del sistema y puede usarse para la interpolación en el dominio experimental. Los valores más altos de RDC (%) se alcanzaron con una concentración de enzima de 295 ppm, un tiempo de reacción de 39 min y una temperatura de reacción de 54 °C, los cuales corresponden a los niveles altos de las variables independientes.

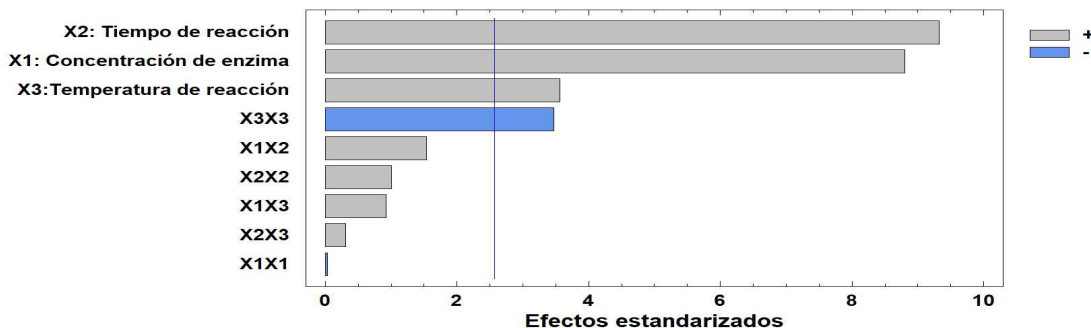
Asimismo, los valores de los efectos no significativos fueron removidos del modelo matemático obtenido, con lo que se obtuvo la ecuación (4):

$$RDC (\%) = -46.0194 - 0.0519 * X_1 - 0.7346 * X_2 + 3.7576 * X_3 - 0.0441 * X_3^2 \quad (4)$$

Correspondientemente, no se encontraron referencias bibliográficas referidas específicamente a la acción en condiciones óptimas de la enzima Dextranfree Xe (Enmex) sobre el sustrato dextrano como para discutir estos resultados.

**Tabla 3. Análisis de varianza para la reducción del contenido de dextrano (%)**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	p-valor
X1: Concentración de enzima (ppm)	926.719	1	926.719	107.61	0.0000
X2: Tiempo de reacción (min)	1039.28	1	1039.28	120.68	0.0000
X3: Temperatura de reacción (°C)	150.985	1	150.985	17.53	0.0041
$X_1 X_1$	0.0153223	1	0.0153223	0.00	0.9675
$X_1 X_2$	28.125	1	28.125	3.27	0.1137
$X_1 X_3$	10.125	1	10.125	1.18	0.3142
$X_2 X_2$	11.8163	1	11.8163	1.37	0.2798
$X_2 X_3$	1.125	1	1.125	0.13	0.7284
$X_3 X_3$	143.872	1	143.872	16.71	0.0046
Error total	60.2828	7	8.61183		
Total (corr.)	2417.76	16			



**Figura 2. Diagrama de Pareto para la reducción del contenido de dextrano (%).**

Sin embargo, desde la Figura 3 se muestran las superficies de contorno que permiten determinar las condiciones que maximizan el valor de RDC (%), las cuales se obtiene en a) a una concentración de enzima entre 340 y 350 ppm y un tiempo de reacción entre 44 y 46 min; en b) a una concentración de enzima entre 340 y 350 ppm y una temperatura de reacción entre 43 y 45 °C; y en c) una temperatura de reacción entre 45 y 47 °C y un tiempo de reacción entre 44 y 46 min. Asimismo, en la Figura 4 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el RCCD del presente estudio, en las cuales se muestra a) un incremento en la concentración de enzima y el tiempo de reacción favorecen la RDC (%) en los límites estudiados; en b) un incremento en la temperatura favorece la RDC (%) hasta cierto punto a partir del cual éste decrece, también se corrobora que un incremento en el tiempo de reacción favorece la reacción de hidrólisis; en c) se corrobora el efecto de la temperatura de reacción y de la concentración de enzima.

Asimismo, mediante el software estadístico se determinó las condiciones que optimizan la reducción del contenido de dextrano (95.51 %) son una concentración de enzima de 340 ppm, un tiempo de reacción de 45 min y una temperatura de reacción de 45 °C.

Por otra parte, se ha reportado que, una mayor carga enzimática y también mayores tiempos de residencia favorecen el proceso catalítico de las dextranasas (Eggleston & Monge, 2005; Ninchan *et al*, 2017), dado que existe una mayor cantidad de sitios activos de contacto con el sustrato operando por un mayor tiempo. Asimismo, debe considerarse que una menor concentración de enzima conlleva una mayor cantidad de agua disponible para desactivar y desnaturalizar la estructura de la proteína enzimática y aumentar su movilidad conformacional, lo cual puede generar pérdida de la actividad enzimática (Eggleston *et al.*, 2011).

Respecto al efecto de la temperatura, Eggleston & Monge (2005) reportaron que un rango de temperatura entre 43.3 y 54.4 °C favorece la actividad enzimática de las dextranasas actuando sobre dextrano (500 ppm), y Ninchan *et al.* (2017) reportaron que la actividad de una

dextranasa de *Chaetomium sp.* actuando sobre dextrano (1500 ppm) fue favorecida a un rango de temperatura entre 35 y 55 °C, y temperaturas mayores a estos rangos tienen un efecto negativo sobre la hidrólisis, lo cual es coherente con lo reportado en la presente investigación. Asimismo, se ha reportado que temperaturas por encima de los 65 °C promueven la desnaturalización de la enzima y la pérdida parcial de su actividad (Eggleston *et al.*, 2011).

Así se tiene que, las condiciones que optimizan la RDC (95.51 %) son, concentración de enzima de 340 ppm, tiempo de reacción de 45 min y temperatura de reacción de 45 °C. Si bien en general, el análisis de superficie de respuesta arroja un alto valor de reducción de dextrano, estas condiciones de mayor tiempo y alta temperatura no son favorables al proceso de elaboración del azúcar.

### Validación de los parámetros de optimización

Para efectos del presente estudio, se validaron los resultados del proceso de optimización por la metodología de superficie de respuesta, considerando una RDC objetivo del 70 % en jugo de caña de azúcar, para lo cual los resultados obtenidos por el software estadístico para esta condición son, una concentración de enzima de 224 ppm, un tiempo de reacción de 32 min y una temperatura de reacción de 36 °C.

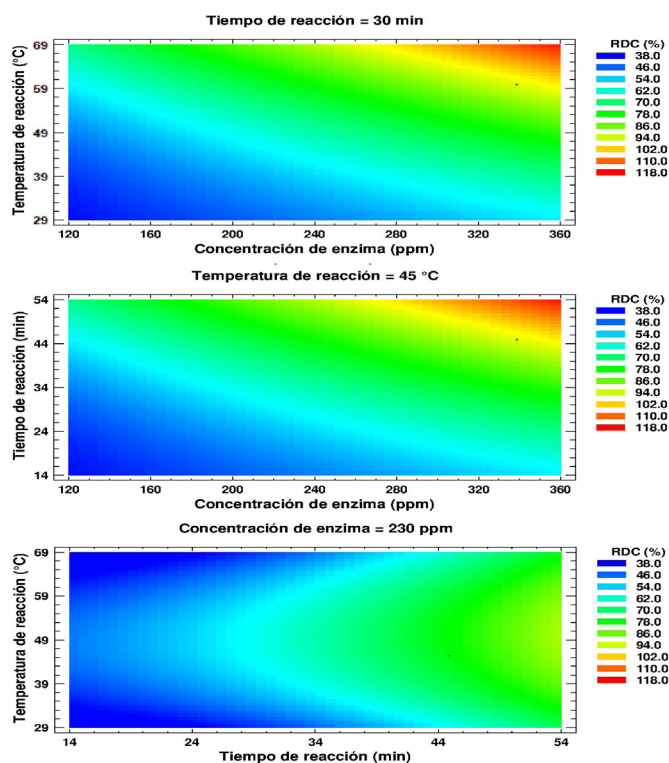


Figura 3. Superficies de contornos para la reducción del contenido de dextrano (%).

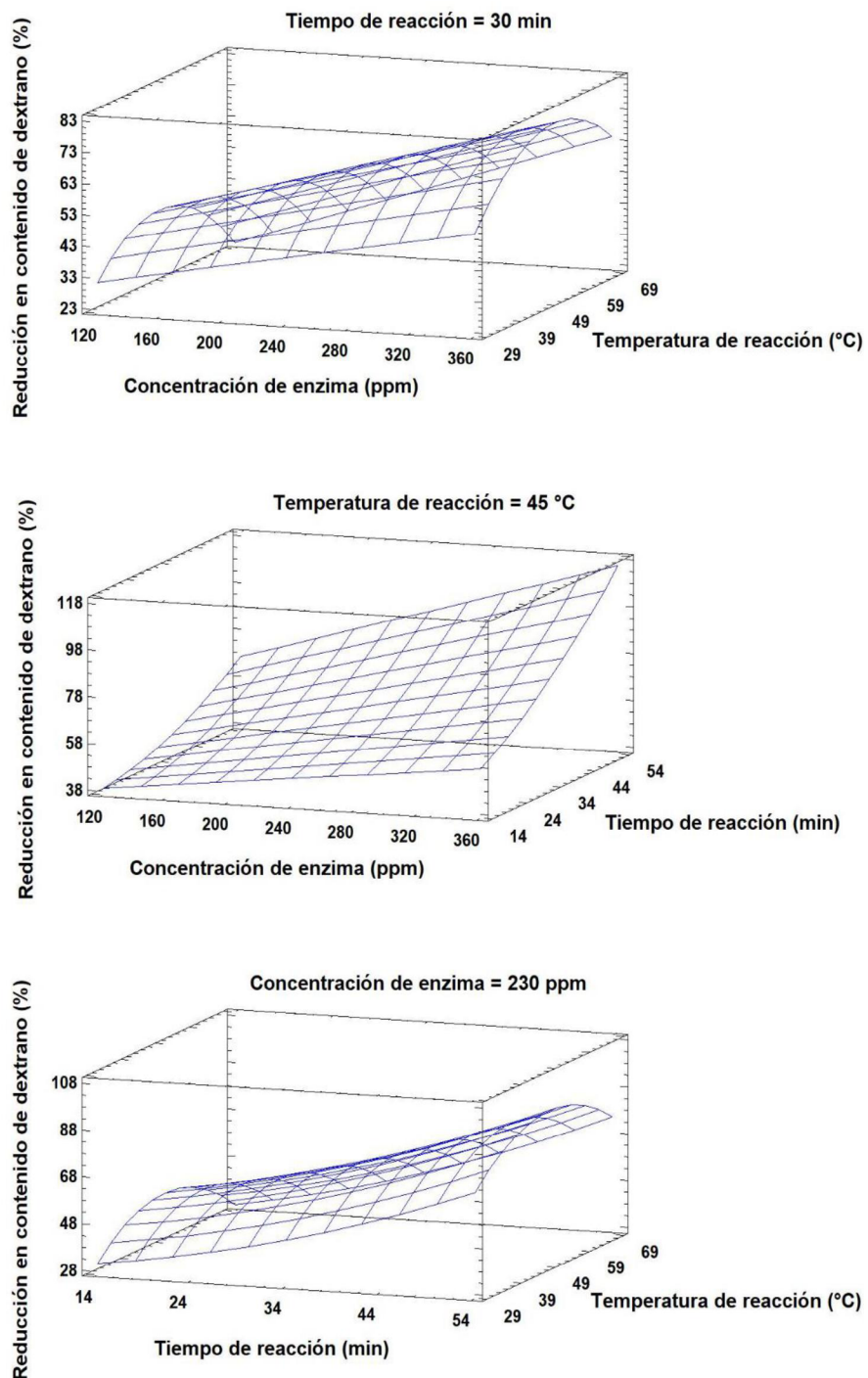


Figura 4. Superficies de respuesta para la reducción del contenido de dextrano (%).

En la Tabla 4 se muestra la composición del jugo de caña de azúcar utilizado antes (base) y después de la hidrólisis enzimática (hidrolizado). Asimismo, se determinó el valor de la desviación media absoluta para el valor de la RDC obtenido siguiendo la metodología de Baş & Boyaci (2007), siendo de 11,61 %, lo cual indica el buen ajuste del modelo a los datos experimentales. En cuanto a la RDC se obtuvo un valor de 69.2 %, el cual coincide con el reportado por Oropeza *et al.* (2019), quienes estudiaron el proceso de hidrólisis enzimática de dextrano en puré fermentado (con un contenido inicial de dextrano de 353 ppm) utilizando la enzima Dextranfree con una relación enzima:sustrato de 1:10 a 40 °C, pH 5,17, por 180 min, por lo que también se afirma que el jugo de caña es un mejor sustrato en comparación al puré fermentado, ya que se obtienen resultados similares a menor tiempo de hidrolisis. Asimismo, se ha reportado que la actividad de las dextranasas es estable hasta 25-30°Brix y valores superiores a este rango influyen negativamente sobre su actividad (Oropeza *et al.*, 2019), por ello, la condición de 20,42°Brix del jugo de caña de azúcar utilizado en el presente estudio no debió inhibir a la dextranasa durante la hidrólisis de dextrano. En adición, se conoce que la hidrólisis enzimática de dextrano incrementa los niveles de azúcares reductores y produce una disminución en la viscosidad de la solución (Bashari *et al.*, 2013; Oropeza *et al.*, 2019). Lo anterior fue corroborado en el presente estudio, dado que tal como se muestra en la Tabla 3, los niveles de azúcares reductores y el valor de la viscosidad en el jugo de caña se incrementaron en 30 % y redujeron en 10 %, respectivamente, luego de la hidrólisis.

**Tabla 4. Características fisicoquímicas del jugo de caña de azúcar antes (base) y después de la hidrólisis enzimática (hidrolizado)**

Parámetro	Jugo de caña de azúcar	Jugo hidrolizado
Dextrano (ppm)	227 ± 12	70 ± 4
°Brix	20.4 ± 0.5	20.5 ± 0.1
Azúcares reductores (g/L)	0.23 ± 0.01	0.30 ± 0.01
Viscosidad (cP)	0.01 ± 0	0.009 ± 0
pH	5.4 ± 0.5	5.4 ± 0.5

El incremento en los niveles de azúcares reductores se debe a la generación de isomaltoligosacáridos de dos a cinco unidades glucosídicos productos de la hidrólisis (Eggleston *et al.*, 2011; Khalikova *et al.*, 2005); mientras que, la disminución de los niveles de viscosidad es una consecuencia del fraccionamiento molecular de dextrano presente en el jugo de caña de azúcar (Eggleston *et al.*, 2011; Ninchan *et al.*, 2017).

## Conclusiones

Las actividades volumétrica y específica de la enzima Dextranfree Xe fueron de  $0.42 \pm 0.04$  (UD/mL) y  $4.7 \pm 0.47$  (UD/mg), KM igual a 0.215 g/L y Vmax 0.007 g/L\*min. Asimismo, se determinó que los factores concentración de enzima, tiempo y temperatura de reacción

fueron relevantes para el proceso de hidrólisis enzimática de dextrano, determinándose que las condiciones que optimizaron la reducción del contenido de dextrano en un 95.51 % fueron de 340 ppm, 45 min y de 45 °C respectivamente. Finalmente, se determinó que las condiciones que lograron una reducción del contenido de dextrano con un valor objetivo inferencial estadístico del 70 % en jugo de caña de azúcar fueron: concentración de enzima 224 ppm, tiempo 32 min y temperatura de reacción 36 °C. Con estos parámetros la validación de la hidrólisis en jugo de caña de azúcar resultó en un 69.2 % de reducción de dextrano.

### Contribución de los autores

“Conceptualización del trabajo, C.C.C., K.S.G., A.C.C.; desarrollo de la metodología, C.C.C., K.S.G., A.C.C.; manejo de software, J.D.B., C.C.C., K.S.G.; validación experimental, C.C.C., K.S.G., A.C.C.; análisis de resultados, C.C.C., K.S.G., A.C.C., J.D.B.; manejo de datos, C.C.C., K.S.G., A.C.C., J.D.B.; escritura y preparación del manuscrito, C.C.C., K.S.G., A.C.C., J.D.B.; redacción, revisión y edición, C.C.C., K.S.G., A.C.C., J.D.B.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

### Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo.

### Agradecimientos

A la Empresa Agroindustria San Jacinto S. A. C. Perú por la donación de dextrana T-2000 y facilidades de comunicación otorgadas y a ENMEX de la Ciudad de México por donar la enzima.

### Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

### Referencias

- Balakishnan, R., Mohan, N., & Sivaprakasam, S. (2022). Application of design of experiments in bioprocessing: process analysis, optimization, and reliability. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 289-319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91167-2.00013-7>
- Bashari, M., Lagnika, C., Ocen, D., Chen, H., Wang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2013). Separation and characterization of dextran extracted from deteriorated sugarcane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.046>
- Baş, D., & Boyacı, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836–845. <http://dx.doi.org/10.1016/j.>

- [jfoodeng.2005.11.024](#)
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 48-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bourne, E.J., Hutson, D. H., & Weigel, H. (1962). Studies on dextrans and dextranases 2. The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. *Biochemical Journal*, 85 (1), 158-163. <https://doi.org/10.1042/bj0850158>
- Comisión Nacional de Normalización [CNM]. (2011). Industria azucarera y alcoholera - Determinación de grados brix en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados - Método del refractómetro (Norma Mexicana NMX-F-436-SCFI-2011). <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-f-436-scfi-2011.pdf>
- Dotaniya, M.L., Datta, S.C., Biswas, D.R., Dotaniya, C.K., Meena, B.L., Rajendiran, S., Regar, K.L., & Manju Lata. (2016). Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5, 185–194. <https://doi.org/10.1007/s40093-016-0132-8>
- Eggleston, G., Dilks, A., Blowers, M., & Winters, K. (2011). Successful application of dextranase in sugar beet factories. In: Proceedings of the American Society of Sugarbeet Technologists meeting, 1-16. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=266696>
- Eggleston, G., & Monge, A. (2005). Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry*, 40(5), 1881–1894. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.025>
- International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis [ICUMSA]. (2011). The determination of dextran in sugars by a modified alcohol. Haze Method Official (Method GS1/2/9-15). <https://www.icumsa.org/index.php?id=835>
- International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis [ICUMSA]. (2007). The determination of pH by a direct method – in raw sugar, molasses, juices and syrups – Official – in white sugar, speciality sugars and plantation white sugar (Method GS1/2/3/4/7/8/9-23, 2007). <https://www.icumsa.org/index.php?id=935>
- Khalikova, E., Susi, P., & Korpela, T. (2005). Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.306-325.2005>
- Li, K., Lu, H., Hang, F., Li, S., & Liu, J. (2016). Improved dextranase production by *Chaetomium gracile* through optimization of carbon source and fermentation parameters. *Sugar Tech*, 19, 432-437. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0476-4>
- Li, Y., Luo, J., & Wan, Y. (2020). Biofouling in sugarcane juice refining by nanofiltration membrane: Fouling mechanism and cleaning. *Journal of Membrane Science*, 612, 118432. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118432>
- Lira, E., & Jasso, R. (2013). Comparación de los diferentes métodos de análisis cinéticos para determinar el tipo de inhibición de dos compuestos. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(1), 19-32. Recuperado en 29 de Noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952013000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000100004&lng=es&tlng=es)
- Liu, J., Sun, Q., Yin, H., Wang, L., Wei, H., Li, K., & Hong, F. (2019). Optimal Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing a Dextranase from *Chaetomium gracile*. *Sugar Tech*, 22, 171-178. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00746-5>
- Lu, Y., Thomas, L., & Schmidt, S. (2017). Differences in the thermal behavior of beet and cane sucrose sources. *Journal of Food Engineering*, 201, 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.014>



[jfoodeng.2017.01.005](#)

- Martínez, D., Menéndez, C., Chacón, O., Fuentes, A., Borges, D., Sobrino, A., Ramírez, R., Pérez, E., & Hernández, L. (2021). Removal of bacterial dextran in sugarcane juice by *Talaromyces minioluteus* dextranase expressed constitutively in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 333, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.04.006>
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Misra, V., Solomon, S., Hashem, A., Abd Allah, E.F., Al-Arjani, A.F., Mall, A.K., Prajapati, C.P., & Ansari, M.I. (2020a). Minimization of post-harvest sucrose losses in drought affected sugarcane using chemical formulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.028>
- Misra, V., Solomon, S., Malla, A.K., Prajapati, C.P., & Ansari, M.I. (2020<sup>b</sup>). Impact of chemical treatments on *Leuconostoc* bacteria from harvested stored cane/stale cane. *Biotechnology Reports*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00501>
- Ninchan, B., Vanichsritatana, W., & Sriroth, K. (2017). Investigation of the optimized dextran-degrading enzyme conditions on the decomposition of different molecular weights of pure dextran using response surface methodology. *Archives Industrial Biotechnology*, 1(1), 8-19. <https://www.alliedacademies.org/abstract/investigation-of-the-optimized-dextran-degrading-enzyme-conditions-on-the-decomposition-of-different-molecular-weights-of-pure-dext-6760.html>
- Oropeza, E., López, L., Luna, G., Urrea, G., & Cantú, D. (2019). Hidrolisis de dextrana y su reología en mostos provenientes del proceso de producción de bioetanol. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(2), 543-554. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/Oropeza>
- Petit, H. (2021). Efecto del *Leuconostoc mesenteroides* en la caña de azúcar para la industria azucarera. *Revista de Ciencia y Tecnología Agrollanía*, 20, 23-30. <http://bdigital2.uia.ve:8080/xmlui/bitstream/handle/654321/5802/Art13.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Silalertruksa, T., & Gheewala, S.H. (2020). Competitive use of sugarcane for food, fuel, and biochemical through the environmental and economic factors. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 25, 1343–1355. <https://doi.org/10.1007/s11367-019-01664-0>
- Sufiate, B.L., Soares, F.E.F., Gouveia, A.S., Moreira, S.S., Cardoso, E.F., Tavares, G.P., Braga, F.R., De Araujo, J.V., & De Queiroz, J.H. (2018). Statistical tools application on dextranase production from *Pochonia chlamydosporia* (VC4) and its application on dextran removal from sugarcane juice. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90(1), 461-470. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160333>
- Tena, M., & Jorrián, J. (2000). Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Córdoba, España.