

## Optimización de la hidrólisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar (*Saccharum spp híbrido*)

## Optimization of the enzymatic hydrolysis of starch in sugarcane juice (*Saccharum spp hybrid*)

Yanamango Chavez, V.<sup>1</sup> , Morales Zuñiga, M.<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, 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:** Yanamango-Chavez, V., Morales-Zuñiga, M., Castillo- Calderón, A., Diestra-Balta, J. (2023). Optimization of the enzymatic hydrolysis of starch in sugarcane juice (*Saccharum spp hybrid*). *Revista Bio Ciencias*, 10, e1514. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1514>

### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: May 08<sup>th</sup> 2023.

Accepted/Aceptado: November 28<sup>th</sup> 2023.

Available on line/Publicado: December 26<sup>th</sup> 2023.

### RESUMEN

El almidón, componente natural del jugo de caña de azúcar, es causante de pérdidas y problemas operacionales en la industria azucarera, debido al incremento en la viscosidad en el jugo, que inhibe la cristalización e incrementa la pérdida de sacarosa. El objetivo de esta investigación fue optimizar el proceso de hidrólisis enzimática del almidón por acción de la alfa amilasa de *Bacillus licheniformis*. Se optimizaron la concentración de enzima y el tiempo de reacción, con respecto a la maximización de la concentración de maltosa, determinado como azúcar reductor por el método del Ácido Dinitrosalicílico; el porcentaje de hidrólisis del almidón y la productividad, las cuales fueron analizadas independientemente y en conjunto por un Diseño Central Compuesto Rotacional y la Metodología de Superficie de Respuesta.

Se caracterizó la enzima alfa-amilasa obteniéndose una temperatura óptima de 90 °C y pH óptimo de 7, determinándose un rango de linealidad para la dilución 1:100 de 20 minutos, una actividad enzimática de 28.35 UI/mg y las constantes cinéticas Km de 5.82 g/L y Vmax de 0.30 g/L\*min. Finalmente, del diseño experimental se obtuvieron las condiciones ambientales óptimas de concentración de enzima de 817 ppm y tiempo de reacción de 17 minutos a una temperatura de 90 °C. De la validación de las condiciones óptimas de hidrólisis del almidón en el jugo de caña de azúcar, se obtuvieron: concentración de maltosa 0.380 g/L, porcentaje de hidrólisis 73.09 % y la productividad 1.341 g/L\*h, que correspondieron a variaciones mayores que los valores calculados, en 16%, 11.3% y 18% respectivamente.

**PALABRAS CLAVE:** Alfa amilasa, industria azucarera, *Bacillus licheniformis*, productividad.

### \*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

---

Starch, a natural component of sugarcane juice, causes losses and operational problems in the sugar industry, due to the increase in juice viscosity, which inhibits crystallization and increases sucrose loss. This research aimed to optimize the enzymatic hydrolysis process of starch by the action of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. Enzyme concentration and reaction time were optimized for maximizing maltose concentration, determined as reducing sugar by the Dinitrosalicylic Acid method; starch hydrolysis percentage and productivity, which were analyzed independently and together by a Rotational Compound Central Design and Response Surface Methodology.

The alpha-amylase enzyme was characterized, obtaining an optimum temperature of 90 °C and optimum pH of 7, determining a linearity range for the 1:100 dilution of 20 minutes, an enzymatic activity of 28.35 IU/mg, and the kinetic constants  $K_m$  of 5.82 g/L and  $V_{max}$  of 0.30 g/L\*min. Finally, the experimental design obtained the optimal environmental conditions of enzyme concentration of 817 ppm and reaction time of 17 minutes at a temperature of 90 °C. From the validation of the optimal conditions for starch hydrolysis in sugarcane juice, the following were obtained: maltose concentration 0.380 g/L, percentage of hydrolysis 73.09 %, and productivity 1.341 g/L\*h, which corresponded to variations greater than the calculated values of 16%, 11.3%, and 18%, respectively.

---

**KEY WORDS:** Alpha amylase, sugar industry, *Bacillus licheniformis*, productivity.

---

## Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) representa la mayor fuente de producción mundial de sacarosa (Lu *et al.*, 2017). Para el año 2021, el cultivo de caña de azúcar a nivel mundial alcanzó los 1,859, millones de toneladas (FAO, 2022) de las cuales 10.468.800 tn son de la producción de caña en Perú (MIDAGRI, 2022), por ello se puede reconocer que es un cultivo de relevancia económica.

Uno de los problemas que se da en la industria azucarera, es la presencia del almidón, componente natural de la caña de azúcar, el cual causa pérdidas e inconvenientes operacionales durante el proceso de producción de azúcar, afectando negativamente la cantidad y calidad de los cristales de azúcares obtenidos como productos de procesamiento (Nascimento & Verbi, 2019; Zhou *et al.*, 2008). Este componente es un polisacárido natural producido en las hojas verdes de

las plantas y es almacenado en múltiples tejidos vegetales a modo de gránulos insolubles (Cole *et al.*, 2015). El almidón está formado por dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa que es esencialmente una cadena molecular lineal, y la amilopectina que es una molécula ramificada (Quintero *et al.*, 2016). En la caña de azúcar, a diferencia de la mayoría de las plantas que almacenan carbohidratos, la mayor parte del carbono almacenado está en forma de sacarosa y no como almidón, siendo así, los niveles de almidón en los tallos de caña de azúcar son muy bajos, alcanzando aproximadamente solo 0.01% de su peso fresco (Ferreira *et al.*, 2008); sin embargo, el contenido de almidón es mayor en hojas y puntos de crecimiento (Figueira *et al.*, 2011). Se destaca que, la cantidad de almidón presente en la caña de azúcar depende de diversos factores tales como la estación del año, la variedad de planta, enfermedades presentes, grado de madurez, método de procesamiento, método de análisis, condiciones climáticas, estrés y tipo de suelo (Eggleston *et al.*, 2007). Aun así, en pequeñas cantidades, la presencia de almidón en el jugo de caña de azúcar puede causar problemas debido al incremento en la viscosidad (Viginotti *et al.*, 2014; Misra *et al.*, 2022) y, asimismo, inhibe la cristalización e incrementa la pérdida de sacarosa a través de la melaza (Figueira *et al.*, 2011).

Los efectos adversos de la presencia de almidón durante el procesamiento de caña de azúcar son resultado del comportamiento de los gránulos de almidón durante la hidratación y el calentamiento (Zhou *et al.*, 2008), cuando los gránulos de almidón se calientan entre 60 °C y 70 °C, empiezan a absorber agua a medida que sube la temperatura y se empiezan a hinchar aumentando su volumen, este proceso de gelatinización es propio del almidón. Además, si se continúa incrementando calor a los gránulos, estos pueden llegar a romperse y dispersar amilosa y amilopectina formando un gel (Peña, 2009). Al enfriarse, las cadenas de amilosa experimentan un proceso conocido como retrogradación, lo cual influencia la distribución del almidón en los productos del procesamiento del jugo de caña de azúcar (Zhou *et al.*, 2008).

Si la cantidad de almidón que pasó a la meladura, luego de la clarificación, es mayor a 150 ppm, afectará el proceso, ya que esta coagulación de almidón formará partículas de gran tamaño, mayor densidad y viscosidad de la meladura, lo cual tiene impacto negativo en la velocidad de cristalización en los tachos, no deja que las mieles se agoten y dificultan la purga en las centrifugas (Penados, 2004). Así mismo el cambio en el orden molecular del gránulo de almidón que se produce dentro de un pequeño margen de temperatura, gelatinizando los gránulos, ocasiona hinchamiento irreversible y la pérdida de estructura cristalina. (Brumovsky, 2014). Debido a los efectos que produce el almidón en el proceso, las industrias buscan alternativas de solución para evitar estos problemas operacionales y pérdidas de materia que se dan en la producción de azúcar.

Tradicionalmente, el almidón presente en el jugo de caña de azúcar ha sido tratado mediante hidrólisis ácida; sin embargo, la especificidad de las enzimas, la ausencia de reacciones secundarias, entre otras ventajas, han colocado a la hidrólisis enzimática como una alternativa promisoriosa para la industria (Klasson *et al.*, 2022; Rajesh & Gummadi, 2021; Quinteros *et al.*, 2016; Monteiro & De Olivera, 2010). Las enzimas utilizadas a nivel industrial para la eliminación de almidón en jugo de caña de azúcar son las  $\alpha$ -amilasas (E.C.3.2.1.1), las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1, 4 en el almidón formando productos de bajo peso molecular tales como glucosa, maltosa, maltotriosa y otros oligosacáridos (Monteiro & De Olivera, 2010).

La conversión enzimática del almidón incluye una etapa de gelatinización, la cual comprende la disolución de los gránulos de almidón para formar una solución viscosa; licuefacción, que comprende hidrólisis parcial y pérdida de viscosidad; y sacarificación, que comprende la producción de glucosa y maltosa mediante hidrólisis (Li *et al.*, 2019).

La enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* es una de las soluciones más eficientes para la hidrólisis de almidón, pues trabaja en un alto rango de temperatura y actuando solo en los enlaces glucosídicos  $\alpha$  -1,4 encontrados en las cadenas de amilosa y amilopectina que componen el almidón, hidrolizándolas al azar, dando como producto glucosa y maltosa. (Martinez, 2005), eliminando así los problemas de producción mencionados anteriormente. Asimismo, se conoce que la hidrólisis enzimática de almidón mediante amilasas se ve influenciada por las características fisicoquímicas del sustrato, la naturaleza y concentración de la enzima, y las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo el proceso, tales como temperatura y pH, y tiempo de reacción (Sirohi *et al.*, 2021; Prompiputtanapon *et al.*, 2020; Quinteros *et al.*, 2016). Por ende, la presente investigación tuvo por objetivo optimizar las condiciones ambientales (concentración de enzima y el tiempo de reacción) para la hidrólisis enzimática de almidón en jugo de caña de azúcar mediante la metodología de superficie de respuesta.

## Material y Métodos

### Materia prima, enzima y almidón

Se utilizó caña de azúcar (*Saccharum spp híbrido*) de la variedad Mex 73-523, cosechada en Caylan, distrito de Nepeña, provincia del Santa, región Áncash, Perú. En todos los experimentos se utilizó una enzima comercial  $\alpha$ -amilasa proveniente del *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich/ CAS RN®: 9000-85-5) comercializada por Merck Peruana S.A., Este producto tiene un rango de pH de 5-9, es estable entre 40 a 60 °C a pH 7, según ficha técnica su máxima actividad se mostró a 90 °C. Asimismo, se utilizó almidón de maíz (GRM198 de BioGenicsLab) y, sacarosa pura  $\geq$  99.5 % grado analítico (Bioextra/ CAS RN®: 57-50-1).

### Caracterización enzimática

### Preparación de reactivos y muestras

Se preparó una solución tampón fosfato potásico 0.05 M a pH 7 a ser utilizada como disolvente en todos los experimentos. Posteriormente, se preparó una solución de almidón de maíz (500 ppm) en el tampón, se calentó en horno microondas durante 1:30 minutos, seguidamente se colocó en un baño de hielo por 1 minuto. Finalmente, la solución se sometió a 30 minutos a sonicación, obteniéndose así una solución homogénea (Cole *et al.*, 2016). Asimismo, se preparó una solución de HCl 0.25 M para la inactivación ácida de la enzima en todos los experimentos.

## Determinación de pH y temperatura óptima

Se realizaron experimentos para determinar los valores óptimos de pH y temperatura de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, condiciones ambientales en las que pueda expresar su máximo potencial catalítico durante la hidrólisis enzimática. Para la prueba de temperatura se preparó una solución de 500 ppm de almidón aforado con buffer fosfato potásico 0.05 M, pH 7, se colocó 2.7 mL de esta solución en tubo de ensayo y 0.3 mL de enzima por 20 min sometido a temperaturas de 60, 70, 80, 90 y 100 °C. Para la determinación de pH óptimo, las soluciones de almidón a 500 ppm fueron preparadas con tampón fosfato potásico a pH 6, 6.5, 7 y 7.5 sometiéndolo a una temperatura de 90 °C por 20 minutos, las reacciones fueron detenidas mediante inactivación ácida, añadiendo 150 µL de HCl 0.25 M a los tubos y colocándolos en un baño de hielo posteriormente. Finalmente, se determinó los productos de la hidrólisis como azúcares reductores mediante el método del ácido dinitrosalicílico - DNS (Miller, 1959) reportándose en términos de maltosa, al comprobarse que los productos de la hidrólisis del almidón fue fundamentalmente maltosa con concentraciones despreciables de glucosa del orden de 0.031 g/L y se calculó la actividad enzimática en UI/mL de acuerdo con la ecuación 1.

$$\alpha_{\alpha\text{-amilasa}} = \text{velocidad} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} * \text{min} \right) * \frac{1}{340} * \left( \frac{10^6}{1} \right) * \left( \frac{30}{3} \right) * \left( \frac{1}{1000} \right) * 100 \quad \dots(1)$$

Donde:

La masa molar de la maltosa es 340 g/mol

El volumen de reacción 30 mL y el volumen de la enzima es 3 mL (dilución 1:100)

## Rango de linealidad

Para determinar el rango de linealidad de la enzima se midió la velocidad de reacción (formación de producto) de diluciones de la enzima (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:500) en la solución tampón, actuando sobre la solución de almidón 500 ppm. Para ello, en un baño maría se incubaron 6 tubos de ensayo conteniendo 2,7 mL de la solución de almidón a 90 °C por 3 minutos, y se añadieron 0,3 mL de dilución enzimática y se dejaron reaccionar por 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. La reacción fue detenida mediante inactivación ácida añadiendo 150 µL de HCl 0.25 M a los tubos y colocándolos en un baño de hielo posteriormente. También se prepararon un blanco

enzima y un blanco sustrato. Finalmente, se determinó la producción de maltosa como azúcares reductores mediante el método del Ácido Dinitrosalicílico - DNS, con la que luego se calculó la actividad enzimática de acuerdo a la ecuación 1.

### Actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó midiendo la velocidad inicial de reacción de la liberación de azúcares reductores a partir del almidón y realizando el experimento por triplicado. Se tomó 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 almidón (500 ppm) con 0,3 mL de una disolución enzimática (1:100) a 90 °C por un tiempo total de 20 minutos. La reacción fue detenida mediante inactivación ácida añadiendo 150 µL de HCl 0.25 M a los tubos y colocándolos en un baño de hielo posteriormente. También se prepararon un blanco enzima y un blanco sustrato. Finalmente, la producción de azúcares reductores se midió mediante el método DNS y posteriormente se calculó la actividad enzimática de acuerdo a la ecuación 1. En el presente estudio se midieron la actividad volumétrica (UI/mL) y la actividad específica (UI/ mg proteína) de la solución enzimática, donde UI fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de azúcares reductores (maltosa) por minuto. Asimismo, la concentración de proteína fue determinada por el método Bradford (Bradford, 1976).

### Determinación de parámetros cinéticos

Para la determinación de parámetros cinéticos, se midió el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, evaluando la acción de la enzima en diferentes diluciones de la solución de almidón (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm) a 90 °C, tomando como referencia la dilución enzimática y el tiempo de reacción definidos en la evaluación del rango de linealidad. Luego, se procedió a determinar azúcares reductores (maltosa) y después determinar las velocidades iniciales (g/L \*min), para aplicar el método de Lineweaver-Burk (1934) para determinar los parámetros cinéticos  $V_{max}$  and  $K_m$  analizando graficamente  $1/V_0$  en función de  $1/S_0$ , según la ecuación 2.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_{max}} \dots(2)$$

Donde:

La pendiente es  $K_m/V_{max}$

La abscisa en el origen ( $1/v_0 = 0$ ) es  $-1/K_m$

La ordenada en el origen ( $1/[S]_0 = 0$ ) es  $1/V_{max}$

## Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de almidón en un medio sintético de jugo de caña de azúcar.

### Medio sintético de jugo de caña de azúcar

Se preparó 1 L de un medio sintético de jugo de caña de azúcar a partir de una solución tampón buffer fosfato potásico 0,05 M a pH 7, en la cual se disolvieron almidón y sacarosa hasta lograr una concentración de 500 ppm y 16 °Brix, respectivamente, se calentó en horno microondas durante 1:30 minutos, seguidamente se colocó en un baño de hielo por 1 minuto. Finalmente, la solución sometió a 30 minutos de sonicación, obteniéndose así una solución homogénea (Cole *et al.*, 2016). Se colocó el medio sintético en un envase de vidrio esterilizado y se almacenó en refrigeración hasta su uso posterior. El medio sintético de jugo de caña de azúcar obtenido fue caracterizado, determinando °Brix (Norma NMX-F-436-SCFI, 2011), porcentaje de pol (Polarímetro automático, marca Analytical Autopol I Rudolph Research) y azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico - DNS.

### 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) con dos factores (variables independientes): concentración de enzima (ppm) y tiempo de reacción (min); y como variables respuestas (variables dependientes): concentración de maltosa (g/L), almidón hidrolizado (%) y productividad (g/L.h). El diseño experimental constó de 11 experimentos, con 4 puntos correspondientes a un diseño factorial 2<sup>2</sup>, 3 puntos centrales y 4 puntos axiales, con  $\alpha = 1.41421$ . Los rangos de las variables del diseño experimental fueron determinados según pruebas preliminares y referencia bibliográficas. Los niveles de las variables independientes y el diseño experimental con las variables codificadas se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 1. Niveles de las variables independientes del estudio**

VARIABLES	NIVELES				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Concentración de enzima (ppm)	500	573	750	927	1000
Tiempo de reacción (min)	10	13	20	27	30

**Tabla 2. Diseño experimental DCCR para la hidrólisis de almidón por acción de la enzima alfa-amilasa.**

N°	Variables Independientes			
	Real		Codificada	
	Concentración de enzima (ppm)	Tiempo de reacción (min)	Concentración de enzima (ppm)	Tiempo de reacción (min)
1	573	13	-1.0	-1.0
2	573	27	-1.0	1.0
3	927	13	1.0	-1.0
4	927	27	1.0	1.0
5	500	20	-1.41421	0.0
6	1000	20	1.41421	0.0
7	750	10	0.0	-1.41421
8	750	30	0.0	1.41421
9	750	20	0.0	0.0
10	750	20	0.0	0.0
11	750	20	0.0	0.0

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). La optimización simultánea de las variables independientes fue realizada mediante la función deseabilidad (Meyers y Montgomery, 1995), todos los cálculos y gráficos fueron realizados con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.

### **Hidrólisis enzimática de almidón en el medio sintético de jugo de caña de azúcar**

Para los 11 experimentos del RCCD se utilizó un sistema reactor de 100 mL de volumen total y 30 mL de medio sintético de jugo de caña de azúcar, que constituyó el volumen de trabajo, con control de temperatura a 90 °C, pH 7.0 y velocidad de agitación a 150 rpm, posteriormente 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 tomó una muestra de 3 mL en un vial, y se detuvo la reacción mediante inactivación ácida utilizando 150  $\mu$ L de HCl 0.25 M y manteniéndolo en un baño de hielo por 3 minutos.

### **Determinación de la concentración de maltosa y glucosa**

La concentración de maltosa se determinó a partir de una curva de calibrado por el método del ácido dinitrosalicílico - DNS (Miller, 1959) con una solución estándar de maltosa de 1g/L. La determinación de glucosa se realizó por el método enzimático MonlabTest.

### Determinación de la hidrólisis de almidón

El porcentaje de hidrólisis de almidón (%) fue determinado considerando la concentración inicial de almidón y la concentración final de maltosa, los cuales fueron relacionadas según la ecuación 3:

$$\text{Hidrólisis de almidón}(\%) = \frac{\text{Concentración final de maltosa}(\text{mg})}{\text{Concentración inicial de reacción}(\text{mg})} * 100 \quad \dots(3)$$

### Determinación de la productividad

La productividad del proceso de hidrólisis enzimática fue determinada mediante la ecuación 4:

$$\text{Productividad} \left( \frac{\text{g}}{\text{L} * \text{h}} \right) = \frac{\text{Concentración final de maltosa}(\text{g} / \text{L})}{\text{Tiempo de reacción}(\text{h})} \quad \dots(4)$$

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

Para la validación de los parámetros de optimización obtenidos, se extrajo jugo de caña a través del trapiche en el laboratorio de Operaciones Unitarias de la E.A.P. Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa, Chimbote, Perú. El jugo de caña de azúcar obtenido fue sometido a un proceso de doble encalado. Para el primer encalado, se agregó una solución de cal al 25% hasta lograr un pH de 6.3, posteriormente, el jugo fue sometido a un primer calentamiento para generar la precipitación de partículas, las cuales fueron retiradas. Adicionalmente, para el segundo encalado, se añadió la solución de cal al 25 % hasta lograr un pH de 7 y finalmente se calentó el jugo de caña de azúcar hasta ebullición, logrando la sedimentación de partículas, cuales fueron retiradas posteriormente mediante filtración al vacío. Posteriormente, se dispusieron en un reactor 30 mL del jugo de caña de azúcar filtrado para la hidrólisis enzimática a 90 °C, pH 7 y velocidad de agitación a 150 rpm, considerando las condiciones de concentración de enzima y tiempo de reacción optimizadas. Al cumplir el tiempo de reacción, se tomó una muestra de 3 mL en un vial, y se detuvo la reacción mediante inactivación ácida utilizando 150 µL de HCl 0.25 M. y manteniéndolo en un baño de hielo por 3 minutos. Este experimento se realizó por triplicado. Asimismo, el jugo de caña de azúcar filtrado y el hidrolizado fueron caracterizados determinando °Brix (Norma NMX-F-436-SCFI, 2011), porcentaje de pol (Polarímetro automático, marca Analytical Autopol I Rudolph Research), azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico-DNS (Miller, 1959) y el contenido de almidón (Cole *et al.*, 2016). Finalmente, se determinó la concentración de maltosa, la hidrólisis de almidón y la productividad del proceso de hidrólisis, según lo estipulado anteriormente.

## Resultados y Discusión

### Caracterización enzimática

#### Determinación de T° y pH óptimo

La enzima alfa amilasa de *B. licheniformis* se caracteriza por ser termoestable y tener estabilidad en un intervalo amplio de pH, por estas razones han sido rápidamente introducidas en los procesos industriales, al ser más activas en esas condiciones, además de mostrar una estabilidad térmica menos dependiente de los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que las del *Bacillus amiloliquefaciens* (Martínez, 2005).

En la figura 1 encontramos una marcada diferencia entre las temperaturas y la que reporta una mayor actividad es la de 90 °C, el cual coincide con el valor reportado por Božić *et al.* (2011).

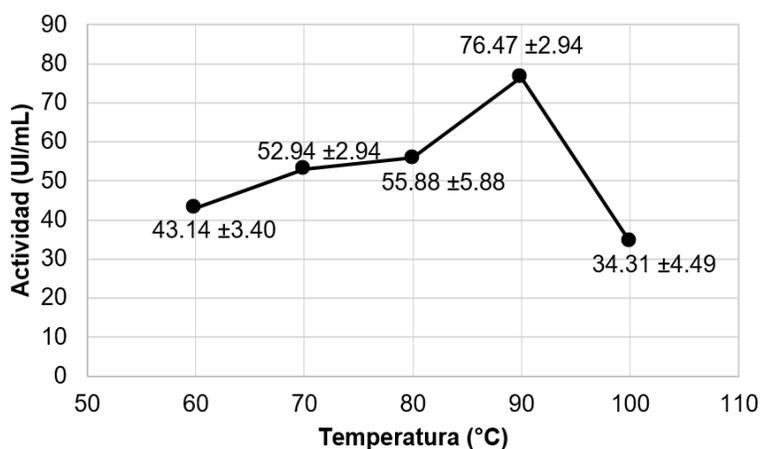
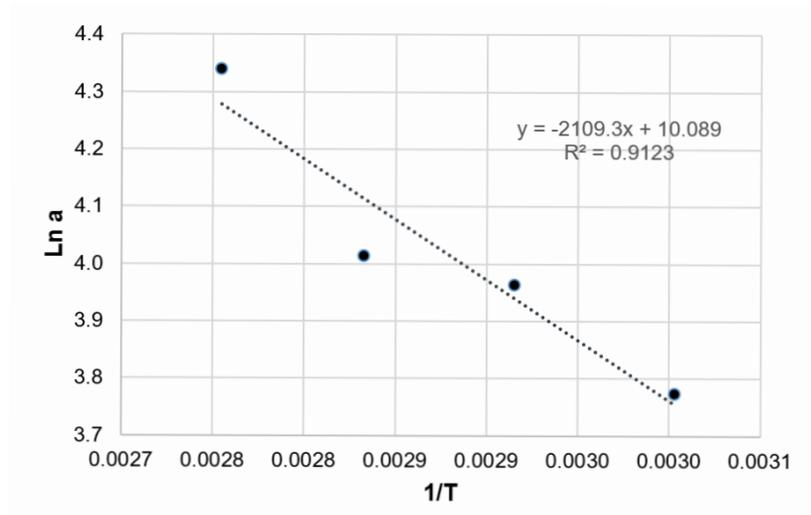


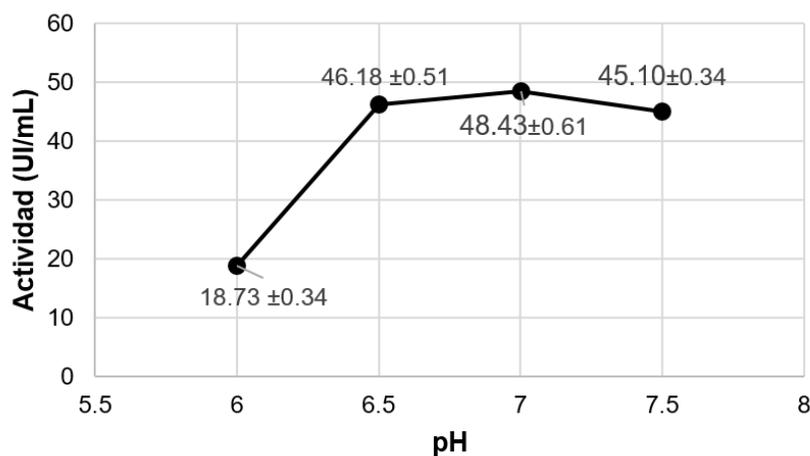
Figura 1. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima alfa-amilasa de *B. licheniformis*.

Con los resultados del estudio del efecto de la temperatura en la actividad enzimática se calculó la energía de activación en 4197.507 cal/mol y la constante de la ecuación de Arrhenius en  $2.4076 \times 10^4$ . Figura 2 muestra el efecto de la temperatura en la actividad enzimática según Arrhenius.



**Figura 2.** Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima alfa-amilasa según la ecuación de Arrhenius.

En la figura 3 se observa que la diferencia de valores de actividad entre el pH de 6.5 a 7.5 no es tan marcada, lo cual reafirma lo anterior descrito por Martínez (2005) que, la enzima alfa amilasa de *B. licheniformis* actúa en ese rango de pH; pero experimenta una caída notable en su actividad a pH menor de 6.5. Por tanto, el pH óptimo fue de 7 que corresponde al de mayor actividad.



**Figura 3.** Efecto del pH en la actividad de la enzima alfa-amilasa de *B. licheniformis*.

## Rango de linealidad

La figura 4 muestra las curvas de rango de linealidad para las diferentes diluciones de enzima, notándose que la dilución enzimática 1:25 alcanza una meseta temprana, debido al agotamiento del sustrato (Brooks, 2012). Se aprecia que la dilución enzimática 1:100 es la más adecuada al mantener el rango de linealidad por 20 minutos. Por otra parte, la dilución enzimática 1:50 también presentó un rango de linealidad de 20 minutos; sin embargo, esta requiere una mayor carga enzimática.

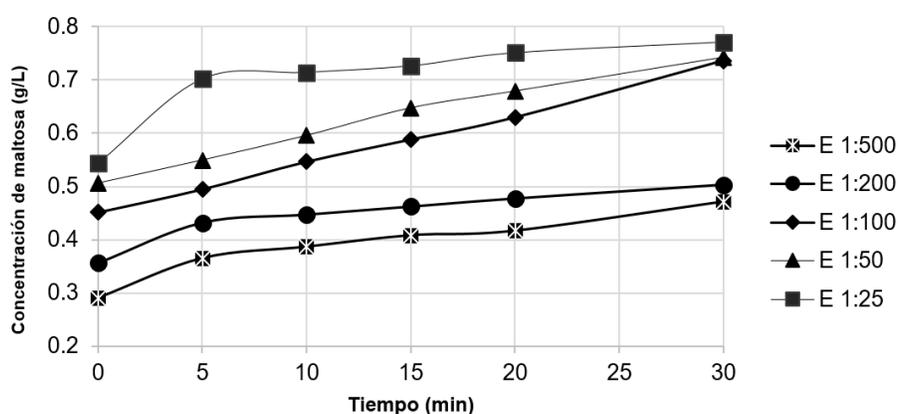


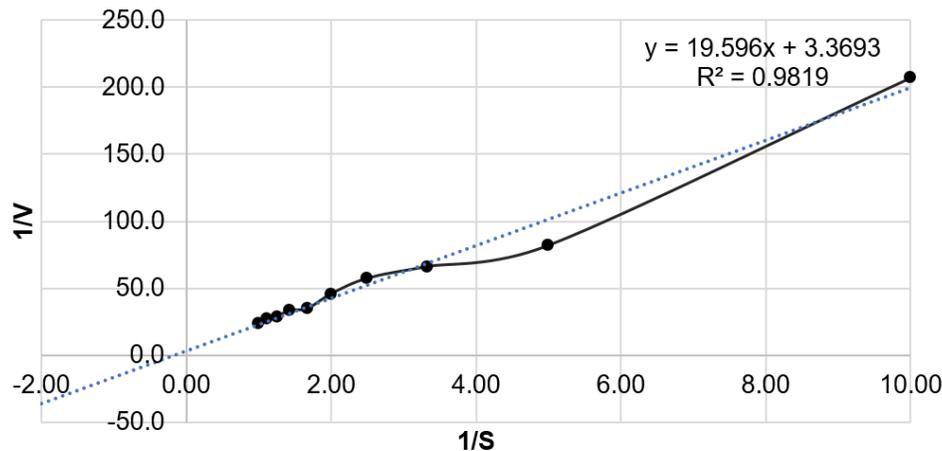
Figura 4. Perfil del rango de linealidad de la hidrólisis enzimática del almidón.

## Actividad enzimática

Con la dilución 1:100 en un tiempo de 20 minutos, pH 7 y 90 °C, se obtuvo un valor de velocidad de 0.0090 g/L\*min y aplicando la ecuación 1, se determinaron las actividades volumétrica y específica de la alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* resultando los valores de 26.40 UI/mL y de 28.35 UI/mg respectivamente. No se ha encontrado información de otras alfa amilasas comerciales, que permitan comparar los resultados obtenidos, sin embargo, para tener una idea en general sobre el valor del potencial catalítico de esta alfa amilasa se compara con otras alfa amilasas de estudio producido por microorganismos y que han sido purificadas. Al respecto, Božić *et al.* (2011) reportaron valores de actividad enzimática de 7.5 UI/mL para una  $\alpha$ -amilasa proveniente de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 purificada por cromatografía de filtración en gel, actuando sobre una solución de almidón 104 ppm a 75 °C, pH 6.5 y por un tiempo de reacción de 15 minutos. Por otro lado, Fincan *et al.* (2021) reportaron valores de 88.981 UI/mg para una  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* SO-B3, enzima purificada por cromatografía de intercambio iónico de DEAE-celulosa, actuando sobre almidón a 70 °C y por un tiempo de reacción de 30 minutos; sin embargo, no se menciona la dilución enzimática empleada en ninguno de los estudios.

## Valores de los parámetros cinéticos

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la alfa amilasa fueron: la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 5,82 g/L y velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de 0.3 g/L\*min para una dilución enzimática 1:100 y un tiempo de reacción de 20 min a partir del método de Lineweaver-Burk (1934) como se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Representación de Lineweaver-Burk (1934) para determinar parámetros cinéticos experimentales.**

Sapadip *et al.* (2014) y Ferrer (2014) reportan valores de  $K_m$  de 6.2g/L y 8.7g/L respectivamente para alfa-amilasas de *B. licheniformis*, mientras que Hoissain (2006) reporta un  $K_m$  de 4.8 g/L con *B. stearothermophilus* y Peña (2009) un valor de 6.7 g/L con *A. niger*, con la excepción del valor de Hoissain (2006) los demás fueron de menor afinidad.

Con respecto a  $V_{max}$ , Hoissain (2006) reportó un valor 6.67 g/L\*min (por conversión de unidades) que expresa mayor reactividad.

## Optimización del proceso de hidrólisis enzimática

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para las dos variables independientes en los 11 experimentos del diseño central compuesto rotatable (RCCD) de la investigación en función de las variables codificadas y no codificadas.

**Tabla 3. Concentración final de maltosa, hidrólisis de almidón y productividad en función de los niveles codificados y no codificados de las variables independientes.**

Experimentos	Concentración de enzima (ppm)	Tiempo de reacción (min)	Concentración de maltosa (g/L)	Porcentaje de hidrólisis (%)	Productividad (g/L*h)
1	573 (-1)	13 (-1)	0.175 ± 0.02	35 ± 4.76	0.808 ± 0.11
2	573 (-1)	27 (1)	0.196 ± 0.02	39 ± 3.83	0.435 ± 0.04
3	927 (1)	13 (-1)	0.333 ± 0.01	67 ± 1.56	1.537 ± 0.04
4	927 (1)	27 (1)	0.251 ± 0.04	50 ± 7.23	0.557 ± 0.08
5	500 (-α)	20 (0)	0.197 ± 0.01	39 ± 2.78	0.590 ± 0.04
6	1000 (+α)	20 (0)	0.200 ± 0.01	40 ± 1.89	0.599 ± 0.03
7	750 (0)	10 (-α)	0.186 ± 0.01	37 ± 1.02	1.115 ± 0.03
8	750 (0)	30 (α)	0.223 ± 0.03	45 ± 5.01	0.446 ± 0.05
9	750 (0)	20 (0)	0.334 ± 0.01	67 ± 2.45	1.002 ± 0.04
10	750 (0)	20 (0)	0.264 ± 0.01	53 ± 2.38	0.793 ± 0.04
11	750 (0)	20 (0)	0.391 ± 0.03	78 ± 5.66	1.173 ± 0.08

Como se observa en la tabla 3, los valores de la concentración final de maltosa oscilaron entre 0,175 y 0,391 g/L, los cuales corresponden a los experimentos con las niveles bajos y altos para cada variable dependiente, respectivamente; los valores de porcentaje de hidrólisis, entre 35 y 78 %, los cuales también correspondieron a los experimentos con las niveles bajos y altos para cada variable dependiente, respectivamente; finalmente, la productividad, oscilaron entre 0,435 y 1,537 g/L\*h. Cabe mencionar que los puntos centrales presentaron coeficientes de variación de 19 % para las tres variables dependientes mencionadas respectivamente, lo cual indicó la buena reproducibilidad del proceso.

En los análisis de varianza (ANOVA) realizados para cada variable dependiente los datos fueron ajustados a un modelo cuadrático. Para el caso de la concentración final de maltosa, se observó que todos los factores lineales, cuadrático y de interacción no fueron significativos (valor-p < 0.05). Los resultados evidenciaron que un incremento en la concentración de enzima y/o el tiempo de reacción no necesariamente genera un incremento en la formación de producto. Lo anterior coincide con lo reportado por Sirohi *et al.* (2021), quienes estudiaron la hidrólisis de almidón por una α-amilasa proveniente de una especie de *Bacillus*, determinando que la concentración de enzima y el tiempo de reacción no tuvieron un efecto significativo sobre la

conversión de almidón en azúcares reductores. Tal resultado se debe a que, al incrementar la concentración de enzima en la solución se incrementa la capacidad de unión del sustrato a los sitios activos de la enzima resultando en una mayor conversión del mismo; sin embargo, dado que la cantidad de sustrato disponible para la hidrólisis no se incrementa, tampoco se incrementa la reactividad de la enzima, por tanto, no se promoverá una mayor formación de producto de la ya alcanzada.

### Análisis de la concentración final de maltosa

En el diagrama de Pareto se muestran los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño. En la figura 6 se observa que el efecto que influyo más sobre la concentración de maltosa fue la concentración de enzima y el de la menos influencia fue tiempo de reacción, pero ambas no significativas.

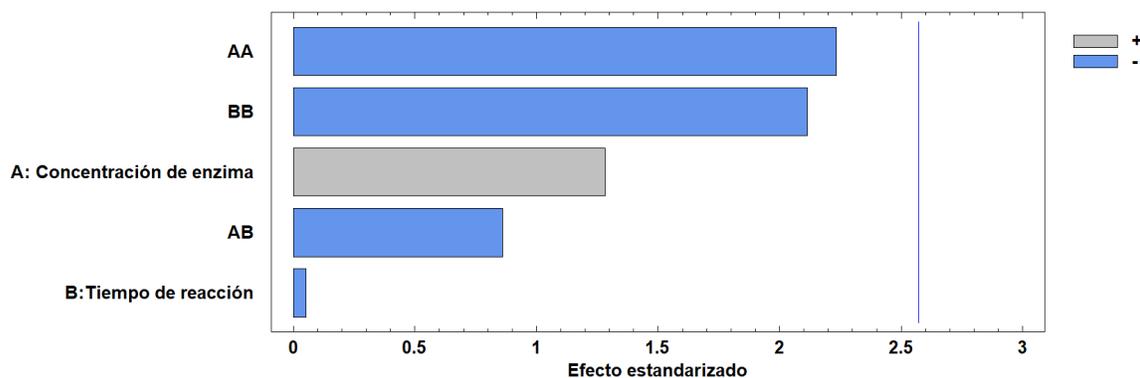


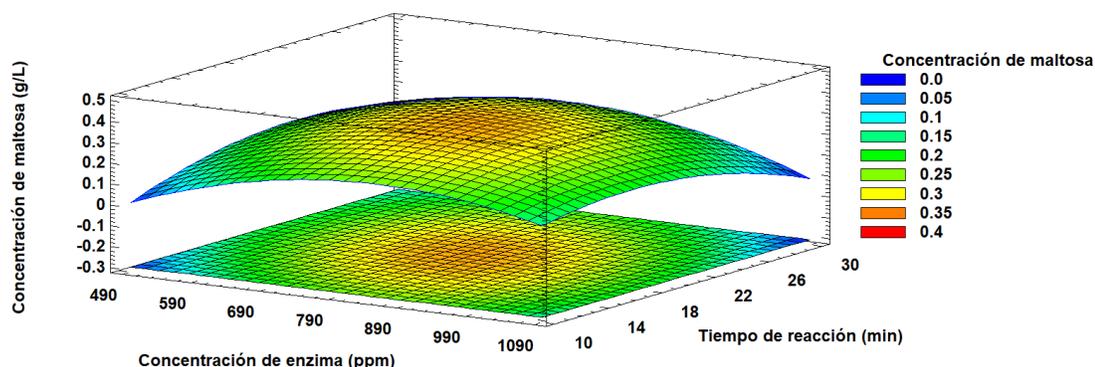
Figura 6. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la concentración de maltosa en el medio sintético de jugo de caña.

El modelo matemático obtenido en función de sus coeficientes de regresión y en términos de los factores reales, para la concentración final de maltosa se muestra en la ecuación 4:

$$\begin{aligned}
 \text{Concentración final de maltosa } \left(\frac{g}{L}\right) = & -1.53923 + 0.00326327 * \text{Concentración de enzima} + \\
 & 0.058919 * \text{Tiempo de reacción} - 0.00000179613 * \text{Concentración de enzima}^2 - 0.0000207829 * \\
 & \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - 0.00108717 * \text{Tiempo de reacción}^2
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 65.9945$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj} = 31.9889$ ) indicaron que, el modelo matemático no se ajusta adecuadamente a los datos experimentales, según Martínez (2005) exponía que lograr una ecuación cinética que represente los cambios en función del tiempo y las condiciones experimentales de la hidrólisis es complicado, a causa de que el almidón tiene una estructura compleja, y la mezcla de este y sus productos de reacción cambian en función al tiempo y estos tienen diferentes pesos moleculares. También, se determinó el valor de la desviación media absoluta (AAD) siguiendo la metodología de Baş & Boyaci (2007), determinando un valor de AAD=13.18%, Teniendo en cuenta los valores obtenidos de  $R^2$  y AAD se concluye que es posible determinar el punto estacionario usando el método de superficie de respuesta (RSM) pero no significa que todos los puntos estacionarios sean óptimos para la reacción enzimática (Bas & Boyaci, 2007).

En la figura 7 se observa que, la concentración final de maltosa se incrementó hasta un punto máximo, después del cual comienza a descender. Dicho punto corresponde a valores cercanos a 800 ppm y 20 min para la concentración de enzima y el tiempo de reacción, respectivamente. Siendo así, se determinó los niveles óptimos de la concentración de enzima y tiempo de reacción son 795.63 ppm y 19.5 min, respectivamente, con los cuales se obtendría una concentración final de maltosa de 0.33 (g/L).

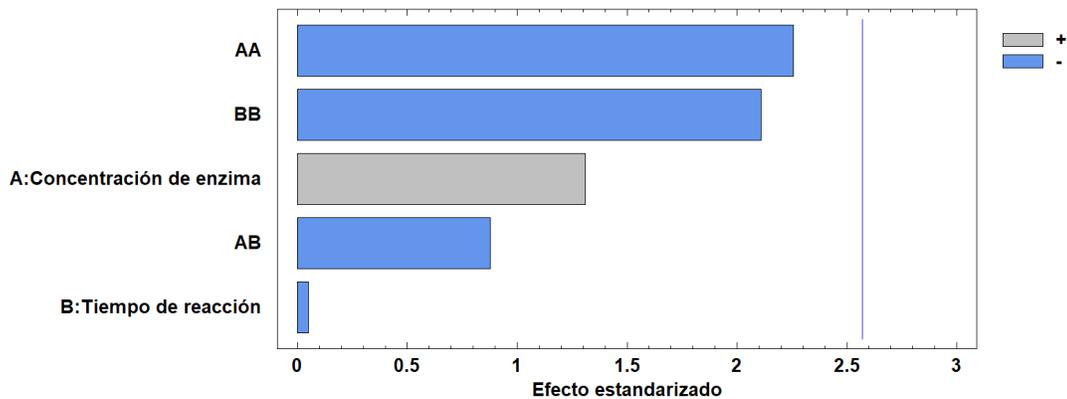


**Figura 7. Superficie de respuesta para la optimización de concentración de maltosa en la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.**

## **Análisis de la hidrólisis del almidón**

Para el caso de la hidrólisis de almidón (%), se observó que todos los factores lineales, cuadrático y de interacción no fueron significativos (valor-p < 0.05). Los resultados de hidrólisis de almidón (%) descritos en la presente investigación están directamente relacionados con los

referidos a la concentración final de maltosa; por lo que, es de esperarse que los factores lineales, cuadráticos y de interacción sean no significativos según se aprecia en la figura 8 y tal como fue descrito anteriormente.

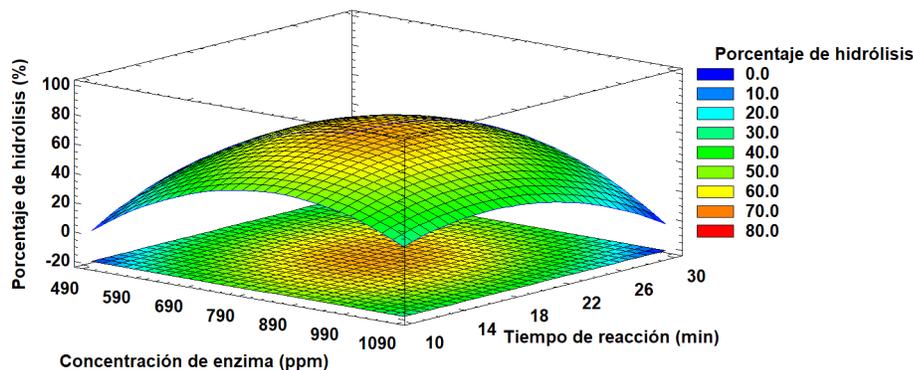


**Figura 8. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para el porcentaje de hidrólisis en el medio sintético de jugo de caña.**

El modelo matemático obtenido en función de sus coeficientes de regresión y en términos de los factores reales, para la hidrólisis de almidón (%) se muestra en la ecuación 5:

$$\begin{aligned}
 \text{Porcentaje de hidrólisis (\%)} = & -311.451 + 0.660736 * \text{Concentración de enzima} + 11.8214 * \\
 & \text{Tiempo de reacción} - 0.000363082 * \text{Concentración de enzima}^2 - 0.00423729 * \\
 & \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - 0.216838 * \text{Tiempo de reacción}^2
 \end{aligned} \quad (5)$$

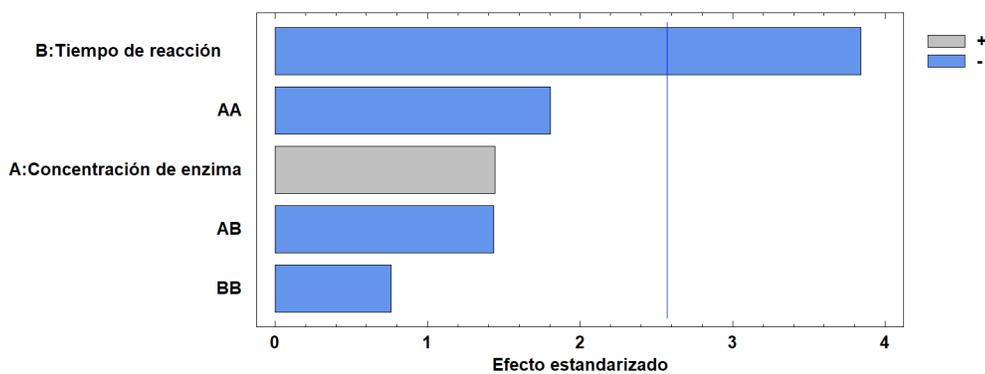
El valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 66.3906$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{adj}} = 32.7812$ ) indicaron que el modelo matemático no se ajusta adecuadamente a los datos experimentales. Asimismo, se determinó el valor de la desviación media absoluta siguiendo la metodología de Baş & Boyacı, (2007), determinando un valor de 13.375%, el cual unido al valor del  $R^2$  definen el comportamiento verdadero del sistema y puede usarse para la interpolación en el dominio experimental. También se determinó que para la hidrólisis de almidón los niveles óptimos de la concentración de enzima y tiempo de reacción serían 796 ppm y 19 min, respectivamente, con los cuales se obtendría una hidrólisis de almidón de 66.73 %, tal como se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Superficie de respuesta para la optimización del porcentaje de hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.**

### **Análisis de la productividad:**

Para el caso de la productividad de la hidrólisis enzimática, se observó que solo el efecto lineal de tiempo de reacción (valor-p < 0.05) es significativo. El efecto significativo del tiempo de reacción sobre la productividad se debe que en la ecuación de cálculo se establece el tiempo como una de las variables inversamente proporcional a la productividad, por lo que, a menor tiempo de reacción se obtendrá una mayor productividad. En la Figura 10 se aprecian estos efectos e interacciones.

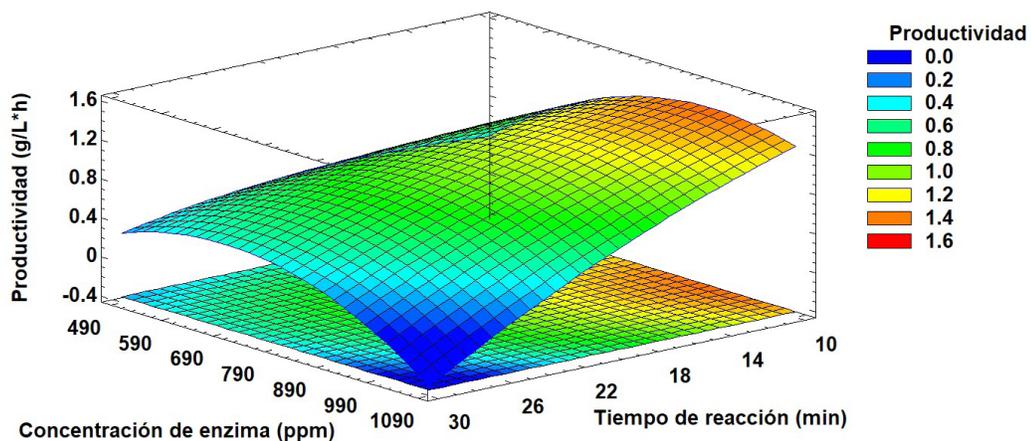


**Figura 10. Diagrama de Pareto de efectos estimados e interacciones para la productividad de la hidrólisis en el medio sintético de jugo de caña.**

El modelo matemático obtenido en función de sus coeficientes de regresión y en términos de los factores reales, para la productividad (g/L\*h) se muestra en la ecuación 6:

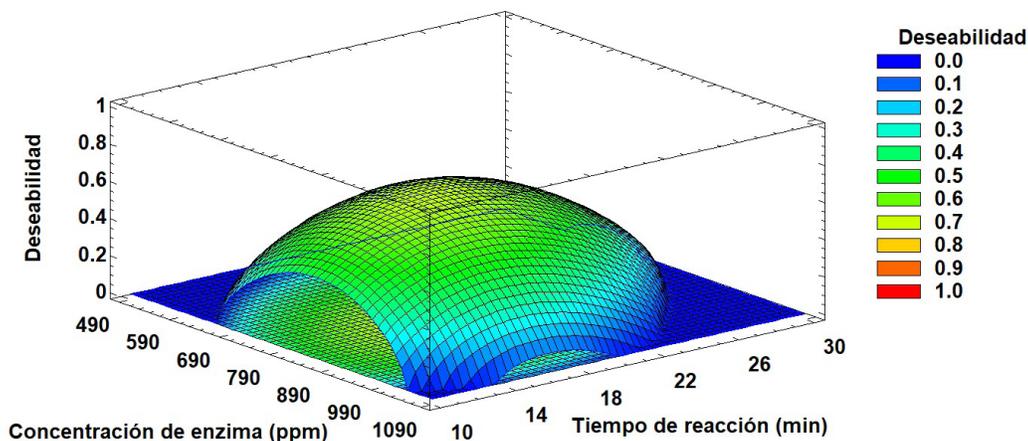
$$\begin{aligned} \text{Productividad (g/L} \cdot \text{h)} = & -3.92296 + 0.0107551 * \text{Concentración de enzima} + 0.106093 * \\ & \text{Tiempo de reacción} - 0.00000513039 * \text{Concentración de enzima}^2 - 0.000122478 * \\ & \text{Concentración de enzima} * \text{Tiempo de reacción} - 0.00138225 * \text{Tiempo de reacción}^2 \end{aligned} \quad (6)$$

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 81.6152$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{adj}} = 63.2304$ ) indicaron que el modelo matemático se ajusta adecuadamente a los datos experimentales. Asimismo, se determinó el valor de la desviación media absoluta siguiendo la metodología de Baş & Boyacı. (2007), determinando un valor de 14.889 %, el cual unido al valor del  $R^2$  definen el comportamiento verdadero del sistema y puede usarse para la interpolación en el dominio experimental. También se determinó que para la productividad los niveles óptimos de la concentración de enzima y tiempo de reacción serían 928 ppm y 10 min, respectivamente, con los cuales se obtendría una productividad de 1.4222 g/L\*h, tal como se aprecia en la figura 11.



**Figura 11. Superficie de respuesta para la optimización de la productividad de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.**

La optimización de las respuestas, concentración de maltosa, porcentaje de hidrólisis y productividad, mediante la función de deseabilidad que, según el criterio de optimización establecido en el diseño, se combinan en una función única (Derringer & Suich, 1980) llamada deseabilidad global, la cual corresponde a una media geométrica de las funciones de deseabilidad individuales. Se halló la combinación de variables (concentración de enzima y el tiempo de reacción ) que alcanza la 'deseabilidad' global óptima (teniendo esta un rango de cero a uno), obteniendo un valor óptimo de 0.68381, donde uno representa la situación ideal y cero indica que una o más respuestas están fuera de los límites aceptables (Meyers y Montgomery, 1995), siendo los valores óptimos para las variables independientes, 817 ppm para concentración de enzima y 17 min para el tiempo de reacción, a partir de los cuales se obtendrían valores para las variables respuestas de concentración final de maltosa, hidrólisis de almidón y productividad, valores de 0.328 g/L, 65.642 % y 1.135 g/L\*h, respectivamente, conforme se aprecia en la figura 12.



**Figura 12. Superficie de respuesta para la optimización de la deseabilidad de las variables de respuesta de la hidrólisis del medio sintético de jugo de caña por acción del alfa-amilasa.**

### Validación de los parámetros de optimización

Para la validación de los resultados del proceso de optimización de la hidrólisis enzimática se utilizó jugo de caña de azúcar (*Saccharum spp híbrido*) de la variedad Mex 73-523, con una concentración de enzima alfa amilasa de 817 ppm y un tiempo de reacción de 17 min. En la tabla 4 se muestra la composición proximal del jugo de caña de azúcar utilizado antes (base) y después

del hidrólisis enzimática (hidrolizado). Como puede observarse en la tabla 5, se alcanzaron valores de 0.38 g/L, 73.09 % y 1.341 g/L\*h de, concentración final de maltosa, porcentaje de hidrólisis y productividad, respectivamente, los que correspondieron a variaciones mayores que los calculados, en 16%, 11.3% y 18% respectivamente entre los valores predichos por el software y los experimentales.

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

Parámetros	Jugo de caña "base"	Jugo de caña hidrolizado
pH	7	7.2
°Brix	18	20
Sacarosa (pol) (%)	17.2	22.7
Azúcares reductores (g/L)	8.5±0.07	8.8±0.05

**Tabla 5. Variables de respuesta calculados y experimentales de la hidrólisis enzimática del almidón en el jugo de caña de azúcar con los valores óptimos.**

Variable Dependiente	Calculado	Experimental	Variación porcentual
Concentración de maltosa (g/L)	0.328	0.380	16.0
Hidrólisis (%)	0.656	0.7309	11.3
Productividad (g/L*h)	1.135	1.341	18.2

Al respecto, Viginotti *et al.* (2014) reportaron un proceso de hidrólisis de almidón con una  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina actuando sobre un jugo de caña de azúcar con una concentración de almidón de 200, 000 ppm y alcanzado una concentración final de azúcares reductores de 0.18 g/L en un tiempo de reacción de 20 min. Al respecto, Sirohi *et al.* (2021) determinaron los valores óptimos para la concentración de enzima y el tiempo de reacción en un proceso de hidrólisis de almidón con una  $\alpha$ -amilasa proveniente de una especie *Bacillus*, estableciendo valores de 50 000 ppm y 60 min, respectivamente, con los cuales obtuvieron 85.25 g/L de azúcares reductores a partir de una solución de almidón 19 000 ppm. Por otro lado, Božić *et al.* (2011) determinaron porcentajes de hidrólisis cercanos al 60% utilizando una enzima proveniente de  $\alpha$ -amilasa *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a actuando sobre una solución de almidón de 1000 ppm con un tiempo

de reacción de 240 min. Asimismo, se ha reportado que la actividad de  $\alpha$ -amilasas provenientes de *Bacillus licheniformis* es estable hasta 90° C y pH 7 (Božić *et al.*, 2011), que fueron las condiciones utilizadas en el presente estudio. Estas condiciones de mayor estabilidad hacen que las  $\alpha$ -amilasas provenientes de *Bacillus licheniformis* tengan aplicación en diversos procesos industriales en el rubro alimentario, fermentación, textiles y otros (Monteiro & De Oliveira, 2010).

Se conoce que la hidrólisis enzimática de almidón mediante  $\alpha$ -amilasas genera un incremento en los niveles azúcares reductores (Božić *et al.*, 2011; Monteiro & De Oliveria, 2010). Lo anterior fue corroborado en el presente estudio, dado que el jugo de caña de azúcar hidrolizado presentó un incremento en la concentración de azúcares reductores, así como en los °Brix, tal como se muestra en la tabla 4. El incremento en los niveles de azúcares reductores se debe a la generación de oligosacáridos y glucosa como productos de la reacción de hidrólisis (Rajesh & Gummadi, 2021). Se precisa que, la determinación de niveles óptimos de variables de procesos tales como la concentración de enzima y el tiempo de reacción, permitirá mejorar el desempeño de los procesos de hidrólisis enzimática realizados al jugo de caña de azúcar y disminuir significativamente los niveles de almidón a nivel industrial.

## Conclusiones

Las actividades de la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* fueron de  $26.48 \pm 0.04$  UI/mL y  $0.284 \pm 0.07$  UI/mg, los valores de sus parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron de 5.82 g/L y 0.3 g/L\*h, respectivamente. Asimismo, se determinó que los factores concentración de enzima y tiempo de reacción no fueron significativos respecto a la concentración final de maltosa e hidrólisis de almidón; sin embargo, el tiempo de reacción si fue significativo para la productividad del proceso. También se determinó que los valores de concentración de enzima y tiempo de reacción óptimos para el proceso fueron 817 ppm y 17 min, respectivamente. Finalmente aplicando las condiciones ambientales optimas al jugo de caña encalado resulto con una hidrólisis del 73.1% del almidón contenido en el jugo de caña de azúcar, obteniendo una concentración de maltosa de 0.380 g/L y una productividad de 1.341 g/L\*h, los cuales tuvieron variaciones de 11.3%, 16%, y 18% respectivamente en relación con los valores calculados, demostrando que el proceso de validación superó los predichos por el diseño experimental.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, V.Y.C., M.M.Z., A.C.C.; desarrollo de la metodología, V.Y.C., M.M.Z., A.C.C.; manejo de software, V.Y.C., M.M.Z.; validación experimental, V.Y.C., M.M.Z., A.C.C.; análisis de resultados V.Y.C., M.M.Z., A.C.C., J.D.B.; Manejo de datos, V.Y.C., M.M.Z., A.C.C.; escritura y preparación del manuscrito, V.Y.C., M.M.Z., A.C.C., J.D.B; redacción, revisión y edición, V.Y.C., A.C.C.

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

## Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo.

## Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”

## Referencias

- Baş, D., & Boyaci, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Božić, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J., & Vujčić, Z. (2011). Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.014>
- 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 (1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brooks, H., Geeganage, S., Kahl, S., Montrose, C., Sittampalam, S., Smith, M., & Weidner, J. (2012). Basics of Enzymatic Assays for HTS. En Sittampalam, G., Grossman, A., Brimacombe K, et al., (Ed.). Assay Guidance Manual [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92007/>
- Brumovsky, L. (2014). Química del almidón. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Cole, M., Eggleston, G., Gilbert, A., & Chung, Y. J. (2016). Development of an analytical method to measure insoluble and soluble starch in sugarcane and sweet sorghum products. *Food Chemistry*, 190, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.049>
- Cole, M.R., Rose, I., Chung, Y.J., & Eggleston, G. (2015). A structured approach to target starch solubilisation and hydrolysis for the sugarcane industry. *Food Chemistry*, 166, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.151>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variable. *Jourl of Quality Technology*, 12 (4), 214-219 <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Eggleston, G. Montes, B. Monge, A., & Guidry, D. (2007). Optimization of amylase application in raw sugar manufacture. Part II: Factory trials. *International Sugar Journal*, 109(1305), 579–584. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=222996>
- FAO [FAOSTAT Statistical Database]. (2022) Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Ferreira, S.J., Kossmann, J., Lloyd, J.R., & Groenewald, J.H. (2008). The reduction of starch accumulation in transgenic sugarcane cell suspension culture lines. *Biotechnology Journal*, 3(11), 1398–1406. <https://doi.org/10.1002/biot.200800106>

- Ferrer, C. (2014). Caracterización enzimática de la  $\alpha$ -amilasa de la cepa termófila *Bacillus Licheniformis* bta-03 aislada de los geiseres de Calientes, candarave- Tacna, 2013 (Tesis pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú.
- Fincan, S. A., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Mustafov, S. D., Ulutaş, M. S., & Şen, F. (2021). Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. *Life Sciences*, 264, 118639. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118639>
- Figueira, J., Carvalho, P.H., & Sato, H.H. (2011). Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 806-815. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300040>
- Hossain, S., Haki, G., & Rakshit, S. (2006). Optimum Production and Characterization of Thermostable Amylolytic Enzymes from *B. stearothermophilus* GRE1. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 84(8), 368 – 374. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450840313>
- Klasson, T., Cole, M., Pancio, B., & Heckemeyer, M. (2022) Development of an enzyme cocktail to bioconvert untapped starch in sweet sorghum processing by-products: Part II. Application and economic potential. *Industrial Crops and Products*, 176, 114370. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114370>
- Li, Z., Wang, D., & Shi, Y.C. (2019). High-Solids Bio-Conversion of Maize Starch to Sugars and Ethanol. *Starch*, 71(1-2), 1800142. <https://doi.org/10.1002/star.201800142>
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of American Chemical Society*, 56(3), 658-666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- 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.2017.01.005>
- Martinez, J. (2005). Utilización de  $\alpha$ -amilasas en la formulación de detergentes industriales (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (1995). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons, New York
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [ MIDAGRI] (2022). Panorama mundial y nacional del azúcar ante variaciones de precios - nota técnica de coyuntura económica agraria (N.º 004-2022-MIDAGRI). <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3035139/Panorama%20del%20az%C3%BAcar%20ante%20variaciones%20de%20precios.pdf>
- 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., Mall. A., Solomon, S., & Ansari, M. (2022). Post-harvest biology and recent advances of storage technologies in sugarcane, *Biotechnology Reports*, 33, e00705. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00705>
- Monteiro, P., & De Oliveira, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Nascimento, W., & Verbi, F.M. (2019). Raw sugarcane classification in the presence of small solid impurity amounts using a simple and effective digital imaging system. *Computers and Electronics in Agriculture*, 156, 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.11.039>

- Norma Mexicana NMX-F-436-SCFI. (2011). Industria azucarera y alcoholera - Determinación de grados brix en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados - Método del refractómetro. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-f-436-scfi-2011.pdf>
- Penados, M. (2004). Evaluación del impacto de adicionar la enzima alfa amilasa durante el proceso de evaporación en los niveles de almidón de azúcar crudo producido en un ingenio azucarero. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Peña, A. (2009). Hidrólisis del almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa. (Tesis de pregrado). Universidad industrial de Santander. Colombia.
- Prompiputtanapon, K., Sorndech, W., & Tongta, S. (2020). Surface Modification of Tapioca Starch by Using the Chemical and Enzymatic Method. *Starch*, 72(3-4), 1900133. <https://doi.org/10.1002/star.201900133>
- Quintero, J.A., Dávila, J.A., Moncada, J., Giraldo, O.H., & Cardona, C.A. (2016). Analysis and characterization of starchy and cellulosic materials after enzymatic modification. *DYNA*, 83(197), 44-51. <https://doi.org/10.15446/dyna.v83n197.42729>
- Rajesh, R., & Gummadi, S. (2021).  $\alpha$ -Amylase and cellulase production by novel halotolerant *Bacillus* sp.PM06 isolated from sugarcane pressmud. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 149-159. <https://doi.org/10.1002/bab.2091>
- Saptadip, S., Arpan, D., Suman, K., Arijit, J., Sanjay, K., Pradeep, K., Bikash, R., & Keshab, C. (2014). Thermodynamic and kinetic characteristics of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* SKB4. *Acta Biologica Szegediensis*, 58, 147-156.
- Sirohi, R., Pandey, J.P. Goel, R., Singh, A., Lohani, U.C., & Kumar, A. (2021). Two-Stage Enzymatic Hydrolysis for Fermentable Sugars Production from Damaged Wheat Grain Starch with Sequential Process Optimization and Reaction Kinetics. *Starch*, 73(1-2), 2000082. <https://doi.org/10.1002/star.202000082>
- Viginotti, F., Polesi, L.F., Aguiar, C.L., & Silveira, S.B. (2014). Structural and physicochemical characteristics of starch from sugarcane and sweet sorghum stalks. *Carbohydrate Polymers* 111, 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.034>
- Zhou, M. M., Kimbeng, C. A., Egglest, G., Viator, R. P., Hale, A. L., & Gravois, K. A. (2008). Issues of starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content in sugarcane. *Sugar Cane International*, 26(3), 3–17. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/48898>.