



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Efecto de la combinación de enzimas amilolíticas en la
obtención de jarabe glucosado a partir de miga de pan.**

Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:

Ingeniero en Alimentos

Autor

Miguel Orlando Urgilez Calle

Director

Marco Antonio Lazo Vélez

Cuenca - Ecuador

2018

DEDICATORIA

El presente trabajo dedico a mis hijos
Mathías y Andrés, motor esencial que
han impulsado y dado orientación a mi vida;

A mi esposa Lady, pilar que me sostuvo en los
momentos que sentía derrumbarme;

A mis padres Lourdes y Miguel, por el ejemplo de
lucha y constancia que han infundido en mí.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a Dios por la sabiduría que me ha brindado para llegar a cumplir esta meta.

Al doctor Marco Lazo Vélez, por la confianza depositada en mi persona al dirigir el presente trabajo de graduación.

A la Doctora María Elena Cazar, Doctor Rodrigo Caroca e Ingeniero Diego Montero por su constante apoyo durante la realización de esta tesis.

A la Universidad del Azuay por abrirme las puertas y por el aporte económico invaluable en la realización del presente trabajo.

A mis hermanos, Martín, Fernando y Hernán por todos los momentos buenos y malos que la vida nos ha permitido compartir.

A Juan Encalada y Dolores Reinoso, personas en quienes encontré apoyo incondicional, mismo que me ha permitido hoy llegar hasta aquí.

A mis amigos, a mis compañeros de aula, a mi familia, gracias a todos ellos que de una u otra forma han hecho de este camino universitario un poco más llevadero.

Índice de contenidos

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IV
RESUMEN.....	V
PALABRAS CLAVES	V
ABSTRACT	VI
KEYWORDS	VI
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE ANEXOS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	4
1.1. MIGA DE PAN ENRIQUECIDA CON ALMIDÓN	4
1.2. LICUEFACCIÓN Y SACARIFICACIÓN DE LOS ALMIDONES POR HIDROLISIS ENZIMÁTICA	4
1.4. ANÁLISIS PROXIMALES	5
1.5. CALIDAD DEL ALMIDÓN Y JARABES.....	5
1.6. RENDIMIENTO.....	6
1.7. DISEÑO ESTADÍSTICO	6
1.8. DIAGRAMA DE PROCESO PARA OBTENCIÓN DE JARABES GLUCOSADOS....	7
CAPITULO II	8
RESULTADOS	8
2.1. COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LA MIGA.	8
2.2. COMPOSICIÓN DE AZÚCARES SIMPLES °BRIX Y COLOR DE LOS JARABES. .	8
2.3. GRADO DE CONVERSIÓN DE ALMIDÓN A JARABE EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	9
CAPITULO III.....	11
DISCUSIONES	11
3.1. ANÁLISIS PROXIMAL Y DE CONTENIDO DE ALMIDÓN DE LA MIGA	11
3.2. ANÁLISIS DE °BRIX, AZÚCARES Y COLOR DE LOS JARABES.....	11
3.3. ANÁLISIS DEL GRADO DE CONVERSIÓN DE ALMIDÓN A JARABE EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	12
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	13
BIBLIOGRAFÍA	14
ANEXOS.....	16

Efecto de la combinación de enzimas amilolíticas en la obtención de jarabe glucosado a partir de miga de pan.

Resumen

En la actualidad el desperdicio de alimentos significa pérdidas económicas elevadas, así como también supone un problema ambiental y social. Los desperdicios de pan pueden ser convertidos en miga rica en almidón a través de procesos como el desgrasado y desproteínizado. El presente trabajo demostró la factibilidad de uso de esta miga enriquecida para la obtención de jarabes glucosados con el uso combinado de dos enzimas, α -Amilasa y glucoamilasas (AMG), mismas que fueron empleadas en dos etapas, licuefacción y sacarificación respectivamente. La conversión de almidón en el mejor tratamiento fue de 78.7%, mientras que las azúcares reductores totales alcanzaron 45.8%.

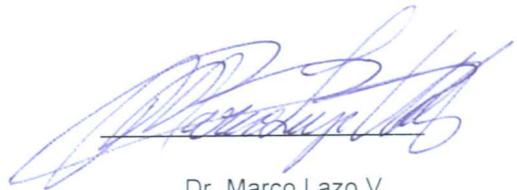
Palabras claves: Hidrólisis, α -amilasa, glucoamilasa, enzimas, almidón.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.

Coordinadora Escuela

Ingeniería en Alimentos



Dr. Marco Lazo V.

Director de tesis



Sr. Miguel Urgilez Calle

Autor

Effect of the combination of amylolytic enzymes in obtaining glucosed syrup from breadcrumb.

Abstract

Currently, waste food means high economic losses and has become an environmental and social problem. Waste bread could be turned into crumbs rich in starch through processes such as defatted and deproteinized. The present work demonstrated the feasibility of using this enriched crumb to obtain glucosed syrups with the combined use of the α -Amylase and glucoamylase (AMG) enzymes. These were used in two phases, liquefaction and saccharification. The conversion to starch in the best treatment was 78.7%, while the total reducing sugars reached 45.8%.

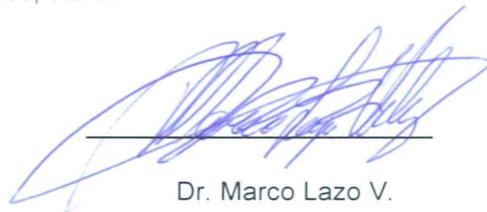
Keywords: Hydrolysis, α -amylase, glucoamylase, enzymes, starch.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.

Faculty Coordinator

Food Engineering



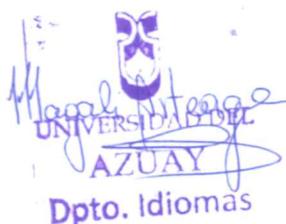
Dr. Marco Lazo V.

Thesis Director



Sr. Miguel Urgilez Calle

Author



Translated by

Ing. Paul Arpi

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: CANTIDAD DE ALIMENTOS DESPERDICIADOS AL AÑO POR PERSONA.....	1
TABLA 2: COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LAS MIGAS DE PAN.¹	8
TABLA 3. CONTENIDO DE ° BRIX, AZÚCARES Y COLOR DE LOS JARABES.¹.....	9
TABLA 4. PORCENTAJES DE CONVERSIÓN DE ALMIDÓN A JARABE EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.¹	10

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. MEJOR ACTIVIDAD DE A-AMILASA EN EL TIEMPO	16
ANEXO 2. MEJOR ACTIVIDAD DE LA AMILOGLUCOSIDASA EN EL TIEMPO	16

Miguel Orlando Urgilez Calle

Trabajo de graduación

Marco Antonio Lazo Vélez

Marzo, 2018

Efecto de la combinación de enzimas amilolíticas en la obtención de jarabe glucosado a partir de miga de pan

INTRODUCCIÓN

Actualmente los hábitos de adquisición de alimentos nos han empujado a comprar más de lo necesario, generando una importante cantidad de desperdicios alimentarios. Alrededor del mundo, los grupos de alimentos más desperdiciados son las carnes, frutas, vegetales y productos de panadería, estos últimos, alimentos básicos de las culturas occidentales. Koseva & Colin, (2013).

En el mundo casi la mitad de los alimentos desechados están en estado fresco, crudo o mínimamente procesado, también se encuentran alimentos enteros, intactos o sin abrir en los depósitos de basura. Los alimentos ricos en almidón son los más comúnmente desechados luego de haber sido preparados; alrededor de 1 millón de toneladas de estos alimentos se desperdician anualmente, dentro de los cuales sobresalen los artículos de panadería con un desperdicio de 1.2 millones de artículos anuales Ventour (2007).

En la tabla 1 se destaca los alimentos más desperdiciados por persona en un año y los costos asociados a los mismos.

Tabla 1: Cantidad de alimentos desperdiciados al año por persona.

TIPO DE ALIMENTO	KG/PERSONA/AÑO		
	Cantidad comprada	Cantidad desperdiciada	Costo £ millón año
PANADERÍA	56	17	£ 135
CARNES Y PESCADO	46	6	£ 602
LÁCTEOS	120	4	£ 415

Fuente. Datos tomados de (Ventour, 2007).

La mayor parte de los desperdicios generados en la industria panificadora, son destinados a la elaboración de alimentos animales y la generación de bioalcohol principalmente, el resto es desechado a la basura, convirtiéndose en desperdicios. Sin embargo, podrían ser aprovechados de mejor manera recuperando los almidones y convirtiéndoles en

edulcorantes, minimizando de esta forma el impacto ambiental y las pérdidas económicas de las empresas panificadoras.

En la actualidad se está buscando reducir los desperdicios de los alimentos obteniendo derivados de los mismos, tales como alimentos para animales, abonos, biopolímeros entre otros. Joe Leunga, Yeung Cheunga, Yan-Zhu Zhanga, Fung Lamb, & Ki Lin (2012) describen un estudio para la "Utilización de residuos de pan para la producción fermentativa de ácido succínico", donde el pan de deshecho se fermento con *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae* que producen complejos enzimáticos amilolíticos y proteolíticos respectivamente que luego fueron añadidos directamente a una solución de pan para generar un hidrolizado de glucosa y nitrógeno amino libre (FAN). Este hidrolizado de pan se utilizó como única materia prima para fermentación con *Actinobacillus succinogenes*, lo que condujo a la producción de Ácido succínico. Sin embargo, el proceso de recuperación de alimentos desperdiciados puede tener algunos riesgos durante el proceso; es así que en Alemania al reprocesar residuos de panadería para alimentación animal se desato un problema de contaminación con dioxinas, de los piensos obtenidos, dicha contaminación se originó en el momento del secado de las muestras, al utilizar residuos de madera en el proceso. Hoogenboom et al (2004)

Los almidones constituyen la base principal para la producción de jarabes y edulcorantes, sean estos glucosados o fructosados mismos que la industria de bebidas los utiliza con mayor frecuencia. La base de almidón se obtiene generalmente del maíz Serna Saldívar (2003). El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa, tiene en su estructura dos polímeros, amilosa y amilopectina unidas entre sí por enlaces α -D-(1,4)-glucosídicos. La amilosa es un polisacárido lineal formado por unidades de α -D-glucosa con enlaces α -1,4 originando estructuras helicoidales, la mayoría de los almidones tienen en su estructura alrededor del 20% de amilosa, el restante \approx 80% lo conforma la amilopectina, con estructura compleja de cadenas ramificadas, las cadenas principales están unidas por enlaces α -1,4 mientras que las ramificaciones se forman mediante enlaces α -1,6 FAO (1999), Herrera et al (2003). Debido a que el almidón es el polisacárido más utilizado como ingrediente funcional en la industria alimentaria, se hace necesario buscar nuevas fuentes para su extracción Hernández Medina, Torruco Uco, Chel Guerrero, & Betancur Ancona, (2008).

Por su parte las enzimas son proteínas que actúan como catalizador biológico, llevan a cabo reacciones a muy altas velocidades, no se consumen durante la reacción Badui (2006). Una de las características más sobresalientes de las enzimas es que son catalizadores altamente selectivos y versátiles, esto debido a la gran diversidad existente y a las reacciones que llevan a cabo, entre ellas, polimerización, hidrolisis, transferencia de grupos funcionales, etc.; la catálisis de los complejos ES (enzima-sustrato) tiene lugar en un punto específico de la enzima, llamado centro activo Berg et al (2008), Voet & Voet (2006).

La velocidad de la reacción enzimática está determinada por varios factores, como la relación enzima sustrato, la temperatura y el pH; es así que al tener un complejo ES saturado la velocidad de reacción va a ser mayor, el pH y la temperatura también inciden en la velocidad

de reacción y son específicas de acuerdo a cada grupo de enzimas, la velocidad aumenta de manera proporcional con la temperatura hasta llegar a un punto máximo de reacción luego del cual comienza a disminuir la actividad hasta que finalmente se inactiva Christensen & Palmer (1980), McGilvery (1977).

El principio para la transformación de almidón a edulcorantes está en la hidrólisis, sea esta enzimática o química (ácida), cuyo principal objetivo es la de romper las cadenas de amilosa y amilopectina del almidón, mismo que de forma progresiva se va transformando en un producto más soluble y dulce. El producto final de la hidrólisis de las cadenas moleculares del almidón es la glucosa en su forma de dextrosa, siendo posible detener el proceso en cualquiera de las etapas, teniendo siempre en cuenta el espectro de carbohidratos presentes ya que de esto dependen las propiedades físicas y poder edulcorante que tendrá el jarabe Serna Saldívar (2003).

El uso de enzimas en los procesos de obtención de jarabes ha hecho de esta industria más innovadora y competitiva, pudiéndose obtener una gran variedad de productos muy funcionales y con diferente poder edulcorante, dejando de lado los procesos tradicionales como la hidrólisis ácida que era utilizada para la obtención de jarabes con bajos valores en equivalente de dextrosa o como paso previo a la hidrólisis ácida Serna Saldívar (2003).

Los jarabes con bajo equivalente de dextrosa son ricos en dextrinas, pero con bajo grado de dulzura, caracterizados por ser viscosos, contienen alrededor de 10-20 equivalentes de dextrosa y son considerados como materia prima, especialmente en la elaboración de jarabes glucosados o fructosados Serna Saldívar (2013).

Los jarabes glucosados son jarabes que se pueden obtener por hidrólisis ácida o enzimática, siendo más utilizada esta última ya que genera mayor cantidad de producto final. Con el descubrimiento de la amiloglicosidasa la conversión ácida se utiliza como paso preliminar a la conversión enzimática, aunque en la actualidad se utilizan mayoritariamente los procesos enzimáticos en la totalidad del proceso ya que se llega a obtener jarabes con hasta 96% de glucosa. Los jarabes resultantes de la conversión son refinados y clarificados mediante procesos combinados de centrifugado y filtrado con carbón activo y resinas iónicas Serna Saldívar (2013).

CAPITULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en dos etapas: La primera tuvo como objetivo la obtención de almidón a partir de miga de pan generada en locales comerciales de la ciudad de Cuenca y la segunda consistió en la conversión de almidones a jarabes glucosados por métodos químicos y enzimáticos. Para llevar a cabo la segunda parte fue necesario diseñar procesos enzimáticos para transformar el almidón a dextrinas (licuefacción) y convertir las dextrinas a glucosa (sacarificación).

1.1. Miga de pan enriquecida con almidón

Para la obtención de la miga control (MC) se utilizó una mezcla de desperdicios de panes, adquiridos en una empresa panificadora asentada en la ciudad de Cuenca, a los cuales se les sometió a un proceso descortezado y secado por convección durante 14 horas a 50°C (Tecnopast, Trento, Italia). Una vez secas las muestras fueron reducidas a partícula de 0.16 – 0.25 mm de tamaño en un molino (Krupps, Solingen, Alemania).

La extracción de la grasa de la miga se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Mosquera (2018). Brevemente, 500g de miga fueron homogenizadas en 300 mL de hexano durante 2 horas, finalizado el tiempo fueron centrifugadas a 2500g por 10 min en una centrifuga (Eppendorf Hamburgo, Alemania), Este procedimiento fue realizado por tres ocasiones. El precipitado obtenido fue neutralizado con HCl 0,1N y lavado dos veces con agua destilada y dos veces con alcohol. Finalmente, la miga desgrasada (MD) fue colocada en bolsas plásticas tipo ziploc debidamente rotuladas y almacenadas en un congelador a -20°C para su posterior análisis y uso. En este proyecto se realizó un lavado extra con hexano debido a que no se eliminó toda la grasa de la miga.

Por otro lado, se realizó la extracción enzimática de proteínas de acuerdo a Mosquera (2018). Para lo cual se utilizó la bromelina como enzima proteolítica, debido a su bajo costo y rendimientos similares a la fisisina, con este proceso se obtuvo la miga desproteinizada (MDP).

1.2. Licuefacción y sacarificación de los almidones por hidrolisis enzimática

Las proporciones de miga utilizadas para preparar las soluciones fueron calculadas tomando en cuenta el contenido de almidón presente en la MDP. La obtención del jarabe glucosado fue realizada en dos etapas, la primera etapa consiste en la licuefacción del almidón contenido en una solución 1:5 almidón/HCl 0.03N, la cual fue ajustada a pH 6.8 mediante la adición de Ca(OH)₂, esta solución fue calentada a 85°C temperatura a la cual se agregó α -Amilasa (SIGMA, San Luis Misuri, USA) a razón de 600 μ L/L de solución. La suspensión fue mantenida durante una hora en una estufa con agitación marca (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), (ver anexo 1), una vez transcurrido este tiempo la solución se ajustó a pH 4.3 mediante la adición de HCl 1N, y la temperatura fue disminuida a 60°C.

La segunda etapa de la hidrólisis fue la sacarificación, para lo cual a la solución resultante de la etapa anterior se adicionó AMG (SIGMA, San Luis, Misuri, USA) en una proporción de 0.4 ml/100ml, esta solución fue mantenida a 60°C durante 19 horas. Una vez transcurrido este tiempo el jarabe fue retirado de la estufa, enfriado y neutralizado (ver anexo 2).

Para poder llevar el control de cada una de las etapas fueron necesarias realizar pruebas de control positivo tanto con AMG así como con α -amilasa.

También fue ejecutado un control positivo con un jarabe obtenido por hidrólisis ácida. Este proceso fue realizado de acuerdo a la técnica descrita por Serna Saldívar (2003), con ligeras modificaciones.

1.3. Refinación de jarabes

Una vez obtenidos los jarabes estos fueron tratados de manera tal que se eliminaran las sustancias indeseables presentes, para esto fue necesario un primer filtrado en un filtro tipo lienzo donde se retuvieron las partículas de mayor tamaño, un segundo filtrado fue realizado con carbón activado y un filtro Whatman #40, todo esto con la ayuda de una bomba de vacío (Gast, Michigan, USA). Una vez finalizada la etapa de filtrado, los jarabes se evaporaron hasta llegar a los °Brix deseados, este paso se realizó en un rotavapor (Heidolph, Schwabach, Alemania) al cual se le adaptó una bomba de vacío para conseguir extraer el agua a bajas temperaturas, los jarabes fueron filtrados nuevamente para aclararlos.

1.4. Análisis proximales

Los análisis proximales se realizaron acorde a las Normas Técnicas Ecuatorianas INEN: NTE INEN-ISO 712:2013, NTE INEN ISO 20483:2013, NTE INEN 523:1981, NTE INEN 520:1980, NTE INEN 522:2013, para valoración de humedad, proteínas, grasas, cenizas y fibra, respectivamente. El contenido total de carbohidratos se obtuvo por diferencia. los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

1.5. Calidad del almidón y jarabes.

El contenido de almidón total, resistente y dañado, así como la *D*-Glucosa, *D*-Fructosa y azúcares reductores totales, donde fue requerido, se determinaron mediante métodos colorímetros analizados a través de kits de la marca Megazyme (Megazyme International Ireland, Bry, Irlanda): *Total Starch (Amyloglucosidase/ α -Amylase Method)* (AOAC: Method 2002.02, AACC: Method 32-40.01 y Codex Type II); *Resistant Starch K-RSTAR* (AOAC Método Oficial 996.11 y AACC Método 76.13.01) y *Starch Damage, K-SDAM*, (AACC Method 76-31.01 e ICC Method No. 164) para los tres primeros análisis, respectivamente. Mientras que los tres últimos se realizaron mediante la utilización de *D-Fructose/D-Glucose ASAY KIT*, K-FRGLQR 09/15. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las especificadas del manual de usuario de cada kit. Para el cálculo de los equivalentes de dextrosa (ED) fue usada la siguiente fórmula:

$$ED = \frac{AT}{MW} * 100$$

Donde:

AT= Azucares reductores totales

MW= Peso de la muestra expresada en base seca

Los grados Brix de las muestras se midieron a temperatura ambiente con un refractómetro digital (Milwaukee, Wisconsin, EE. UU) con una escala de 0 a 85 unidades.

El color de los jarabes fue determinado de acuerdo a Hernández, Rodríguez y Bello (2008) en un espectrofotómetro (Epoch, USA) a una longitud de onda de 560nm. El color fue determinado de acuerdo al siguiente cuadro.

Unidades DO	Color Visual
0,025	Agua
0,035	Paja muy ligero
0,050	Paja ligero
0,060	Paja
0,075	Paja amarillo muy ligero
0,100	Amarillo medio ligero
0,125	Amarillo ligero
0,150	Amarillo
0,200	Amarillo fuerte

1.6. Rendimiento

El porcentaje de conversión se obtuvo aplicando la formula $\%conversion = 100 - \left(\frac{Pr}{Pm} * 100\right)$, donde:

% conversión= cantidad total de almidón hidrolizado

Pr= peso del residuo expresado en base seca*

Pm= peso de la muestra expresado en base seca**

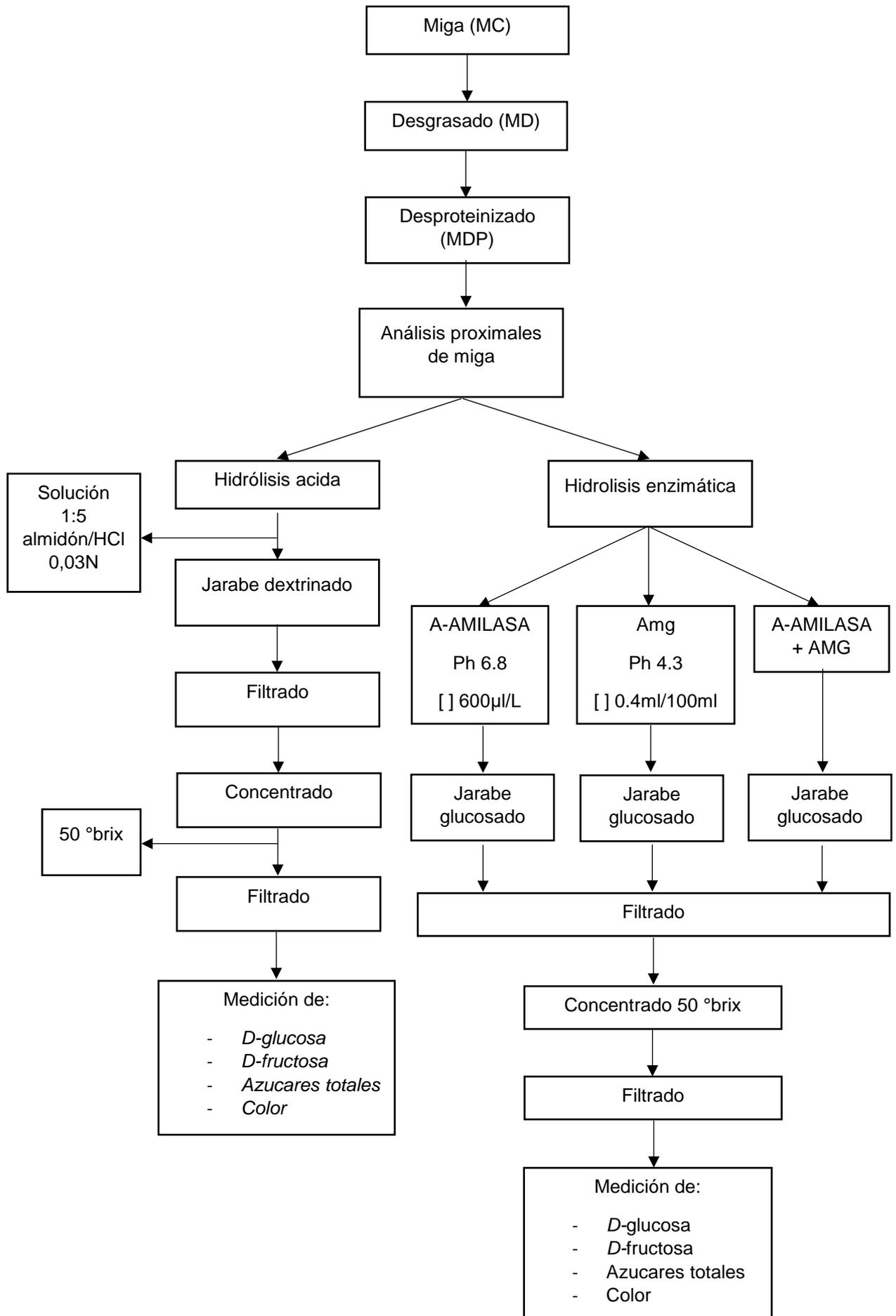
* Pr, es el peso del almidón no hidrolizado, resultante de la filtración de los jarabes.

** Pm, peso total del almidón a ser hidrolizado.

1.7. Diseño estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP-13 (SAS Corporation, Long Beach, CA, USA). Todos los análisis se expresaron como desviación estándar media de mínimo tres replicas independientes (n = 9), a menos que se indique lo contrario. Cuando fue necesario se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis de Tukey HSD o t-Student para evaluar las diferencias entre las muestras con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

1.8. Diagrama de proceso para obtención de jarabes glucosados



CAPITULO II

RESULTADOS

Las muestras se analizaron por triplicado y se presentan los valores medios con desviación estándar.

2.1. Composición proximal de la miga.

Los valores porcentuales de la composición proximal de la miga base para la elaboración de los jarabes son detalladas en la tabla 2. Todos los parámetros evaluados varían significativamente entre sí y entre muestras. La mayor variación fue observada en el contenido de grasas, estas fueron 8 veces menor en las muestras desgrasadas (MD y MDP) cuando fueron comparadas con la muestra control. En cuanto a las cenizas. Si bien hubo una variación significativa entre las muestras, todas se mantuvieron en valores alrededor del 3%.

Por otro lado, cuando fue comparado el contenido de proteínas en las muestras MD y MDP estas presentaron un porcentaje mayor y menor cuando se compararon en con la muestra control, respectivamente. Esto último sugiere un proceso de desproteínado facilitado por las enzimas usadas en el proceso. Mientras que tanto el proceso de desgrasado y o el subsecuente despretinado generaron que la fibra no sea detectada en MD y MDP.

Tabla 2: Composición química proximal de las migas de pan.¹

Parámetros	Muestra		
	MC ²	MD ³	MDP ⁴
	%	%	%
Humedad	22.8±0.9 ^a	8.7±0.12 ^c	9.3±0.10 ^b
Cenizas	3.3±0.3 ^b	2.9±0.03 ^c	3.4±0.10 ^a
Grasa	7.3±0.3 ^a	0.9±0.01 ^b	0.9±0.01 ^b
Proteínas	5.4±0.2 ^b	7.1±0.1 ^a	4.2±0.10 ^c
Carbohidratos	60.6±0.9 ^c	80.2±0.09 ^b	81.9±0.28 ^a
Fibra	0.26±0.1	ND	ND

¹ Los datos son media ± desviación estándar de mínimo 3 réplicas. Los valores con la misma letra dentro de las filas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

²MC: muestra control

³MD: Muestra desgrasada

⁴MDP: muestra desproteínada

En cuanto a la composición de almidones en la MDP, estos fueron de 78.6%, 6.7%, 13.7% de almidón total, almidón resistente y almidón dañado respectivamente.

2.2. Composición de azúcares simples °Brix y color de los jarabes.

Los valores de sólidos totales en las muestras tratadas con enzima no presentan diferencias significativas entre sí. Sin embargo, el contenido de sólidos totales en el jarabe obtenido por hidrólisis ácida fue significativamente menor ($p < 0.05$) frente a los demás tratamientos. Los

jarabes tratados con hidrólisis ácida presentaron un valor de 7% °Brix mientras sus contrapartes elaboradas con procesos enzimáticos presentaron valores medios de 15% °Brix, previos a su concentración a 60° Brix. Siendo los jarabes tratados con hidrólisis ácida los que llegaron solo a una concentración final de 50–Brix.

Tanto el color como la cantidad de azúcares reductores totales en los jarabes varió significativamente. En cuanto a las azúcares reductoras, los tratamientos en los que se uso AMG de formas aislada y su combinación con α -amilasa fueron los que mejores resultados presentaron, teniendo una concentración de 12.3 y 13,8 veces más que el jarabe obtenido por hidrólisis ácida. Por otro lado, en el análisis del color las muestras tratadas con α -amilasa – AMG presentaron una coloración más intensa.

El contenido de solidos totales, azúcares y color de los jarabes en los diferentes tratamientos son descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido de ° Brix, azúcares y color de los jarabes.¹

Tratamiento	Parámetros				
	°Brix (Sólidos totales)	D-glucosa (mg/l)	D-fructosa (mg/l)	Azucares totales (mg/l)	Color ² (DO) ³
Hidrólisis ácida	49.3±0.24 ^b	2.5 ±0.07 ^d	0.6±0.49 ^c	3.3±0.73 ^d	0.05±0,01 ^d
α -amilasa	59.8±0.30 ^a	20.4±0.50 ^c	3.2±0.08 ^b	23.5±0.50 ^c	0.07±0.01 ^c
AMG	59.8±0.30 ^a	36.9±0.48 ^b	3.6±0.20 ^b	40.5±0.60 ^b	0.09±0.01 ^b
α -amilasa -AMG	59.9±0.32 ^a	41.7±0.87 ^a	4.1±0.56 ^a	45.8±0.81 ^a	0.12±0.01 ^a

¹ los datos son media \pm desviación estándar de 9 replicas

Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

² Absorbancia del jarabe a 560 nm

³Densidad óptica

2.3. Grado de conversión de almidón a jarabe en los diferentes tratamientos.

La cantidad de almidón convertido a jarabe glucosado varía significativamente de acuerdo a cada tratamiento aplicado, siendo el complejo enzimático α -amilasa – AMG el que mayor grado de conversión presenta, resultando este 1,7 veces mayor a la conversión obtenida de la hidrólisis ácida. Los valores de conversión se reportan en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de conversión de almidón a jarabe en los diferentes tratamientos.¹

Tratamiento	Rendimiento (%)
Amiloglucosidasa	71.7±0.19 ^b
α-amilasa + amiloglucosidasa	78.7±0.76 ^a
Hidrólisis ácida	45.8±0.63 ^d
α-amilasa	65.8±0.95 ^c

¹ los datos son media ± desviación estándar de 9 replicas

Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

CAPITULO III

DISCUSIONES

3.1. Análisis proximal y de contenido de almidón de la miga

La composición química de la MC obtenida fue comparable con los valores expuestos por Cando y León (2012) quienes reportan valores de **23.9, 5.8, 8.7, 1.4 y 60.2 %** de humedad, grasa, proteína, cenizas y carbohidratos respectivamente. La MDP al poseer un bajo contenido de grasa y proteínas y un alto porcentaje de carbohidratos, en comparación con la muestra control, fue utilizada para la obtención de los jarabes glucosados.

El contenido de almidón total típico para muestras de pan frescos según Sosa Sellan (2015) fue de 54% y el contenido de almidón resistente de 1.25%. No se reporta valores para almidón dañado. En comparación con los valores obtenidos en la presente investigación se obtuvieron contenidos de almidón total y almidón resistente 1.4 y 5.36 veces más respectivamente que los reportados por el autor. Sin embargo, estos valores pueden variar de acuerdo al tipo de pan y el tiempo transcurrido desde la elaboración del producto, ya que a medida que pasa el tiempo el almidón comienza su proceso de retrogradación. Las muestras analizadas en el presente trabajo corresponden a muestras de pan residual, también llamado pan duro, mismos que debido al periodo de almacenamiento han tenido el tiempo necesario para que se produzca la retrogradación, proceso durante el cual dos moléculas adyacentes de almidón se recrystalizan para formar dobles hélices, dando como resultado un mayor contenido de almidones resistentes cuya estructura es más difícil romper durante la hidrólisis enzimática (Ai, 2013).

3.2. Análisis de °brix, azúcares y color de los jarabes

Los resultados obtenidos para sólidos totales están dentro de los límites aceptables por la norma mexicana (NMX-F-169-1984) la cual establece que el contenido mínimo de sólidos totales presentes en jarabes glucosados será de 59.1%. Por otro lado la normativa del Codex Alimentario (CODEX STAN 212-1999) dictamina que los jarabes glucosados deben presentar un contenido total de sólidos de no menos del 70% m/m. En estudios similares de hidrólisis de almidón de yuca y ñame Tejada Benitez, Rivera, Rosales, Tejada & Tordecilla (2011). reportan valores de 56 y 58° brix respectivamente, asemejándose a los valores obtenidos en este estudio. Sin embargo, en el presente estudio se observó que al incrementar el contenido de sólidos por encima de los 60°brix los jarabes tienden a cristalizar. El bajo contenido de sólidos totales observado con el tratamiento de hidrólisis ácida en este trabajo, puede deberse a que durante la hidrólisis ácida se rompen los enlaces glucosídicos α (1,4) y α (1,6) al azar dando como producto jarabes dextrinados característicos por sus bajos contenidos de sólidos y equivalentes de dextrosa Serna Saldívar (2011).

Los contenidos de *D*-glucosa, *D*-fructosa y azúcares totales obtenidos en el presente trabajo, se debe a la acción específica de cada enzima; así como a la sinergia producida por la

combinación de las mismas, las cuales catalizan la ruptura de los diferentes enlaces de las moléculas de almidón, en mayor o menor proporción. Los contenidos de azúcares son más bajos en los jarabes tratados con hidrólisis ácida, llamados jarabes dextrinados ya que contienen hasta 30 equivalentes de dextrosa Serna Saldívar (2011).

Los valores obtenidos en jarabes hidrolizados enzimáticamente pueden compararse con los datos obtenidos por Aguilar, Rodríguez & Batista (2017) mismos que reportan valores de entre 10.25 y 56.8 equivalentes de dextrosa para hidrólisis de almidón de sorgo. Siendo mucho más altos que los reportados por Saldívar (2011) que menciona que con el uso de esta enzima se pueden llegar a tener productos con entre 15-25 equivalentes de dextrosa, coincidiendo también con Vidal & Páez (2011) que reportan valores similares para la hidrólisis de almidón de ñame.

En cuanto al color, Hernández, Rodríguez y Bello (2008) reportan colores para jarabes hidrolizados a partir de almidón de plátano que van desde un paja ligero para los jarabes dextrinados, hasta un amarillo ligero para los jarabes obtenidos por hidrólisis enzimática, el color fue determinado por espectrofotometría. Los colores que son similares a los obtenidos en este trabajo. Al comparar los datos con los obtenidos por Mellado & López (2013) en jarabe de agave, los colores determinados en esta tesis estarían entre transparente y ámbar claro, cuyos valores van de 0,017 a 0,961 UDO.

3.3. Análisis del grado de conversión de almidón a jarabe en los diferentes tratamientos.

La conversión de almidón no se ha podido comparar con otros valores obtenidos en miga de pan, ya que no se encontraron estudios previos. Sin embargo, la conversión por hidrólisis ácida presentó porcentajes de rendimientos que se encuentran dentro de los rangos observados por Rodríguez (2011) para el mismo tratamiento de hidrólisis en plátano, quien reportan rendimientos de entre 14.9 y 53.1%. En el presente trabajo el rendimiento obtenido por hidrólisis enzimática usando α -amilasa – AMG se pueden comparar con los valores reportados por Quitiguiña & Santacruz (2012), mismos que registran rendimientos de entre 70% al 90% para procesos similares en almidón de banano.

La mayor conversión de azúcares en los tratamientos combinados con enzimas se debe a que las α -amilasas, endoenzimas, atacan los enlaces α (1-4) glucosídicos sobre las regiones interiores de la molécula, reduciendo la viscosidad de los almidones en la etapa llamada licuefacción dejando listo el sustrato para que actúe la AMG, una exoenzima la cual hidroliza los enlaces α (1-4) y α (1-6) al azar generando glucosa como producto (Martinez, 2015).

En otros estudios como el realizado por Aguilasochó (2004) en almidón de ñame, reporta valores de conversión de almidón de $\approx 88\%$, 10 % más que el valor más alto encontrado en el presente trabajo, esto puede deberse al uso de un complejo enzimático compuesto por AMG, pullanasa y β -amilasa durante el proceso de sacarificación del almidón.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La obtención de jarabes glucosados a partir de desperdicios generados en la industria panificadora es posible a través de la aplicación de proceso de hidrólisis enzimática, usando enzimas aminolíticas de forma individual o en combinación. De acuerdo a los rendimientos obtenidos en el presente trabajo se puede observar que el uso de enzimas combinadas es el mejor tratamiento para la obtención de jarabes glucosados con un equivalente de dextrosa de un 42%. Esta tesis es un trabajo exploratorio que nos permite determinar el uso de los desperdicios de pan como sustratos para la obtención de jarabes. Sin embargo, es necesario determinar la rentabilidad del proceso en un futuro estudio a nivel piloto. Además, se recomienda realizar investigaciones con otras enzimas para establecer la factibilidad de la elaboración de jarabes con un mayor índice de equivalentes de dextrosa. Finalmente, utilizar la refinación con membranas de intercambio iónico para la obtención de jarabes fructosados.

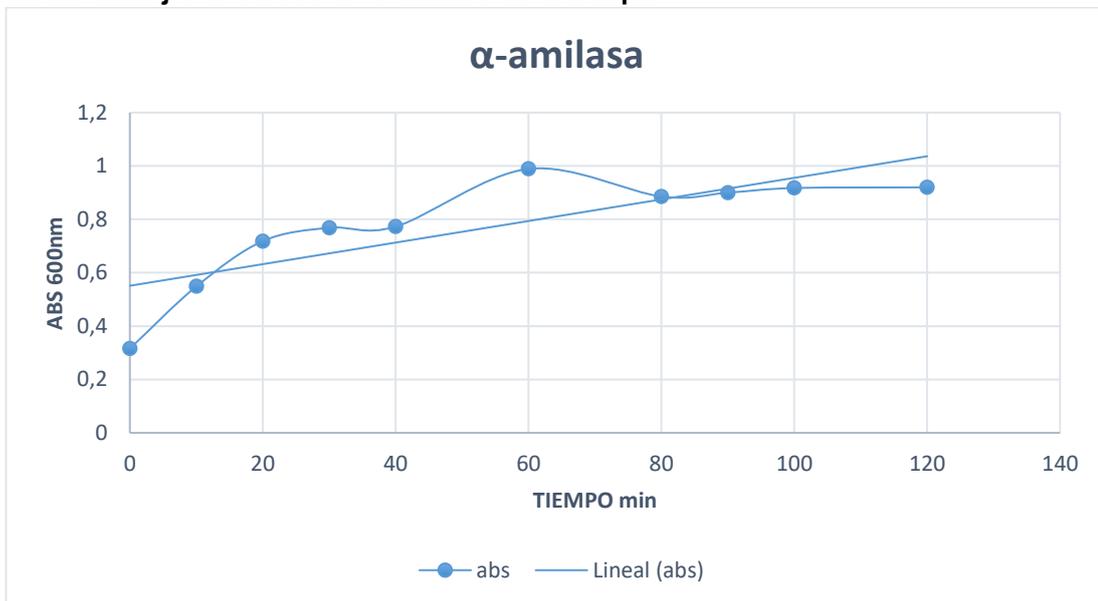
BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, I. G., Rodríguez, L. R., & Batista, J. (2017). Obtención de jarabes glucosados por hidrólisis enzimática empleando almidón de sorgo CIAPR-132, (December), 295–301.
- Aguilasocho Leyva, B. (2004). Obtención de Jarabes Fructosados a partir de Almidón de Dos Tipos de Sorgo (Sorghum bicolor) -Edición Única. Tecnológico de Monterrey. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11285/570654>
- ASEMOL. (2008). *www.scribd.com*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/52348076/mercado-cereales-ecuador#scribd>
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta ed.). (E. Q. Duarte, Ed.) México D.F, México: PEARSON EDUCACIÓN. Recuperado el 08 de 12 de 2016
- Berg, J., Stryer, L., & Tymoczko, J. (2008). *Bioquímica* (Sexta ed.). Barcelona: REVERTÉ. Recuperado el 15 de Marzo de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA225&dq=enzymas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj1qfP8_djSAhXilFQKHARCCe8Q6AEIGDAA#v=onepage&q&f=false
- Carbonell, A. S. (2015). *www.cronicanorte.es*. Obtenido de <http://www.cronicanorte.es/cerveza-hecha-con-migas-de-pan/84928>
- FAO. (1999). *Los carbohidratos en la nutrición humana*. Roma, Italia: Food & Agriculture Org. Recuperado el 24 de Enero de 2017
- Hernández Medina, M., Torruco Uco, J., Chel Guerrero, L., & Betancur Ancona, D. (2008). Caracterización Físicoquímica de Almidones de tubérculos Cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), 718-726. Recuperado el 03 de Enero de 2017
- Hernández-Uribe, J. P., Rodríguez-Ambriz, S. L., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Obtención de jarabe fructosado a partir de almidón de plátano (*Musa paradisíaca* L.). Caracterización parcial. *Interciencia*, 33(5), 372–376.
- Herrera, C., Bolaños, N., & Lutz, G. (2003). *Química de Alimentos. Manual de Laboratorio* (Primera ed.). San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica. Recuperado el 25 de Enero de 2017
- Hoogenboom, R., Bovee, T., Portier, L., Bor, G., Van Der Weg, G., Onstenk, C., & Traag, W. (13 de Mayo de 2004). The German bakery waste incident; Use of a combined approach of screening and confirmation for dioxins in feed and food. *Talanta*(63), 1249-1253. doi:10.1016/j.talanta.2004.05.046
- Joe Leunga, C. C., Yeung Cheunga, A. S., Yan-Zhu Zhanga, A., Fung Lamb, K., & Ki Lin, C. S. (22 de Marzo de 2012). Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. (C. Webb, M. Taya, & W. Miller, Edits.) *Biochemical Engineering Journal*, 60, 10-15. Recuperado el 21 de 12 de 2016
- Koseva, M. R., & Colin, W. (Edits.). (2013). *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities* (Primera ed.). Elsevier. Recuperado el 06 de Enero de 2017, de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0OWqJxuB7GkC&oi=fnd&pg=PA63&dq=bread+waste+syrup+production&ots=hKgx1aykKR&sig=3NWUldZGsT10LLDRrVbhRIWqAek#v=onepage&q&f=false>

- Martinez, J. F. (2005). *Utilización de a-amilasa en la formulación de detergentes*. Universidad de Granada.
- Mellado Mojica, E., & López Pérez, M. (2013). COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN BLUE AGAVE SYRUP (Agave tequilana Weber var. azul) AND OTHER NATURAL SYRUPS. *Agrociencia*, 1, 233–244.
- Mosquera, C. I. (2018). *Determinación de la funcionalidad de almidones aislados de residuos de panificación mediante métodos físicos - químicos y enzimáticos*. Universidad del Azuay. Retrieved from <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/7734>
- PRO ECUADOR . (2013). *www.proecuador.gob.ec*. Obtenido de <http://www.proecuador.gob.ec/sector1-6/>
- Quitiguiña, C., & Santacruz, S. (2012). Obtención De Jarabe De Glucosa a Partir De La Hidrólisis Enzimática De Almidón De Banano, Musa Cavendish. *Revista Bolivariana de Química*, 1(1), 55–62.
- Rispoli, J., & Shaw, J. (07 de Abril de 1981). *Patente nº US4260637 A*. Recuperado el 09 de Enero de 2017, de <https://www.google.com/patents/US4260637>
- Rodríguez Reinoso, Carmen Elizabeth. Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (musa cavendish) para la obtención de jarabe de glucosa. Universidad San Fransisco de Quito, 2011, <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1219/1/100891.pdf>.
- Serna Saldívar , S. (2013). *Qímica, almacenamiento e industrialización de los cereales*. Mexico: AGT EDITOR,S.A.
- Serna Saldívar, S. (2003). *Manufactura y control de calidad de productos basados en cereales* (Primera ed.). México D.F, México: AGT. Recuperado el 09 de Enero de 2012
- Serna Saldívar, S. (2011). Bioconversión de Almidones en Jarabes Dextrinizados, Maltosados, Glucosados y Fructosados. Quinto Simposio Internacional de Innovación Y Desarrollo de Alimentos. Retrieved from <http://www.innova-uy.info/docs/presentaciones/20111012/SergioSerna.pdf>
- Tejada Benitez, L., Rivera , A., Rosales , J., Tejada, L., & Tordecilla , E. (2011). Hidrólisis de lmidón de yuca (Manihot Sculenta) y de ñame (Dioscorea rotundata) para producir jarabes glucosados. *Reciteia*, 128-137.
- Tejada Benitez, Lesly, y otros. «Hidrólisis de lmidón de yuca (Manihot Sculenta) y de ñame (Dioscorea rotundata) para producir jarabes glucosados.» *Reciteia* (2011): 128-137.
- Ventour, L. (Julio de 2007). The food we waste. *WRAP*. Recuperado el 21 de 12 de 2016, de <http://www.ifr.ac.uk/waste/Reports/WRAP%20The%20Food%20We%20Waste.pdf>
- Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires, Argentina: MEDICA PANAMERICANA. Recuperado el 15 de Marzo de 2017, de https://books.google.com.ec/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA513&dq=enzymas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj1gfP8_djSAhXilFQKHARCCe8Q6AEITjAl#v=onepage&q&f=false

ANEXOS

Anexo 1. Mejor actividad de α -amilasa en el tiempo



Anexo 2. Mejor actividad de la amiloglucosidasa en el tiempo

