

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA CIENCIAS QUÍMICAS**



**“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ENZIMA
MODIFICADA ALFA-AMILASA-Mg DE ASPERGILLUS ORYZAE
PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA A PARTIR
DE DIFERENTES FUENTES DE ALMIDÓN”**

TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE MASTER EN CIENCIAS QUÍMICAS

POSTULANTE: JORGE FABIO YAÑIQUEZ VEDIA
TUTORA: DRA. PATRICIA A. MOLLINEDO PORTUGAL
TRIBUNAL: DR. MAURICIO PEÑARRIETA LORIA
DR. RÓMULO GEMIO

LA PAZ – BOLIVIA

2019

A MI FAMILIA...

POR SU INCONDICIONAL COMPAÑÍA Y APOYO....

Y AQUELLOS QUE ME AYUDARON Y CREYERON EN MÍ

AGRADECIMIENTOS

Principalmente, a la Agencia Sueca de cooperación para el Desarrollo Internacional ASDI por la beca que financio el presente trabajo.

A la carrera de Ciencias Químicas por permitirme el desarrollo de este trabajo.

A mi tutora la doctora Patricia Mollinedo por todo su apoyo, guía y consejos en el desarrollo de este trabajo y por ser una gran motivación en mi camino guiándome en el desarrollo de esta investigación.

Al mis tribunales, el doctor Mauricio Peñarrieta y el Doctor Rómulo Gemio por ayudarme a mejorar el trabajo.

A todos los docentes que aportaron en mi conocimiento a través del transcurso de la maestría.

A aquellos en mi familia que siempre estuvieron a mi lado, a mis padres Favio Jorge Yañiquez Monasterios y Lupe Norma Vedia Rodriguez, a mis queridos abuelos “Zenón y Regina” y “María”, a mis tíos y tías: Zulma ; Marisol, Sonia, Edith, Iván, Beto, Marlene, Rudy, Marcelo, y a mi primo Tavo; por su continuo afecto y apoyo.

A personas muy importantes para mí; Rubén T, Eduardo O, Óscar R, Susan HL, por la compañía y ayuda en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	JUSTIFICACIÓN	2
2	MARCO TEÓRICO	3
2.1	ALMIDÓN	3
2.1.1	<i>Estructura</i>	3
2.1.1.1	Amilosa y amilopectina.....	3
2.1.1.2	Características	4
2.1.1.3	Tipos cristalinos.....	5
2.2	ENZIMAS.....	5
2.2.1	<i>Estructura</i>	5
2.2.2	<i>Propiedades, actividad y estabilidad</i>	6
2.3	AMILASAS.....	7
2.3.1	<i>La α-amilasa</i>	7
2.3.1.1	Propiedades, actividad y estabilidad	8
2.3.1.2	Estructura e Interacciones iónicas.....	10
2.3.2	<i>α-amilasa Mg</i>	12
2.3.3	<i>Métodos de análisis de actividad de α-amilasa</i>	13
2.4	JARABE DE GLUCOSA	13
2.4.1	<i>Hidrólisis enzimática</i>	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVOS	15
3.1.1	<i>OBJETIVO GENERAL</i>	15
3.1.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	15
4	METODOLOGÍA	16
4.1	INSTRUMENTOS Y REACTIVOS.....	16
4.1.1	<i>INSTRUMENTOS</i>	16
4.1.2	<i>REACTIVOS</i>	16
4.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	17
4.2.1	<i>DE LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS</i>	17
4.2.2	<i>DEL PROCEDIMIENTO</i>	18
4.2.2.1	Método para determinar la actividad enzimática	18
4.2.2.2	Determinación de la actividad enzimática a concentración constante.....	18
4.2.2.3	Determinación de la actividad enzimática a temperatura constante.....	18

4.2.2.4	Determinación de la actividad enzimática a pH constante	18
4.2.2.5	Determinación de la velocidad de desaparición de almidón por acción enzimática	19
4.2.2.6	Determinación de viscoamilograma	19
4.2.2.7	Método modificado para determinar la actividad enzimática para almidones normales	19
4.2.2.8	Método para determinar el porcentaje de glucosa por DNS.....	20
4.2.2.9	Hidrólisis enzimática.....	20
4.2.2.10	Método para determinar los equivalentes de dextrosa DE	20
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES FISICOQUÍMICAS (TEMPERATURA Y PH) DE MÁXIMA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MODIFICADA	21
5.2	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA MODIFICADA POR DECAIMIENTO.	29
5.3	DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ENZIMA MODIFICADA A-AMILASA-MG EN DIFERENTES TIPOS DE ALMIDÓN	33
5.4	DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ENZIMA MODIFICADA EN LA PRODUCCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA A PARTIR DE ALMIDONES.....	41
5.5	CORRELACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LA A-AMILASA-MG MODIFICADA Y LA GLUCOAMILASA EN LA PRODUCCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA	43
6	CONCLUSIONES.....	44
7	RECOMENDACIONES	46
8	BIBLIOGRAFÍA.....	47
	ANEXO.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de amilosa y amilopectina en almidón de diversas fuentes. Fuente 5.	4
Tabla 2 Propiedades de algunas α -amilasas bacterianas. Fuente 5.	9
Tabla 3 Propiedades de algunas α -amilasas fúngicas. (5).	9
Tabla 4 Efecto de diferentes metales en solución a 5 tipos de α -amilasa. Considerando respecto de un 100%. Fuente 1	12
Tabla 5 Porcentajes de amilosa para el grupo D de acuerdo a datos bibliográficos	38
Tabla 6 Porcentajes de amilosa para los grupos A y C de acuerdo a datos bibliográficos ordenados por actividad decreciente de actividad amiloclástica	39
Tabla 7 Porcentaje de glucosa obtenido por el método DNS color azul grupo A, color verde grupo B, color amarillo grupo C, color violeta grupo D	40
Tabla 8 Porcentajes de glucosa después del proceso hidrólisis enzimática comparado con información bibliográfica.	41
Tabla 9 Equivalentes de Dextrosa(DE) después del proceso hidrólisis enzimática comparado con información bibliográfica. *Referencia Huanca 36	42
Tabla 10 Valor de DE para experimentos cambiando las cantidades de enzima de acuerdo a las proporciones denotadas en la tabla para la enzima α -amilasa Mg(Amy Mg) y Dextrozyme DX1,5(DEXTRO) donde 1 representa el valor usado en el método 4.2.2.9. 2 representa el doble y 0,5 la mitad.....	43
Tabla 11 Tabla de sólidos totales para el cálculo del DE de la tabla 9.....	51
Tabla 12 Tabla de sólidos totales para el cálculo del DE de la tabla 10.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Efecto de varios iones en la reactivación de la taka-amilasa, tras una incubación de 20 horas a 20°C y pH 8. Fuente 8.	12
Gráfica 2 Curva de concentración vs absorbancia de la enzima α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> en el intervalo lineal 2 – 9 U/mL de concentración.	21
Gráfica 3 Actividad de la enzima modificada α -amilasa Mg a Concentración constante de 5,6U/mL, en un rango de pH de 2 a 10 y temperatura de 10 a 80°C.	22
Gráfica 4 Absorbancia vs pH a temperatura de 20, 30, 40, 50,60 y 70°C a diferentes concentraciones de enzima modificada α -amilasa Mg, donde se observa el cambio en la actividad a valores de pH ácido.....	24
Gráfica 5 Actividad de la enzima modificada α -amilasa Mg a diferentes temperaturas y concentraciones a pH constante de 5, se muestra los cambios en la actividad a las diferentes temperaturas en una gráfica 3D	26
Gráfica 6 Gráfica de curvas de actividad a diferentes concentraciones donde muestra la semejanza de actividad a diferentes temperaturas.	27
Gráfica 7 Actividad a diferentes concentraciones de la enzima, comparando la α -amilasa Mg (α -amy Mg) y la α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (α -amy A.oryzae) con las curvas de regresión lineal y logarítmica respectivamente a pH 5, 50°C por 30 minutos de reacción.....	28
Gráfica 8 Actividad máxima de la enzima modificada α -amilasa Mg entre 0,8 y 5,6U/mL, donde se muestra que la actividad máxima tiene un punto limitante en pH 6 sin importar la temperatura y puntos dispersos a valores de pH menores a 6, con la mejor actividad en pH 5 a temperatura 50°C	29
Gráfica 9 Cinética de desaparición de almidón a concentración 5U/mL para ambas enzimas, de la α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (amy N) y α -amilasa Mg(amy Mg)	31
Gráfica 10 Segmento lineal de 0 a 30 minutos de la cinética de desaparición de almidón a concentración 5U/mL de la α -amilasa Mg(amy Mg)	31
Gráfica 11 Actividad a diferentes concentraciones de la enzima, comparando la α -amilasa Mg (α -amy Mg) y la α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (α -amy A.oryzae) a pH 5, 50°C por 30 minutos de reacción	32

Gráfica 12 Viscoamilograma de 10g de almidón de papa soluble de 11,6% de humedad	34
Gráfica 13 Viscoamilograma de 10g de almidón de yuca de 11,6% de humedad.....	35
Gráfica 14 Grupo A donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Ch (chuño) y T (tunta)	36
Gráfica 15 Grupo B donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Pstd (papa de Sigma) y S (almidón soluble de papa).....	36
Gráfica 16 Grupo C donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PI (papalisa), Chpl (chuño de papalisa).....	37
Gráfica 17 Grupo D donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Y(yuca), I(isaño), IN(Isaño negro)	37
Gráfica 18 Curva de Porcentaje de Glucosa p.a. en el intervalo lineal de 0 a 0,16% analizado por el método DNS.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de los cambios que ocurren en una mezcla agua-almidón en el calentamiento, enfriamiento y almacenamiento. I) Gránulos de Almidón Nativo, II) Gelatinización (a.- hinchamiento; b.- liberación parcial de amilosa y ruptura del gránulo), III) Retrogradación (a.- formación de red de amilosa, b.- cristalización de moléculas de amilopectina) Fuente 6.....	5
Figura 2 Estructura de la α -amilasa de <i>Aspegillus oryzae</i> que muestra los dominios A, B, C. muestra el ion Calcio estructural y un ion Calcio secundario en el dominio A como esferas de color plomo. Fuente 18	11

1 INTRODUCCIÓN

Las **enzimas** son proteínas que catalizan reacciones **químicas** en los seres vivos, también son catalizadores, es decir, sustancias que sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. Las enzimas glucolíticas como las α -amilasas son muy importantes por sus diferentes aplicaciones en la industria, tal como en la industria de los textiles, panadería, producción de jarabe de glucosa, industrias de alimentos y la heladería entre otros. Las α -amilasas ocupan aproximadamente el 25% del mercado mundial de enzimas, esto muestra el impacto de esta enzima en la economía mundial.

El uso de estas enzimas requiere condiciones específicas para su máxima actividad, por esta razón muchos procesos tienen problemas al ajustar los parámetros de funcionamiento de estas enzimas. Por ejemplo, el proceso de producción del jarabe de glucosa requiere que se modifique el pH del sustrato de 4,5 a 6, pH necesario para un rendimiento adecuado de la enzima α -amilasa.

La complejidad de las condiciones de uso para una adecuada actividad enzimática ha llevado a un estudio profundo de la estructura de la α -amilasa, en los cuales se encontró que las variaciones más simples en su estructura, como el cambio de algún aminoácido en la secuencia general o cambios en los cofactores modifican la actividad enzimática.

Pocos trabajos científicos analizan el efecto de sustitución de cofactores en la actividad enzimática y su estabilidad molecular. Yañiquez estudió la sustitución de los iones Calcio periféricos por iones Magnesio y determinó que la sustitución indirecta de iones Calcio por Magnesio afecta la estructura y rendimiento de la enzima.

La enzima a evaluar en el presente estudio es una α -amilasa de *Aspergillus oryzae* modificada de acuerdo al método descrito en la patente de invención SP 002-2017 y se enfoca en determinar los parámetros (temperatura, pH) de mejor actividad de la enzima, la cinética de la enzima modificada, así como el impacto en diferentes almidones y

finalmente la eficiencia de la enzima en un proceso enzimático industrial como es la producción de jarabe de glucosa.

1.1 Justificación

Hoy en día las enzimas tienen un amplio desarrollo por su impacto en diferentes industrias, esto conlleva un estudio exhaustivo de estas enzimas y sus características para tener un rendimiento óptimo. Por esta razón, debido a la alta especificidad de las enzimas es necesario analizar las condiciones de máxima actividad a las que la enzima modificada α -amilasa Mg funciona. Además, es necesario evaluar las diferentes interacciones enzima sustrato.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ALMIDÓN

El almidón es un polisacárido de reserva en los vegetales, este se encuentra abundantemente en las semillas de los cereales como el arroz, en los tubérculos como la papa, en las raíces como el camote y yuca entre otros. Este polisacárido es producido como medio de almacenamiento por las plantas y es un carbohidrato importante en la dieta humana por su alto valor energético. Por esta razón es usado en una gran variedad de productos en la industria alimenticia. (1 - 3)

El almidón tiende a usarse por su contribución a las propiedades de los alimentos como espesante, estabilizador coloidal, agente formador de geles por la retención de agua en las diferentes industrias y para la obtención de jarabe de glucosa como producto secundario principal. (4, 5)

2.1.1 Estructura

El almidón tiene una estructura semicristalina, que tiene un centro amorfo y anillos cristalinos concéntricos alternados con anillos amorfos de crecimiento como su estructura principal. Este centro amorfo está compuesto por cadenas de amilosa y amilopectina desordenadas, donde el tamaño de este centro está definido por la cantidad de amilosa específica del almidón analizado. Se considera que tiene una estructura semicristalina porque a partir de este centro, la amilopectina se ramifica formando diferentes niveles por su estructura de doble hélice, estos niveles forman láminas (los anillos cristalinos y anillos amorfos) dando un carácter cristalino al almidón por la formación de estas. Sin embargo, la amilosa lineal al ser también parte de esta estructura, modifica la estructura cristalina final del almidón. (6, 7)

2.1.1.1 Amilosa y amilopectina

El almidón es consiste de una gran cantidad de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos, existen dos polímeros principales, amilosa y amilopectina. Ambas tienen estructuras y propiedades diferentes. La composición está en 10-25% de amilosa y 75-90% de amilopectina. La amilosa es un polímero lineal que consiste en glucosas unidas por enlaces α -1,4 glicosídicos que puede tener hasta 6000 glucosas unidas. La

amilopectina es un polímero que tiene enlaces α -1,4 glicosídicos y α -1,6 glicosídicos. Tiene cadenas cortas de glucosa unida por enlaces α -1,4 glicosídicos (entre 10 - 60 glucosas) que enlaces α -1,6 glicosídicos después de estos. Esto genera ramificaciones en la amilopectina, variación principal respecto a la amilosa. (1 - 5).

FUENTE	AMILOSA (%)	AMILOPECTINA (%)
Papas	23	77
Yuca	20	80
Trigo	20	80
Arroz	15-35	65-85
Sorgo	25	75
Maíz	25	75

Tabla 1.- Composición de amilosa y amilopectina en almidón de diversas fuentes. Fuente referencia 5.

2.1.1.2 Características

Las moléculas de almidón tienden a aglomerarse en gránulos semi-cristalinos, cada planta tiene un tamaño de diferente, que puede variar en un rango de 2 μ m hasta 100 μ m. Este polímero es básicamente la unión ramificada de amilopectina y amilosa. El almidón puro es un polvo blanco, insoluble en agua fría y alcohol. (1, 2)

El almidón es soluble en agua caliente, esto debido a que los gránulos pierden su estructura semicristalina y las moléculas más pequeñas de amilosa son liberadas del gránulo. Este proceso sucede en tres pasos, primero existe una absorción de agua que hincha los gránulos, pero mantiene las propiedades del almidón. En la segunda etapa, existe se hincha más el almidón, pero en este caso aumenta la viscosidad de la suspensión, los gránulos se alteran y pierden su estructura. Finalmente, en la tercera etapa los gránulos se han deformado completamente y liberan toda la amilosa contenida en su estructura. (3, 4, 6)

Se forma una red que se une al agua, aumentando la viscosidad de la mezcla. Este proceso es llamado gelificación. La insolubilización espontanea del almidón en soluciones acuosas es denominada retrogradación, la tendencia aumenta mientras más amilosa exista, debido a su habilidad para formar puentes de hidrógeno intermoleculares. El almidón retrogradado pierde las propiedades básicas del almidón,

por tanto, es inútil funcionalmente. La manera de invertir la retrogradación es por calentamiento, una regelificación. (1, 6).

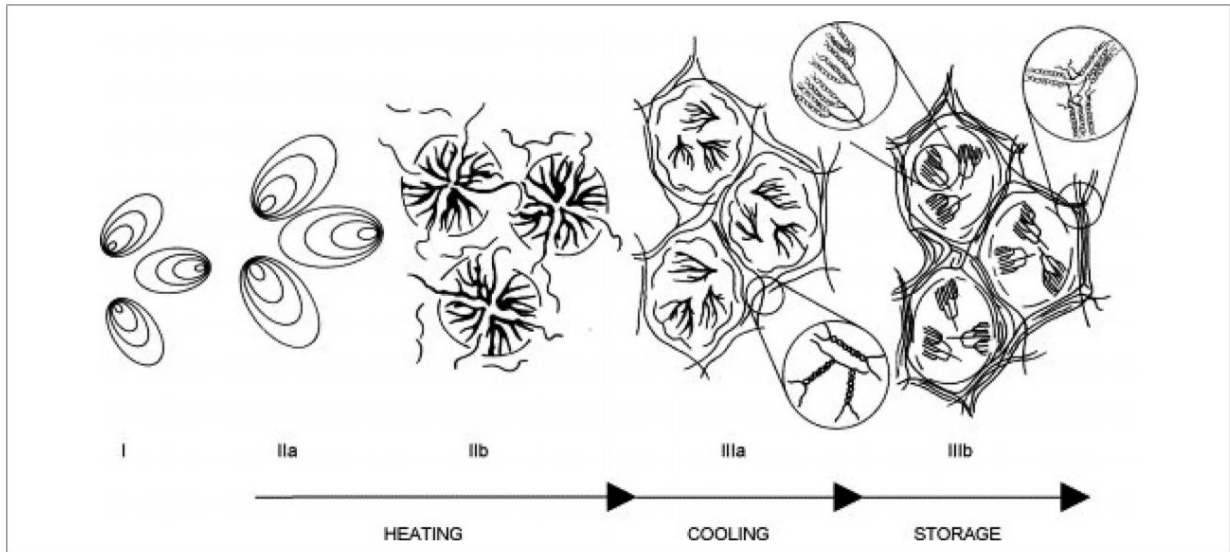


Figura 1 Representación esquemática de los cambios que ocurren en una mezcla agua-almidón en el calentamiento, enfriamiento y almacenamiento. I) Gránulos de Almidón Nativo, II) Gelatinización (a.- hinchamiento; b.- liberación parcial de amilosa y ruptura del gránulo), III) Retrogradación (a.- formación de red de amilosa, b.- cristalización de moléculas de amilopectina) Fuente referencia 6

2.1.1.3 Tipos cristalinos

La formación de las láminas de amilopectina no depende de las cantidades de amilosa y amilopectina. Estas láminas tienen una distancia de 10nm y en almidones de alta cantidad de amilopectina tienen más láminas amorfas, y en mayor cantidad de amilosa tienen más láminas cristalinas. Estas láminas están formadas por dobles hélices que cristalizan en dos formas, un tipo A de celdas unitarias monoclinicas con 6 dobles hélices y poca cantidad de agua; un tipo B de cristal hexagonal de 6 dobles hélices con el centro lleno de agua; y un tipo C que es una mezcla de A y B.

Los cereales suelen presentar almidón con cristalización de tipo A, los tubérculos y raíces cristalización de tipo B y las legumbres cristalización de tipo C. (7)

2.2 ENZIMAS

2.2.1 Estructura

Las enzimas son proteínas globulares, que consisten de largas cadenas de aminoácidos produciendo moléculas tridimensionales. La secuencia de aminoácidos es

determinante para la estructura específica y las propiedades de la enzima. Además, están compuestas por apoenzima y, coenzima y/o cofactor. (1, 2, 3, 10)

Los cofactores, parte importante de la enzima y de naturaleza inorgánica, están presentes en su forma iónica y suelen enlazarse por enlaces covalentes o de coordinación, algunos de estos iones son: Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , K^{+1} y Na^{+1} , determinando así su efectividad y su especificidad de acuerdo al medio de reacción en diferentes organismos vivos. (1, 2, 8)

La estructura de la enzima es afectada por la fuente de la que se extrae; hongos, bacterias o plantas. Todas tienen la misma función catalítica, pero su estabilidad y reactividad son diferentes a la misma temperatura y pH. Esto se debe a pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos que deviene en una enzima con un comportamiento diferente, pero actividad catalítica semejante. (2, 9)

Las enzimas suelen estar compuestas por dominios, que son proteínas. Estos dominios interactúan y dan funciones especiales a la enzima. Algunas de las funciones de los dominios son: mediar interacciones moleculares generando actividad enzimática, marcar proteínas de una región específica, proveer medios de reconocimiento de proteínas, centralizar la formación de complejos multiproteicos señalados y controlar la conformación, actividad y especificidad respecto al sustrato en la enzima. (8 - 10)

2.2.2 Propiedades, actividad y estabilidad

La actividad de la enzima está relacionada a su estabilidad; considerando que las enzimas son sensibles a los cambios de pH, temperatura y otros; existen condiciones en las que la enzima tiene máxima actividad. A otras condiciones, su actividad se ve reducida o nulificada. Altas temperaturas tienden a desnaturalizar las enzimas y modificaciones en el pH modifican las interacciones electrostáticas dentro la enzima produciendo la inactivación de esta, o en algunas condiciones su desnaturalización. (3, 11)

Las enzimas rompen compuestos específicos, donde el compuesto en el que actúan es denominado sustrato. Los productos obtenidos son estereoespecíficos, de alto rendimiento y alta pureza. (3, 11)

La estabilidad también está definida por la agregación de proteínas, que es básicamente la formación de oligómeros o polímeros no esperados.

Las proteínas activas naturales se mantienen unidas por un delicado balance de fuerzas no covalentes, cuando altas temperaturas perturban estas interacciones, las proteínas se despliegan. La inactivación está relacionada a la pérdida de sus estructuras secundarias y terciarias. Algunas estructuras regresan a su conformación natural después de enfriarlas. Esto se llama desplegado reversible, sin embargo la mayoría de las proteínas mesofílicas tienen desplegado irreversible. (10, 12)

2.3 AMILASAS

Las amilasas son un grupo de enzimas de gran importancia debido a su gran rango de aplicación. Se usan en procesos industriales de alimentos, fermentación, textiles, producción de papel, medicina, análisis químico y otros. Las amilasas son importantes en la mayoría de las industrias basadas en almidón, por la hidrolización enzimática que produce. También existen aplicaciones biotecnológicas, como en la producción de jarabes por su obtención de oligosacáridos (dextrinas), maltosa y glucosa. (2, 3, 5)

Las amilasas pueden ser divididas en dos grupos principales: endoamilasas y exoamilasas. Las endoamilasas hidrolizan aleatoriamente en el interior del almidón, produciendo toda clase de productos; cadenas largas, cortas, ramificadas y lineales. Las exoamilasas actúan desde los extremos no reductores sucesivamente. (13, 14)

Las principales enzimas en las amilasas son la α -amilasa, β -amilasa y amilogucosidasa. Donde estas enzimas actúan en los enlaces α -1,4 y/o α -1,6 glicosídicos. (13, 14, 15)

2.3.1 La α -amilasa

Las α -amilasas son enzimas endoamilasas α -1,4-D-glucan glucanohidrolasa código (EC 3.2.1.1). Estas enzimas se encuentran en una gran cantidad de microorganismos como bacterias *B. acidocaldarius*, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolyticus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. sp.*, *Clostridium acetobutylicum*, y otros. Pero también se obtiene de hongos y diversas fuentes. (14, 15)

Las α -amilasas hidrolizan específicamente los enlaces α -1,4 glicosídicos en la amilosa y en la amilopectina, por tanto los enlaces α -1,6 glicosídicos que ramifican la amilopectina

no son atacados. Al ser endoamilasas, las α -amilasas actúan mucho más rápido que las β -amilasas.

La mayoría de las α -amilasas son calcio metaloenzimas, donde su función catalítica es puede ser anulada en ausencia de calcio.

El mecanismo catalítico de la familia de α -amilasas es que genera una retención α - de doble desplazamiento, este mecanismo es característico de las α -amilasas donde varia en su especificidad; donde las uniones de diferentes dominios al sitio catalítico o uniones extra de azúcares, es lo que principalmente genera estas diferencias. El dominio catalítico A es el dominio más conservado en todas las α -amilasas. (1, 2, 3, 14, 15)

2.3.1.1 Propiedades, actividad y estabilidad

El pH afecta a las α -amilasas, usualmente son estables a un pH entre 5.5 - 8.0, donde su mayor actividad ocurre entre pH 4.8 – 6.5. La actividad específica y del rango de pH exacto depende de la procedencia de la enzima. Donde la forma de la curva de actividad es función de cada α -amilasa.

La α -amilasa pierde fácilmente su actividad con el cambio de temperatura, dependiendo de la procedencia tiene rangos amplios o cortos de estabilidad que están entre 20 y 100°C. (16)

La α -amilasa puede aumentar su rango de actividad, tanto en pH como en temperatura en presencia de calcio en solución. El calcio es determinante para su actividad catalítica, además retrasar los procesos de desnaturalización de la enzima. Aumentar los tiempos de actividad en condiciones límite y de baja actividad de la enzima. (5, 14)

Dependiendo de la fuente, la α -amilasa tiene diferentes cantidades de calcio adheridos por mol de enzima. La α -amilasa producida por el *Bacillus subtilis* tiene 4 átomos de Calcio por molécula. Y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* tiene 10 átomos de Calcio por molécula de enzima. (8)

Estos parámetros fisicoquímicos son los más importantes, aunque también tienen un rol importante, la superficie de agentes activos, fosfatos, iones metálicos, agitación y las fuentes de carbón y nitrógeno.

MICROORGANISMO	PH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA °C
<i>B. acidocaldarius</i>	3,5	75
<i>B. amiloliquefaciens</i>	5,9	65
<i>B. caldarius</i>	5,4	70
<i>B. licheniformis</i>	5,0-8,0	76
	9,5	91
	6,0-7,0	85
<i>B. stearothermophilus</i>	7,0-9,0	70-90
	5,4-6,1	70
	4,5-6,5	65-73
<i>B. sp</i>	5,0-6,0	70
<i>B. subtilis</i>	5,3-6,4	50
<i>Streptomyces aucofaciens</i>	4,6-5,3	40
<i>Thermoactinomyces vulgans</i>	5,0	70

Tabla 2 Propiedades de algunas α -amilasas bacterianas. Fuente referencia 5.

MICROORGANISMO	PH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA °C
<i>Aspergillus niger</i>	5,0-6,0	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5-5,9	40
<i>Mucor pusillos</i>	3,5-4,0	65-70
<i>Paccilomyces subglobosum</i>	4,0	38
<i>Lipomyces starkeyi</i>	3,0-4,0	50-60
<i>Sacharomyces castellii</i>	6,0	60
<i>Torulopsis ingeniosa</i>	5,5	50
<i>Endomicopsis fibukiger</i>	5,5	45

Tabla 3 Propiedades de algunas α -amilasas fúngicas. Fuente referencia 5.

Existen diversos reportes de aumento de actividad enzimática en presencia de maltosa y almidón en la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, esto debido a que las α -amilasas son enzimas inducibles principalmente en presencia de almidón o maltosa. En otros casos la lactosa, trehalosa y α -metil-D-glicosidos también han funcionado como inductores.(5,14,16)

2.3.1.2 Estructura e Interacciones iónicas

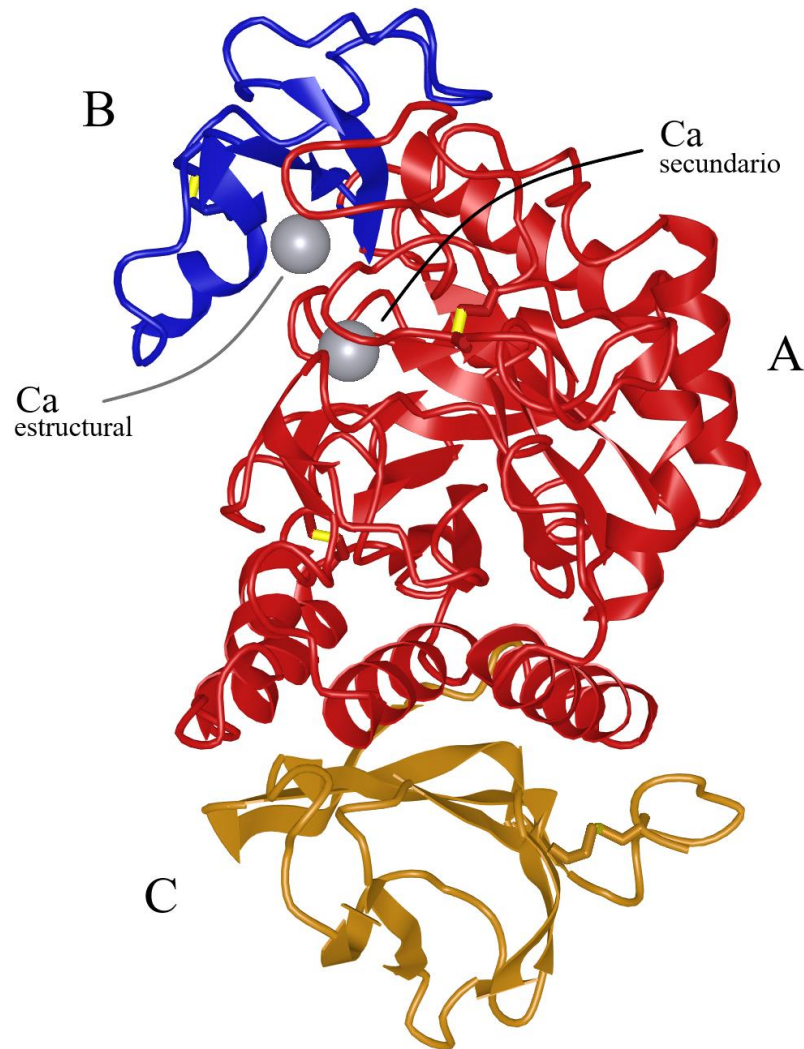
La α -amilasa de *Aspergillus oryzae* ha sido descrita estructuralmente en diversos trabajos, esta presenta una estructura tridimensional de 3 dominios (A, B y C) y un ion Calcio estructural ubicado entre los dominios A y B, del cual sus ligandos están compartidos en ambos dominios y permite mantener la estructura estable del sitio activo. Por otra parte, también existen sitios secundarios de enlace en los cuales existen iones Calcio que ayudan mantener la integridad estructural del sitio activo ante la desnaturalización por interacciones con el dominio B. (17, 18)

Se debe considerar que la presencia de estos iones Calcio no es la única que afecta la estructura enzimática. Iones como el Sodio y Cloro tienen diferentes interacciones en los dominios. Y estas interacciones en conjunto modifican la actividad enzimática. (17, 20)

Una característica principal de las α -amilasas es que el ion Calcio estructural tiene un gran impacto en la termoestabilidad de la enzima debido a la formación de una estructura compacta, y su extracción causa irreversiblemente la pérdida total de actividad enzimática debido a la inestabilidad estructural generada. (18, 19)

Estos iones estructurales no son los únicos que incrementan la actividad y estabilidad enzimática, adiciones externas también han mostrado incrementos en la actividad, pero principalmente ha sido ampliamente estudiado el efecto de adición de sales de Calcio en la estabilidad de diferentes procesos relativos a la enzima, como: purificación de la α -amilasa, estabilizar la α -amilasa y cristalizar la enzima sin la pérdida de su actividad. (20, 21)

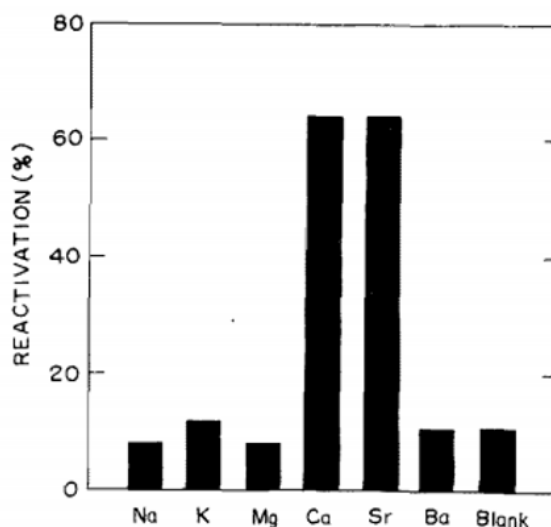
Otra característica importante es que la adición de Calcio aumenta la resistencia a la desnaturalización por efecto de las proteasas. Por el contrario, las α -amilasas de las cuales se ha removido los iones de Calcio, son susceptibles de desnaturalizarse completamente incluso con cantidades bajas de proteasas. (22)



Ref. Imagen modificada del banco de datos de proteínas para la búsqueda 6TAA
 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=58564&bu=1&showanno=1>)

Figura 2 Estructura de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* que muestra los dominios A, B, C. muestra el ion Calcio estructural y un ion Calcio secundario en el dominio A como esferas de color plomo. Fuente referencia 18

El Calcio no solo tiene un efecto estabilizador, también tiene un rol importante en la reactivación de α -amilasas desnaturalizadas o inactivadas por agentes quelantes. Otros iones no tienen el mismo efecto de renaturalización, la reactivación es muy baja en la mayoría de ellos. (23, 24, 25)



Gráfica 1 Efecto de varios iones en la reactivación de la taka-amilasa, tras una incubación de 20 horas a 20°C y pH 8. Fuente 8.

Además, estos iones presentan diferentes efectos si están en la solución enzimática. Pero, en su mayoría inhiben la actividad de la α -amilasa cuando su concentración es elevada. (8, 26, 27, 28)

Metal	Actividad Relativa %				
	A1	A4a	A4b	A5a	A5b
Ni ²⁺	43	205	131	103	40
Ca ²⁺	108	152	141	110	195
Co ²⁺	17	242	139	111	98
Zn ²⁺	18	217	42	112	27
Cu ²⁺	34	114	103	65	85
Pb ²⁺	86	90	99	85	82
Hg ²⁺	1	5	2	2	2

Tabla 4 Efecto de diferentes metales en solución a 5 tipos de α -amilasa. Considerando respecto de un 100%. Fuente referencia 1

2.3.2 α -amilasa Mg

La α -amilasa Mg es una enzima modificada en la cual son sustituidos los iones Calcio secundarios o periféricos por Magnesio iónico, de acuerdo al procedimiento descrito en la patente de invención boliviana SP 02-2017.

Esta enzima tiene una actividad mayor que la enzima original por 11 veces según el estudio realizado por Yañiquez. (1)

2.3.3 Métodos de análisis de actividad de α -amilasa

Existe una gran variedad de métodos que han sido y están siendo usados para la medición de α -amilasas, estos métodos tienen diferentes ensayos de la actividad total de la α -amilasa. Esta gran variedad de métodos ha llevado al problema de no existir un sustrato estándar, ni un ensayo estándar o una actividad enzimática estándar.

Estos métodos se pueden agrupar en 3 grupos principales: amiloclástico, que mide la desaparición de un almidón como sustrato usando alguna propiedad del almidón para detectar la variación de la concentración original; sacarimétrico, que miden la aparición de oligosacáridos, principalmente azúcares reductores; y cromogénicos, que usan sustratos sintetizados para generar productos coloreados que se pueden medir espectrofotométricamente. (23)

La actividad de las amilasas usualmente es estudiada usando almidón soluble o almidón modificado como sustrato. Existen varios métodos que están principalmente basados en la reducción de intensidad de color del complejo iodo almidón y aumento de azúcares reductores. En los métodos de degradación del complejo iodo-almidón, existen variaciones en la concentración de iodo usada en los ensayos, variando desde $3\mu\text{M}$ hasta $0,25\text{mM}$, y con la longitud de onda máxima variando desde 550 hasta 700nm . (28-35)

Usualmente para el análisis de α -amilasa se usa amilosa como sustrato, porque otros análisis no dan resultados replicables o válidos, pero es factible por el método Xiao y Tsang (29) usar almidón como sustrato, con ventajas de volumen de enzima, de sustrato y efecto reducido de maltosa. (14, 23, 24, 29, 30, 31)

2.4 JARABE DE GLUCOSA

Los jarabes de glucosa por definición son una solución acuosa concentrada y purificada de sacáridos nutritivos con equivalentes de dextrosa mayores a 20 obtenidos por hidrólisis de almidón. Esto tienen D – glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas. Estos se clasifican en 4 tipos de acuerdo al DE: tipo I de 20 a 38 DE, tipo II de 38 a 58 DE, tipo III de 58 a 73 DE, tipo IV superior a 73 DE.

Cabe señalar que el cálculo de los equivalentes de dextrosa se hace en función de la cantidad de azúcares reductores respecto de la cantidad de sólidos totales. Por esta razón existe la confusión que un valor de 20DE significa 20% de glucosa; sin embargo, los valores de glucosa obtenidos pueden ser mucho menores a los indicados por el DE. La DE representa el porcentaje de hidrólisis en los enlaces glucosídicos presentes donde glucosa pura anhidra se considera como 100 DE y el almidón tiene un DE igual a cero.

Este jarabe de glucosa tiene diferentes usos en las industrias como la obtención de dextrosa cristalina, control de cristalización en helados, retención de humedad, aumentar la viscosidad en dulces, uso en curtiembres, adhesivos y otros. (36, 39)

2.4.1 Hidrólisis enzimática

La obtención del jarabe de glucosa en la actualidad requiere un proceso enzimático, este proceso usa 2 enzimas la α -amilasa fúngica y la glucoamilasa. Los productos de esta hidrólisis varían desde glucosa hasta dextrinas de alto peso molecular.

Este proceso comprende 2 etapas para reducir el almidón a estructuras de menor peso molecular: Licuefacción y sacarificación.

La primera etapa es la licuefacción en la que se usa una α -amilasa en las condiciones adecuadas para su máxima actividad, en este paso se reduce el tamaño de las cadenas de amilosa y amilopectina con el objetivo de facilitar la reacción con la siguiente enzima. De acuerdo a las características de la alfa amilasa utilizada se obtienen diferentes dextrinas y oligosacáridos puesto que es una endoenzima y esta hidroliza los enlaces α -(1,4) glucosídicos internos.

La segunda etapa es la sacarificación, en la que se usa la glucoamilasa. La glucoamilasa una enzima que puede hidrolizar también los enlaces α -(1,6) glucosídicos y de esta forma reducir los fragmentos de dextrinas del paso anterior a unidades de D-glucosa. Se debe considerar que la etapa de licuefacción es importante para aumentar el rendimiento de la glucoamilasa. (36-39)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficiencia de la enzima modificada α -amilasa-Mg de *Aspergillus oryzae* para la producción de jarabe de glucosa a partir de diferentes fuentes de almidón.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones fisicoquímicas (temperatura y pH) de máxima actividad de la enzima modificada.

- Determinar la estabilidad de la enzima modificada por decaimiento.

- Determinar la eficiencia de la enzima modificada en diferentes tipos de almidón.

- Determinar la eficiencia de la enzima modificada en la producción de un jarabe de glucosa a partir de almidones.

- Correlacionar las interacciones entre la α -amilasa Mg modificada y la glucoamilasa en la producción de jarabe de glucosa.

4 METODOLOGÍA

4.1 INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

4.1.1 INSTRUMENTOS

- Lector de placas μ Quant– BioTek, USA
- Thermomixer – Eppendorf, Germany
- pHmetro JENWAY 3520, UK
- Simplicity 185 – Milipore, Brasil
- Viscoamilografo Micro-Visco-Amylo-Graph Brabender, Germany
- Higrómetro MAC110 RADWAG
- Balanza ME204 MetlerToledo

4.1.2 REACTIVOS

- α -Amylase from *Aspergillus oryzae* 1,5U/mg, Sigma Aldrich (CAS 9001-19-8) (ChemieGmbH, Steinheim, Germany)
- Soluble Starch from Potato synthesis grade, Scharlau (G Perez, España)
- Ácido clorhídrico 37% 1,19g/mL BioPack (Buenos Aires, Argentina)
- Cloruro de Magnesio hexahidratado Merck (Darmstadt, Germany)
- Iodo sublimado para ACS de Merck (Darmstadt, Germany)
- Ioduro de Potasio de Winkler LTDA. (Santiago, Chile)
- α -amilasa-Mg obtenida bajo el procedimiento protegido legalmente bajo la patente de invención SP-002-2017.
- Almidón de papa Sigma Aldrich (ChemieGmbH, Steinheim, Germany)
- Almidones de papa negra, yuca, tunta, chuño, isaño, isaño negro, papalisa, chuño de papalisa provistos por la M.Sc. Huanca S. que fueron usados en sus estudios previos. (36, 38)
- Glucosa anhidra p.a. (Sigma Aldrich, ChemieGmbH, Steinheim, Germany)
- DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico p.a., Sigma Aldrich, ChemieGmbH, Steinheim, Germany)
- Dextrozyme DX 1,5(Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880-Bagsvaerd, Dinamarca)

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 DE LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Almidón al 2%w/v

Disolver 0,5g almidón soluble de papa en 25mL agua miliQ en agitación constante, a 65°C por 11 minutos. (1)

Almidón al 2%w/v de pH modificado

Disolver 0,5g almidón soluble de papa en 20mL agua miliQ en agitación constante, a 65°C por 11 minutos, una vez gelificado modificar el pH con una solución de HCl 1M o NaOH 1M de acuerdo al pH requerido.

Enzima α -amilasa

Disolver la enzima en agua miliQ.

Enzima α -amilasa Mg

Preparada de acuerdo a la patente de invención SP 02-2017

Solución de Iodo (Iugol)

Preparar una solución 0,04% de I₃. Usar un mortero y pulverizar primero el KI, agregar lentamente el I₂ mezclandolo con el KI y finalmente disolver en agua miliQ.

HCl 1M

Diluir ácido Clorhídrico concentrado de densidad 1,19g/mL y pureza 37% en agua miliQ.

NaOH 1M

Disolver en agua caliente NaOH al 99%, filtrar y aforar al volumen calculado.

Acetato de Sodio 0.02N

Disolver 0,8283g de acetato de sodio en medio litro de agua miliQ.

Cloruro de Magnesio 0,5M; 0,1M

Disolver Cloruro de Magnesio en agua miliQ

DNS Ácido 3,5 - dinitrosalicílico

De acuerdo al método descrito por Huanca (36)

4.2.2 DEL PROCEDIMIENTO

4.2.2.1 Método para determinar la actividad enzimática

Se determinó el grado de hidrólisis de forma indirecta a través del complejo almidón-iodo residual por espectrofotometría usando el método descrito por Xiao y Tsang(29). Una mezcla de 200µL de almidón al 2% y 200µL de enzima a diferentes concentraciones, pH y temperatura respectivamente, es incubada a una temperatura constante por 30 minutos con agitación constante a 1000RPM en un Thermomixer confort marca Eppendorf.

Una vez concluido el proceso enzimático se desactiva la enzima con 100µL de HCl 1M, y se agregan 500µL de Lugol de concentración 0,04%, luego de 15 minutos, se siembran 150µL del complejo almidón-iodo en una placa Nunc 96well y se lee la absorbancia a 620nm en un lector de placas marca µQuant BioTeK.

4.2.2.2 Determinación de la actividad enzimática a concentración constante

De acuerdo al método descrito para determinar la actividad enzimática, se determina la correlación entre los parámetros variables de temperatura entre 20 y 70°C y el pH de 2 a 10, a concentración de enzima constante de 5,6U/mL.

4.2.2.3 Determinación de la actividad enzimática a temperatura constante

Evaluando la actividad enzimática por el método espectrofotométrico del complejo Iodo-Almidón se mantiene constante la temperatura de reacción a 50°C. Los parámetros variables para el experimento son la concentración en el intervalo de 0 a 5,6U/mL y el pH de 2 a 10.

4.2.2.4 Determinación de la actividad enzimática a pH constante

Basados en la metodología descrita para la determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría 4.2.2.1. Se evalúa el comportamiento de la enzima a pH=5

como constante. Los parámetros variables para el experimento son el intervalo de la concentración enzimática de 0 a 5,6U/mL y la temperatura entre 20 y 70°C.

4.2.2.5 Determinación de la velocidad de desaparición de almidón por acción enzimática

A través de la metodología descrita para la determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría 4.2.2.1. Se evalúa el comportamiento de la enzima a evaluar a pH=5, temperatura 50°C y concentración 5U/mL como constante. El parámetro variable del experimento es el tiempo de reacción, que será modificado entre 0 y 140 minutos.

4.2.2.6 Determinación de viscoamilograma

Se determinó el cambio de viscosidad de una mezcla de almidón-agua en una rampa de temperatura.

Una muestra de 10g de almidón es homogeneizada en 100mL de agua, esta muestra es introducida al equipo BRABENDER. Se configura el equipo para la medición de 10g de muestra, añadiendo el valor de humedad, el volumen de agua en el que se homogeneizo, una corrección de 14%, velocidad 250 (1/min), rango de medida 120cmg y finalmente lo intervalos de temperatura. El análisis empieza a 30°C, donde calienta hasta 85°C en 7,33 minutos, se mantiene a esta temperatura por 5 minutos, se enfría hasta 50°C en 4,37 minutos y se mantiene a 50°C por 3 minutos.

4.2.2.7 Método modificado para determinar la actividad enzimática para almidones normales

Se preparó el almidón usando el método descrito por Huanca (36). Se hidrolizó y se determinó por espectrofotometría la concentración de almidón residual.

A una masa de 0,1 o 0,05g de almidón se agrega 100µL de alcohol 96GL en agitación constante y luego 900µL de NaOH 1M y se deja incubar por 24horas. Una vez concluida la incubación se afora a 10mL y a partir de esta solución se separan 1,8mL y se agregan 0,2mL de NaOH 0,09M.

500µL del almidón final se incuban con 100µL de ácido Acético y 200µL de 7U/mL de enzima a 50°C y 30 minutos con agitación constante a 1000RPM en un Thermomixer confort marca Eppendorf. Una vez concluido el proceso enzimático se

agregan 200µL de Lugol al 2% y se afora a 10mL, luego de 15 minutos, se siembran 150µL del complejo almidón-iodo en una placa Nunc 96well y se lee la absorbancia a 620nm en un lector de placas µQuant BioTeK

4.2.2.8 Método para determinar el porcentaje de glucosa por DNS

De acuerdo al método descrito por Huanca (36), se determinó el porcentaje de glucosa a través de una curva patrón de glucosa p.a.

A 250µL de muestra se agregan 750µL de DNS, se incuba a 70°C por 5 minutos y se lee a 540nm en un lector de placas µQuant BioTeK.

4.2.2.9 Hidrólisis enzimática

Para este proceso se usó la metodología descrita por Huanca (38) usando la enzima α-amilasa Mg y la Dextrozyme DX 1,5X(Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880-Bagsvaerd, Dinamarca).

A una solución de 3g de muestra y 10mL de buffer de pH 6,4 se agregó 58,5µL α-amilasa Mg y se incubo a 50°C por 90minutos, luego se desnaturalizó la enzima a 90°C por 1 hora. Después de este proceso se agregó 30 µL de Dextrozyme DX 1,5X y se incubó a 60°C por 3 días, finalmente se desactiva la enzima a ebullición por 20 minutos.

4.2.2.10 Método para determinar los equivalentes de dextrosa DE

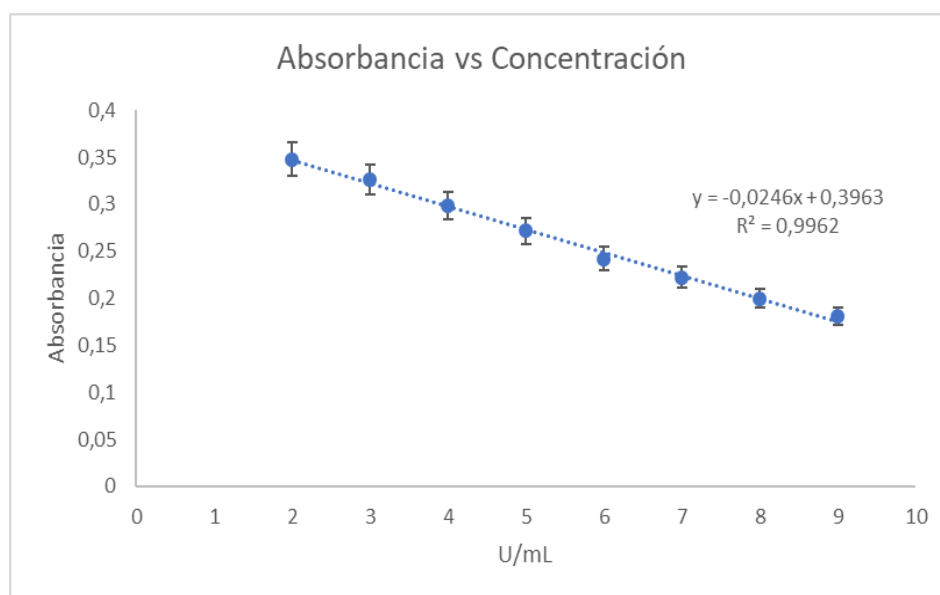
Después de enfriar el hidrolizado, se pesa una masa de 1 gramo y se determina su humedad. Finalmente, se divide el contenido de glucosa entre los sólidos totales por 100.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de las condiciones fisicoquímicas (temperatura y pH) de máxima actividad de la enzima modificada

Los valores de actividad enzimática fueron cuantificados como absorbancia del complejo Iodo-almidón, un método amiloclástico iodométrico siguiendo el método descrito para determinar la actividad enzimática 4.2.2.1.

Primero se determinó la curva más estable para la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae* que se observa en la Gráfica 2, que tiene un comportamiento lineal en el intervalo 2 – 9U/mL de concentración con respecto de la absorbancia con un $R^2 = 0.9962$ y un error relativo menor al 5%.

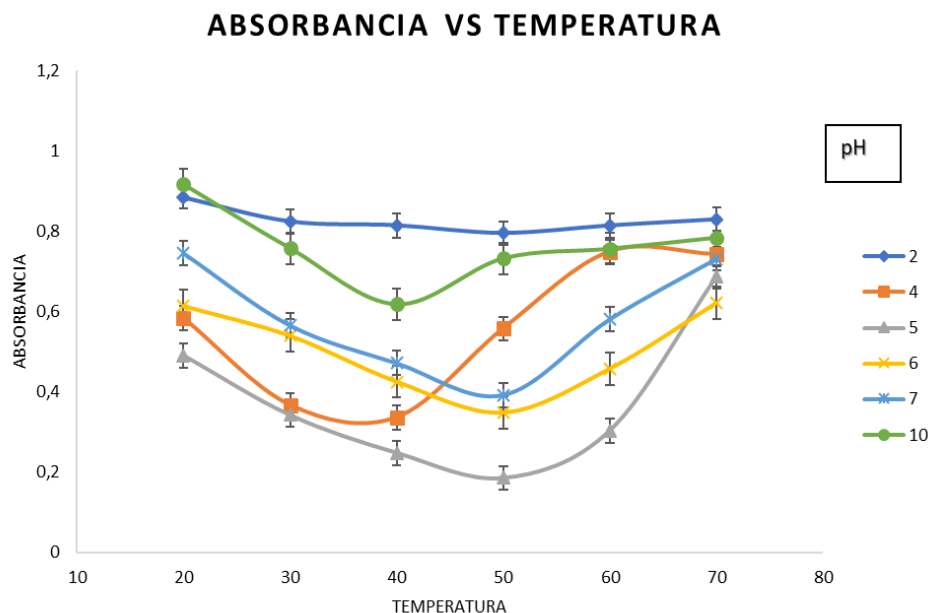


Gráfica 2 Curva de concentración vs absorbancia de la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en el intervalo lineal 2 – 9 U/mL de concentración.

Usando esta información se determinó la concentración de la α -amilasa Mg producida por el método patentado, para las sucesivas diluciones acorde a los experimentos necesario

Inicialmente, se realizaron los experimentos de modificación de temperatura y pH a concentración constante de acuerdo al procedimiento 4.2.2, en el cual el método muestra la degradación del almidón por el proceso de hidrólisis enzimática con la nueva enzima α -amilasa Mg.

Como se muestra en las Gráficas 3 - 6 una mayor actividad enzimática está dada por un valor menor de absorbancia, que a su vez tiene una relación directamente proporcional a la concentración remanente de almidón sin hidrolizar.



Gráfica 3 Actividad de la enzima modificada α -amilasa Mg a Concentración constante de 5,6U/mL, en un rango de pH de 2 a 10 y temperatura de 10 a 80°C.

Los resultados de correlación entre los parámetros de temperatura y pH a una concentración constante se muestran en la Gráfica 3. La función matemática muestra principalmente que la mejor actividad enzimática está a temperaturas altas y pH ácidos, resultados que coinciden con los reportados por otros autores para este tipo de enzimas. (32)

Las condiciones de actividad máxima para la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* están el intervalo de pH 4,5 a 5,5 y la máxima actividad en el intervalo 40 a 50°C. (33)

Como resultado del análisis de las diferentes curvas para la enzima modificada, se observa en la Gráfica 3 que el pH de máxima actividad es 5 en el intervalo de temperatura de 20 a 60°C; donde el valle máximo de actividad se encuentra en 50°C y los valores encontrados para 40, 50 y 60°C a pH 5 son mayores al siguiente valle de actividad a pH=4.

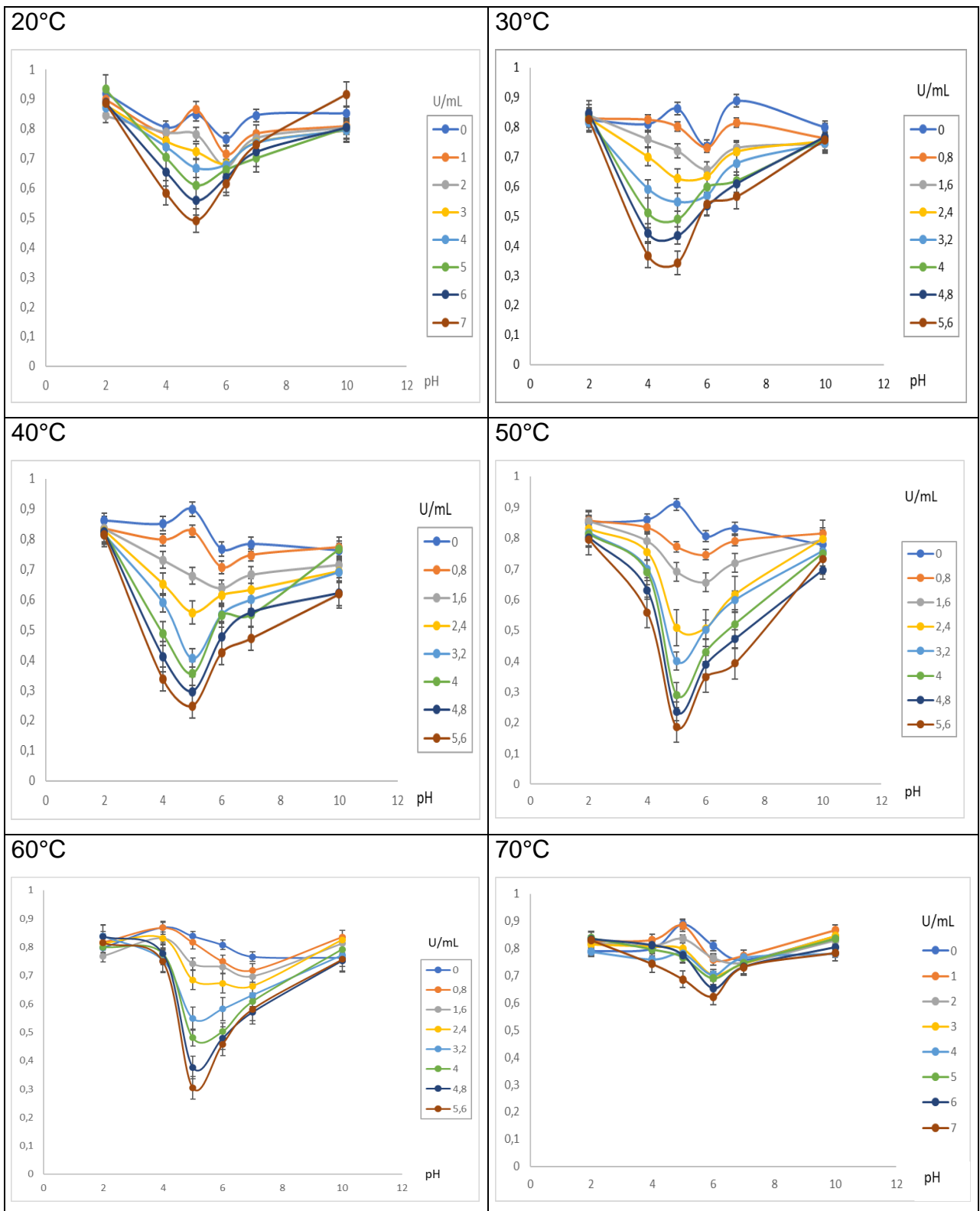
La actividad enzimática de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* a pH 5 no presenta una reducción mayor al 5% de actividad en el intervalo de temperatura de 40 - 50°C en comparación con el intervalo 50 - 60°C donde existe una pérdida del 30% de actividad, según los resultados descritos por Patel et al (33) y Kundu y Das (34).

Esta similitud en el comportamiento entre la α -amilasa Mg y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* se puede explicar por la presencia del ion Calcio estructural que mantiene la integridad del sitio activo de la enzima generando termoestabilidad en la enzima modificada como explica Prakash y Jaiswal(21). Por tanto, en la α -amilasa Mg se mantiene la propiedad de termoestabilidad aunque se cambiaron los iones secundarios de Calcio por Magnesio.

La relación entre la concentración de enzima α -amilasa Mg y los valores de pH a una temperatura constante fueron analizados en el rango de actividad Gráfica 4, entre 20 y 70°C. Los valores de actividad enzimática máxima para cada temperatura fueron determinados en un rango de 0,8 a 5,6U/mL de concentración de enzima y pH entre 2 y 10 los resultados se muestran en la Gráfica 4.

En el análisis de los datos se puede observar que la actividad enzimática tiene un mayor intervalo de absorbancia de 0,3 a 0,9 a valores de pH ácidos entre 2 y 6 a diferencia de los resultados en el intervalo de actividad entre 0,5 y 0,8 en el que se reducen a valores de pH básico entre 7 y 10 de este análisis se puede inferir que la relación entre estos dos parámetros es inversamente proporcional dentro de los límites de detección del método empleado. Determinándose así que a pH ácido de 5 la temperatura óptima de reacción es de 50°C para una concentración de 5,6U/mL.

De acuerdo a los datos reportados por Patel et al(33) y Kundu – Das(34) para la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, el pH la actividad de la enzima es 5 a 50°C, que presenta una reducción del 4% de actividad cuando se reduce el pH a 4 y una reducción del 40% actividad a pH 3 para valores de pH ácidos, por el contrario en



Gráfica 4 Absorbancia vs pH a temperatura de 20, 30, 40, 50,60 y 70°C a diferentes concentraciones de enzima modificada α -amilasa Mg, donde se observa el cambio en la actividad a valores de pH ácido.

valores más básicos como pH 6 se observa una reducción del 20% de actividad, a pH 7 una reducción de 55% y a pH 10 no se presenta actividad enzimática.

Estos datos teóricos son diferentes a los obtenidos para la α -amilasa Mg estudiados en la Gráfica 4, porque a pH 4 esta enzima modificada presenta una reducción de actividad del 60% para 5,6U/mL. Y por el contrario en valores de pH básicos se tiene resultados parecidos, a pH 6 una reducción del 20%, en pH 10 la actividad es mínima, excepto el pH 7 que tiene una reducción de 30% de actividad enzimática.

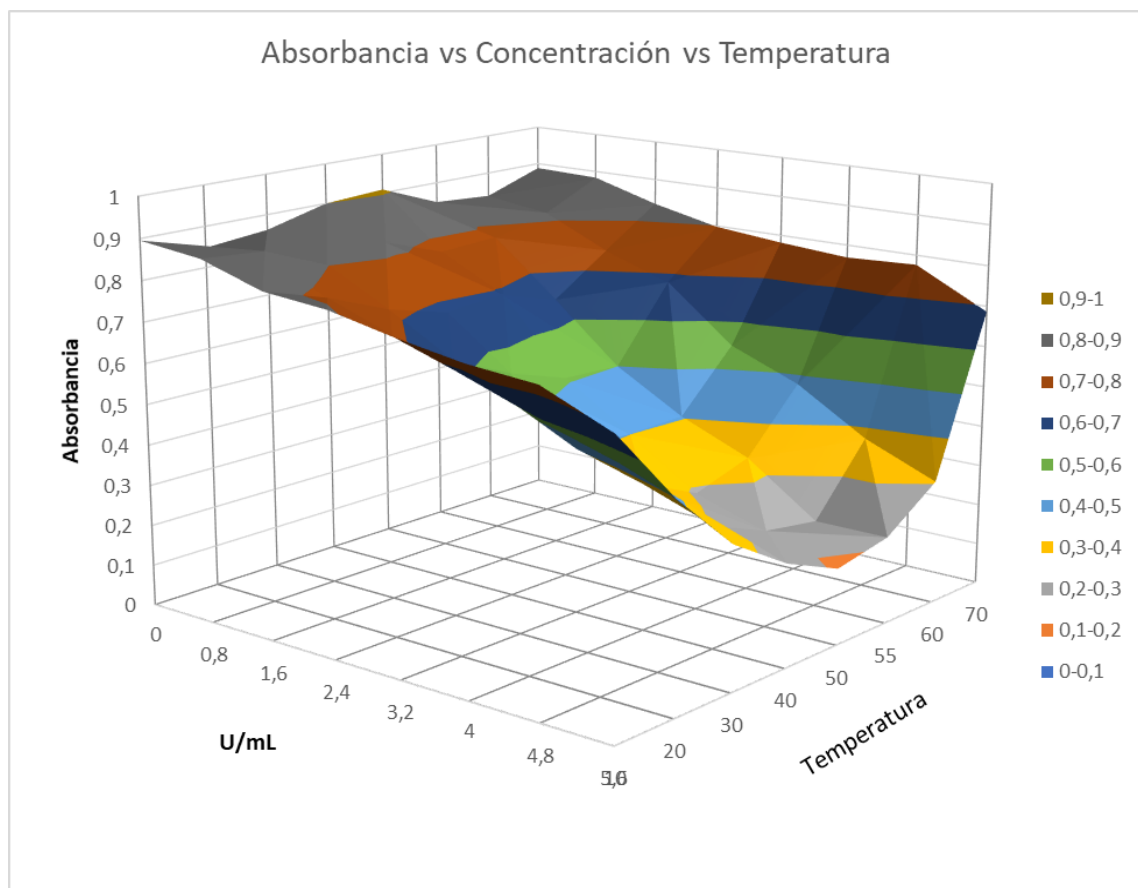
La razón de este cambio en el comportamiento enzimático respecto al pH, puede ser explicada por la sustitución de los iones secundarios de Calcio por Magnesio que modifican el tamaño estructural de la enzima, menor tamaño iónico, así como por la diferente electroafinidad del Magnesio, además de los cambios en las interacciones Calcio estructural y Calcio secundario en los sitios activos como muestra Prakash y Jaiswal (21) en su estudio.

Comparando la información teórica con los resultados de la enzima α -amilasa Mg de la Gráfica 4, existe una similitud en los resultados obtenidos a temperatura 30°C, en este caso el efecto de separación dominios por la temperatura a la que reacciona la enzima puede ser la causa principal. (21)

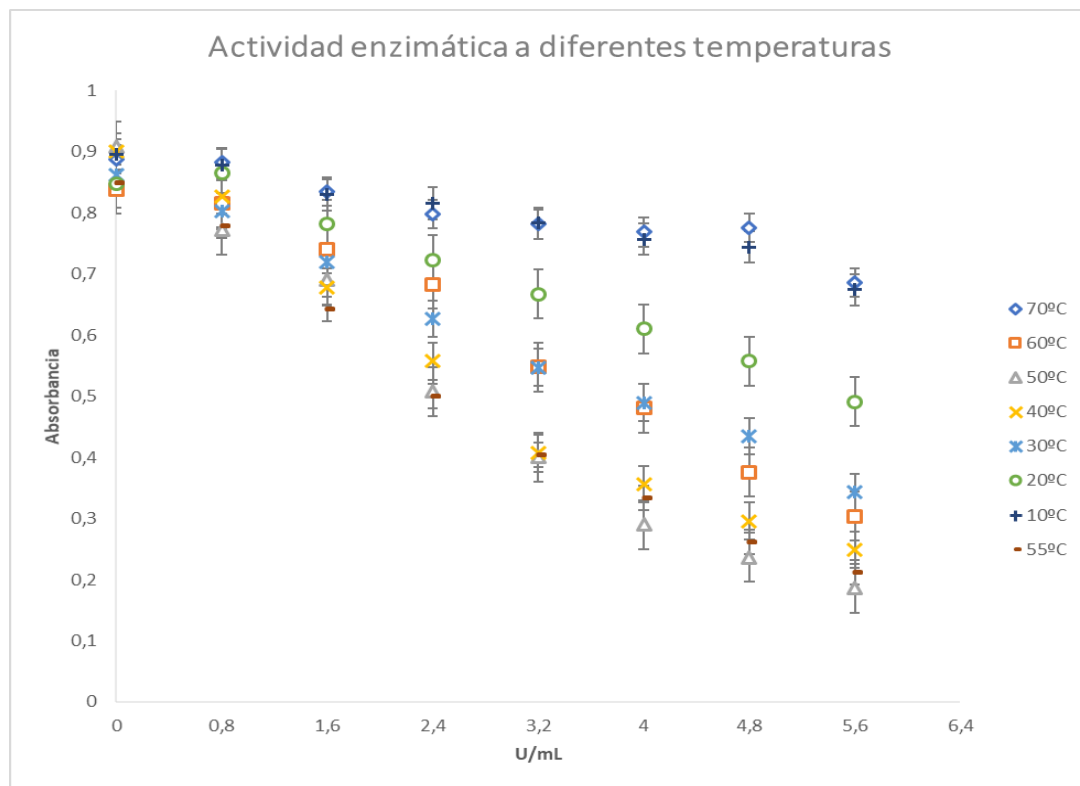
Finalmente, la Gráfica 5 y 6 muestra la relación entre la temperatura y la concentración de la enzima α -amilasa Mg a pH = 5 constante por ser este el valor de pH óptimo determinado para la reacción de acuerdo a los resultados presentados en las Gráfica 3 y 4.

Observando los datos de la Gráfica 6, los resultados muestran que a temperatura de 70 y 10°C la hidrólisis enzimática no sucede, por tanto la enzima esta inactiva, a 10°C la enzima es muy estable y no reacciona sobre el sustrato a pesar de tener las condiciones de los otros parámetros, y a 70°C es todo lo contrario la enzima esta inactiva debido a que su estructura ha sido alterada y puede concluir que esta desnaturalizada por lo tanto no se produce la reacción y la absorbancia tiene un valor de 0,8 muy próximo al valor del blanco de la reacción de 0,9 de absorbancia.

Los valores de actividad enzimática en la Gráfica 6 muestran que en los intervalos de temperatura de 30 a 60°C y 40 a 55°C, tienen comportamientos funcionales similares y muestran que las interacciones a temperaturas bajas así como a temperaturas altas, dan resultados similares, lo que muestra la estabilidad de la estructura de la enzima con el cofactor Mg. Sin embargo, la actividad enzimática de glucolisis en un intervalo entre 45 y 55 °C es la óptima determinándose que 50°C es el valor adecuado para que la reacción se lleve a cabo eficientemente con una absorbancia de 0,1 como se muestra en la Gráfica 5.



Gráfica 5 Actividad de la enzima modificada α -amilasa Mg a diferentes temperaturas y concentraciones a pH constante de 5, se muestra los cambios en la actividad a las diferentes temperaturas en una gráfica 3D

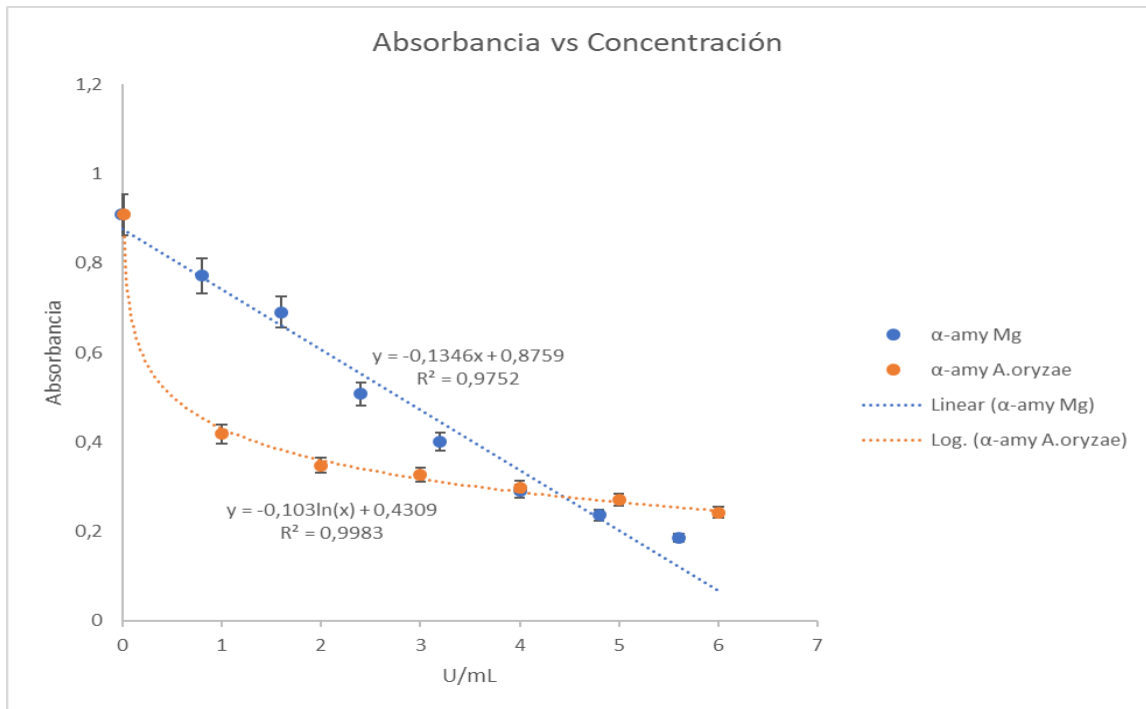


Gráfica 6 Gráfica de curvas de actividad a diferentes concentraciones donde muestra la semejanza de actividad a diferentes temperaturas.

La actividad a diferentes concentraciones de la α -amilasa Mg y la enzima original en las condiciones de actividad máxima a 30 minutos de reacción se muestran en la Gráfica 7. De acuerdo a estos resultados, se determina que la enzima modificada tiene una correlación lineal entre actividad y concentración por el contrario la enzima original tiene una correlación logarítmica. Analizando, observamos que a altas concentraciones la α -amilasa-Mg tiene una mayor velocidad de reacción comparada a la enzima original, y se considera que la enzima Mg es más rápida a concentraciones mayores a 4U/mL de ambas enzimas. La razón de este cambio es que la α -amilasa de *Aspegillus oryzae* tiene un paso limitante en su mecanismo de reacción que hace que el incremento en la concentración de la enzima no aumente la actividad enzimática: esta velocidad está definida por la estructura, tamaño y mecanismo de reacción del sitio activo en la enzima (25).

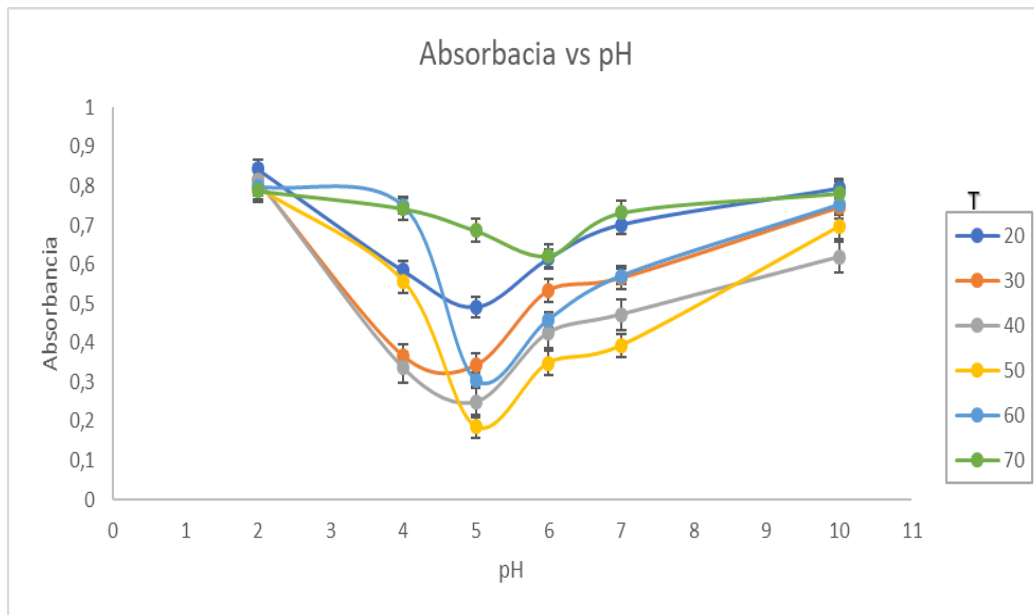
La modificación en la estructura y tamaño de la enzima como consecuencia de la sustitución del Calcio secundario por Magnesio, afecta efectivamente al mecanismo de reacción y no presenta paso limitante respecto de la concentración enzimática. Por esta

razón la enzima α -amilasa Mg muestra un tiempo menor de reacción y mayor eficiencia a concentración 5,6 U/mL que la enzima original.



Gráfica 7 Actividad a diferentes concentraciones de la enzima, comparando la α -amilasa Mg (α -amy Mg) y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (α -amy A.oryzae) con las curvas de regresión lineal y logarítmica respectivamente a pH 5, 50°C por 30 minutos de reacción

Adicionalmente se analizaron los intervalos de actividad máxima reportados como absorbancia con los parámetros óptimos y tomando en cuenta los intervalos de actividad enzimática en la Gráfica 4. Este análisis determina que el rango pH es el parámetro preponderante para la reacción; por otro lado, la temperatura puede variar en un rango no muy amplio entre 30 - 40°C, los datos también muestran que a pH cercano a 4 la reacción se puede desarrollar, pero con un rendimiento menor como se puede ver en la Gráfica 8.



Gráfica 8 Actividad máxima de la enzima modificada α -amilasa Mg entre 0,8 y 5,6U/mL, donde se muestra que la actividad máxima tiene un punto limitante en pH 6 sin importar la temperatura y puntos dispersos a valores de pH menores a 6, con la mejor actividad en pH 5 a temperatura 50°C

Así mismo por las curvas en la Gráfica 8 podemos establecer las condiciones límite para la reacción enzimática a valores por debajo o igual a pH=2 y pH igual o mayor a 6 la enzima se desnaturaliza y la reacción no se lleva a cabo, sin embargo estos límites nos permiten establecer las condiciones para desactivación de la enzima y control de la reacción. La razón de esta desnaturalización tiene que ver con la sustitución del ion Calcio por Magnesio, donde la estabilidad de los dominios es reducida, puesto que los iones Calcio internos estructurales de la enzima son los responsables de los sitios activos y mantienen la estructura adecuada de las α -amilasas en diferentes condiciones de pH y temperatura. (21)

La Gráfica 8 también muestra que los valores de temperatura tienen un efecto positivo en la reacción cuando valores de pH están fijos entre 4 y 5. También se puede ver que a pH 6 y 7 sin importar el valor de temperatura, ni la concentración se tiene una actividad enzimática reducida.

5.2 Determinación de la estabilidad de la enzima modificada por decaimiento.

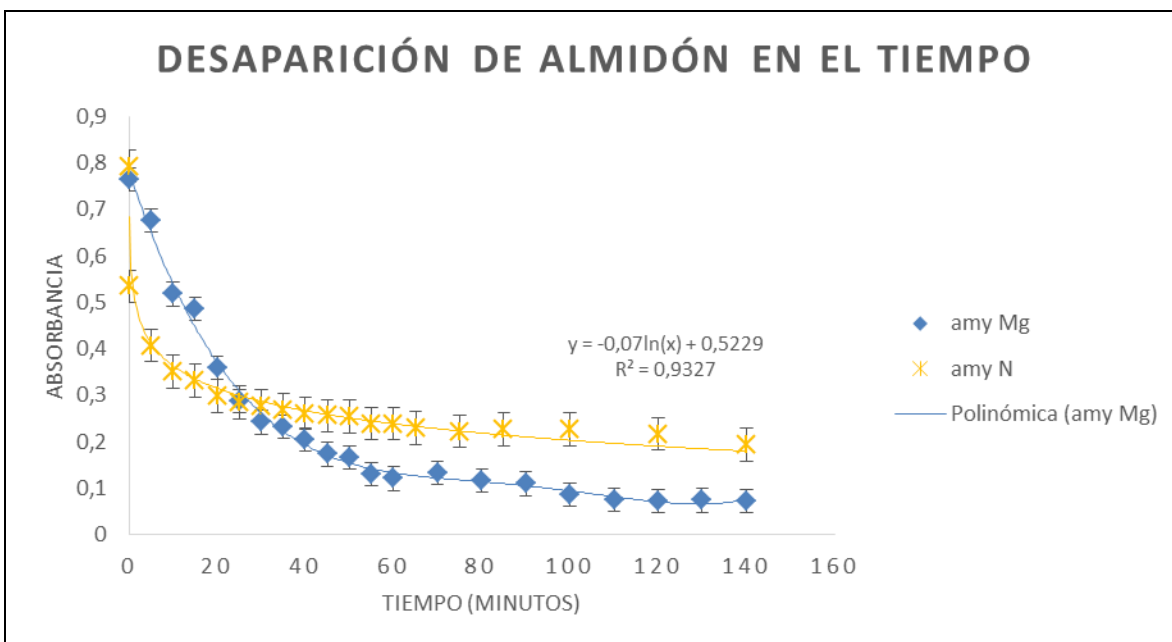
Respecto a la estabilidad de la enzima modificada, se enfatizaron dos tipos de evaluaciones, la primera es la diferencia de velocidad de reacción como comparación en las mismas condiciones de pH, T y concentración para las dos enzimas, la alfa

amilasa de *Aspergillus oryzae* y la alfa amilasa Mg como se observa en la Gráfica 9. La segunda evaluación está dada por la diferencia de límite de reacción a mayores concentraciones de enzima.

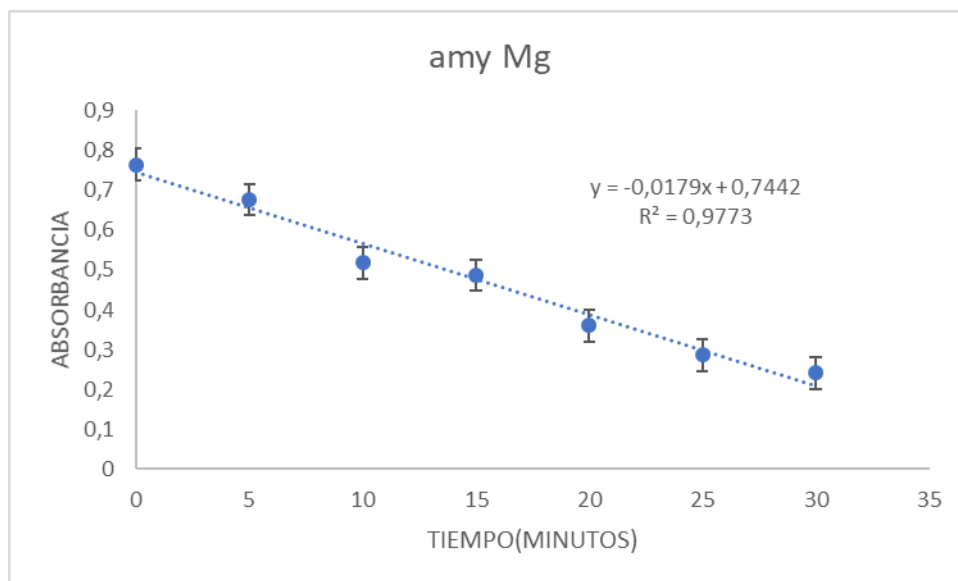
La Gráfica 9 muestra la diferencia en la velocidad de decaimiento amiloclástico entre la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* y la α -amilasa Mg. En este gráfico se puede comprobar que la velocidad de reacción de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* es mayor en los primeros 15 minutos reduciendo la concentración de almidón soluble en 60%, y llega a un límite de reacción a los 30 minutos donde alcanza una absorbancia de 0,3 y ha reducido un 10% más del almidón residual. Después de los 30 minutos, la reacción sucede lentamente, reduciendo la concentración de almidón en menos del 5% hasta los 60 minutos de reacción y otros 5 % tras otros 60 minutos de incubación. Se debe considerar que la reacción completa tiene un valor de absorbancia de 0,06, y en el experimento a 120 minutos se tiene aún una absorbancia de 0,22; por tanto, no hidrolizó al 100% el almidón.

La α -amilasa Mg por el contrario, tiene una reacción lenta al inicio de la reacción pero un comportamiento lineal de pendiente negativa en los primero 30 minutos de la reacción como se observa en la Grafica 10. Después de los 30 minutos de reacción se tiene una reducción en la velocidad de hidrolisis de almidón, con una reducción del 15% hasta los 60 minutos de reacción. Y una reacción completa del 100% a los 120 minutos de iniciada la incubación.

De acuerdo a los resultados de las Gráficas 9 y 10 el tiempo de reacción significativo para hacer el seguimiento de la hidrolisis de ambas enzimas tiene como tiempo estándar de incubación 30 minutos.



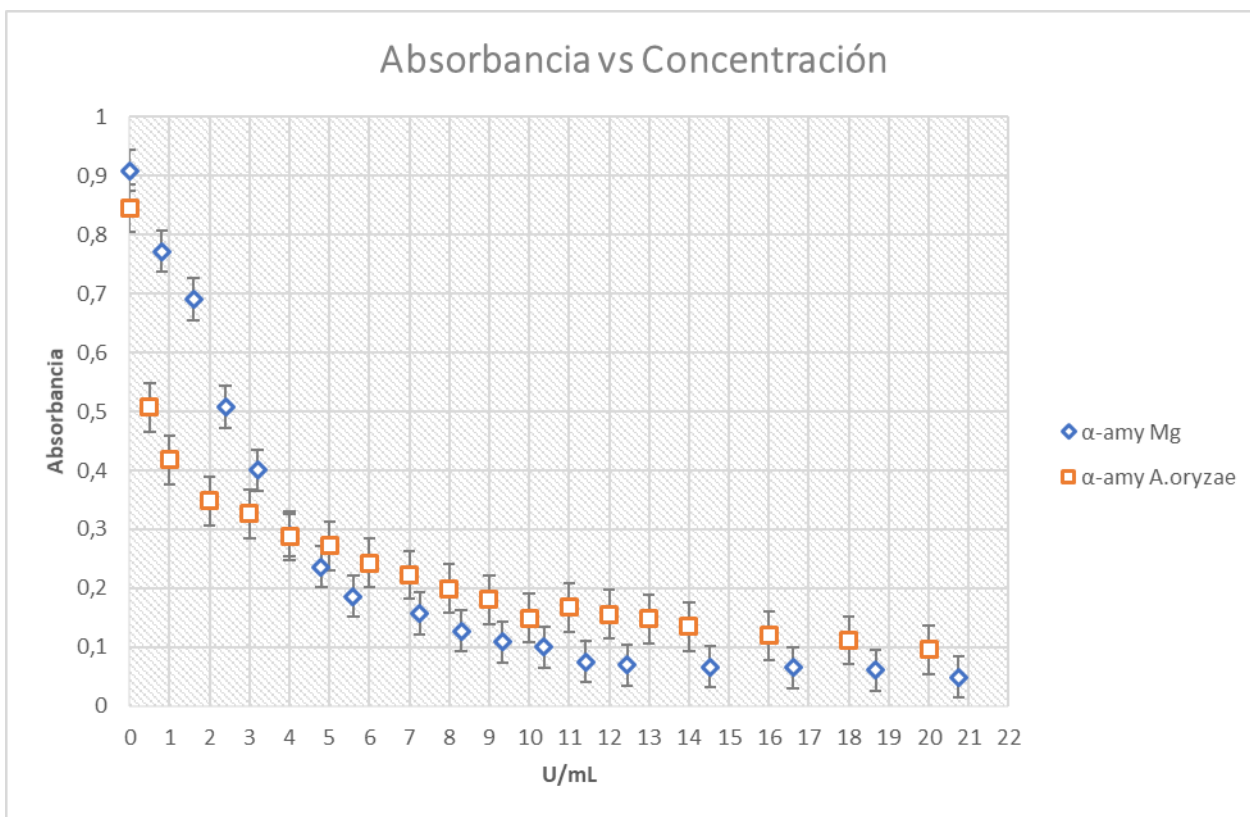
Gráfica 9 Cinética de desaparición de almidón a concentración 5U/mL para ambas enzimas, de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*(amy N) y α -amilasa Mg(amy Mg)



Gráfica 10 Segmento lineal de 0 a 30 minutos de la cinética de desaparición de almidón a concentración 5U/mL de la α -amilasa Mg(amy Mg)

Como se observa en la Gráfica 10, a 30 minutos es posible tener un intervalo lineal de concentración que cumple con la ley de Lambert Beer(40) determinando de esta manera el intervalo de cuantificación de la concentración parcial de una enzima modificada entre 0,3 a 0,7 de absorbancia relacionada directamente al concentración residual de almidón .

Por otra parte, para valores fuera del intervalo de cuantificación y en concentraciones similares de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* y α -amilasa Mg, la Gráfica 11 muestra que la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae* a concentraciones de 20U/mL no llega a hidrolizar todo el sustrato, por el contrario, la enzima α -amilasa Mg tiene una actividad mayor que la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* a partir de 4U/mL. Además, a 11U/mL la enzima α -amilasa Mg reacciona con el 100% del almidón por tanto llega al máximo de actividad evaluable por este método.



Gráfica 11 Actividad a diferentes concentraciones de la enzima, comparando la α -amilasa Mg (α -amy Mg) y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (α -amy A.oryzae) a pH 5, 50°C por 30 minutos de reacción

La razón por la que la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae* tiene este comportamiento, tiene relación con el estudio de Windish y Mhatre (35) en el cual determinan que esta enzima solo llega a un 70% de glucosa como producto final de una hidrólisis; por tanto, siempre existe un residuo de almidón que no llega a reaccionar. Considerando la información cinética de la Gráfica 9 y de concentración de la Gráfica 11, la enzima modificada α -amilasa Mg no presenta este límite de reacción.

5.3 Determinación de la eficiencia de la enzima modificada α -amilasa-Mg en diferentes tipos de almidón

Después de determinar los parámetros fisicoquímicos de máxima actividad de la enzima, se realizaron experimentos para determinar la eficiencia en sustratos no estándar aislados de alimentos característicos del departamento de La Paz - Bolivia.

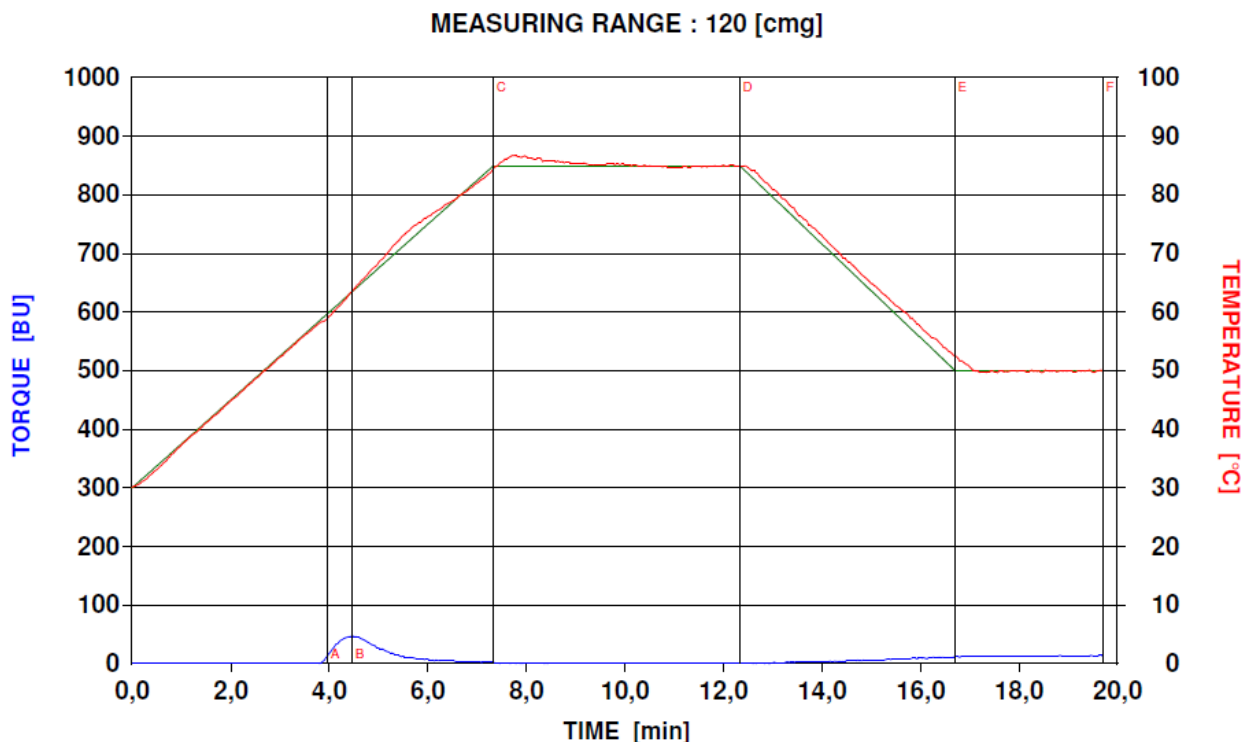
Las fuentes de los almidones aislados y analizados son: Papa negra imilla (Pacajes) (PN), Chuño (Calamarca) (Ch), Tunta (Collana) (T), Papalisa (Sorata) (Pl), Chuño de papalisa (Sorata) (Chpl), Isaño (Sorata) (I), Isaño negro (Sorata) (IN) y Yuca (Y). Además, para comparar los resultados, se analizó también el almidón de Papa estándar de Sigma Aldrich (Pstd) como estándar de comparación.

El uso del método de evaluación 4.2.2.1 para los diferentes almidones estudiados presenta la aparición de almidón retrogradado. Según el estudio realizado por Wang et al(6), se considera que la formación de almidón retrogradado esta favorecida por el reagrupamiento de cadenas de amilosa dispersas en con un rango entre 14 a 24 unidades de glucosa. Por tanto, la reducción del tamaño de las cadenas de amilosa y amilopectina debido a la enzima modificada α -amilasa Mg, incrementa la población de fragmentos de DP(grado de polimerización) 14 - 24 de glucosa, formando almidón retrogradado mientras enfría la solución.

La presencia de almidón retrogradado difiere del comportamiento del almidón soluble. Para analizar las diferencias entre el almidón soluble y otros almidones se determinaron sus viscoamilogramas de acuerdo al método 4.2.2.6.

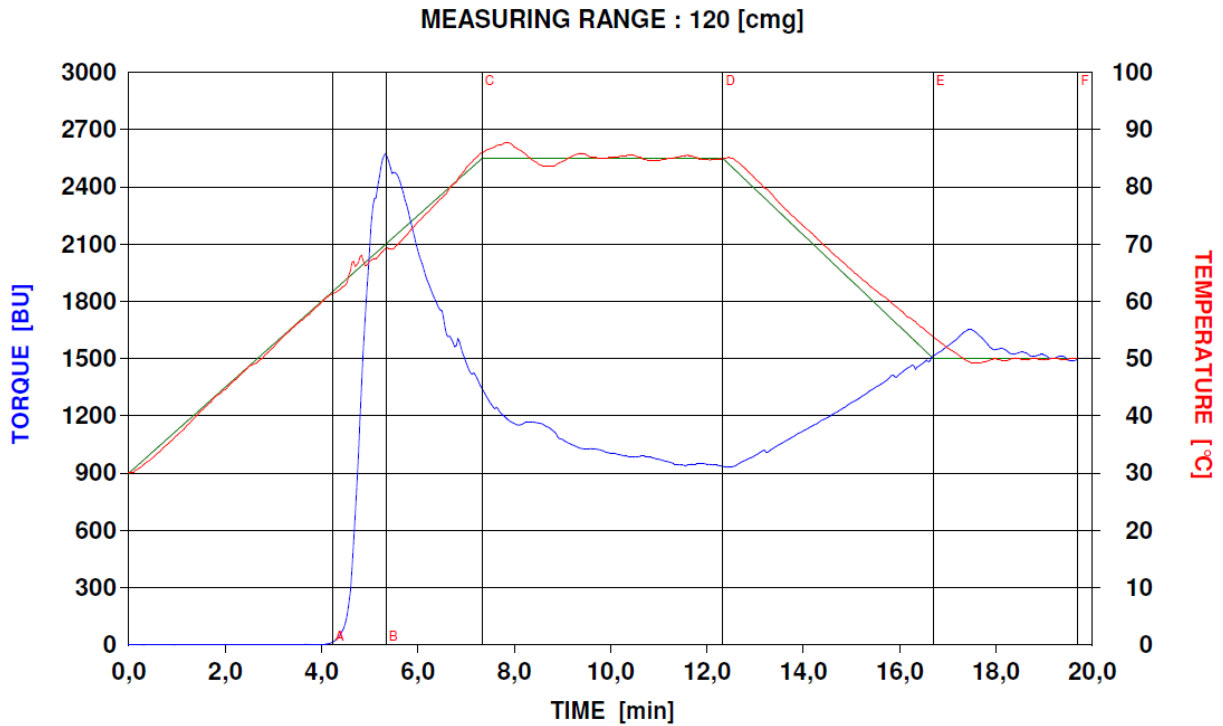
Como se observa en la Gráfica 13 se observan cambios en la viscosidad del almidón de yuca en 3 partes. Inicialmente el cambio de viscosidad en el viscoamilograma refleja el proceso de aumento de viscosidad por hinchamiento de gránulo de almidón con agua y gelificación, en un proceso de calentamiento inicial; luego, la ruptura parcial del gránulo de almidón y liberación de amilosa, después del pico de gelificación, se observa como una caída en la viscosidad de la solución y finalmente la formación de una red de amilosa que puede estar como un gel o formando almidón retrogradado, que se observa como un aumento en la viscosidad cuando empieza el proceso de enfriamiento.

Al mantener una temperatura estable, las amilopectinas, dentro de las estructuras de amilosa retrogradada, se reordenan cristalinamente (retrogradación de amilopectina) como explica Wang et al(6).(Para referencia visual del proceso de retrogradación ver Figura 1)



Gráfica 12 Viscoamilograma de 10g de almidón de papa soluble de 11,6% de humedad

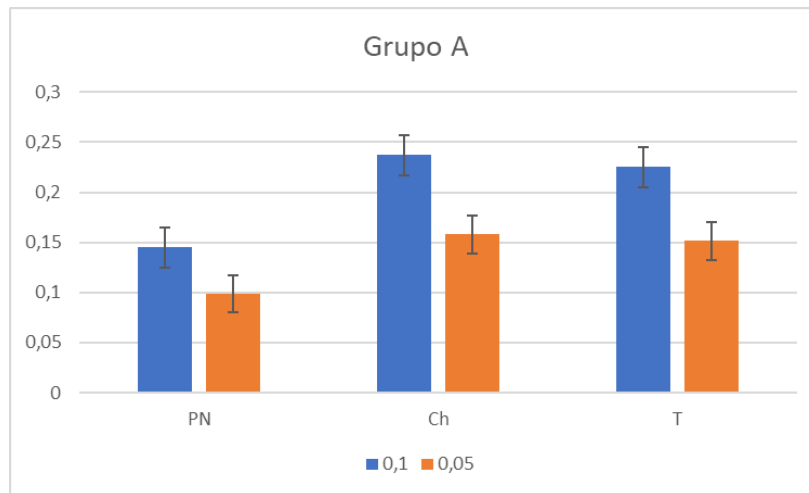
Comparando las Gráficas 12 y 13 vemos la diferencia estructural entre un almidón soluble y uno normal. El almidón soluble no presenta todas las características descritas para el almidón de yuca, por tanto no presenta retrogradación después de realizarse la hidrólisis enzimática. Basados en estos resultados se evaluó la eficiencia de la enzima α -amilasa Mg en los almidones a estudiarse, por el método iodométrico amiloclástico usado para la medición de la cantidad de amilosa y amilopectina, usado en diferentes almidones sin presentar retrogradación, y el método sacarimétrico comparativo de actividad enzimática respecto a diferentes los sustratos.



Gráfica 13 Viscoamilograma de 10g de almidón de yuca de 11,6% de humedad

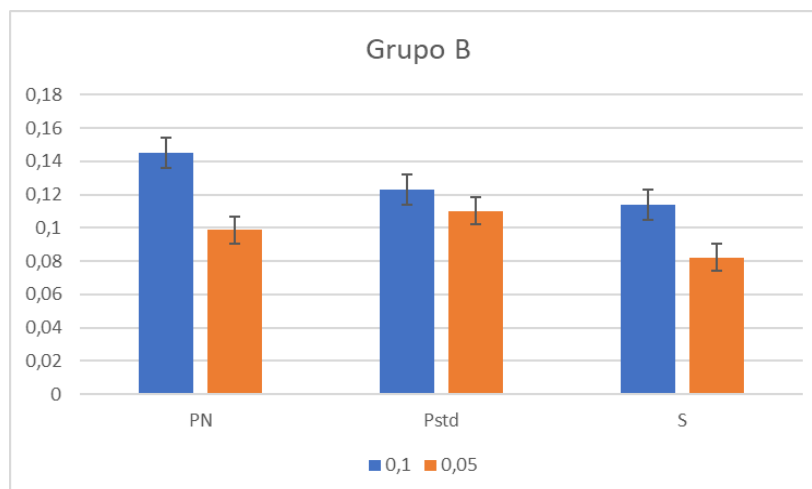
Los resultados de este análisis son descritos a continuación; para su análisis los diferentes sustratos fueron agrupados de acuerdo a su procedencia; Grupo A: Papa negra y sus deshidratados (chuño y tunta), Grupo B Papa y semejantes (Papa negra, papa estándar de Sigma, almidón soluble de papa), Grupo C Papalisa y chuño de papalisa y Grupo D Papa negra y otros almidones (yuca, isaño e isaño negro).

Para el Grupo A se observa en la Gráfica 14 que el almidón de Papa tiene la menor absorbancia por tanto la mayor actividad, seguida del almidón de tunta y el chuño. La diferencia en la reacción enzimática está relacionada a la estructura del almidón que fue modificado en el proceso de chuñificación de la papa al igual que el proceso de elaboración de la tunta.



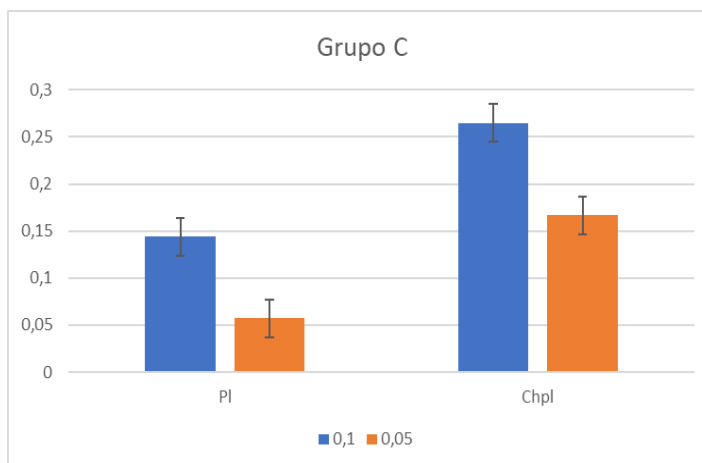
Gráfica 14 Grupo A donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Ch (chuño) y T (tunta)

La característica del Grupo B es la presencia de la papa estándar y del almidón soluble. Como se observa en la Gráfica 15 el almidón de Papa negra presenta un comportamiento diferente de la papa estándar y el almidón soluble, en ambos casos estas dos últimas muestras tienen una menor absorbancia por tanto un límite de reacción mayor. Desde una perspectiva comparativa el almidón soluble reacciona con una mayor eficiencia por su estructura diferente a la de los otros almidones por tanto no es posible relacionar estos resultados. Pero, entre el almidón de papa negra y el almidón de papa estándar de Sigma, se puede atribuir estos cambios a sus diferentes fuentes de origen como explica Huanca (36).



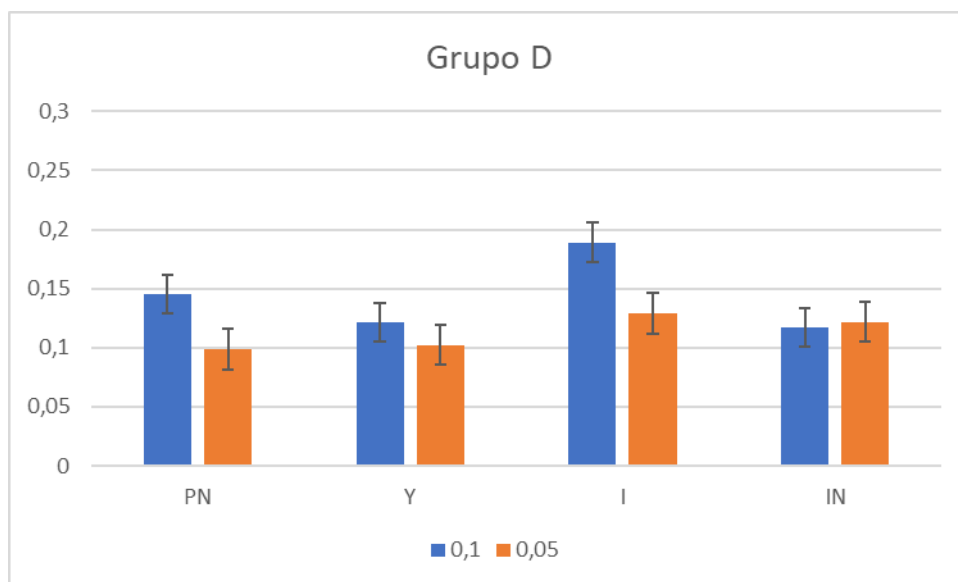
Gráfica 15 Grupo B donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Pstd (papa de Sigma) y S (almidón soluble de papa)

En el Grupo C se puede observar que la papalisa y su deshidratado tienen un comportamiento parecido a la papa y el chuño. Donde la papalisa reacciona más eficientemente que el chuño de papalisa, esta información se ve en la Gráfica 16.



Gráfica 16 Grupo C donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PI (papalisa), Chpl (chuño de papalisa)

Finalmente, el Grupo D presenta diferentes tipos de almidones, como se muestra en la Gráfica 17 el almidón de isaño negro reacciona eficientemente con la enzima contrariamente a el almidón de isaño.



Gráfica 17 Grupo D donde 0,1 y 0,05 son las masas en gramos iniciales dispersadas en la preparación del almidón, PN (papa negra), Y(yuca), I(isaño), IN(Isaño negro)

El análisis de los resultados de la eficiencia de la enzima en diferentes sustratos y su relación estructural entre amilosa y amilopectina, para las muestras de Isaño negro, yuca, papa negra e isaño(Grupo D) se muestran de menor a mayor en la Tabla 5.

Muestra	Amilosa %
Almidón de Isaño negro	28,6 ³⁶
Almidón de Yuca	17,0 ³⁷
Almidón de Papa negra	22,7 ³⁶
Almidón de Isaño	7,6 ³⁶

Tabla 5 Porcentajes de amilosa para el grupo D de acuerdo a datos bibliográficos ordenada de menor a mayor absorbancia

En esta tabla se puede observar que existe una mayor eficiencia de la reacción a mayor porcentaje de amilosa para los tubérculos con estructura cristalina de tipo B, sin embargo la muestra de almidón de yuca, no muestra este mismo comportamiento puesto que se trata de una raíz. Por tanto, se considera que pese a tener la misma estructura cristalina de acuerdo a Nakamura (7), la interacción enzima sustrato varía entre los almidones de raíz y aquellos provenientes de tubérculos.

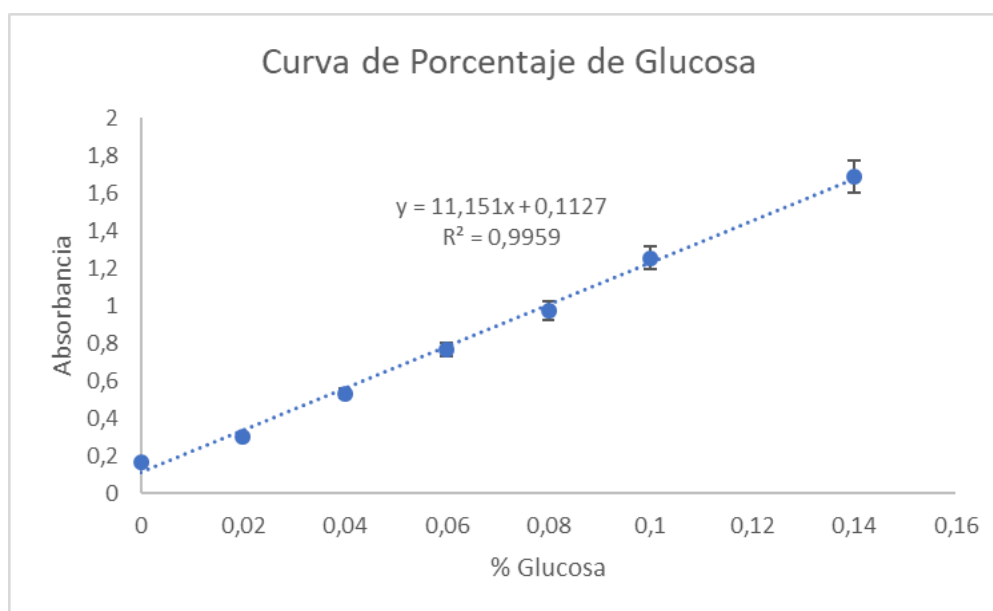
Por otra parte, cuando analizamos los almidones de los Grupos A y C notamos que no existe una relación semejante a la obtenida en la Tabla 5 en la Tabla 6. Esto es debido al cambio estructural por el proceso enzimático y deshidratación (chuñificación) que tienen este tipo de almidones como muestra Huanca (36) en su estudio.

Muestra	Amilosa %
Almidón de Papa negra	22,7 ³⁶
Almidón de Tunta	19,2 ³⁶
Almidón de Chuño	26,4 ³⁶

Almidón de Papalisa	15,8 ³⁶
Almidón de Chuño de Papalisa	16,2

Tabla 6 Porcentajes de amilosa para los grupos A y C de acuerdo a datos bibliográficos ordenados por actividad decreciente de actividad amiloclástica

Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en la etapa de licuefacción por el método 4.2.2.9 donde solo se realizó la hidrólisis enzimática con la enzima α -amilasa Mg. Y se determinó el porcentaje de glucosa obtenido por el método sacarimétrico 4.2.2.8 obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 7, usando la Curva estándar de glucosa p.a. en la Gráfica 18.



Gráfica 18 Curva de Porcentaje de Glucosa p.a. en el intervalo lineal de 0 a 0,16% analizado por el método DNS

De esta información se puede comprobar que los resultados obtenidos por ambos métodos difieren en algunas de las muestras. En el grupo A, el almidón de Tunta tiene el mayor porcentaje de glucosa, y el almidón de Papa negra tiene el menor porcentaje de glucosa. Los resultados obtenidos difieren de los resultados iniciales que mostraban que el almidón de Papa negra reaccionaba con más eficiencia que los almidones de sus deshidratados. Estos resultados se explican por la especificidad de las enzimas respecto la estructura de los sustratos, la α -amilasa Mg que interacciona con los enlaces glicosídicos 1-4 produce diferentes productos en el proceso enzimático, desde dextrinas hasta glucosa. El método amiloclástico se enfoca en la determinación de

almidón residual o dextrinas de elevado grado de polimerización (DP) por el contrario, el método sacarimétrico solo analiza la cantidad de glucosa generada sin importar el grado de hidrolisis que tenga el almidón.

En el grupo B podemos observar que el almidón de Papa estándar tiene un porcentaje mayor de glucosa que el almidón de Papa negra igual que los datos amiloclásticos. Sin embargo, de los resultados obtenidos podemos comprobar que el almidón soluble tiene un menor porcentaje de glucosa que el almidón de Papa estándar lo cual muestra que el análisis sacarimétrico difiere del amiloclástico.

Muestra	% glucosa	Error
Papa negra	0,84	0,04
Chuño	0,93	0,02
Tunta	1,87	0,06
Papa negra	0,84	0,04
Papa estándar	1,38	0,05
Soluble	1,02	0,04
Papalisa	1,14	0,01
Chuño de papalisa	1,17	0,03
Isaño Negro	1,37	0,04
Yuca	0,91	0,02
Papa negra	0,84	0,04
Isaño	0,82	0,03

Tabla 7 Porcentaje de glucosa obtenido por el método DNS color azul grupo A, color verde grupo B, color amarillo grupo C, color violeta grupo D

Respecto al Grupo C, podemos ver que los resultados obtenidos para el almidón de Papalisa y el almidón de Chuño de papalisa se asemejan a los resultados de los almidones de Papa negra y Chuño en el Grupo A, donde los almidones provenientes de un sustrato deshidratado tienen un porcentaje mayor que su homólogo sin deshidratar. Finalmente, comparando los resultados del Grupo D los resultados amiloclásticos y sacarimétricos son similares. Por tanto, para el método sacarimétrico se puede considerar que el efecto del porcentaje de amilosa tiene el mismo comportamiento que con los resultados del método amiloclástico como se observa en la Gráfica 17.

5.4 Determinación de la eficiencia de la enzima modificada en la producción de jarabe de glucosa a partir de almidones

Considerando la información obtenida en el punto 5.3 se utilizó en la etapa de licuefacción del proceso de producción de jarabe de glucosa la nueva enzima modificada α -amilasa Mg, sustituyendo la enzima BAN480L de acuerdo a Huanca(38). Se analizó la cantidad de glucosa obtenida y la calidad del jarabe de glucosa con la enzima modificada para ver la eficiencia de la α -amilasa Mg en este proceso.

Inicialmente se analizó la enzima BAN 480L para tener la misma concentración en el proceso con nuestra enzima modificada. Se determinó que la enzima BAN 480L tenía una actividad de $19327 \pm 32 \text{U/mL}$ usando el método 4.2.2.1 y la Gráfica 2 para el cálculo de la actividad.

Los resultados obtenidos para el Grupo A muestran que se obtuvo mas glucosa en el jarabe de almidón de Papa negra con la enzima modificada en comparación con la enzima BAN 480L, pero para los almidones de Tunta y Chuño se obtuvieron menores valores, principalmente el chuño que presenta una reducción del 32% en la cantidad de glucosa. Respecto al Grupo D se puede observar en la Tabla 8 que los almidones de Papa negra, Yuca e Isaño presentan un mayor porcentaje de glucosa que en un experimento con la enzima BAN 480L.

Muestra	%glucosa amy Mg	Error	%glucosa BAN 480L **
Almidón de Papa negra	19,9	0,3	16,8
Almidón de Chuño	13,5	0,1	20,0
Almidón de Tunta	21,5	0,2	22,8
Almidón de Papalisa	19,2	0,2	20,9
Almidón de Chuño de papalisa	10,0	0,1	
Almidón de Isaño negro	21,1	0,1	24,9
Almidón de Papa Negra	19,9	0,3	16,8
Almidón de Yuca	21,9	0,2	21,3
Almidón de Isaño	20,7	0,2	14,5

Tabla 8 Porcentajes de glucosa después del proceso hidrólisis enzimática comparado con información bibliográfica. Referencia Huanca 36**.

Los valores de DE para los diferentes grupos de sustratos fueron obtenidos por el método 4.2.2.10, está información se encuentra en la Tabla 9 donde se encuentran

elevados valores de equivalentes de dextrosa en todas las muestras analizadas. Comparando esta información con la obtenida por la enzima BAN 480L, tenemos un incremento en la calidad de todas las muestras, el único incremento menor al 5% es del almidón de Chuño.

Analizando los resultados, podemos inferir que la cantidad de dextrosas y azúcares no reductores se reduce significativamente y por esta razón la calidad del jarabe de glucosa aumenta. La razón principal de este cambio es debido a los fragmentos residuales de almidón no hidrolizado; como se explicó en el punto 5.3 los residuos de almidón se retrogradan.

Muestra	DE amy Mg	Error	DE BAN 480L
Almidón de Papa negra	88,4	0,9	52,8*
Almidón de Chuño	63,3	0,5	61,8*
Almidón de Tunta	98,3	0,8	70,8*
Almidón de Papalisa	87,4	0,6	46,1*
Almidón de Chuño de papalisa	73,2	0,4	
Almidón de Isaño negro	97,2	0,6	61,2*
Almidón de Papa Negra	88,4	0,9	52,8*
Almidón de Yuca	80,5	0,7	72,7*
Almidón de Isaño	94,3	0,5	46,2*

Tabla 9 Equivalentes de Dextrosa(DE) después del proceso hidrólisis enzimática comparado con información bibliográfica. *Referencia Huanca 36

Los almidones de Tunta, Isaño negro e Isaño tienen los mayores valores de DE con 98,3; 97,2 y 94,3 respectivamente, para una reacción con la enzima modificada α -amilasa Mg.

Después entre 90 y 80 de Equivalentes de Dextrosa se tienen los almidones de Papa negra, Papalisa y Yuca con 88,4; 87,4 y 80,5 respectivamente.

Finalmente, el almidón de Chuño de papalisa y el de Chuño tienen los menores valores de DE con 73,2 y 63,3 respectivamente. Estos resultados concuerdan con la información amiloclástica analizada en el punto 5.3 que mostraba que los almidones deshidratados tienen una menor reacción que sus almidones no deshidratados. El almidón de Tunta es una excepción a esta regla y concuerda con los datos bibliográficos (36) al tener el mayor DE de las muestras analizadas.

Considerando los resultados, el uso de la enzima modificada α -amilasa Mg en el proceso de hidrólisis enzimático aumenta el rendimiento de los almidones de papa negra, yuca e isaño y en general aumenta la calidad del jarabe de glucosa obtenido.

5.5 Correlación de las interacciones entre la α -amilasa-Mg modificada y la glucoamilasa en la producción de jarabe de glucosa

Finalmente, se determinó una relación entre la cantidad de enzima α -amilasa Mg y de Dextrozyme; evaluando su impacto en los resultados de la hidrólisis enzimática en el almidón de yuca, las muestras Yuca 1 al 7 se analizaron con las diferentes proporciones de enzima como se describe en la Tabla 10.

Muestra	%glucosa	Error %glu	DE	Error DE	Amy Mg	DEXTRO
Yuca 1	21,9	0,4	80,5	0,6	1	1
Yuca 2	18,6	0,6	81,8	0,7	1	2
Yuca 3	12,5	0,6	58,4	0,8	1	0,5
Yuca 4	18,3	0,5	82,8	0,9	0,5	1
Yuca 5	14,6	0,4	66,9	0,7	2	1
Yuca 6	20,5	0,5	90,0	0,7	2	2
Yuca 7	16,1	0,6	70,7	0,9	0,5	0,5

Tabla 10 Valor de DE para experimentos cambiando las cantidades de enzima de acuerdo a las proporciones denotadas en la tabla para la enzima α -amilasa Mg(Amy Mg) y Dextrozyme DX1,5(DEXTRO) donde 1 representa el valor usado en el método 4.2.2.9. 2 representa el doble y 0,5 la mitad

Respecto al porcentaje de glucosa se puede observar que el mejor resultado se obtiene con las 2 enzimas como se evaluaron inicialmente en proporción 1Mg:1Dex y contrariamente a lo que se obtiene en la proporción de 1Mg:0,5Dex.

Analizando el efecto del incremento y reducción de la concentración de la enzima Dextrozyme, se observa que el efecto de la reducción de esta glucoamilasa, reduce la cantidad de glucosa obtenida. Inversamente un incremento de esta enzima mejora la calidad de el jarabe de glucosa que se muestra en el valor de DE, a pesar de que se puede observar una reducción del porcentaje de glucosa entre 1 a 3%.

Desde una perspectiva de calidad de jarabe de glucosa, cuando la proporción de enzima Dextrozyme es mayor a la de la enzima α -amilasa Mg, se obtienen mejores resultados de DE.

6 CONCLUSIONES

Se determinó que las mejores condiciones de actividad de la enzima modificada son a 50°C y pH 5. Condiciones en las que la enzima es estable por su estructura y activa por la conservación de sus sitios activos.

A pesar de haberse modificado la estructura con el cambio de cofactor los parámetros fisicoquímicos de actividad máxima muestran un comportamiento normal y la relación entre ellos es consistente con lo reportado en bibliografía para la enzima sin modificar.

Se establece los nuevos rangos de parámetros fisicoquímicos para la reacción de hidrólisis de la α -amilasa Mg, para valores de pH ácidos y temperatura moderadas 30-55 °C, la reacción es eficiente lo que hace más viable el uso de esta enzima en procesos industriales para la obtención de jarabe de glucosa.

Por otra parte, la sustitución de los cofactores secundarios Calcio por Magnesio, mantuvo la termoestabilidad de la enzima, pero modificó el efecto del pH en su actividad máxima a valores de pH ácido, esto por el efecto de la electroafinidad y la dimensión de los iones Magnesio.

La temperatura de inicio de la reacción es menor comparada con las α -amilasas normales lo que hace más viable el uso de esta enzima α -amilasa Mg en sustratos termolábiles en medios ácidos.

El cambio de cofactor afecta al mecanismo de hidrólisis, mayor velocidad de reacción a concentraciones mayores a 4U/mL comparadas con la enzima original y una correlación lineal entre la actividad, concentración de enzima y sustrato.

Por tanto, en procesos de hidrólisis de almidones la enzima α -amilasa Mg modificada de *Aspergillus oryzae* alcanza su mejor actividad a un pH de 5, temperatura de 50°C y una concentración de 5,6U/ mL sobre un sustrato de almidón preparado al 2% de concentración.

La cinética de la reacción cambia de primer orden a orden 0 en los primeros 30 minutos de la reacción, esto aumenta la velocidad final de reacción respecto al sustrato.

La enzima modificada no tiene un límite de reacción respecto del almidón como la enzima original en la evaluación cinética.

Con la información amiloclástica obtenida respecto de los diferentes sustratos se tiene que la enzima modificada alfa amilasa Mg es más eficiente sobre el almidón de Papa negra y Papalisa que sus deshidratados. Debido al cambio en la proporción de amilosa y amilopectina, a mayor % de amilosa la enzima modificada es más eficiente en el corte de enlaces glicosídicos 1-4.

En general la comparación de los resultados entre el método amiloclástico y sacarimétrico, solo es posible cuando se analizan almidones de fuentes sin pretratamientos. Los almidones de muestras deshidratadas difieren en los resultados obtenidos por ambas técnicas. Sin embargo, se obtuvo los mismos resultados para todo el Grupo D y por tanto la consideración de asociación de fuente y no de tipo cristalino también es aplicable a los métodos sacarimétricos.

La enzima modificada es eficiente en la reacción de hidrolisis como se muestra en los resultados de almidones de Tunta y Yuca. Igualmente, esta enzima es más eficiente que la enzima BAN 480L en el proceso de obtención de jarabe de glucosa, influyendo en la calidad del jarabe con valores entre 80 y 90 DE en las muestras de Tunta e Isaño negro. El incremento de la calidad del jarabe de glucosa se debe a la formación de almidón retrogradado de los fragmentos y dextrinas no hidrolizadas en el proceso. El análisis de las estructuras y la relación amilosa- amilopectina de los sustratos estudiados permite establecer que la α -amilasa Mg, puede producir jarabe de glucosa de alta calidad valores de DE mayores a 73 empleando almidones tipo IV como el de los sustratos evaluados con excepción del almidón de Chuño que se clasifica como almidón tipo III y consecuentemente se obtiene un jarabe de glucosa con 63,3 DE.

Finalmente, de acuerdo a la evaluación sacarimétrica se encontró que la mejor proporción de las enzimas es 1:1 de α -amilasa Mg y Dextrozyme para el proceso de obtención de jarabe de glucosa.

7 RECOMENDACIONES

El presente estudio muestra las mejores condiciones para un rendimiento óptimo de jarabe de glucosa a partir de almidones sustituyendo una enzima comercial por una enzima modificada de mayor eficiencia.

Sin embargo, el escalamiento de la producción de la enzima modificada α -amilasa Mg y su uso en procesos industriales sería de beneficio para la producción industrial de jarabe de glucosa de fuentes propias en el país y sustituir este producto por el importado que es actualmente el de mayor uso en las industrias nacionales.

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Yañiquez, J., (2016), Efecto del Mg como cofactor mayoritario en la enzima modificada α -amilasa Mg de *Aspergillus oryzae*, Tesis. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia.
- 2 Souza, P. M. D. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861.
- 3 Mojsov, K. (2012). Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2(10), 583-609.
- 4 Coultate, T. P. *Food: the chemistry of its components*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry., Fourth edition (2002), 41-52
- 5 Vargas Apaza, S. L. (1983). *Selección y evaluación de bacterias del género Bacillus productoras de amilasa en cultivo sumergido* (Doctoral dissertation, Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú).
- 6 Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568-585.
- 7 Nakamura, Y. (Ed.). (2015). *Starch: metabolism and structure*. Springer.
- 8 TAKAGI, T., & ISEMURA, T. (1965). Necessity of Calcium for the Renaturation of Reduced Taka-amylase A. *The Journal of Biochemistry*, 57(1), 89-95.
- 9 Vallee, B. L., Stein, E. A., Sumerwell, W. N., & Fischer, E. H. (1959). Metal content of α -amylases of various origins. *Journal of Biological Chemistry*, 234(11), 2901-2905.
- 10 Pawson, T., & Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *science*, 300(5618), 445-452.

- 11 Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1-43.
- 12 Mahler, H. C., Friess, W., Grauschopf, U., & Kiese, S. (2009). Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(9), 2909-2934.
- 13 Reddy, N. S., Nimmagadda, A., & Rao, K. S. (2004). An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 645-648.
- 14 Naidu, M. A. (2013). Bacterial Amylase A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 4(2).
- 15 Mohamed, S. A., Almulaiky, Y. Q., Ahmed, Y. M., Al-Bar, O. A., & Ibrahim, I. H. (2014). Purification and characterization of α -Amylase from Miswak *Salvadora persica*. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1.
- 16 Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., ... & Miller, C. (2002). A novel, high performance enzyme for starch liquefaction discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26501-26507.
- 17 Brzozowski, A. M., & Davies, G. J. **1997**, Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution, *Biochemistry*, 36(36), 10837-10845.
- 18 Yañiquez, J. V., Huanca, S. L., Tejeda, L. K., Aliaga, E. R., Peñarrieta, J.M., Mollinedo, P. P.,(2019) Determination of the temperature, pH and concentration parameters for α -amilasa mg a new enzyme, *Revista Boliviana de Química, en revisión*.
- 19 Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- 20 Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014), α -amylase production and applications: a review, *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.

- 21 Prakash, O., & Jaiswal, N. (2010), α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes, *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(8), 2401-2414.
- 22 Bolton, D. J., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1997), Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 20(5), 340-343.
- 23 Zakowski, J. J., & Bruns, D. E. (1985), Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes, *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 21(4), 283-322.
- 24 Oikawa, A., & Maeda, A. (1957), The role of calcium in Taka-amylase A, *The Journal of Biochemistry*, 44(11), 745-752.
- 25 Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002), Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
- 26 Negi, S., & Banerjee, R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food research international*, 42(4), 443-448.
- 27 Stein, E. A., & Fischer, E. H. (1958). The resistance of α -amylases towards proteolytic attack. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2), 867-880.
- 28 Mohamed, S. A., Almulaiky, Y. Q., Ahmed, Y. M., Al-Bar, O. A., & Ibrahim, I. H. (2014). Purification and characterization of α -Amylase from Miswak *Salvadora persica*. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1.
- 29 Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical biochemistry*, 351(1), 146-148.
- 30 Akabori, S., Ikenaka, T., & Hagihara, B. (1954). Isolation of crystalline Taka-amylase A from "Takadiastase sankyo". *The Journal of Biochemistry*, 41(5), 577-582.
- 31 Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *The journal of Biochemistry*, 41(5), 583-603.

- 32 Sahnoun, M., Bejar, S., Sayari, A., Triki, M. A., Kriaa, M., & Kammoun, R. (2012), Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2, *Process Biochemistry*, 47(1), 18-25.
- 33 Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005), Partial purification and characterization of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent-brewing grains, *Indian Journal of Biotechnology*, 4(1), 336-341.
- 34 Kundu, A. K., & Das, S. (1970), Production of α -amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 19(4), 598-603.
- 35 Windish, W. W., & Mhatre, N. S. (1965). Microbial amylases. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 7, pp. 273-304). Academic Press.
- 36 Huanca, S.(2017) Determinación de la relación entre Estructura y Rendimiento de jarabe de Glucosa a partir de almidón extraído de diferentes tubérculos del departamento de la paz, Tesis. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia.
- 37 Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology*, 28(3), 718-726.
- 38 Huanca López, S., Espinal, C., & Mollinedo, P. (2015). Evaluación de la calidad de jarabe de glucosa producido por hidrólisis enzimática a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta*). *Revista Boliviana de Química*, 32(2), 24-29.
- 39 Estrada Toscano, M. F. (2017). Parámetros operativos para la obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón de "Oca"(*Oxalis tuberosa*. M.) con enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa. UNSCH–Ayacucho.
- 40 Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental* (No. 543.4/. 5). McGraw-Hill Interamericana de España.

ANEXO

Muestra	Sólidos totales	D.E.
Almidón de Papa negra	22,5	0,1
Almidón de Chuño	21,3	0,1
Almidón de Tunta	21,9	0,1
Almidón de Papalisa	21,7	0,1
Almidón de Chuño de papalisa	22,0	0,1
Almidón de Isaño negro	21,7	0,1
Almidón de Papa Negra	22,5	0,1
Almidón de Yuca	13,6	0,1
Almidón de Isaño	27,2	0,1

Tabla 11 Tabla de sólidos totales para el cálculo del DE de la tabla 9

Muestra	Sólidos totales	D.E.
Yuca 1	22,4	0,1
Yuca 2	22,8	0,1
Yuca 3	21,4	0,1
Yuca 4	22,1	0,1
Yuca 5	21,9	0,1
Yuca 6	22,8	0,1
Yuca 7	22,7	0,1

Tabla 12 Tabla de sólidos totales para el cálculo del DE de la tabla 10