

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
EN INDUSTRIA ALIMENTARIAS



**“Optimización de calidad y propiedades funcionales de la  
glucosa obtenida a partir de almidón de quinua  
(*Chenopodium quinoa Willd.*) Vía hidrólisis enzimática”**

Tesis para optar el Título Profesional de:

**INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTADO POR:**

**Wendy Odilia TORRES SULCA**

**Ayacucho – Perú**

**2017**

## **DEDICATORIAS**

A Dios en primer lugar por haberme permitido el milagro de la vida, por ser mi fuerza, verdad y voluntad; por dejarme llegar hasta este día dándome todo lo bueno.

Dedico este trabajo a mis queridos padres Nilo Torres Huamani y Odilia Sulca Berrocal; por haberme dado su apoyo incondicional para la culminación de mi carrera profesional y el apoyo ante tiempo difíciles, por su entrega, que me enseñaron a vivir sin arrepentimientos; cada día mi vida, con honradez y disciplina.

A mi tío Julián Sulca Berrocal que en paz descansa por ser quien, me apoyo en los momentos de más flaqueza y siendo un ejemplo de persona para mi desarrollo personal y social.

## **AGRADECIMIENTO**

Me es grato expresar este sincero agradecimiento a mi alma mater la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, gestora de conocimientos de la ciencia y la cultura en sus diversas manifestaciones y de mi estudio profesional. A la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias y a todos los docentes por su aporte en mi formación profesional.

A mi asesor Ingeniero Alberto Luis Huamani Huamani, asesor de la presente tesis por su apoyo y orientación en la realización y culminación de mi presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	pagina
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Definición del Problema	3
1.2 Antecedentes	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
<b>II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
2.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALMIDÓN	6
2.1.1 Gelatinización	10
2.1.2 Hidrólisis de almidones	13
2.2 <b>ENZIMAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN</b>	16
2.2.1 Amilasas	16
2.2.2 Glucoamilasas	19
2.3 <b>JARABES DE GLUCOSA</b>	20
2.3.1 Color de jarabe	21

2.3.2	Usos en la industria alimentaria	22
2.4	<b>OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS</b>	25
2.4.1	Optimización de múltiples respuestas por el método de la función de conveniencia	26
2.4.2	Funciones de conveniencia	27
2.4.3	Función de conveniencia global	29
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
3.1	LUGAR DE TRABAJO	31
3.2	MATERIALES	31
3.2.1	Materia prima	31
3.2.2	Enzimas	32
3.2.3	Materiales de laboratorio	32
3.2.4	Reactivos	33
3.2.5	Equipos	34
3.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	35
3.3.1	Determinación de humedad	35
3.3.2	Determinación de la proteína	35
3.3.3	Determinación de grasa	36
3.3.4	Determinación de fibra	36
3.3.5	Determinación de ceniza	36

<b>3.3.6</b>	Determinación de carbohidratos	36
<b>3.3.7</b>	Determinación de azúcares reductores por el método del DNS (tema, 2008)	36
<b>3.4</b>	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	37
<b>3.5</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	41
<b>3.5.1</b>	Diseño experimental para la optimización de variables de proceso en función de variables respuestas múltiples	41
<b>3.5.2</b>	Procedimiento para la obtención de datos experimentales	44
<b>3.5.3</b>	Clarificado	52
<b>3.5.4</b>	Concentrado	52
<b>3.5.5</b>	Procedimiento para el proceso de optimización de datos experimentales	53
<b>3.6</b>	<b>EVALUACIÓN DE CALIDAD DEL JARABE DE GLUCOSA</b>	56
<b>3.6.1</b>	Estabilidad de color del jarabe	56
<b>3.6.2</b>	Densidad	58
<b>3.6.3</b>	Humedad y sólidos solubles totales	58
<b>3.7</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA PROPIEDAD FUNCIONAL DEL JARABE DE GLUCOSA</b>	58
<b>3.7.1</b>	pH	58
<b>3.7.2</b>	Sólidos solubles (°brix)	58
<b>3.8</b>	<b>VALIDACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO OPTIMIZADO</b>	59

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE LA HARINA Y ALMIDÓN DE QUINUA</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE HIDROLISIS EN FUNCIÓN DE RESPUESTAS MÚLTIPLES.</b>	<b>62</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Hidrolisis (%)</b>	<b>62</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Calidad del jarabe</b>	<b>64</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Propiedades funcionales del jarabe</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS</b>	<b>70</b>
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	
<b>V.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>N°</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>2.1</b>	(a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa; (b) estructura química de la amilopectina)	8
<b>2.2</b>	Hidrólisis de carbohidratos	13
<b>3.1</b>	Flujo para la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón	40
<b>3.2</b>	Flujo del procesamiento para la obtención del almidón de quinua a nivel de laboratorio	46
<b>3.3</b>	Diferentes cantidades de almidón, para las soluciones de acuerdo al diseño de la Tabla 3.2	47
<b>3.4</b>	Soluciones de almidón regulándose el pH de 4,6	47
<b>3.5</b>	Dosificación de concentraciones de enzimas de acuerdo al diseño de la Tabla 3.2	48
<b>3.6</b>	Proceso de hidrolisis	49
<b>3.7</b>	suspensión en el jarabe bruto obtenido y el sedimento es el almidón no hidrolizado	49
<b>3.8</b>	Jarabe de glucosa obtenido vía hidrolisis enzimática listo para clarificar	50
<b>3.9</b>	Jarabe de glucosa clarificado y concentrado a 70 °Brix aproximadamente.	50
<b>3.10</b>	Diagrama de bloques del algoritmo completo de optimización de hidrolisis.	54
<b>3.11</b>	Adecuación para medición de estabilidad de color	57



<b>3.12</b>	Medición de estabilidad de color	57
<b>4.1</b>	Optimización de hidrolisis	61
<b>4.2</b>	Optimización de estabilidad de color de jarabe de glucosa	65
<b>4.3</b>	Optimización de propiedad funcional	67
<b>4.4</b>	Gráficos de superficie de la función de conveniencia individual y total y contornos de la optimización-DO de hidrolisis. Izquierda: conveniencia individual para el hidrolisis, pérdida de calidad (color) y solidos solubles (°Brix). Derecha: conveniencia total.	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>N°</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pagina</b>
<b>2.1</b>	Propiedades de las macromoléculas del almidón amilosa y amilopectina	6
<b>2.2</b>	Clasificación subjetiva de la densidad óptica de los jarabes	23
<b>3.1</b>	Variables independientes de evaluación y sus niveles mínimos y máximos	42
<b>3.2</b>	Valores máximos y mínimos de las variables independientes en su forma real.	43
<b>4.1</b>	Características del almidón de quinua	61
<b>4.2</b>	Análisis de la varianza de los modelos predictivos polinómicos para las respuestas durante el hidrolisis enzimática de almidón de quinua	68
<b>4.3</b>	Propiedades del jarabe de glucosa	69
<b>4.4</b>	Condiciones óptimas de operación para el hidrolisis de almidón de quinua.	73

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar de las variables de proceso de hidrólisis enzimática del almidón de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) en la obtención de jarabe de glucosa, a través del uso de variables múltiples de respuesta (Maximización de % hidrolisis, Minimización de pérdida de Calidad y maximización de propiedad funcional), por ser un tema aún no estudiado. La metodología experimental fue obtener primero el almidón de quinua y luego realizar el hidrolisis enzimática, haciendo usos de las enzimas Alfa amilasa NATURALZYME HT-340L y glucoamilasa NATURALZYME GA-300L. Variables independientes: (Harina de quinua y como indicadores: Variables de proceso: relación Enzima/Almidón (0,013, 0,026 y 0,039 %), Concentración de almidón en solución (20, 40 y 60%), tiempo (horas)). Variable dependiente: (Jarabe de glucosa sus *indicadores*: Hidrolisis (%); Calidad del jarabe de glucosa: Estabilidad del color (DO); Propiedad funcional del jarabe de glucosa: Solidos solubles (°Brix)). Para la optimización de respuestas múltiples se usó la función de conveniencia elaborando el programa en el lenguaje Matlab. Obteniéndose como resultados y conclusiones: una hidrolisis optima del 64,5829%, y un jarabe con una estabilidad de cambio de color 0,0055 DO, y un 75,67 % de concentración del jarabe final; para conseguir un jarabe de esas características las variables de proceso óptimo fueron de solución de almidón (p/V) fue de 44% y relación de Enzima/almidón (p/p) de 0,0338%, como producto final semejante a los jarabes comerciales para la industria alimentaria.

## INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es un cultivo nativo de la región Andina. Estas zonas son consideradas como uno de los ocho centros de origen de las especies cultivadas de quinua. La mayoría de los investigadores coinciden en indicar que la quinua es originaria del altiplano que comparten Perú y Bolivia, ya que en dichas áreas se encuentra la mayor diversidad de plantas cultivadas y parientes silvestres (Gabriel *et al.*, 2012).

Los carbohidratos de la semilla de la quinua contienen entre 58 a 68% de almidón; se encuentran localizados en el perisperma en gránulos pequeños ( $2 \mu m$ ), siendo más pequeños que los granos comunes; son parcialmente cristalinos e insolubles en agua a temperatura ambiente; los tamaños y formas dependen de la fuente biológica; es altamente digerible (Matos & Sanchez, 2011). Arzapalo (2015) determinó el contenido de almidón de quinua a nivel de laboratorio, encontrando la variedad negra Collana con un 71,30%, seguido de la variedad roja Pasankalla con 68,79% y la de menor porcentaje 66,37% la variedad blanca Junín. Repo-Carrasco *et al.* (2001) manifiestan que la fracción de carbohidratos está constituida principalmente por almidón (50-60%), en forma de gránulos, cuyos componentes son la amilosa (20%) y la amilopectina (80%). Frente a la aplicación de extractos proteicos de quinua, otro de los componentes de la quinua que aún no estudiado es el almidón. Hasta el momento este tema aún no ha sido investigado. El principal componente de los granos de quínoa es el almidón (60% del

peso fresco del grano) y amilosa (11%). La estructura de la amilopectina del almidón de la quínoa es similar a la de los cereales, pero su elevado contenido hace que la pasta de quínoa sea más viscosa que la del trigo (Herencia, 1998). Una alternativa de desarrollo de la industria es el estudio de la transformación de insumos, como es el caso del desarrollo de obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón de quinua, para su uso en la industria alimentaria.

En el desarrollo de un producto un problema típico es encontrar un conjunto de condiciones o valores de las variables de entrada, que den como resultado el producto más conveniente en términos de sus características o respuestas en las variables de salida. El procedimiento para resolver este problema generalmente involucra dos pasos: (1) predecir las respuestas de las variables dependientes  $Y$ , ajustando las respuestas observadas usando una ecuación basada en los niveles de las variables independientes  $X$  y (2) buscar los niveles de las variables independientes  $X$  que simultáneamente producen los valores de las variables de respuestas predichas más convenientes (Winer, 1971).

Existen varios métodos de optimización para este tipo de problemas, entre ellos el procedimiento de superficie de respuesta extendido, el método de distancia generalizada, el método de regiones de confianza restringidas (Castillo, 1996 citado por Núñez de Villavicencio, 2002), el método de minimización de la suma de cuadrados de las desviaciones y el método de función de conveniencia, que será el que se describirá aquí (Anderson y Whitcomb, 1993). El método de la función de

conveniencia permite resolver problemas de la optimización experimental con múltiples respuestas (Núñez de Villavicencio, 2002).

## **1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

El desarrollo de jarabe de glucosa a partir de almidón de quinua, hasta el momento este tema aún no ha sido investigado. El desarrollar un producto de este pseudocereal es una opción para incrementar significativamente su explotación comercial, para su uso en la industria alimentaria.

## **1.2 ANTECEDENTES**

La elaboración de jarabes de glucosa a partir de almidón no es algo nuevo. Ya en 1833, se observó que el extracto de malta precipitado producía azúcar con el almidón de maíz (Hebeda y Teague; citado por Alexander y Zobel, 1992). Igualmente, en el siglo XIX, Kirchoff descubrió que el almidón de maíz calentado con ácido producía un licor líquido conteniendo glucosa (López-Munguía, 1993). Utilizar almidón de quinua en la elaboración de jarabe de glucosa es novedoso; Calixto y Arnao (2004) de la Universidad de Nacional Mayor de San Marcos realizó una modificación enzimática del almidón nativo de *Amaranthus caudatus* Lineo.

La hidrólisis enzimática de almidones ha tenido un desarrollo acelerado, ya que desde 1920 se han realizado numerosos ensayos y técnicas sobre ella. En 1945 se desarrollaron técnicas industriales novedosas que permitieron la obtención de un

producto de gran pureza, estudios en base a diferentes enzimas demostraron que el uso de maltasa, glucoamilasa, amilasas tiene gran extensión específica y selectiva para la obtención de glucosa (Soto, 1976 citado por Huanca *et al.*, 2015).

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Optimizar de las variables de proceso de hidrólisis enzimática del almidón de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) en la obtención de jarabe de glucosa, a través del uso de variables múltiples de respuesta (Maximización de % hidrolisis, Minimización de pérdida de Calidad y maximización de propiedad funcional).

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Optimización de Enzima/Almidón y Concentración de solución de almidón a usarse para maximizar el hidrolisis en la obtención del jarabe de glucosa.
2. Optimización de Enzima/Almidón y Concentración de solución de almidón a usarse para minimización de pérdida de calidad, como indicador de cambio de color (DO) del jarabe de glucosa obtenido del almidón quinua vía hidrolisis enzimática.

3. Optimización de Enzima/Almidón y Concentración de solución de almidón a usarse para la maximización de la propiedad funcional del jarabe de glucosa, obtenido del almidón quinua vía hidrolisis enzimática
  
4. Optimizar las variables de proceso (Enzima/Almidon, Concentración de solución de almidón) a través de múltiples respuestas como: maximización de la variable hidrolisis, minimización de pérdida de calidad y maximización de su propiedad funcional) en la obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón quinua vía hidrolisis enzimática.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALMIDÓN

Desde el punto de vista químico (Tabla 2.1), el almidón es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina (Badui, 2006).

Tabla 2.1: Propiedades de las macromoléculas del almidón amilosa y amilopectina

<b>Propiedades</b>	<b>Amilosa</b>	<b>Amilopectina</b>
Peso molecular	1-2 x 10 <sup>5</sup>	>2 X 10 <sup>7</sup>
Grado de polimerización	990	7200
Ligamentos glicosidicos	$\alpha$ - D (1- 4)	$\alpha$ - D (1- 6)
Estructura molecular	Básicamente lineal	Muy ramificada
Susceptible a la retrogradación	Alta	Baja
Afinidad con el yodo	20.1 g/100g	1.1 g/100g

Fuente: Badui (2006).

### a) **Amilosa**

Las ramificaciones de la amilosa ramificada pueden ser muy largas o muy cortas, pero los puntos de ramificación están separados por largas distancias, de manera que las propiedades físicas de las moléculas de amilosa son esencialmente las de las moléculas lineales. Las moléculas de amilosa tienen pesos moleculares de alrededor de  $10^6$  Dalton (Fennema, 2012). Producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha(1,4)$ , que establece largas cadenas lineales con 200 a 2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una  $\alpha$ -D-(1,4)-glucana, cuya unidad repetitiva es la  $\alpha$ -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Badui, 2006).

El acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosilo con enlaces (1 ~4) en las cadenas de amilosa da a las moléculas una forma de hélice o espiral con giro a la derecha, el interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa. Los dos almidones de maíz comúnmente conocidos como ricos en amilosa que existen comercialmente poseen contenidos aparentes de masa de alrededor del 52% y del 70-75% (Fennema, 2012).

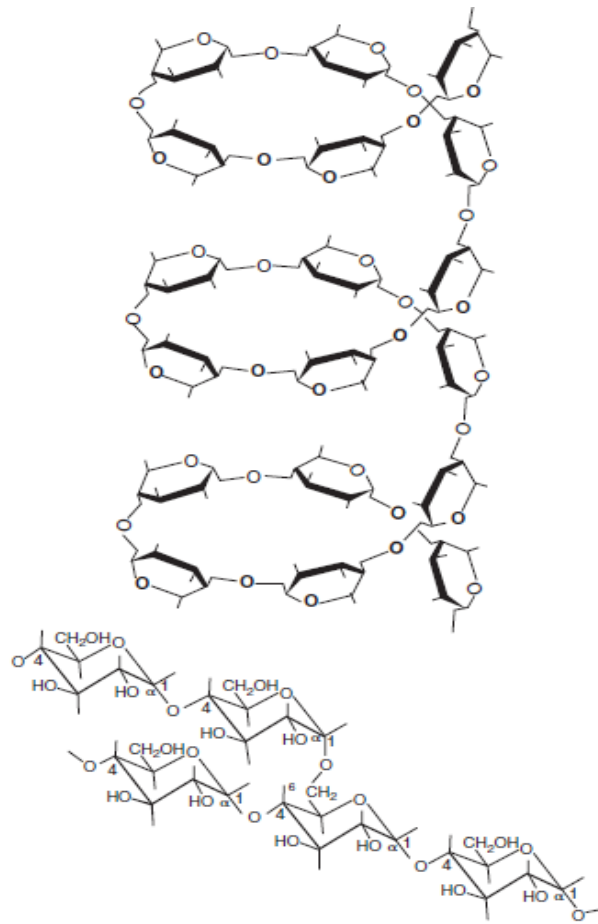


Figura 2.1: (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa; (b) estructura química de la amilopectina. ) Fuente: (Badui, 2006).

## b) Amilopectina

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto, ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones, aunque se han reportado pesos de entre

300,000 y 500,000 (Badui, 2006). La amilopectina es un polímero muy ramificado de residuos de  $\alpha$ -D-glucosa unidos por uniones  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4), con ramificaciones en  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6). El peso molecular de la amilopectina es considerablemente mayor que el de la amilosa, entre  $10^7$  y  $5 \times 10^8$  g/mol.

Las cadenas de amilopectina están dispuestas radialmente dentro del gránulo, con su extremo no reductor orientado hacia la superficie. En las moléculas de amilopectina, los puntos de ramificación están localizados en las regiones poco ordenadas, mientras que las sub-cadenas lineales están en la región de alto orden molecular. Estas sub-cadenas lineales pueden formar dobles hélices y empaquetarse en una estructura cristalina, siendo las responsables de los anillos resistentes a tratamientos con ácidos, álcalis o amilasas, mencionados anteriormente. La difracción de rayos X de amplio ángulo muestra que los gránulos de almidón presentan efectivamente estructura cristalina. Se han identificado tres estructuras cristalográficas diferentes, dependiendo de los ángulos de difracción causados por el empaquetamiento de las dobles hélices de las cadenas laterales de amilopectina: tipo A, característica de cereales; tipo B, característica de tubérculos, y tipo C, en legumbres. También se pueden observar estructuras tipo V cuando se forman complejos de amilosa con lípidos polares. Se puede plantear un modelo en el cual las zonas rígidas de amilopectina están en la capa semicristalina, y los espaciadores y puntos de ramificación de la amilopectina en los espacios de esta capa, mientras que la zona amorfa (anillos amorfos) contendría la amilosa, ya que se supone que la amilosa no estaría en su forma cristalina en el gránulo (Lupano, 2013).

El almidón de la quinua tiene una masa molar promedio de  $11,3 \times 10^6$  g / mol, que es comparable a la de amaranto ( $11,8 \times 10^6$  g / mol) de almidón, más alta que la de trigo almidón ( $5,5 \times 10^6$  g / mol), pero inferior a la de almidón de maíz ceroso ( $17,4 \times 10^6$  g / mol). El almidón es muy ramificado, con un mínimo grado de polimerización (DP) glucano de 4,600 unidades, un máximo de 161,000 DP y una media ponderada de DP 70,000 citado por (Praznik *et al.* 1999). Tang *et al.* (2002) informó de un DP glucano de 6,700 unidades fracción de amilopectina de la fécula de la quinua.

### **2.1.1 Gelatinización**

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, debido a que su estructura está altamente organizada y a que presenta una gran estabilidad por las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos constituyentes; sin embargo, cuando se calientan empieza un proceso lento de absorción de agua en las zonas intermicelares amorfas, que son las menos organizadas y las más accesibles, ya que los puentes de hidrógeno no son tan numerosos ni rígidos como en las áreas cristalinas. A medida que se incrementa la temperatura, se retiene más agua y el gránulo empieza a hincharse y a aumentar de volumen, fenómeno que puede observarse en el microscopio, sin que se presente un aumento importante en la viscosidad; una vez que la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina inicia un proceso semejante, pero para esto se requiere más energía. Al llegar a ciertas temperaturas normalmente cercanas a  $65^{\circ}\text{C}$ , aunque dependen de cada tipo de almidón, el gránulo alcanza su volumen máximo y pierde tanto su patrón de difracción de rayos X como la propiedad de birrefringencia;

si se administra más calor, el gránulo hinchado, incapacitado para retener el líquido, se rompe parcialmente y la amilosa y la amilopectina, fuertemente hidratadas, se dispersan en el seno de la disolución. En este punto se pierden la estructura original y la birrefringencia del gránulo; esto va aunado a un aumento de la viscosidad. Aproximadamente 30% de la amilosa se encuentra en solución. A todo este proceso se le llama gelatinización, y es una transición de un estado ordenado a otro desordenado en el que se absorbe calor (Badui, 2006).

Los gránulos de almidón no dañados son insolubles en agua fría, pero pueden embeber agua de manera reversible; es decir, pueden hincharse ligeramente con el agua y volver luego al tamaño original al secarse. Sin embargo, cuando se calientan en agua, los gránulos de almidón sufren el proceso denominado gelatinización. La gelatinización es la disrupción de la ordenación de las moléculas en los gránulos. Evidencias de la pérdida de orden son: el hinchamiento irreversible del gránulo, la pérdida de la birrefringencia y la pérdida de la cristalinidad. Durante la gelatinización se produce la lixiviación de la amilosa, pero también puede producirse antes de la gelatinización. La gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan. La temperatura inicial aparente de gelatinización y el intervalo dentro del cual tiene lugar dependen del método de medida y de la relación almidón-agua, del tipo de gránulo, así como de las heterogeneidades en la población de gránulos. Los diversos estados de la gelatinización pueden ser determinados utilizando un microscopio de polarización equipado con un sistema de calentamiento. Estos estados son: la

temperatura de iniciación (primera observación de la pérdida de birrefringencia), la temperatura media, la temperatura final de la pérdida de birrefringencia (TFPB, es la temperatura a la cual el último gránulo en el campo de observación pierde su birrefringencia), y el intervalo de temperatura de gelatinización (Fennema, 2012).

La birrefringencia es un fenómeno que ocurre cuando la luz polarizada atraviesa una estructura altamente ordenada, tal como un cristal. Estos cambios se observan luego de que el granulo de almidón al contacto con el agua fría se hidrata; al aplicarle calor el granulo comienza a hincharse hasta que, en cierta temperatura, la estructura del grano se altera, perdiendo su birrefringencia (Torres, 2007).

Lupano, 2013 menciona, hay estudios que sugieren que el agua se absorbe primero en la zona amorfa del gránulo. Al hincharse la zona amorfa, se genera un estrés en la zona cristalina de la amilopectina, se disocian las dobles hélices y la integridad del gránulo se rompe. Esto ocurre con un exceso de agua, y se observa como un pico simple, a una temperatura de alrededor de 65°C, dependiendo del almidón, por calorimetría diferencial de barrido.

Por lo tanto, la ruptura de la estructura granular, el hinchamiento y la hidratación, y la solubilización de las moléculas de almidón, en conjunto, constituyen la “gelatinización”, proceso endotérmico que ocurre por encima de 55-70°C, más específicamente, la temperatura de gelatinización en el maíz oscila en el rango de 62 a 74°C. Si se prolonga el tratamiento hidrotérmico, puede surgir una ruptura de los

gránulos, hidrólisis parcial y disolución más o menos completa de las moléculas constituyentes, lo que origina una disminución en la viscosidad (Cheftel, 1999; Bello-Pérez *et. al*, 2006).

### 2.1.2 Hidrólisis de almidones

Industrialmente la hidrólisis se realiza por métodos enzimáticos o con soluciones de ácidos, como el ácido clorhídrico y sulfúrico y se aplica calor para facilitar el rompimiento de los enlaces glucosídicos; Figura 2.2, (Torres, 2007).

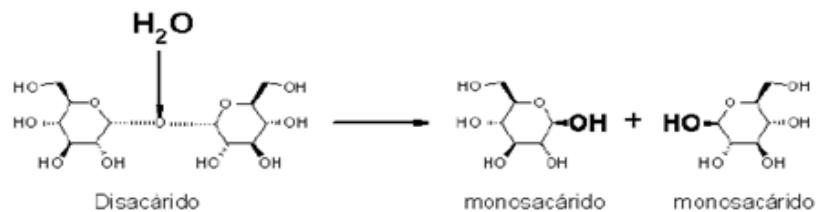


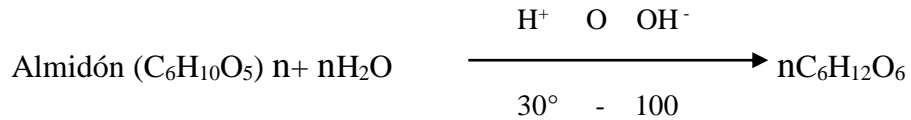
Figura 2.2: Hidrólisis de carbohidratos

#### a) Hidrólisis ácida o básica.

En estos casos se usan HCl,  $H_2SO_4$  o KOH dependiendo si la hidrólisis es ácida o básica, respectivamente. Estos procesos son llevados a cabo a presiones que varían entre 1 a 1,5 atm y temperaturas entre 30 y 100 °C, estas condiciones de operación varían dependiendo de la naturaleza de la materia prima que se quiera hidrolizar, debido



a los requerimientos energéticos y al tipo especial de materia de construcción de autoclave empleadas para la hidrólisis acida o básica, estos procesos en la actualidad están quedando en desuso por su elevado costo de producción.



Fluidización (o hidrólisis) por ácidos, los almidones llamados fluidizados se logran calentando una suspensión al 40% a menores de 55°C en presencia de HCl o de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N durante un tiempo que puede variar entre 10 y 20 horas para lograr la viscosidad deseada. Como no se alcanza la temperatura de gelatinización, el ácido sólo hidroliza las regiones amorfas del gránulo y muy poco o nada las cristalinas, por lo que la amilopectina es la más afectada; después se neutraliza con NaOH, se filtra, se lava y se seca. Este tipo de almidones forma pastas que, en caliente, tienen poca viscosidad, y sus geles son débiles; se usan en la industria de caramelos cuando se desea lograr textura gomosa (Badui, 2006).

#### **b) Hidrólisis enzimática**

En estos casos se utiliza enzimas provenientes de diversas fuentes (vegetales, animales o microbiana). La industria de la producción de enzimas a partir de los

microorganismos es muy importante y se halla en pleno desarrollo, manteniéndose en secreto en número considerable de detalles. La mayor parte de las enzimas que se utilizan son impuras, porque su purificación es difícil y costosa además porque una purificación excesiva reduce su eficiencia y en general, los preparados que se emplean contienen principalmente la enzima deseada. La mayor parte de las enzimas preparadas a escala industrial son enzimas hidrolíticas.

Las amilasas que hidrolizan los almidones se dividen en varios tipos según su modo de actuar sobre las moléculas de almidón, el almidón está compuesto por dos tipos de glucosas: la amilasa lineal que contiene unidades de D-glucosa unidas por enlace alfa-1,4 y la amilopectina ramificada, que contiene además enlaces 1,6 en los puntos de ramificación, entre las amilasas se encuentran la fosforilasa, que pueden degradar completamente la amilasa, pero solo parcialmente la amilopectina, dejando dextrina límite; isoamilasa que suprime las ramas de la amilopectina para romper los enlaces 1,6 glucosídicos, alfa-amilasa, que hidrolizan sin un orden determinado los enlaces 1,6 glucosídicos; la beta amilasa, que rompe únicamente el segundo enlace 1,4 glucosídico del extremo no reductor de las cadena, desprendiendo una molécula de maltosa cada vez y dejando por último dextrinas límite; y la amilo-glucosidasa, que hidrolizan tanto los enlaces 1,6 como las 1,4 glucosídicos produciendo glucosa sin dextrina intermedias y maltosa.

La maltasa o alfa – glucosidasa (que no es una amilasa) hidrolisa la maltosa o glucosa. Gran parte de la amilasa que se emplea en la industria, procede de los granos de la malta, que contienen amilasa a partir de hongos o bacterias o una mezcla de ellas. Los mohos se utilizan como fuente de amilasas y otras enzimas hidrolíticas, seleccionándose para cada caso la especie y sepa de moho apropiado, (Taquiri, 2002).

## **2.2 ENZIMAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN**

### **2.2.1 Amilasas**

Son enzimas que hidrolizan el almidón dos de ellas han sido estudiadas con un gran detalle,  $\alpha$ - y  $\beta$ - amilasa, una endo-enzima hidroliza los enlaces 1,4 glucano, aparentemente al azar. El ataque al azar de la  $\alpha$ -amilasa sobre la amilosa en disolución da lugar a un rápido descenso en viscosidad y en una capacidad de producir un complejo coloreado en el iodo, así como un aumento en el poder reductor por la aparición de grupos reductores. Dado que basta romper unos pocos enlaces glucano internos para provocar un gran descenso en la viscosidad, los efectos sobre estas son proporcionalmente mayores que el aumento en capacidad reductora (Fennema, 1993).

#### **a) $\alpha$ -amilasa:**

Ataca a la amilopectina de un modo similar, sin embargo, los puntos de ramificación  $\alpha$ -1,6 no son hidrolizados, por lo que se forma una pequeña cantidad de panosa, el

trisacárido que contiene estos enlaces  $\alpha$ -1,6. Esta amilasa suele ser denominada enzima licuante, debido a su rápida acción de reducir la viscosidad de las disoluciones de almidón, el tratamiento de la amilosa o amilopectina con  $\alpha$ -amilasa da como resultado una mezcla de maltosa, glucosa y también una cierta cantidad de panosa si la reacción continua durante un largo periodo (Fennema, 1993).

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima específico que actúa únicamente sobre los enlaces 1:4 separando moléculas largas de oligosacaridos a partir del almidón, en la industria estas mezclas obtenidas por hidrólisis enzimática o acida, se denominan dextrinas o jarabes de almidón (Braverman, 1980).

#### **b) $\beta$ -Amilasa**

Es una exoenzima, es decir, ataca solo a la unidad final de las cadenas de almidón. Más específicamente, retira unidades de maltosa del extremo no reductor de la cadena de almidón hidrolizando enlaces glicosidicos alternos, como la maltosa incrementa el sabor dulce de la disolución de almidón, la  $\beta$ -amilasa se denomina también enzima sacarificante. El termino  $\beta$ -en la  $\beta$ -amilasa hace referencia a la inversión del enlace  $\alpha$ -1,4 del almidón de la configuración  $\beta$ . No ataca los enlaces 1,3 que aparecen ocasionalmente en la amilosa ni los 1,6 de la amilopectina, lo que da lugar a la degradación del almidón sea incompleta. Si se encuentra presente una enzima capaz de romper las ramificaciones, la actividad de la  $\beta$ -amilasa continuara con la amilopectina, la actividad de esta enzima se detiene dos o tres unidades de glucosa antes del punto de

ramificación, denominándose a las moléculas resultantes. Se sabe que la  $\beta$ -amilasa existe solo en los tejidos vegetales.

Las amilasas son importantes en la maduración de la fruta, en la producción de jarabes y azúcar de maíz, en la industria cervecera y en la fabricación de panificación general, la hidrólisis de almidones por estas enzimas puede:

- a. Proporcionar azúcares para la posterior fermentación y utilización por microorganismos.
- b. Proporcionar azúcares reductores que participan en el pardeamiento no enzimático.
- c. Altera textura, la palatabilidad, la jugosidad y el dulzor de los alimentos afectados.

Las amilasas endógenas de la malta de cebada y del trigo juegan un papel crucial en la elaboración de cerveza y en la panificación, con frecuencia actuando en conjunción de otras carbohidrasas endógenas y exógenas (Fennema, 1993).

La  $\beta$ -amilasa ataca a las moléculas de amilosa en su extremidad no reductora separando moléculas de de maltosa en las posiciones 1:4 y continuando de esta forma hasta que llegue al punto de ramificación del enlace 1:6 en donde su actividad se detiene, las moléculas de maltosa originadas de esta forma por la acción de la amilosa son atacadas por la enzima maltosa ( $\alpha$ -glucosidasa) y convertidas en moléculas sencillas de

glucosa. Lo que antecede nos muestra la especificidad absoluta de estos enzimas (Braverman, 1980)

### **2.2.2 Glucoamilasas**

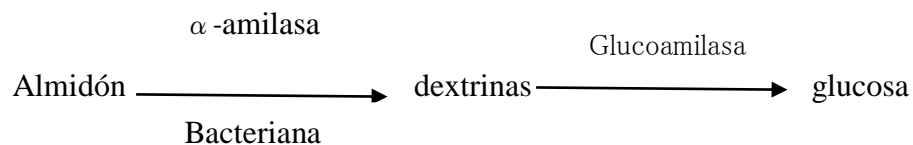
La  $\alpha$ -amiloglucosidasa, que actúa únicamente en las dextrinas límite que se quedan después de la degradación de la amilopectina por la fosforilasa siendo en este caso la glucosa la única sustancia que se separa. Tratando varias muestras de amilopectina con fosforilasa y  $\alpha$ -amiloglucosidasa simultáneamente fue posible determinar en la mezcla de la reacción glucosa-1-fosfato y glucosa libre admitiendo que cada molécula se origina a partir de un punto de ramificación y que cada molécula de glucosa-1-fosfato procede de la cadena amilosa, la relación de ambas cantidades sería el número de unidades ramificadas de la molécula de amilopectina que equivale a la fracción de los grupos terminales. Ellos constituirían la medida del grado de ramificación de la amilopectina. (Braverman, 1980).

### 2.3 JARABES DE GLUCOSA

Los jarabes de D-glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D - glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas (Sanchez, 2002). En la industria se consideran jarabes glucosados a hidrolizados a partir de una dextrina equivalente (DE) de 20 un jarabe que presenta un poder reductor similar al de una solución con 20% de glucosa (García *et al.*, 1993).

Jarabe de glucosa es la solución acuosa concentrada y purificada de sacáridos nutritivos con dextrina equivalente (DE) de 20 a más obtenidos por hidrólisis de almidón, debido a que han utilizado como materia prima, casi exclusivamente el almidón de maíz es que los jarabes se conocen como jarabes de maíz. Se caracterizan en 4 tipos: Jarabes de tipo I con D.E. de 20-38; Jarabes de tipo II con D.E. de 38-58; Jarabes de tipo III con D.E de 58-73; Jarabes de tipo IV con D.E de superiores a 73 (Whistler, 1984).

Siendo la dextrina equivalente un índice de los azúcares reductores totales calculados como D- glucosa. La glucosa se produce fundamentalmente por la hidrólisis enzimática del almidón de acuerdo con la reacción:



Tradicionalmente los jarabes de glucosa se producían por hidrólisis acida, pero por este método no era posible alcanzar equivalentes de dextrosa superiores a 55 sin que aparecieran sabores desagradables. La  $\alpha$ -amilasa y la glucoamilasa (amiloglucosidasa) son probablemente las enzimas más usadas en la industria del almidón, siendo además relativamente baratos.

La dextrosa equivalente (DE) es un índice de los azúcares reductores totales, calculados como D-glucosa en base a peso seco. El valor de la DE está relacionado inversamente en base de grado de polimerización. Un almidón no hidrolizado tiene una DE de la glucosa anhidra está definida como 100 (Whistler, 1984).

### **2.3.1 Color de jarabe**

El color de los jarabes de glucosa recién obtenidos, se asemeja al color del agua pura. Sin embargo, esta propiedad cambia debido a que se tiene la presencia de proteínas o restos de aminoácidos, que reaccionan con los azúcares reductores del jarabe (Pancoast y Junk, 1980). El color de los jarabes usualmente se reporta en unidades de densidad óptica (DO). No obstante, se ha establecido una clasificación subjetiva la cual relaciona las DO con una escala de color (Tabla 2.2).



### **2.3.2 Usos en la industria alimentaria**

Industrialmente se dispone de numerosos jarabes de sacarosa invertida parcial o del todo que poseen por lo tanto diferentes grados de dulzura. Tales jarabes se venden comercialmente bajo el nombre de azúcares líquidos y pueden elaborarse con un alto contenido de sólidos dado que la fructuosa es muy soluble y la glucosa no cristaliza con facilidad. Empleo de los azúcares en la industria alimentarias. Con sus 2000 o más tipos de distintos productos, la industria confitera pastelera exige cuidadosamente los edulcorantes que utiliza, a continuación, se señalan algunas de sus características a continuación: Dulzor relativo de los diferentes azúcares; Grado de solubilidad y de cristalización; Peso específico o densidad de los jarabes; Contenido acuoso de los azúcares secos; Hidroscopicidad; Aroma específico; Cualidades conservadoras y tendencia a la fermentación; Peso molecular; Presión osmótica; Punto de congelación; Tendencia al empardeamiento.

Las propiedades físicas del producto final dependen mucho de la adecuada elección del azúcar a utilizar. Por ejemplo, si se emplea sacarosa es importantísimo conocer las posibilidades de inversión en el producto final. La calidad de los jarabes elaborados por hidrólisis del almidón y de otros polisacáridos naturales depende mucho de la estructura de dichos polisacáridos, es decir, de si son de cadena lineal o ramificada, del tamaño de sus moléculas, etc. Todas estas propiedades suponen nuevas posibilidades para los fabricantes, y los materiales edulcorantes modernos están elaborados para entender instrucciones precisas de la industria (Braverman, 1980).

Tabla 2.2: Clasificación subjetiva de la densidad óptica de los jarabes.

<b>Densidad óptica (DO)</b>	<b>Color visual</b>
0,025	Agua
0,035	Paja muy ligero
0,5	Paja ligero
0,6	Paja
0,075	Paja amarillo muy ligero
0,1	Amarillo medio ligero
0,125	Amarillo ligero
0,15	Amarillo
0,2	Amarillo fuerte

Fuente: Guzmán-Maldonado-Maldonado, 1992.

Los jarabes se usan desde hace mucho tiempo y antes de descubrirse el azúcar, se preparaban con miel. Los líquidos que habitualmente integran el jarabe son el agua destilada, soluciones extractivas, zumos, y otros, Lachman & Lieberman (1986). Apiario los Cítricos (2010) recomienda tener cuidado en el proceso de hidrólisis y con la fermentación, así como también la degradación de los jarabes; ya que a mayor temperatura mayor la producción de la molécula conocida como HMF (Hidroxi Metil Furfural) que es un aldehído y un furano formado durante la descomposición térmica de los glúcidos.

Rodríguez (2011); Armenta (2004), Gerena (2013), Revista I Alimentos (2010) describen al jarabe de glucosa como uno de los productos más utilizados por la industria de confitería y de alimentos procesados tales como:

- ✓ En el caso de los helados, el jarabe de glucosa aporta textura, brillo y disminuye la temperatura de congelación.
- ✓ En confitería, es utilizado como anticristalizante del azúcar, regulador del dulzor, generador de brillo, etc.
- ✓ En las carnes procesadas, incrementa el pardeamiento de la carne durante la cocción.
- ✓ El jarabe de glucosa se encuentra importante para la industria, ya que tiene aplicaciones en procesos de producción de etanol.
- ✓ En la elaboración de cerveza, en la industria de alimentos (repostería, confitería, etc.)
- ✓ También impide la cristalización de la sacarosa y otros azúcares, tiene la capacidad de bajar el punto de congelación de algunas soluciones, obtiene buena higroscopicidad.
- ✓ También controla la coloración morena de los azúcares reductores en la superficie durante la cocción.

Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero; la dextrosa o glucosa tiene un poder edulcorante mucho menor que el azúcar y una mayor presión osmótica en solución, por lo que es muy usado como carga

depresora de la actividad de agua. Con salmueras equilibradas se pueden alcanzar concentraciones en producto terminado superiores al 3 % sin afectar negativamente al sabor del producto terminado. El principal inconveniente para la utilización de dextrosa, se presenta en países de clima cálido en que no se pueda asegurar una buena cadena de frío durante toda la vida comercial del producto. La dextrosa es un monosacárido de digestión directa por parte de muchos microorganismos, entre ellos los lactobacilos, por lo que acelera su crecimiento, especialmente si las condiciones de refrigeración no son adecuadas, acortando la conservación del producto, especialmente presentando problemas de acidez por ácido láctico (Llorenc, 2015).

#### **2.4 OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS**

En muchos problemas de optimización experimental, es inusual encontrar sólo una respuesta que necesite ser optimizada, en cambio, frecuentemente deben ser consideradas varias respuestas (Walter y col. 1999). El objetivo de la optimización es la selección, independientemente de la multiplicidad de soluciones potenciales, de la mejor solución con respecto a algún criterio bien definido. La elección de este criterio, el objetivo, es un paso esencial en un estudio (Beveridge y Schechter, 1970). Una función objetivo es aquella que expresa el objetivo en términos de los factores del sistema y/o respuestas. Las funciones objetivo basadas en estrategias económicas tienden a ser altamente complejas, mientras que las basadas en consideraciones técnicas y de calidad son comúnmente simples (Walters y col. 1999).

**Maximización del objetivo** ( $\uparrow$ ): encontrar condiciones bajo las cuales la variable respuesta sea tan grande como sea posible.

**Minimización del objetivo** ( $\downarrow$ ): encontrar condiciones bajo las cuales la variable respuesta sea tan pequeña como sea posible.

Para buscar los valores de los componentes que producen resultados con la mayor conveniencia global se plantean dos métodos. El primero emplea un procedimiento de optimización general de la función de conveniencia global para encontrar los valores óptimos de los componentes dentro del rango experimental específico. El segundo busca en cada combinación específica de valores de los componentes la combinación que produzca la conveniencia global óptima, en este caso la respuesta puede no ser única (Chitra, 1990).

#### **2.4.1 Optimización de múltiples respuestas por el método de la función de conveniencia**

Esta metodología consiste en la obtención de una función que convierte un problema de respuesta múltiple en un caso de respuesta única, esta herramienta es conocida como función de conveniencia simultánea (Martinez-Delfa y col., 2009). En este método cada valor de la respuesta, obtenido a partir de la utilización de las ecuaciones polinomiales, es convertido en un valor adimensional de la función de conveniencia *di*.

Estos valores varían entre 0 y 1, 0 correspondiendo a una respuesta inaceptable y 1 como óptimo, respectivamente.

En el desarrollo de un producto un problema típico es encontrar un conjunto de condiciones o valores de las variables de entrada, que den como resultado el producto más conveniente en términos de sus características o respuestas en las variables de salida. El procedimiento para resolver este problema generalmente involucra dos pasos: (1) predecir las respuestas de las variables dependientes  $y$ , ajustando las respuestas observadas usando una ecuación basada en los niveles de las variables independientes  $x$  y (2) buscar los niveles de las variables independientes  $x$  que simultáneamente producen los valores de las variables de respuestas predichas más convenientes (Winer, 1971).

#### **2.4.2 Funciones de conveniencia**

Lowe (1967) propone un procedimiento simple para formar funciones de conveniencia de respuestas múltiples. Si  $y_{jI}$  y  $y_{jD}$  son mediciones de los valores más indeseables (I) y más deseables (D) de una respuesta  $y_j$  respectivamente y si se asume que la conveniencia se incrementa linealmente de  $y_{jI}$  a  $y_{jD}$ , entonces la conveniencia de la respuesta se calcula como:

a) Si la respuesta debe ser maximizada,  $d_i$  se define como:

$$d_i = 0 \quad y_i < L_i \quad : \quad d_i = 1 \quad y_i > T_i \quad (2.1)$$

$$d_i = \left[ \frac{y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^{\theta_1} \quad L_i \leq y_i \leq T_i \quad (2.2)$$

b) Si la respuesta debe ser minimizada, la función de conveniencia individual ( $d_i$ ) se calcula de la siguiente manera:

$$d_i = 1 \quad y_i < L_i \quad y_i < T_i \quad : \quad d_i = 0 \quad y_i > U_i \quad (2.3)$$

$$d_i = \left[ \frac{U_i - y_i}{U_i - T_i} \right]^{\theta_2} \quad T_i \leq y_i \leq U_i \quad (2.4)$$

donde  $y_i$  es la respuesta predicha por el modelo polinomial,  $L_i$  y  $U_i$  representan los valores de  $y_i$  mínimos y máximos aceptables, respectivamente; y  $T_i$  es el valor objetivo correspondiente al valor máximo, mínimo o fijado dependiendo de las restricciones especificadas para cada respuesta. Los valores  $d_i$  son afectados por factores definidos por el usuario ( $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ) que ponderan la influencia del valor objetivo y de los límites mínimos y máximos.

### 2.4.3 Función de conveniencia global

Hay varias formas en las cuales se pueden combinar las conveniencias individuales, una de ellas podría ser la media aritmética. Sin embargo, en la realidad existe una premisa básica: si una característica es tan pobre que no es conveniente el uso del producto, tal producto no debe ser aceptado, sin tener en cuenta el resto de las características. La reacción del consumidor a un producto está basada en gran medida en las características menos deseables de tal producto debido a que son un foco de problemas potenciales (Harrington, 1965).

Con el fin de alcanzar los valores que representen las condiciones óptimas de procesamiento solo una función de conveniencia global (DT) es obtenida, la cual es calculada utilizando la media geométrica de las respuestas convertidas o adimensionales ( $d_i$ ):

$$DT = \left( d_1^{v_1} \cdot d_2^{v_2} \cdot \dots \cdot d_n^{v_n} \right)^{\frac{1}{\sum_{i=1}^n v_i}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i^{v_i} \right)^{\frac{1}{\sum_{i=1}^n v_i}} \quad (2.5)$$

donde  $v_i$  es la importancia relativa asignada a cada  $d_i$ . Además, puede ser observado que si alguna de las respuestas es inaceptable ( $d_i=0$ ), la función total se hace cero, lo cual da una mayor coherencia a la función de conveniencia obtenida. Un valor alto de DT indica las mejores combinaciones de factores, que es considerado como la solución



óptima del sistema. Los valores óptimos para cada factor son determinados a partir de los valores de las funciones de conveniencia individual que maximizan la función global DT (Corzo y col, 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE TRABAJO**

La investigación fue realizada en los laboratorios de: Análisis de alimentos de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Este trabajo se realizó en los meses de setiembre del 2015 a junio del 2016.

#### **3.2 MATERIALES**

##### **3.2.1 Materia prima**

Para el presente trabajo se utilizó la materia prima quinua (*Chenopodium quinoa*, Willd). Variedad blanca, adquirido del distrito de quinua provincia de huamanga,

departamento de Ayacucho, el cual fue lavado para desaponificar, secado y molido. Posteriormente se realizó la extracción del almidón, lavado y secado.

### **3.2.2 Enzimas**

Fueron usadas Alfa amilasa NATURALZYME HT-340L de *Bacillus licheniformis* con una actividad de 340000 MWU/mL y glucoamilasa NATURALZYME GA-300L derivada de una sepa seleccionada de *Aspergillus niger* con una actividad de 300 GAU/mL.

### **3.2.3 Materiales de Laboratorio**

- ✓ Crisoles de porcelana
- ✓ Espátulas
- ✓ Fiolas de 25, 50,100,250,500 y 1000 ml
- ✓ Kitasato de 500 y 1000 ml
- ✓ Luna de reloj
- ✓ Papel filtro wathman N° 2
- ✓ Pipetas de 0.1; 1.0; 5.0 y 10 ml
- ✓ Probetas de 50 y 100 ml
- ✓ Termómetro
- ✓ tubos de ensayo con tapa roscada
- ✓ vasos de precipitación de 50,100, 250 y 1000 ml

- ✓ Varilla
- ✓ Tubos de ensayo

### 3.2.4 Reactivos

- ✓ Hidróxido de sodio; (NaOH)
- ✓ Rojo de metilo
- ✓ Sulfato de cobre;  $\text{CuSO}_4$
- ✓ Sulfato de potasio;  $\text{K}_2\text{SO}_4$
- ✓ Acido sulfúrico;  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- ✓ 2,4 Dinitrofenol, DNF
- ✓ Fenol
- ✓ Hidróxido de sodio; (NaOH)
- ✓ Tartrato de sodio y potasio
- ✓ Glucosa
- ✓ Ácido Dinitrosalicílico; DNS
- ✓ Acido clorhídrico; HCL
- ✓ Hidróxido de sodio; NaOH
- ✓ Azul de metilo
- ✓ n-hexano  $\text{C}_6\text{H}_{14}$
- ✓ Ácido clorhídrico; HCl
- ✓ Hidróxido de sodio; NaOH

- ✓ Acido sulfúrico; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ✓ Etanol 96%

### 3.2.5 Equipos

- ✓ Balanza analítica, OHAUS, modelo AS200, serie 3526-USA.
- ✓ Centrifuga
- ✓ Cocina eléctrica
- ✓ Espectrofotómetro de UV visible, modelo Spectro Scan 50V, serie 05-1811-17CoV.
- ✓ Estufa eléctrica, marca TOMOS, modelo ODHG 9030B, serie 0510164  
1
- ✓ Horno de calcinación
- ✓ pH-metro digital
- ✓ Termómetro
- ✓ Refractómetro digital, marca ATAGO, serie A93217
- ✓ Refrigeradora de 218 L, marca MIRAY, modelo MI23, serie 01006908  
25.
- ✓ Secador de laboratorio (tipo túnel de aire caliente)

### **3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.3.1 Determinación de humedad**

Para la determinación de humedad se utilizó el Procedimiento (Método 925.10 de la A.O.A.C. (1998), Preparamos las muestras para el análisis por reducción de tamaño haciendo uso de un mortero. Asegurarse que las muestras no se descompongan a temperaturas mayores de 100°C.

#### **3.3.2 Determinación de la proteína**

Se utilizó el procedimiento de análisis (Método Kjeldahl recomendado por la A.O.A.C.), determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (Aurand *et al.*, 1987).

#### **3.3.3 Determinación de grasa**

En caso de los lípidos se utilizó el método de Extracción por solventes en caliente Soxhlet método de la A.O.A.C. (1998) En este método es necesario usar muestras deshidratadas, usar las muestras usadas en determinación de humedad.

### **3.3.4 Determinación de fibra**

Se utilizó el procedimiento para fibra bruta (Método de la A.O.A.C.1998).

### **3.3.5 Determinación de ceniza**

Para la determinación de Cenizas en seco: (para la mayoría de las muestras de alimentos) son los residuos inorgánicos de los alimentos método de la A.O.A.C. (1998).

### **3.3.6 Determinación de carbohidratos**

Por el método por diferencia de cálculo matemático A.O.A.C., Pearson (1998)

### **3.3.7 Determinación de azúcares reductores por el método del DNS (Tema, 2008)**

Para la determinación de los azúcares reductores se utilizó una concentración de glucosa de (1mg/mL), se realizaron diluciones seriadas en agua (Genecor) o Buffer de trabajo (Novozymes) de 0,1; a 1,0 mg/mL. Se determinó la concentración de glucosa en función de la concentración de azúcares reductores por el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se preparó una relación 1:1, (muestra: reactivo), se calentó en baño termostataado a 93°C aprox., por 5 minutos, se detuvo la reacción por

choque térmico, se adicionó 10mL de agua destilada y se leyó a 540nm en un espectrofotómetro Genesys 20.

### **3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Para el hidrolisis del almidón por el método enzimático en la obtención de jarabe de glucosa, las variables intervinientes como podemos observar en la Figura 3.1 muestran: la Temperatura de proceso, pH de la solución, las enzimas, el tipo de almidón, concentración del almidón en la solución, el tiempo de hidrolisis.

Tenemos el flujo para la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón a nivel de laboratorio. El jarabe de glucosa a partir del almidón de quinua se elaboró mediante los procedimientos continuos que se mencionan a continuación:

**a) MATERIA PRIMA:** Obtenido el almidón de quinua en el procedimiento del diagrama de flujo 1 ya mencionado se utilizó para la obtención del jarabe de glucosa.

**b) DISPERSIÓN:** En esta operación se hizo a nivel de laboratorio se utilizó en entre procedimiento vasos precipitados de 500 ml, trabajando a una temperatura ambiente, agregando agua de acuerdo al volumen necesitado, posteriormente se lleva a un pH de 7.3 con una solución de NaOH A 1N.



- c) **PRE-COCCION:** En esta operación se lleva a calentamiento a una temperatura de 80°C por un determinado tiempo de 10 minutos, teniendo una agitación constante.
- d) **DEXTRINIZACIÓN:** En esta operación se baja la temperatura de la operación anterior a 70°C y posteriormente se hace agregar la enzima de acuerdo al volumen necesitado para la muestra, dejando a una temperatura de 12 horas.
- e) **INACTIVACIÓN:** En esta operación se baja a una temperatura baja de 10 °C haciendo un choque térmico así se inactiva la enzima en este caso la  $\alpha$ -amilasa.
- f) **CENTRIFUGACIÓN:** En esta operación se lleva a un pH de 2 con solución de HCl a 1N para poder separar el almidón no hidrolizado de la suspensión obtenida.
- g) **SUSPENSIÓN:** Teniendo la suspensión de la operación anterior esta se lleva a un pH de 4.5 con solución de NaOH a 1N.
- h) **SACARIFICACIÓN:** Para esta operación se lleva a una temperatura de 60°C, se adiciona la enzima glucoamilasa a un tiempo controlado de 15, 30 y 45 horas.
- i) **INACTIVACION:** En esta operación se baja a una temperatura baja de 10 °C haciendo un choque térmico así se inactiva la enzima en este caso la glucoamilasa.

**j) EVAPORACION:** En este proceso, tiene como finalidad concentrar la cantidad de jarabe de glucosa obtenido en la hidrólisis, haciendo el tratamiento a una temperatura de 100°C.

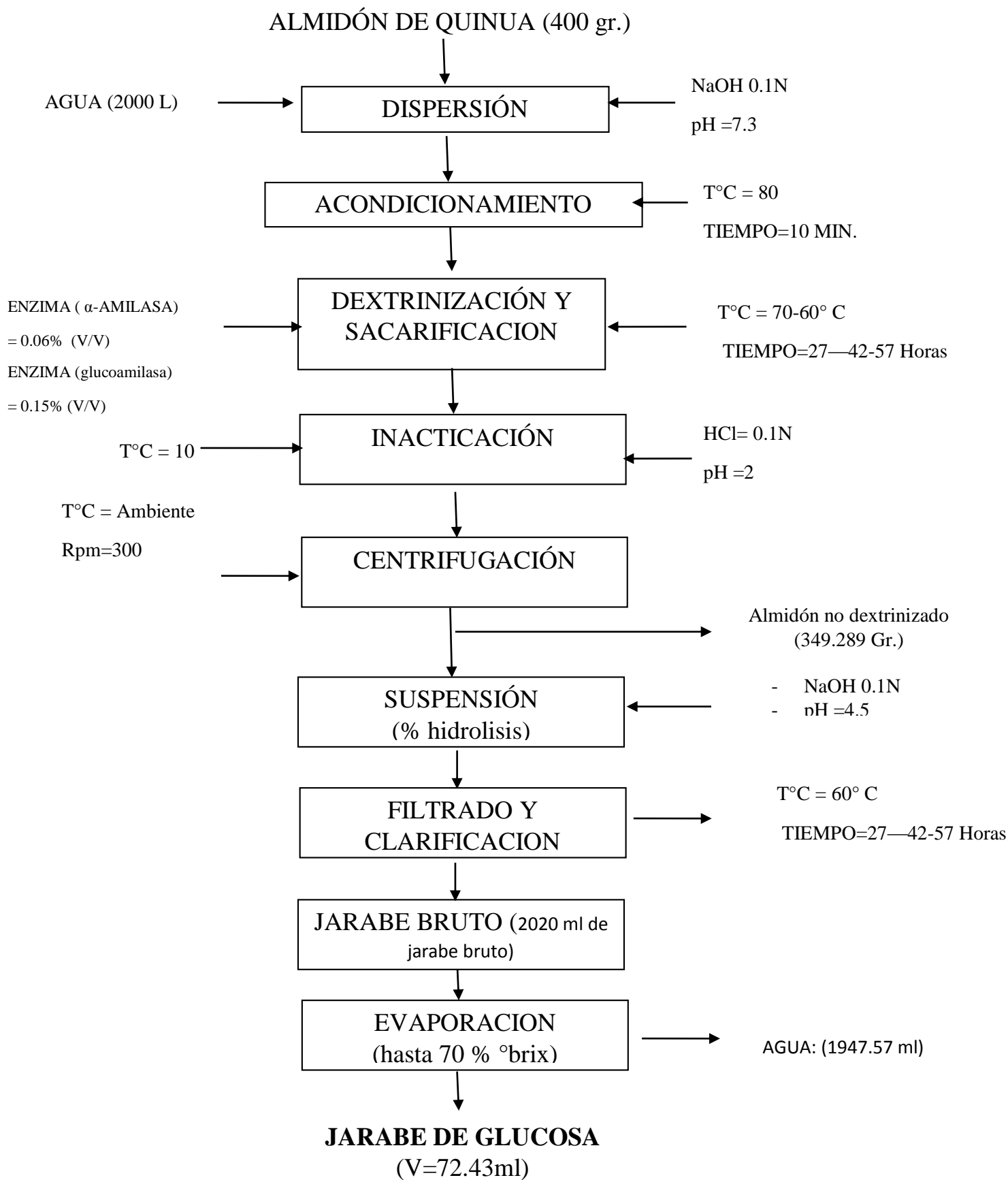


Figura 3.1: Flujo para la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón

En esta investigación, se consideraron como variables constantes el pH, temperatura y tipo de almidón, debido a que los valores obtenidos en la estandarización de las enzimas mostraron resultados no significativos, similar comportamiento reportados por Shariffaa *et al.* (2009). De acuerdo al modelo y el ensayo preliminar se consideraron las siguientes variables en estudio; relación de enzima/sustrato, concentración de la solución y tiempo de hidrolisis. Los límites máximos y mínimos de las variables en estudio y sus niveles fueron calculados de acuerdo al diseño superficie respuesta de tres variables, siendo el diseño de experimentos  $3^3$  (3 niveles, 3 factores) como se muestra en la Tabla 3.1.

### **3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.5.1 Diseño experimental para la optimización de variables de proceso en función de variables respuestas múltiples: Enzima, Concentración de solución de almidón y tiempo.**

Este diseño experimental se basó en la Metodología de Superficie de Respuesta, con un Diseño factorial. El diseño a usar para recabar los datos es un diseño factorial completo  $3^k$ , lo que nos dará el número total de 27 ensayos a realizar, como se muestra en la Tabla 3.2, (Rodríguez y Lemma, 2005).

Tabla 3.1: Variables independientes de evaluación y sus niveles mínimos y máximos.

Factor	Nivel		
	Mínimo	Medio	Máximo
Peso de enzimas (1:2)	0,013	0,026	0,039
Concentración de almidón (%)	20	40	60
Tiempo (h)	27	42	57

Se tiene en la tabla 3.1; como factor tenemos a las enzimas en  $\alpha$ -amilasa ; glucoamilasa relación de 1 a 2 respectivamente con respecto al porcentaje de almidón; la concentración de la solución de almidón en 20%, 40%, 60% en volumen de 2000ml de agua destilada, con los diferentes tiempos de 27, 42 y 57 horas respectivamente.

Las variables independientes son:

**Las variables independientes:** Harina de quinua

**Indicadores: Hidrolisis:** a través de su indicador de porcentaje de hidrolisis

**Las variables dependientes:** Jarabe de glucosa

**Indicadores:**

- **Calidad**, a través de su indicador de cambio de color a través de la Densidad óptica (DO).
- **Propiedad funcional:** a través de la medición de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix).

Tabla 3.2: Valores máximos y mínimos de las variables independientes en su forma real.

Ensayo	Enzima/Almidón %(p/p) *	Concentración de almidón(peso/V)	Tiempo (horas)
1	0,013	20	27
2	0,026	20	27
3	0,039	20	27
4	0,013	40	27
5	0,026	40	27
6	0,039	40	27
7	0,013	60	27
8	0,026	60	27
9	0,039	60	27
10	0,013	20	42
11	0,026	20	42
12	0,039	20	42
13	0,013	40	42
14	0,026	40	42
15	0,039	40	42
16	0,013	60	42
17	0,026	60	42
18	0,039	60	42
19	0,013	20	57
20	0,026	20	57
21	0,039	20	57
22	0,013	40	57
23	0,026	40	57
24	0,039	40	57
25	0,013	60	57
26	0,026	60	57
27	0,039	60	57

\*Respecto al peso del almidón

### 3.5.2 Procedimiento para la obtención de datos experimentales

1. obtención del almidón de quinua. tenemos flujo del procesamiento para la obtención del almidón de quinua a nivel de laboratorio. para la obtención del almidón de quinua se llegó al siguiente diagrama de flujo como el más adecuado y factible en cuanto a la obtención en mayor cantidad de almidón con respecto al grano de quinua.
  - a. **LIMPIEZA:** La limpieza de los granos tiene como finalidad de separar productos ajenos y contaminantes que están presentes así también restos de impurezas.
  - b. **CLASIFICACIÓN:** Se hace una adecuada clasificación de los granos de quinua que están presentes en el proceso, teniendo la mayor cantidad de granos en buenas condiciones organolépticas y no contaminadas.
  - c. **LAVADO:** posteriormente se tiene que extraer los alcaloides restantes presentes en la quinua para poder tener un producto cero en toxinas.
  - d. **REMOJO:** Para poder evitar algunos alcaloides libres en el lavado se asegura un remojo adecuada para asegurar un producto aceptable.
  - e. **MOLIENDA:** En un molino se hace el triturado de los granos para poder tener un producto homogéneo para facilitar su dilución en el posterior proceso.
  - f. **DISPERSIÓN:** procedemos a la dilución adecuada de materia molida 1:6 en agua, teniendo una agitación de 10 rpm, para así tener la separación del almidón en el agua, también se le adiciona bisulfito 5%.

- g. **TAMIZADO:** Se hace el tamizado adecuadamente para la posterior separación de fibra y almidón realizándose el lavado de la fibra hasta obtener en ella ningún residuo de almidón.
- h. **DECANTACIÓN:** Teniendo el material líquido se hace la decantación con un tiempo de 24 hora. Posteriormente de un lavado continua del residual o sólido.
- **Lavado 1:** se hace con la finalidad de extraer el almidón restante que queda en el residual o sólido para así obtener mayor cantidad.
  - **Lavado 2:** se hace con agitación con la misma finalidad del lavado.
- i. **FILTRADO:** Extraemos el agua sobrenadante cuidadosamente y se hace en el papel filtro del almidón concentrado en la decantación.
- j. **SECADO:** Dejamos a secar a una temperatura de aproximadamente 30-38 °C por un tiempo de 6h.
- k. **MOLIENDA:** Molemos el almidón para poder tener homogeneidad en la presentación.



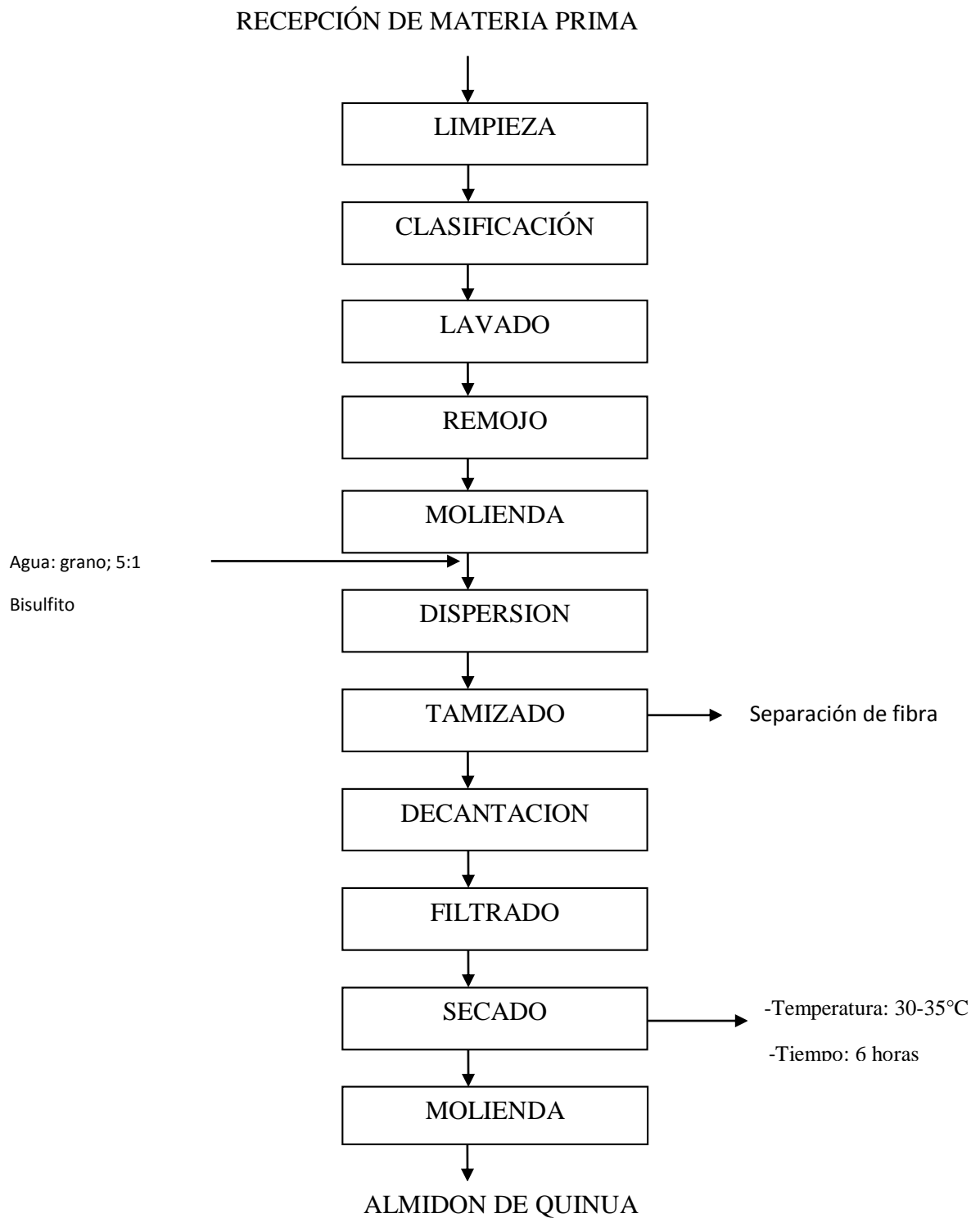


FIGURA3.2: Flujo del procesamiento para la obtención del almidón de quinua a nivel de laboratorio

2. Preparación de las diferentes concentraciones, 20,40,60 gr. de soluciones de almidón

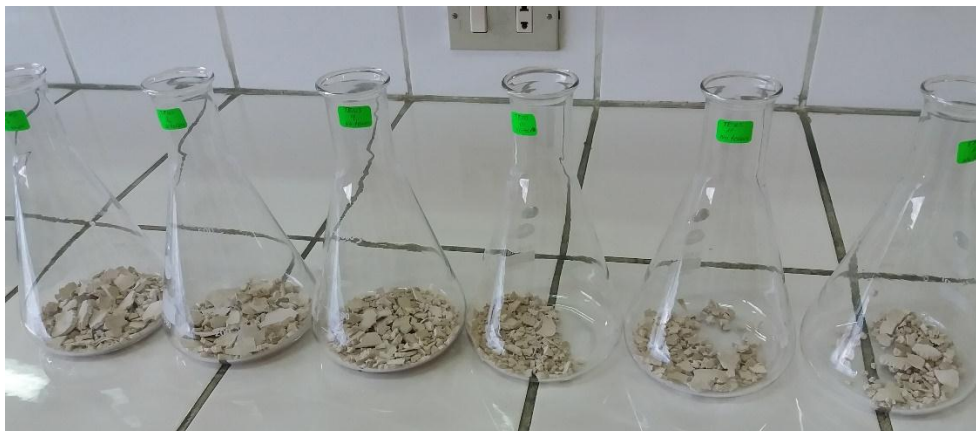


Figura 3.3: Diferentes cantidades de almidón, para las soluciones de acuerdo al diseño de la Tabla 3.2

3. Regulación del pH de las soluciones de almidón, antes de la adición de las enzimas, para obtener las condiciones adecuadas para la hidrolisis.



Figura 3.4: Soluciones de almidón regulándose el pH de 4,6

4. Dosificación de las diferentes concentraciones de enzimas (0,013; 0,026; 0.039) para trabajar a una temperatura establecida.



Figura 3.5: Dosificación de concentraciones de enzimas de acuerdo al diseño de la Tabla 3.2

5. Proceso de hidrolisis del almidón a Temperatura constante de (60-70°C), con agitación semi-continua manualmente y tiempo de acuerdo al diseño de la Tabla 3.2

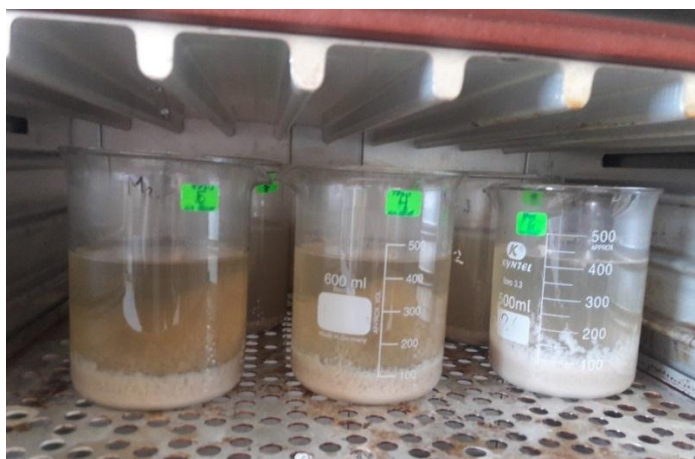


Figura 3.6: Proceso de hidrolisis

6. Separación del sobrenadante y sedimento después de hidrolisis



Figura 3.7: suspensión en el jarabe bruto obtenido y el sedimento es el almidón no hidrolizado

7. Jarabe bruto de glucosa obtenido a diferentes concentraciones realizadas.



Figura 3.8: Jarabe de glucosa obtenido vía hidrolisis enzimática suspensiones  
obtenidas



Figura 3.9: Jarabe de glucosa clarificado y concentrado a 70 °Brix aproximadamente.

## 1. Cálculos de Hidrolisis

Para obtener el % de hidrolisis se procedió de la siguiente manera: a la suspensión de a hidrolisis como podemos ver en la figura 3.6 y figura 3.7 se separó el sedimento por centrifugación y este sedimento se seco en la estufa a 105 °C hasta eliminar la totalidad de humedad, este sedimento viene a ser el almidon no hidrolizado en cada ensayo. (Tabla 1- Anexo I)

El rendimiento del hidrolisis enzimático fue calculado de acuerdo a la formula reportados por Chen *et al.* (2007).

$$\% \text{HIDROLISIS} = \frac{\text{GRAMOS DE ALMIDON HIDROLIZADO (ALMIDON-SEDIMENTO)}}{\text{GRAMOS DE ALMIDON UTILIZADO}} \times 100 \quad (3.1)$$

Esta expresión también fue corroborada cuantificando la cantidad de azúcar reductores en la suspensión de los jarabes brutos( figura 3.8)

## 2. Dextrosa equivalente

Se determinó por el método de Pancoast y Junt (1980). La solución de Fehling A se preparó con una mezcla de partes iguales (5 mL) de solución A y solución B. la mezcla se llevó a ebullición y se tituló con jarabe de dextrosa obtenido. Casi al final del cambio de coloración se agregó 2 gotas de azul de metileno y se siguió titulando hasta la desaparición completa del color azul.

Los azucares reductores (AR) se calcularon como sigue:

$$\%AR = \frac{(\text{factor Feling}) * 100}{\text{mL de titulación}} \quad (3.2)$$

La dextrosa equivalente se calculó:

$$\%DE = \frac{AR * 100}{\% \text{ de solidos totales}} \quad (3.3)$$

### **3.5.3 Clarificado**

Para llegar a cabo este proceso se usó como medio clarificante el carbón activado de 5% a la suspensión de jarabe bruto, se le llevó a agitación por un tiempo de 30 min. A temperatura constante de 30° C; al cabo del tiempo esta suspensión se pasó a un filtro fino y se esa manera se obtuvo un jarabe diluido cristalino.

### **3.5.4 Concentración**

Los jarabes clarificados en todos los tratamientos fueron concentrados en un evaporador al vacío hasta concentrarlos a 74 a 76 °brix y a este jarabe como factor de calidad se evaluarán la transparencia o cristalinidad como indicador de estabilidad del color del jarabe a travez de la medición de la densidad óptica a 450 nm de longitud de onda como menciona Pancoast y Junk (1980).

### **3.5.5 Procedimiento para el proceso de optimización de datos experimentales**

#### **a) Algoritmo de optimización**

Con el propósito de obtener las ecuaciones polinómicas predictivas para cada producto, calcular la función de conveniencia y graficar las superficies cinéticas y de conveniencia, un algoritmo de solución completo fue codificado en Matlab® 7.2 (Mathworks, Natick, MA). El código empleó funciones matemáticas y gráficas de Matlab para obtener los coeficientes polinomiales, coeficientes de determinación ( $R^2$ ), *valor-p* y las superficies predictivas 3D. La Figura 3.6 muestra el diagrama de bloques completo del algoritmo de optimización desarrollado.



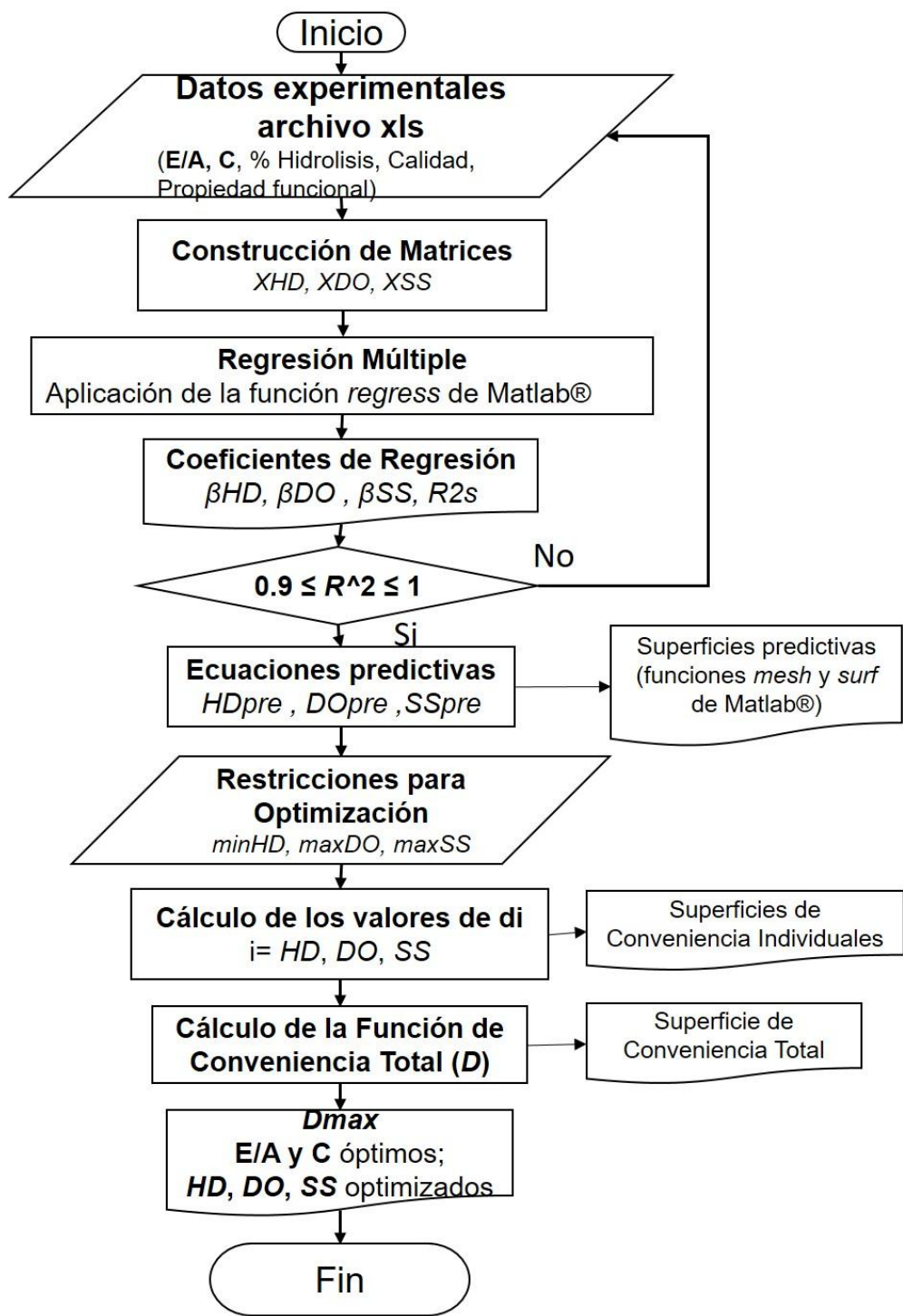


Figura 3.10: Diagrama de bloques del algoritmo completo de optimización de hidrolisis.

## b) Regresión polinomial

Con el propósito de predecir la evolución de la transpiración y evaluar la relativa influencia de cada factor operativo (Enzima, Concentración y tiempo) en las cinéticas de transferencia de masa fueron desarrollados modelos polinomiales de segundo orden para el porcentaje de hidrólisis, calidad del jarabe y propiedad funcional, utilizando regresión lineal múltiple. El modelo general propuesto para cada respuesta cinética se describe a continuación:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.4)$$

donde  $y$  es la respuesta predicha (porcentaje de hidrólisis, calidad del jarabe y propiedad funcional),  $\beta_0$  es el término independiente de la ecuación,  $\beta_i$  es el coeficiente lineal,  $\beta_{ii}$  es el término de los efectos cuadráticos,  $\beta_{ij}$  representa el término de los efectos de interacción entre las variables y  $x_i$  representa a la variable operativa. Los coeficientes fueron obtenidos por medio del ajuste de los datos experimentales aplicando regresión múltiple utilizando un código desarrollado en Matlab® 7.2 (Mathworks, Natick, MA).

El análisis de la varianza (ANVA) de los modelos polinómicos fue realizado con el propósito de evaluar la exactitud de los modelos predictivos y el efecto de cada factor

sobre las respuestas usando Statgraphics Centurion (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia).

### **3.6 EVALUACIÓN DE CALIDAD DEL JARABE DE GLUCOSA**

#### **3.6.1 Estabilidad de color del jarabe**

Se usó la metodología reportada por Pancoast y junk (1980). Para la estabilidad se observó el incremento en el color como consecuencia del calentamiento del jarabe de glucosa, para ello las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo con tapa, luego colocados en baño maría a ebullición por un tiempo de una hora. Luego las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 450 y 600 nm de longitud de onda, los cálculos fueron realizados a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta DO = DO_f - DO_i \quad (3.5)$$

Donde:

- $\Delta DO$ : incremento en el color
- DO<sub>f</sub>: densidad óptica final
- DO<sub>i</sub>: densidad óptica inicial

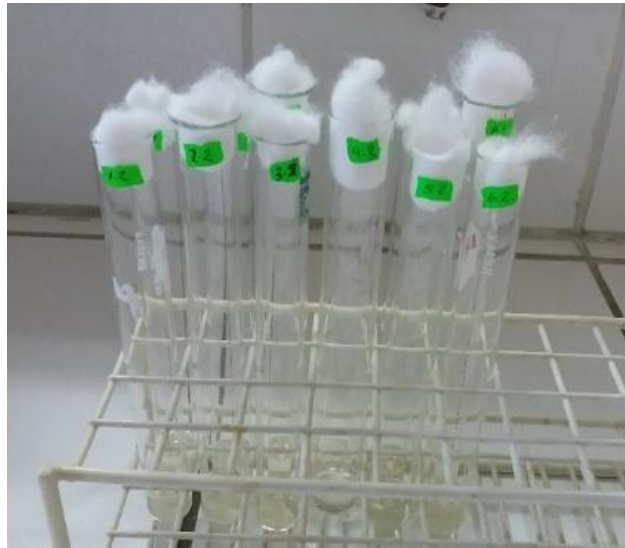


Figura 3.11: Adecuación para medición de estabilidad de color



Figura 3.12: Medición de estabilidad de color

### **3.6.2 Densidad**

Para medir la densidad del jarabe de glucosa, se utilizó el método picnómetro.

### **3.6.3 Humedad y solidos solubles totales**

El contenido de humedad y solidos totales se determinaron por los métodos 925.10 y 945.62, de la A.O.A.C (1990). Se utilizaron 2 g de muestra a una temperatura de 130°C por una hora en una estufa, obteniéndose los valores por diferencia de peso.

## **3.7 EVALUACIÓN DE LA PROPIEDAD FUNCIONAL DEL JARABE DE GLUCOSA**

### **3.7.1 pH**

Se disolvió el jarabe de glucosa 50 g en 50 g de agua destilada a una temperatura de 45°C, se dejó enfriar y se determinó el pH, utilizando un potenciómetro de la marca Thermo Orion.

### **3.7.2 Solidos solubles (°Brix)**

Se determinó con un refractómetro portátil de marca Atago Hand Refractometer, de una escala de 60 a 90°Brix., primero se reguló la temperatura del jarabe a 20°C, luego

se colocó tres gotas de jarabe de glucosa sobre el prisma del refractómetro y se tomó la lectura del porcentaje de sólidos solubles expresadas como °Brix.

### **3.8 VALIDACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO OPTIMIZADO**

Se efectuaron experimentos adicionales para validar la superficie de respuesta del modelo matemático procedente de esta, en los intervalos que van para la relación Enzima /Almidón y Concentración del almidón en las soluciones respectivamente.

## **I. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **4.1 CARACTERÍSTICAS DE ALMIDÓN DE QUINUA**

En la tabla 4.1, observamos los resultados de las características del almidón de quinua, en ello podemos apreciar el 63,95 por ciento es almidón, resultados semejante a lo reportado por Pereira (2013) que el contenido total de carbohidratos, en la quinua, se sitúa entre el 67 y 74% de la materia seca, el mayor componente, donde los almidones comprenden alrededor del 60%. Así mismo Reyes (2006) señala que el almidón se encuentra ampliamente distribuido en diferentes órganos de la planta de la quinua como carbohidratos de reserva, es el componente más abundante del grano (66 %). La cantidad de fibra reportada es por la falta de purificación del almidón en su etapa de extracción y ello lo validamos a través del contenido alto de cenizas, ya que en la parte de la cubierta (cascara) se encuentra la mayor parte de los minerales.

Tabla 4.1: Características del almidón de quinua en 100gr de harina de quinua

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	8,5
Proteína	0,034
Grasa	0,026
Ceniza	10,04
Fibra	17,45
Carbohidratos	63,95

#### **4.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE HIDROLISIS EN FUNCIÓN DE RESPUESTAS MÚLTIPLES.**

Tres modelos predictivos fueron obtenidos (Hidrolisis (%), variación de estabilidad de color (DO) y Propiedad funcional (°Brix)) en hidrolisis, usando el enfoque polinomial codificado en Matlab® 7.2 (Mathworks, Natick, MA). Además, las superficies predictivas 3D para Hidrolisis (%), estabilidad de color (DO) y propiedad funcional (°Brix) en función de Enzima (%) y concentración de solución de almidón (%) para obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón de quinua (Figuras 4.1) fueron graficadas usando funciones gráficas de Matlab.



Las superficies de los valores de conveniencia individuales y totales para el jarabe de glucosa, fueron obtenidas usando funciones gráficas de Matlab de acuerdo con los valores de la función de conveniencia calculados a partir de diferentes niveles de Enzima (0,013, 0,026 y 0,039 %) y Concentración de solución de almidón (20, 40 y 60%). Las regiones de los valores óptimos de la función conveniencia (DT) fueron identificados con círculos grises. A partir del gráfico de conveniencia total, puede ser observado que el gráfico, tiene forma diferente. La zona óptima puede observarse como una cuesta estrecha en el nivel máximo de la Enzima (mayor a 0,03%), entre las concentraciones de 40 a 50% solución de almidón. Adicionalmente es posible determinar una zona de baja conveniencia que se manifiesta como una caída abrupta en el valor de DT cercano a los valores máximos de Enzima y concentraciones de solución de almidón, esto es debido a los valores de conveniencia individual para hidrolisis que hacen máximos los valores de hidrolisis, cercanos al máximo de Enzima y concentración de solución de almidona, tienden a cero, teniendo en cuenta la restricción de minimización de hidrolisis.

#### **4.2.1 Hidrolisis (%)**

Las superficies predictivas 3D para el Hidrolisis, en función de porcentaje de enzima, Sustrato y de la concentración de la solución de almidón (Figuras 4.1) fue graficada usando funciones gráficas de Matlab. Las ecuaciones predictivas obtenidas fueron evaluadas estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANVA).

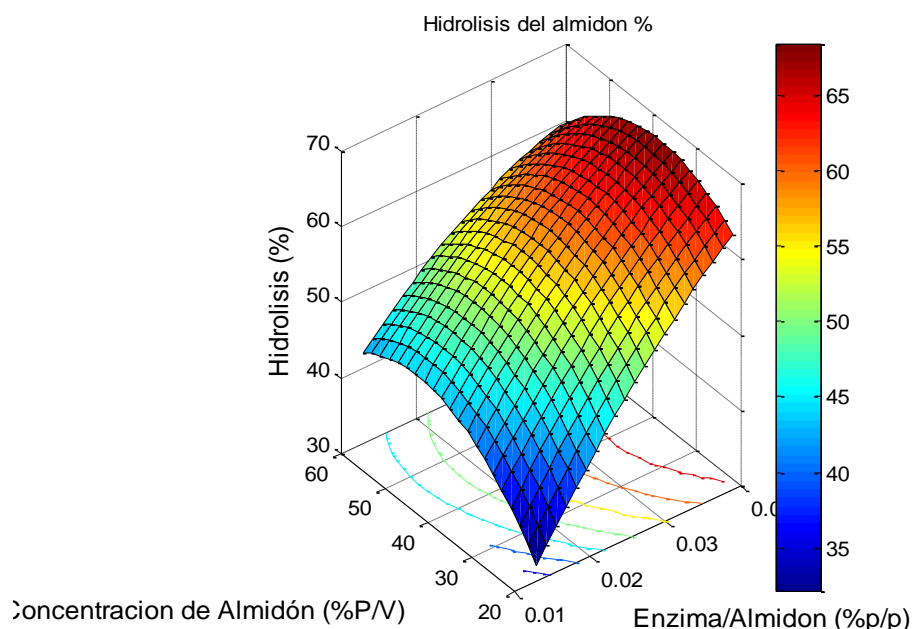


Figura 4.1: Optimización de hidrolisis

En la Figura 4.1 se muestra el efecto de la concentración de sustrato y el porcentaje de enzima usado en la solución del almidón para el hidrolisis, en la actividad enzimática observando un incremento con forme se incrementa el sustrato hasta un máximo y disminución luego después de un máximo, en cuanto al incremento de porcentaje de enzima es de una relación directa, a medida se incrementa un porcentaje se incrementa el hidrolisis del almidón en el rango de estudio, todo ello en un tiempo constante. El efecto del comportamiento del sustrato en el hidrolisis, puede deberse a una posible limitación difusional durante el proceso de hidrólisis provocado por un aumento de la viscosidad, tal y como se ha reportado por Baks *et al.* (2008) en estudios donde se trabaja a altas concentraciones de almidón (60% (p/v)). La zona óptima para esta

relación se encuentra en la zona, de 40 a 50% % de almidón en la solución y superior a 0,03 porciento de enzima.

#### **4.2.2 Calidad del jarabe**

El valor de DO optimo obtenido fue de 0,0055 que corresponde a un color debajo de agua, de acuerdo a la escala de clasificación reportada por Guzmán-Maldonado (1992). Con esto se puede decir el producto obtenido es estable al cambio de color, aunque que no se observaron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ), menor al valor de (0,043 DO) reportado por Pancoast y Junk (1980) en la obtención de glucosa a partir de harina de yuca.

De acuerdo al resultado en la Figura 4.2, los jarabes de glucosa obtenidos tienen estabilidades variables en las diferentes relaciones de Enzima/Almidón (%) y concentración de solución de almidón (%) en el hidrolisis llevado a cabo. El color es más estable en procesos de hidrolisis conforme se incrementa el porcentaje de sustrato, en cuanto al enzima existe un incremento hasta un máximo y luego descende, esta tal vez a medida que se utiliza mayores porcentajes de enzimas existe mayor hidrolisis y la viscosidad del jarabe sea mayor y ello dificulte la transparencia del jarabe. También pueda ser debido a que el contenido de cenizas y puede proporcionar cierta turbidez al jarabe, lo que muestra que tan importante es la refinación del producto de isomerización a través de tratamiento con carbón activado y columnas de intercambio iónico, donde se puede eliminar el color.

Las propiedades físicas del producto final dependen mucho de la adecuada elección del azúcar a utilizar. Por ejemplo, si se emplea sacarosa es importantísimo conocer las posibilidades de inversión en el producto final. La calidad de los jarabes elaborados por hidrólisis del almidón y de otros polisacáridos naturales depende mucho de la estructura de dichos polisacáridos, es decir, de si son de cadena lineal o ramificada, del tamaño de sus moléculas, etc. Todas estas propiedades suponen nuevas posibilidades para los fabricantes, y los materiales edulcorantes modernos están elaborados para entender instrucciones precisas de la industria (Braverman, 1980).

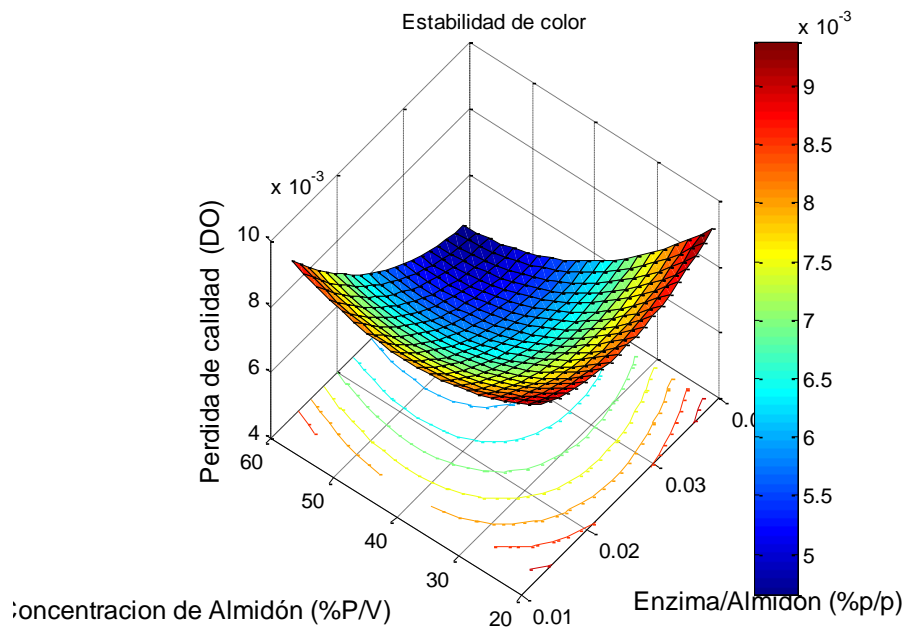


Figura 4.2: Optimización de estabilidad de color de jarabe de glucosa

Esta ligera variabilidad pudiera deberse a que el jarabe obtenido contendría trazas de proteína y aminoácidos que logran provocar una reacción de oscurecimiento, ya que el almidón siempre lleva trazas de componentes, tal como podemos observar en la Tabla 4.2, pues a simple vista el jarabe presentó ausencia de color. Por otro lado, se sabe que hasta los jarabes que están plenamente purificados contienen rastros de proteínas y aminoácidos que llegan a reaccionar con los azúcares reductores dando las reacciones de oscurecimiento o reacciones de Maillard. Otra de las causas de la inestabilidad del color es la caramelización que se produce por el calentamiento de los carbohidratos (Kearsley y Dziedzic, 1995).

#### **4.2.3 Propiedades funcionales del jarabe**

En la Figura 4.3 se observa el contenido de sólidos solubles producidos en los diferentes tratamientos, como variación de porcentaje de sustrato y porcentaje de enzima usado en las soluciones preparadas. La relación sustrato y enzima genera un máximo dentro del rango medio de los porcentajes.

Los resultados del ANVA para los modelos polinómicos desarrollados se muestran en la Tabla 4.2. A partir de los resultados se pueden observar los diferentes comportamientos que se tiene en cuanto al proceso de hidrólisis, el comportamiento del color de jarabe obtenido en la estabilidad en el tiempo y los sólidos solubles obtenidos del jarabe final de glucosa como producto de la hidrólisis, el

comportamiento de hidrolisis y el resultado de conversión de almidón en glucosa , tienen un comportamiento diferente en función de las variables independientes como sustrato y enzima, este comportamiento tal vez sea porque en cada tratamiento se manejó diferentes tiempo de aplicación de hidrolisis. La Tabla 4.3 muestra los valores de las características del jarabe de glucosa final obtenido del proceso óptimo. Este hecho puede explicar las diferencias encontradas, especialmente en la significancia de los términos cuadráticos en el ANVA (Tabla 4.2), de esta manera el porcentaje de sustrato y la concentración de enzima afectan más fuertemente el hidrolisis y la ganancia de sólidos.

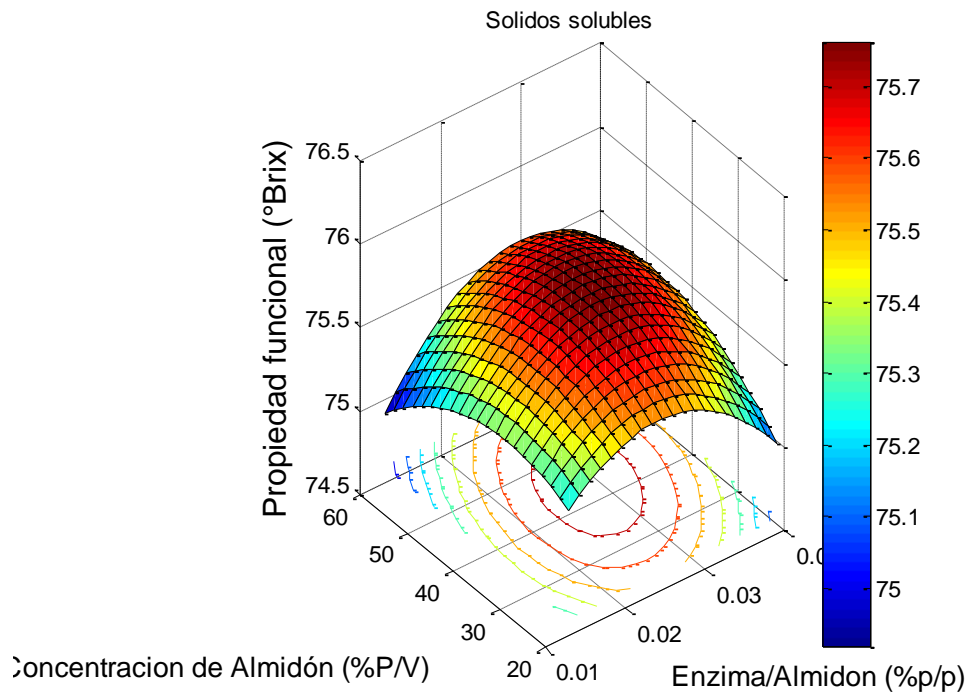


Figura 4.3: Optimización de propiedad funcional

Tabla 4.2: Análisis de la varianza de los modelos predictivos polinómicos para las respuestas durante el hidrolisis enzimática de almidón de quinua

Factores		Hidrolisis	Pérdida de calidad	Propiedad funcional
		Coeficientes	Coeficientes	Coeficientes
Modelo	$\beta_0$	-19,0	0,0141	73,9
X1 (Sustrato)	$\beta_1$	2217	-0,1838	93,6
X2 (Enzima)	$\beta_2$	2	-0,0002	0,000
X1 <sup>2</sup>	$\beta_{11}$	-14205	5,2597	-2205,8
X2 <sup>2</sup>	$\beta_{22}$	-0,000	0,0000	-0,0000
X1X2	$\beta_{12}$	-13	-0,0042	0,6
Valor-p		<b>0,6280</b>	<b>0,3958</b>	<b>0,6853</b>

$$\text{Hidrolisis}(\%) = -19,0 + 2217S + 2E - 14205S^2 - 0,0E^2 - 13ES$$

$$\text{Pérdida de calidad (DO)} = 0,0141 - 0,1838S - 0,0002E + 5,2597S^2 - 0,0E^2 - 0,0042ES$$

$$\text{Propiedad funcional (°Brix)} = 73,9 + 93,6S + 0,0E - 2205,8S^2 - 0,0E^2 + 0,6ES$$

Las propiedades funcionales del jarabe de glucosa, obtenida se muestran en la Tabla 4.3, obteniéndose con una concentración de 75,67% de sólidos solubles. Whistler (1984) define al jarabe de glucosa como una solución acuosa concentrada y purificada de sacáridos nutritivos con dextrosa equivalente (DE) de 20 a más obtenidos por hidrólisis de almidón. Se caracterizan en 4 tipos: Jarabes de tipo I con D.E. de 20-38;

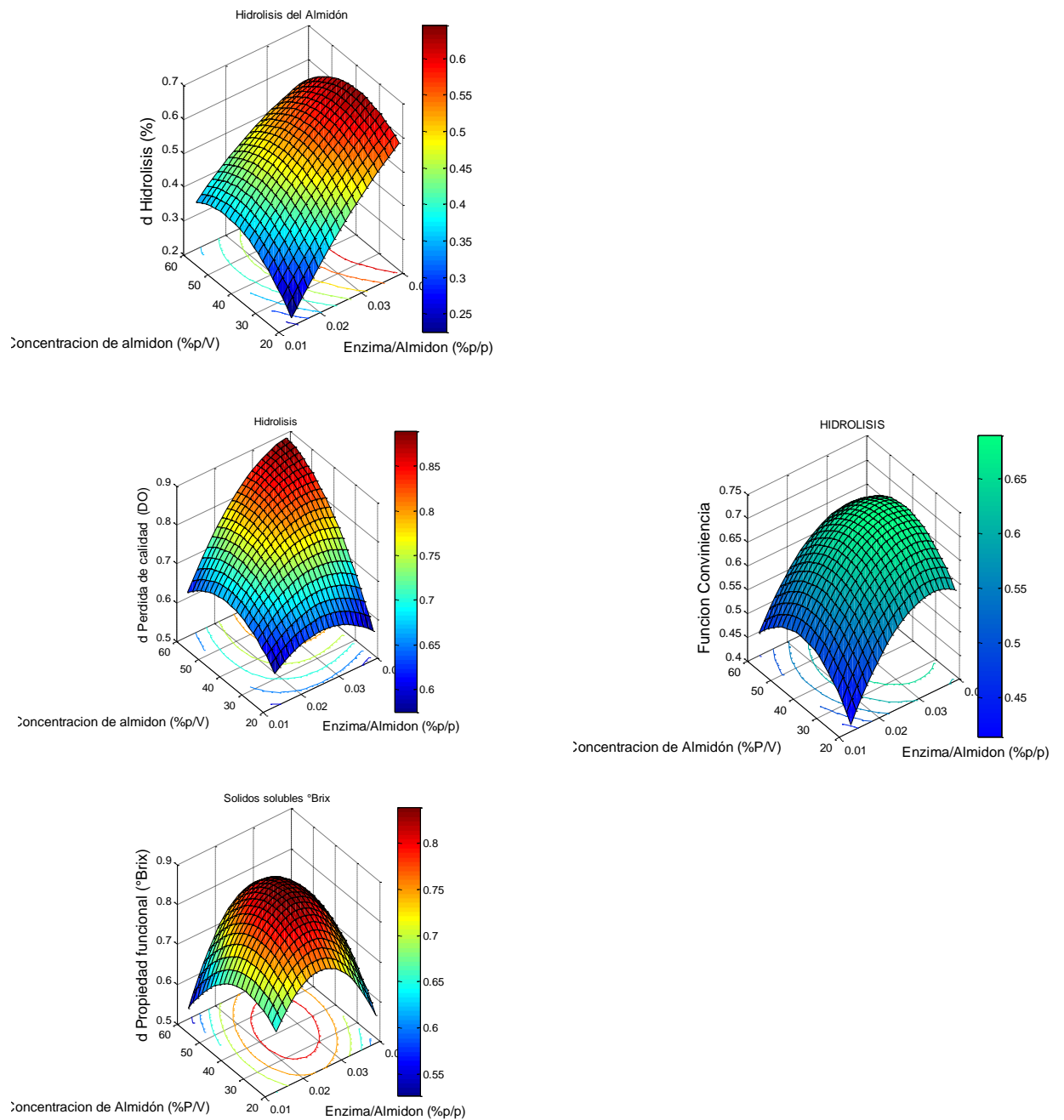
Jarabes de tipo II con D.E. de 38-58; Jarabes de tipo III con D.E de 58-73; Jarabes de tipo IV con D.E de superiores a 73.

Tabla 4.3: Propiedades funcionales del jarabe de glucosa

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Humedad (%)	24,33
pH	4,6
Densidad (g/cc)	1,385
Solidos solubles (°Brix)	75,67



### 4.3 OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS



**Figura 4.4:** Gráficos de superficie de la función de conveniencia individual y total y contornos de la optimización-DO de hidrolisis. Izquierda: conveniencia individual para el hidrolisis, pérdida de calidad (color) y solidos solubles (°Brix). Derecha: conveniencia total.

El método de la función de conveniencia puede ser aplicado a los alimentos y al sistema de procesamiento con el propósito de optimizar los diferentes factores. En el caso de hidrolisis del almidón pueden ser usados, Hidrolisis (%), Pérdida de calidad (olor), Sólidos solubles, tiempo de proceso, costo, etc., solos o combinados. En la presente Tesis, las condiciones óptimas para el hidrolisis fueron encontradas usando el método de la función de conveniencia programada en Matlab® 7.2 (Mathworks, Natick, MA) de acuerdo con el siguiente criterio: maximizar el hidrolisis (%), minimizar la estabilidad de color, maximizar los sólidos solubles (%); este mismo criterio fue utilizado por Eren y Kaymak- Ertekin (2007), Manivannan y Rajasimman (2011) y Noshad y col. (2011). Los modelos polinomiales de segundo orden, obtenidos mediante regresión polinomial (RP), fueron usados para cada respuesta cinética del sistema, con el fin de determinar zonas óptimas de procesamiento y las condiciones óptimas exactas para el hidrolisis del almidón de quinua. Los valores de la función conveniencia fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones 2.1 - 2.5.

Las superficies de los valores de conveniencia individuales y totales para el hidrolisis del almidón de quinua (Figuras 4.4) fueron obtenidas usando funciones gráficas de Matlab de acuerdo con los valores de la función de conveniencia calculados a partir de diferentes niveles de concentración de sustrato (almidón) en la solución (20, 40 y 60 %) y porcentaje de enzima incorporada (0,013; 0,026 y 0,039 %). Las regiones de los valores óptimos de la función conveniencia (DT) fueron identificados con círculos grises. A partir de los gráficos de conveniencia total, puede ser observado que los tres gráficos tienen formas diferentes. La zona óptima puede observarse como una cuesta

estrecha en el nivel máximo de concentración (60%), entre los 40 y 50 % de almidón. Adicionalmente es posible determinar una zona de baja conveniencia que se manifiesta como una caída abrupta en el valor de DT cercano a los valores máximos de concentración de sustrato y % de enzima, esto es debido a los valores de conveniencia individual para el hidrolisis (dDH) que hacen máximos los valores de DO, cercanos al máximo de concentración de sustrato y % de enzima, tienden a cero, teniendo en cuenta la restricción de minimización de estabilidad de color. Analizando la función de conveniencia, puede apreciarse una zona óptima que corresponde a valores máximos de concentración de sustrato y % de enzima de 0,013 a 0,014 % de enzima.

La Figura 4.4 la de función de conveniencia muestra como varía D como función de enzima/Almidón (%) (d1) y concentración de solución de almidón (%) (d2), nótese que si algún valor de di es cero, D será cero, sin tener en cuenta el otro valor. Walters (1999) muestra varios ejemplos de distintos tipos de funciones de conveniencia global, la forma de la función D depende del tipo de función de conveniencia individual que se asuma.

El procedimiento descrito proporciona una vía para transformar los valores predichos para múltiples variables dependientes en un valor simple de conveniencia global. El problema de la optimización simultánea de varias variables respuestas será entonces el de seleccionar las proporciones de los componentes de la mezcla (variables predictoras) que maximicen la conveniencia global.

Las condiciones de procesamiento óptimas para el hidrolisis de almidón de quinua fueron obtenidas de acuerdo con las soluciones matemáticas de la función de conveniencia total considerando el criterio de optimización seleccionado (Tabla 4.4). Una solución para el hidrolisis fue obtenida correspondiente a las condiciones óptimas que maximizan el valor de la función de conveniencia total de 0,6458 para el hidrolisis de almidón.

Tabla 4.4: Condiciones óptimas de operación para el hidrolisis de almidón de quinua.

Producto	Condiciones optimas		Respuestas Optimas			DTmax
	Solución de Almidón (% p/V)	Enzima/Almidón (%p/p)	Hidrolisis (%)	Cambio de color (nm)	Solidos solubles (°Brix)	
Objetivo	-	-	Max	Min	Max	
Jarabe de glucosa	44	0,0338	64,5829	0,0055	75,6724	0,7138
$\Theta_i$	-	-	1	1	1	
$v_i$	-	-	3	1	3	

$v_i$ : Importancia relativa asignada a cada respuesta;  $\Theta_i$ : factor de peso para las restricciones establecidas

Un valor alto función de conveniencia global (DT) indica las mejores combinaciones de factores, que es considerado como la solución óptima del sistema. Los valores óptimos para cada factor son determinados a partir de los valores de las funciones de conveniencia individual que maximizan la función global DT (Corzo y col, 2008).

## CONCLUSIONES

1. La optimización de las variables de hidrolisis fue de: Enzima/Almidón de 0,0338% y concentración de solución de almidón de 44,0%, para obtener una maximización de hidrolisis del 64,5828%.
2. La optimización de las variables de hidrolisis fue de: Enzima/Almidón de 0,0338% y concentración de solución de almidón de 44,0%, para obtener una minimización de pérdida de calidad del 0,0055%.
3. La optimización de las variables de hidrolisis fue de: Enzima/Almidón de 0,0338% y concentración de solución de almidón de 44,0%, para obtener una maximización de propiedad funcional del 75,6724%.
4. El valor de la función de conveniencia para optimizar las variables de proceso (Enzima/Almidón, Concentración de solución de almidón) a través de la optimización de múltiples respuestas como: maximización de hidrolisis, minimización de pérdida de calidad y maximización de su propiedad funcional) en la obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón quinua vía hidrolisis enzimática fue de 0,7138.

### **m. RECOMENDACIONES**

1. Realizar investigaciones referentes a la industrialización de la quinua y de esa manera hacer que la materia prima tenga sostenibilidad en el tiempo.
2. Realizar investigaciones sucesivas a este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahamed, N., Singhal, R., Kulkarni, P. y Pal, M. 1996. "Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* starch" . Botanical Research Institute, Lucknow. India.
2. Aldave Tena, M. Jorrín Novo, J. V. 2008. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Curso académico: Industria de alimentos - productos de panadería, departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Argentina.
3. Anderson, M.J and P.J. Whitcomb (1993): Optimizing formulation performance with desirability functions, Quebec Metalurgical Conference.
4. Arzapalo Quintoa Doyla, Huamán Córdora Katty, Quispe Solano Miguel y Espinoza Silvab Clara. 2015. Extracción y caracterización del almidón de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) negra collana, pasankalla roja y blanca junín. Rev Soc Quím Perú. 81(1).
5. Badui, Dergal, Salvador 2006. Química de los alimentos; cuarta edición. PEARSON educación. México. ISBM: 970-26-0670-5.
6. Benigna Marisol, Toledo Calvopiña; 2008, evaluación de diferentes niveles de harina de quinua en la elaboración de manjar de leche. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, facultad de ciencias pecuarias, Ecuador.

7. Beveridge, G.S.G. and R.S. Schechter (1970): Optimization: Theory and Practice, Mc Graw Hill, New York.
8. Bonifaz Paredes Luis Enrique, 2010. "Determinación de la actividad insecticida de la saponina de quinua (*chenopodium quinoa*) hidrolizada y no hidrolizada sobre *drosophila melanogaster*" Riobamba-Ecuador.
9. Braverman J.B.S.1980. Introducción a la Bioquímica de Alimentos, Valencia , España.
10. Calixto Cotos Maria Rosario y Arnao Salas Ines. 2004. Modificación enzimática del almidón nativo de *Amaranthus caudatus* Linneo. Revista Sociedad Química del Perú.70 N° 1 (28).
11. Carolina Alanoca Quispe, 2014; Diversidad Morfológica, Fenológica y Calidad de Semilla de Ecotipos de *Chenopodium quinoa* Willd. Conservadas en la Comunidad Irpani, Altiplano Sur, Cochabamba – Bolivia.
12. Cervilla, N. S.; Mufari, J. R.; Calandri, E. L.; Guzman, C. A. 2014; Perdidas nutricionales durante la coccion de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd bajo presion de vapor Nutritional losses during cooking of *Chenopodium quinoa* Willd seeds under pressure steam Instituto de Ciencia y Tecnologia de los Alimentos (ICTA, ICyTAC CONICET-UNC). Argentina.
13. Chitra, S.P. (1990): "Multi-response optimization for designed experiments", Proc. Statistical Computing Section. Am Stat Ass. Anaheim, California, Agosto 6-9.



14. FAO /WHO (2000) Normas para bancos de germoplasma de recursos filogenéticos para la alimentación y la agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 167 p.
15. Fennema, Owen R. 1993. Química de los alimentos; Acribia S.A. cuarta edición, España, ISBN: 978-84-200-11424.
16. Gabriel julio, Luna Mayra, Vargas Amalia, Magne Jury, Angulo Ada, La torre Jaime, Bonifacio Alejandro; 2012, Quinoa de valle (*Chenopodium quinoa Willd*) fuente valiosa de Resistencia Genética al mildiu Journal Of The, selva andina Research Socielty.
17. García, Mariano G. Quintero, Rodolfo, R. López, Agustín M. Biotecnología Alimentaria. Primera edición. Editorial Limusa, México 1993, pp. 525-534A. [ Links ] J. Rodríguez, Estudios Electroquímicos de la interacción del Complejo cis- diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) con Bases Nitrogenadas. Tesis para optar el título de Magíster en química, Universidad de Puerto Rico- Recinto Universitario de Mayagüez, 2001.
18. Guzmán-Maldonado S. H. 1992. Optimización de un proceso enzimático para la licuefacción y sacarificación del almidón mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis de maestría. Cinvestav, Guanajuato, México.

19. Harrington, E.C. (1965): "The desirability function", Ind. Qual Control 21, 494-498.
20. Herencia, L. (1998). "Comportamiento y actividad biológica de la quínoa cultivada en ambiente mediterráneo". Tesis doctoral UPM, 450 p. Madrid. España.
21. Huanca López Susana, Espinal Christian, Mollinedo Patricia. 2015. QUALITY ASSESSMENT OF GLUCOSE SYRUP PRODUCED BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ALPHA-AMYLASE AND AMYLOGLUCOSIDASE FROM STARCH OF MANIHOT ESCULENTA (YUCA). REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA Vol. 32, No.2, pp. 24-29, May./Jun. 2015.
22. López Susana, 2013, "elaboración de un producto proteico alternativo a partir de soya (*glycine max*) y quinua (*Chenopodium Quinoa Willd*)" Tesis, Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos Carrera de Ingeniería en Alimentos; Ecuador.
23. LOWE, C.W. (1967): "A report on simplex evolutionary operations for multiple responses". Trans. Inst. Chem. Eng., 45 T3-T7.
24. Lupano 2013. "Limitada Oferta de Productos Elaborados a Base de Soya (*Glycine max*) y su Escaso Consumo en la Ciudad de Ambato". Perfil de Proyecto

de Investigación previo a la Obtención del Título de Ingeniero en Alimentos.  
Ambato-Ecuador.

25. Matos, A., y Sánchez, F. 2011. “Determinación del rendimiento de almidón a partir en tres accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla” . Universidad Peruana Unión, Tercer encuentro de Investigación Universitaria, Lima-Perú.
26. Mujica Angel & Sven-E. Jacobsen; 2006. La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) y sus parientes silvestres Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú
27. Nuñez de Villavicencio Ferrer Margarita. 2002. OPTIMIZACION DE MULTIPLES RESPUESTAS POR EL METODO DE LA FUNCION DE CONVENIENCIA PARA UN DISEÑO DE MEZCLAS. REVISTA INVESTIGACION OPERACIONAL Vol. 23, No. 1, 2002.
28. Pancoast H. M and Junk W. R. 1980. Handbook of sugars. A VI, publishing Co., Inc. Westport CT. USA.
29. Pereira Ordóñez, Sebastián Alejandro 2011. ELABORACIÓN DE LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*, Willd) ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA, Quito-Ecuador.

30. Repo-Carrasco, R., C. Espinoza y S.E. Jacobsen. 2001. Valor Nutricional y Usos de la Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y de la Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). In, Memorias (eds. S.-E. Jacobsen & Z. Portillo). Primer Taller Internacional sobre Quinoa-Recursos Genéticos y Sistemas de Producción, 10-14 May, UNALM. Lima, Peru, 391-400
31. Repo-Carrasco, R.; Espinoza, C.; Jacobsen, S. E. 2003. “Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*)”. In: Food Review International.
32. Reyes Montaña Edgar Antonio, 2006. Artículo de Investigación Científica y Tecnológica; componente nutricional de diferentes variedades de quinoa de la región andina, Investigación en Ingeniería.
33. Rivera Figueroa Mónica Mireya, 2006. Obtención, Caracterización Estructural y Determinación de las Propiedades Funcionales de un Aislado Proteico de Quinoa Orgánica (*chenopodium quinoa*). tesis de la universidad de Chile facultad de ciencias químicas y farmacéuticas departamento de ciencia de los alimentos y tecnología química; Chile
34. Sánchez, Alberto L. 2002. Obtención de jarabe de glucosa por hidrólisis enzimática de almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenta y

Chile) cultivadas en la provincia de Guanentá (Santander).Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, pp. 40 - 43 [ Links ]

35. Sebastián Alejandro Pereira Ordóñez 2011. Elaboración de leche de Quinoa (*chenopodium quinoa*, willd), proyecto previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial; Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito.
36. SESAN, 2013. INVESTIGACIÓN SOBRE EL CULTIVO DE LA QUINUA O QUINOA *Chenopodium Quinoa* Unidad de Gestión de Riesgo en SAN y Cambio Climático Dirección de Emergencias en SAN, Secretaría de Seguridad Alimentaria y Nutricional, Guatelama.
37. Taquiri Huaccachi Karina, 2002; estudio técnico sobre la obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón de maíz (*Zea Mays*) por método enzimático, Ayacucho/peru.
38. Torres María O.; Guzmán a Amelia; Carvajal Roger; 2002. Valoración Nutricional de las 10 variedades de quinoa (*chenopodium quinoa*) del altiplano boliviano; Bolivia.
39. Villagra ,2013.Resistencia durable a patógenos y como mejorar por este tipo de resistencia. PREDUZA en resistencia duradera en cultivos altos en la zona andina. Quito, Ecuador.

40. WALTERS, F.H.; S.L. MORGAN; L.R. PARKER, Jr. and S.N. DEMING (1999): "Sequential Simplex Optimization", Electronic reprint, Multisimplex AB, Karlskrona, Sweden.
  
41. Whistler. Roy L. Smith, Robert J, Be Miller, James N. Y Wolfrom, M.L.. Methods in Carbohydrate Chemistry.volumen IV, Starch.1994. Academic Press. New York 1964 Pagina 67.
  
42. WINER, B. J. (1971): Statistical principles in experimental design (2nd ed.). New York: McGraw Hill.

## ANEXO I:

Tabla 1. Datos de resultados experimentales del hidrolisis de almidón de quinua

ES %(p/p)	C(%p/V)	ti (h)	Hidrolisis (%)	DO	°Brix
0,013	20	27	12,68	0,003	74,8
0,026	20	27	24,065	0,006	75,1
0,039	20	27	31,311	0,007	74,6
0,013	40	27	14,75	0,004	75,3
0,026	40	27	26,653	0,003	76,2
0,039	40	27	35,71	0,004	73,5
0,013	60	27	15,785	0,005	74,2
0,026	60	27	25,618	0,004	74,5
0,039	60	27	33,122	0,004	75,05
0,013	20	42	25,1	0,009	75,2
0,026	20	42	42,955	0,007	75,6
0,039	20	42	63,139	0,008	74,7
0,013	40	42	25,359	0,009	75,5
0,026	40	42	53,047	0,010	76
0,039	40	42	69,608	0,010	75,4
0,013	60	42	23,806	0,014	75,4
0,026	60	42	48,907	0,007	75,6
0,039	60	42	60,551	0,006	76
0,013	20	57	58,74	0,018	75,6
0,026	20	57	81,252	0,012	75,2
0,039	20	57	99,107	0,011	76,2
0,013	40	57	92,379	0,005	75,7
0,026	40	57	97,813	0,008	76
0,039	40	57	96,261	0,007	76
0,013	60	57	84,875	0,011	74,8
0,026	60	57	85,651	0,004	76,2
0,039	60	57	86,428	0,003	75,7

**I) Código Propio para la Optimización múltiple de Hidrolisis enzimática de almidón de quinua mediante regresión polinomial (RP) y la metodología de la función de conveniencia (MFC) usando Matlab.**

```

% -----
% AJUSTE POLINOMIAL Y METODOLOGÍA DE LA FUNCIÓN DE
% CONVENIENCIA DE
% SUPERFICIE RESPUESTA DE 2 VARIABLES t: % enzima y az= Sustrato
% OPTIMIZACIÓN DE HIDROLISIS ENZIMATICA DE ALMIDON DE
% QUINUA
% -----
% Factores de evaluación: Enzima/Almidón Concentracion de solución almidon
% Respuestas: Hidrolisis (%), Estabilidad de color (DO), Solidos solubles
% (°Brix)
% -----
clear all
clc,
close all
A=xlsread('DATOS','Hoja1');% datos en Excel
% VARIABLES INDEPENDIENTES
ES=A(:,1);% columna 1de Enzima/Sustrato (%p/P)
C=A(:,2);% columna 2 de Concentración solución ((%p/V)
% Az=A(:,3);% columna 3 Tiempo
% VARIABLES DEPENDIENTES
HD=A(:,4);% columna HIDROLISIS(%)
DO=A(:,5);% columna PERDIDAD DE CALIDAD
SS=A(:,6);% columna PROPIEDAD FUNCIONAL
% PROCESAMIENTO DE DATOS

% REGRESION POLINOMIAL
n=length(ES);
% MODELO POLINOMIAL PARA HIDROLISIS (HD)
% HD=b1+b2.t+b3.Az+b4.t^2+b5.Az^2+b6.t.Az
X11=ones(n,1);
X12=(ES);
X13=(C);
X14=(ES.^2);
X15=(C.^2);
X16=(C.*ES);
X1=[X11,X12,X13,X14,X15,X16];
[b1,bint1,R1,Rint1,stat1]=regress((HD),X1,0.05);

% MODELO POLINOMIAL PERDIDAD DE CALIDAD
% DO=b1+b2.t+b3.Az+b4.t^2+b5.Az^2+b6.t.Az
X21=ones(n,1);

```



```

X22=(ES);
X23=(C);
X24=(ES.^2);
X25=(C.^2);
X26=(C.*ES);
X2=[X21,X22,X23,X24,X25,X26];
[b2,bint2,R2,Rint2,stat2]=regress((DO),X2,0.05);

%MODELO POLINOMIAL PROPIEDAD FUNCIONAL
%SS=b1+b2.t+b3.Az+b4.t^2+b5.Az^2+b6.t.Az
X31=ones(n,1);
X32=(ES);
X33=(C);
X34=(ES.^2);
X35=(C.^2);
X36=(C.*ES);
X3=[X31,X32,X33,X34,X35,X36];
[b3,bint3,R3,Rint3,stat3]=regress((SS),X3,0.05);

%RESULTADOS REGRESION
b1%Coeficientes Modelo PARA HIDROLISIS
R2_HD=stat1(1)%Coeficiente de Correlacion
p_value=stat1(3)
b2%Coeficientes Modelo PARA PERDIDAD DE CALIDAD
R2_DO=stat2(1)%Coeficiente de Correlacion
p_value=stat2(3)
b3%Coeficientes Modelo PARA PROPIEDAD FUNCIONAL
R2_SS=stat3(1)%Coeficiente de Correlacion
p_value=stat3(3)

%Superficies de Respuesta factores: HIDROLISIS, PERDIDAD DE CALIDAD,
%PROPIEDAD FUNCIONAL
[ES1,C1]=meshgrid(min(ES):(max(ES)-min(ES))/20:max(ES),min(C):(max(C)-
min(C))/20:max(C));
HDpre=b1(1)+b1(2)* ES1+b1(3)*C1+b1(4)*ES1.^2+b1(5)*C1.^2+b1(6)*C1.*ES1;
DOpre=b2(1)+b2(2)* ES1+b2(3)*C1+b2(4)*ES1.^2+b2(5)*C1.^2+b2(6)*C1.*ES1;
SSpre=b3(1)+b3(2)* ES1+b3(3)*C1+b3(4)*ES1.^2+b3(5)*C1.^2+b3(6)*C1.*ES1;

figure(1)
surf(ES1,C1,HDpre)% grafico para hidrolisis
title('Hidrolisis del almidon %')
% shading interp
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)', 'fontsize',12)
ylabel('Concentracion de Almidón (%P/V)', 'fontsize',12)

```

```

xlabel(' Hidrolisis (%)','fontsize',12)

figure(2)
surf(ES1,C1,DOpre)% grafico para PERDIDA DE CALIDAD
title('Estabilidad de color')
% shading interp
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)','fontsize',12)
ylabel('Concentracion de Almidón (%P/V)','fontsize',12)
xlabel('Perdida de calidad (DO)','fontsize',12)

figure(3)
surf(ES1,C1,SSpre)% grafico para solidos solubles
title('Solidos solubles')
% shading interp
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)','fontsize',12)
ylabel('Concentracion de Almidón (%P/V)','fontsize',12)
xlabel('Propiedad funcional (°Brix)','fontsize',14)

%DESIRABILITY FUNCTION METHOD
%-----
%Constraints: Maximización Hidrolisis
THD=max(HD);% Hidrolisis del almidón (%)
UHD=max(HD);% Hidrolisis del almidón (%)
LHD=min(HD);% Hidrolisis del almidón (%)

TDO=min(DO);% MINIMIZAR PERDIDA DE CALIDAD
UDO=max(DO);% Cambio de color (nm)
LDO=min(DO);% Cambio de color (nm)

%Constraints: Maximización PROPIEDAD FUNCIONAL
TSS=max(SS);% DO
USS=max(SS);% DO
LSS=min(SS);% DO
r=1;% factor de peso

% PARA MAXIMIZAR O MINIMIZAR, REVISAR TEORÍA EN FUNCION A
ELLO CAMBIAR L ó T y d1 = 0 ó d1 = 1

%PARA MAXIMIZAR
for i=1:length(C1)
    for j=1:length(ES1)
        if HDpre(i,j)<LHD
            d1(i,j)=0;

```

```

elseif HDpre(i,j)>THD
    d1(i,j)=1;
else
    d1(i,j)=((HDpre(i,j)-LHD)/(THD-LHD))^r;
end
end
end
figure(4)
surfc(ES1,C1,d1)
title('Hidrolisis del Almidón')
% shading interp
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)', 'fontsize',12)
ylabel('Concentracion de almidon (%p/V)', 'fontsize',12)
zlabel('d Hidrolisis (%)', 'fontsize',14)

%PARA MINIMIZAR
for i=1:length(C1)%PARA MINIMIZAR PERDIDA DE CALIDAD
    for j=1:length(ES1)
        if DOpres(i,j)<TDO
            d2(i,j)=1;
        elseif DOpres(i,j)>UDO
            d2(i,j)=0;
        else
            d2(i,j)=((UDO-DOpres(i,j))/(UDO-TDO))^r;
        end
    end
end
end

figure(5)
surfc(ES1,C1,d2)
title('Hidrolisis')
% interpretacion del sombreado
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)', 'fontsize',12)
ylabel('Concentracion de almidon (%p/V)', 'fontsize',12)
zlabel('d Perdida de calidad (DO)', 'fontsize',12)

%PARA MAXIMIZAR
for i=1:length(C1)
    for j=1:length(ES1)
        if SSpre(i,j)<LSS
            d3(i,j)=0;
        elseif SSpre(i,j)>TSS
            d3(i,j)=1;
        end
    end
end

```

```

else
    d3(i,j)=((SSpre(i,j)-LSS)/(TSS-LSS))^r;
end
end
end
figure(6)
surfc(ES1,C1,d3)
title('Solidos solubles °Brix')
% interpretacion del sombreado
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)', 'fontsize',12)
ylabel('Concentracion de Almidón (%P/V)', 'fontsize',12)
zlabel('d Propiedad funcional (°Brix)', 'fontsize',14)
('Factor de Importancia')
v=[3 1 3]% factor de importancia

% FUNCION CONVENIENCIA en base a los resultados anteriores
for i=1:length(C1)% TODA FUNCION CONVENIENCIA
    for j=1:length(ES1)
        D(i,j)=(d1(i,j)^v(1)*d2(i,j)^v(2)*d3(i,j)^v(3))^(1/sum(v));
    end
end
figure(7)
surfc(ES1,C1,D)
title('HIDROLISIS')
% Interpretacion del sombreado
colorbar
xlabel('Enzima/Almidon (%p/p)', 'fontsize',12)
ylabel('Concentracion de Almidón (%P/V)', 'fontsize',12)
zlabel('Funcion Convinencia', 'fontsize',14)
colormap winter

% Valor máximo de función Convinencia
[Valuemax,II]=max(D);
[Dmax,J]=max(Valuemax);
I=II(J);
% Muestra los resultados en pantalla (Workspace)
display('D maxima Hidrolisis'),Dmax
display('Posicion FILA I - COLUMNA J'),[I,J]
display('Enzima/Almidón Optimo'),ES1(1,J)
display('Concentracion de almidón óptimo'),C1(I,1)
display('Hidrolisis Optimo'),HDpre(I,J)
display('Perdida de calidad optimo'),DOpre(I,J)
display('Propiedad funcional Optimo'),SSpre(I,J)
% FIN DEL PROGRAMA

```

## **Anexo III.**

### **CODEX ALIMENTARIO (CODEX STAN 9-1981)**

#### **JARABE DE GLUCOSA**

**1. Se entenderá como una solución acuosa, concentrada y purificada de sacáridos nutritivos obtenidos a partir de almidón.**

**2. Especificaciones**

- contenido de sólidos totales      no menor de 70 % m/m.
- contenidos de azúcares reductores      no menor de 20% m/m, expresados como dextrosa equivalente
- cenizas sulfatadas      no más de 1% m/m

**3. no se puede tener los siguientes aditivos alimentarios:**

Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	40 mg/kg de jarabe
Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	4000mg/kg de jarabe, solo para fabricación de dulces de azúcar

**4. El etiquetado deberá ser el exigido por la Norma General para el Etiquetado de los alimentos Pre envasados o Envasados.**

## ANEXO N° IV

### **1. DETERMINACION DE HUMEDAD EN ALIMENTOS -MÉTODO DE LA A.O.A.C. (1998).**

El contenido de humedad de los alimentos es de gran importancia, pero su determinación exacta es difícil. En el caso de frutas y verduras, el porcentaje de humedad es mayor en relación a otros alimentos que también contienen humedad, y aún en los aceites se encuentra una cierta cantidad de agua.

#### **a) Materiales**

- Luna de reloj.
- Espátula.
- Mortero

#### **b) Equipos**

- Balanza analítica.
- Estufa.

#### **c) Procedimiento**

Preparar las muestras para el análisis por reducción de tamaño haciendo uso de un mortero. Asegurarse que las muestras no se descompongan a temperaturas mayores de 100°C.

Pesar las placas petri o papel de aluminio limpias y secas (P<sub>1</sub>)

P<sub>1</sub> = .....g

Pesar exactamente ente 2 g de muestras en placas petri. Anotar el peso de la muestra + placas petri. P<sub>2</sub> = .....g

Llevar a la estufa a 105°C por 2 (muestras molidas secas) Y 24 h muestras frescas

Sacar las placas con las muestras secas y colocarlas en el desecador para que se enfríe.

Pesar y anotar el peso final (P<sub>3</sub>):.....g

**d) Cálculos:**

g de muestra = (P<sub>2</sub> - P<sub>1</sub>) = .....g

g de agua eliminado = (P<sub>2</sub> - P<sub>3</sub>):..... g

**Por definición humedad es:**

$$\text{Humedad (M)} = \frac{\text{gramos de agua eliminado}}{\text{gramos de alimento}}$$

**% de humedad será:**

$$\% M = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

**2. DETERMINACION DE CENIZA EN ALIMENTOS**

Cenizas en seco: (para la mayoría de las muestras de alimentos)

Esta técnica se realiza mediante el uso de una mufla capaz de mantener temperaturas de 500 a 600°C.

El agua y los vapores son volatizados y la materia orgánica es quemada en presencia de oxígeno en aire a CO<sub>2</sub> y óxidos de N<sub>2</sub>

La mayoría de los minerales son convertidos en óxidos, sulfatos, fosfatos, cloruros y silicatos.

Elementos como el hierro, selenio, plomo y mercurio pueden volatilizarse parcialmente con este procedimiento (si se requiere de un análisis elemental se tiene que recurrir a otro método).

La mayoría de los minerales son convertidos en óxidos, sulfatos, fosfatos, cloruros y silicatos.

Elementos como el hierro, selenio, plomo y mercurio pueden volatilizarse parcialmente con este procedimiento (si se requiere de un análisis elemental se tiene que recurrir a otro método).

**a) Materiales**

- Muestra de harina entera y harina refinada
- Crisol de porcelana.
- Mortero
- Desecador, con desecante de perclorato de magnesio ó silicagel.

**b) Equipos de laboratorio**

- Homo de incineración (Mufla).
- Balanza analítica de precisión.

**c) Procedimiento del método en seco**

- Coloque el crisol limpio en un horno de incineración a 600°C durante una hora. Luego traslade el crisol del homo al desecador y enfríelo a la temperatura del laboratorio. Péselos tan pronto como sea posible para prevenir la adsorción de humedad, usando siempre pinzas de metal para manejar los crisoles después de que incineran o secan. (P<sub>1</sub>):.....g
- Pese 1,5 a 2,0 g de muestra sobre el peso de crisol (P<sub>2</sub>). Colóquelo en un horno incinerador y manténgalo a temperatura de 600°C durante 3 a 5 horas. (P<sub>2</sub>):.....g
- Luego se saca de la mufla y se traslada el crisol a un desecador para enfriarse a temperatura ambiente. Cuando este frío, pese el crisol tan pronto como sea posible para prevenir la absorción de humedad y registre el peso (P<sub>3</sub>). (P<sub>3</sub>):.....g

**d) Cálculo**

$$\text{g de ceniza} = P_3 - P_1$$

Porcentaje de ceniza (%)

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{p_3 - p_1}{p_2 - p_1} \times 100$$

P1: peso de crisol vacío

P2: peso de crisol + peso de la muestra



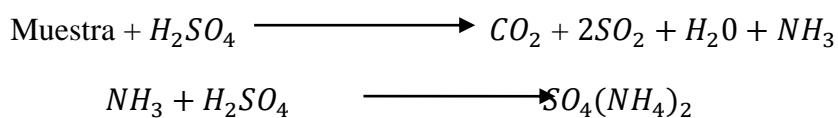
p3: peso de crisol vacío + ceniza

### 3. DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:

#### a) Digestión.

Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por ebullición con ácido sulfúrico concentrado y en presencia de catalizadores metálicos, la materia orgánica se oxida a  $CO_2$  y  $H_2O$ , mientras que la parte de ácido se reduce a  $SO_2$



#### b) Destilación.

Mediante esta operación el nitrógeno que está en forma de sulfato de amonio, se ataca con un álcali fuerte que es la soda cáustica (NaOH) para liberar el amoniaco y después de la condensación lograda con la parte del refrigerante, el hidrato de amonio se recibe en un vaso precipitado.

El vaso de precipitado contiene: ácido bórico, con los siguientes indicadores (Tashiro) de pH rojo de metilo y verde de bromo cresol, formándose borato de amonio en el vaso.

#### c) Titulación.

Se hace con ácido sulfúrico ó clorhídrico de normalidad conocida, el ácido clorhídrico reacciona con el borato de amonio. En el punto final ya no hay borato de amonio y un pequeño exceso de ácido clorhídrico provocará un cambio de pH y por consiguiente el viraje de la mezcla (verde a rosado)

El siguiente procedimiento para Macro Kjeldahl corresponde básicamente al de la AOAC.

**d) Materiales y métodos**

- Balanza analítica
- Balón de Kjeldahl de 250 mL.
- Calefactor eléctrico. Para efectuar la digestión.
- Equipo de destilación.
- Acido sulfúrico (d:1.84) Exento de nitrógeno
- Sulfato de cobre.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Mortero
- Tamiz

**e) Preparación de los reactivos**

- a) Mezcla catalizadora: Se usa  $\text{SO}_4\text{Cu}$  y el  $\text{SO}_4\text{K}_2$  en la siguiente relación ( $\text{SO}_4\text{Cu}$ : 0.25 g; y el  $\text{SO}_4\text{K}_2$ : 1.0 g) ambos previamente triturados mediante un mortero.
- b) Solución 0,05 N de ácido clorhídrico o sulfúrico. Diluir 8.5 mL de HCl concentrado en un volumen de 2 Lt., posteriormente estandarizar con carbonato de sodio previamente secado.
- c) Solución de hidróxido de sodio 0,1 N.- La normalidad debe controlarse periódicamente.
- d) Solución de hidróxido de sodio al 80% (p/v): se pesa 80 g de hidróxido de sodio (NaOH), en un volumen de 100 mL de agua destilada fría por separados. Cuidado que produce una reacción exotérmica (produce calor violento). Hacer esto en una campana de extracción y enfriarla con hielo en una cubeta y almacenarla en un frasco de polietileno.
- e) Indicador: “solución mixta” para 250 mL

- Esta contiene: ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) -----10 gramos
  - 0.1 % Rojo de metilo (indicador pH) -----5 mL
  - 1 % Verde bromocresol (ind. PH) -----2 mL.
  - El ( $H_3BO_3$ ) se diluye primero en agua caliente luego se enfría a temperatura ambiente ya que si se fuerza empieza a precipitar, posteriormente se le adiciona los indicadores y se enraza al volumen.
  - 0.1 % Rojo de metilo: 0.1 g y enraza con alcohol etílico a 100 mL.
  - 1 % verde bromocresol: 1 g y enraza a 100 mL con alcohol etílico.
- NOTA: Los indicadores en solución no deben permanecer mas de 3 meses guardados ya que comienzan a bajar su concentración (se vencen).

## 6. Procedimiento de análisis (Método Kjeldahl recomendado por la AOAC)

### a) Digestión

- Las muestras deben ser molidas previamente lo más fino posible.
- De acuerdo al contenido de nitrógeno, se pesa una porción de la muestra preparada que contenga 0.2 - 0,3 g de muestra, luego agregar 1 g del catalizador de oxidación (mezcla de sulfato de potasio: 1g y sulfato de cobre:0,25g) para acelerar la reacción agregar 2.5 a 3.0 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Colocar el balón de digestión en la cocina y calentar en forma suave el matraz en posición inclinada hasta que deje de hacer espuma. Después se mantiene una ebullición enérgica durante dos horas. Se deja enfriar. La digestión termina cuando el contenido del balón está completamente cristalino (si es necesario añadir gotas de peróxido) es cuando la digestión es muy lenta y difícil.

### b) Destilación

- Enfriar al aire, agregar 5 mL de agua destilada.

- Pasar el contenido del balón digestor al destilador y haciendo un lavado al balón con 5 a 10 mL de agua y luego agregar 5 mL de la solución de NaOH al 80% con sumo cuidado y cerrar la válvula (en copa debe quedar una pequeña cantidad de NaOH ).
- Conectar el refrigerante y recibir el destilado en un erlemeyer de 125 mL conteniendo 5 mL de la mezcla de ácido bórico más indicador de pH. La destilación termina cuando ya no pasa más amoníaco y luego de 7 min titular con ácido clorhídrico valorado (aprox 0.05N) y anotar el gasto.
- NOTA: En destilación tomar tiempo cuando empieza a virar de rojo a verde 7 minutos y termina la destilación.

#### c) Titulación

La muestra recibida en el vaso con la solución de ácido bórico valorar con ácido clorhídrico 0.05N y tomar nota del gasto de HCl obtenido.

#### d) Cálculos

$$\%N_2 = \text{mL de HCl} \times \text{Normalidad} \times \text{meq.del N}_2 \times 100 / \text{g (muestra)}$$

$$\%N_2 = \text{mL de HCl} \times 0,05 \times 0,014 \times 100 / \text{g (muestra)}$$

$$\% \text{ Proteína bruta} = \%N_2 \times \text{Factor}$$

### 4. DETERMINACION DE LIPIDOS

#### a) Extracción por solventes en caliente.- Soxhlet método de la A.O.A.C.(1998).

- En este método es necesario usar muestras deshidratadas, usar las muestras usadas en determinación de humedad.
- El balón del soxhlet lavar y poner a secar en la estufa a 110°C por espacio de una hora, sacarlo, enfriar en un desecador y pesar (P1).

- Pesar 3 g de muestra y empaquetarlo en papel filtro Wattman n° 2. y luego pesar (P2).
- El paquete se coloca en el cuerpo del soxhlet.
- Agregar n – hexano destilado hasta que una parte del mismo sea sifoneado hacia el matraz.
- Conectar la cocina a temperatura baja. El hexano al calentarse se evapora (69-34.6°C) y asciende hacia la parte superior del cuerpo donde se condensa por refrigeración con agua y cae sobre la muestra, regresando posteriormente al matraz por el sifón, arrastrando consigo la grasa. El ciclo es cerrado y la velocidad de goteo del n – hexano debe ser de 30 a 40 gotas por minuto. El proceso dura 3 horas.
- El matraz debe sacarse del aparato cuando contiene poco hexano (momentos antes de que éste sea sifoneado desde el cuerpo).
- Evaporar el matraz en un desecador con silicagel o estufa a temperatura de 60°C.
- Pesar el balón que tiene grasa (P3).
- Determinar la cantidad de grasa total en 3 g de muestra y expresarlo en porcentaje.
- Para verificación el cartucho debe secarse en estufa a 100°C y luego ser pesado (P4) y comprobar:

**b) Cálculos**

$$\% \text{ grasa} = \frac{p_3 - p_1}{g(\text{muestras})} \times 100$$

**5. DETERMINACION DE FIBRA BRUTA**

Procedimiento para fibra bruta (Método de la A.O.A.C.)

**a) Digestión ácida**

- Pesar 3 g de muestra (exenta de grasa) en un vaso de 600 mL.
- Añadir 200 mL de ácido sulfúrico al 1,25% (P/V)

- Hervir suavemente durante 30 minutos
- Filtrar el contenido del balón haciendo uso del embudo Buchner y el kitasato.
- Filtrar y lavar con agua destilada caliente neutralizar la acidez

#### **b) Digestión alcalina**

- Arrastrar la muestra que queda en el filtro hacia el erlemeyer utilizando NaOH al 1,25% (p/v) más o menos 200 mL.
- Hervir exactamente 30 minutos, con el mismo cuidado que en la ebullición con ácido.
- Filtrar el contenido del erlemeyer, Lavando con agua destilada hirviendo
- Lavar dos veces con alcohol y tres veces con acetona.
- Desechar a 100 °C en estufa por 2 horas.
- Pesar el crisol vacío (p1)
- Colocar la muestra en un crisol
- Secar a 105°C durante 3 horas. Enfriar el crisol en desecador y volver a pesar crisol mas muestra. (P2).
- Incinerar a 600°C y luego enfriar y pesar la ceniza.

#### **c) Cálculos**

Gramo de muestra =  $(p_2 - p_1)$ - peso de ceniza

$$\% \text{ Fibra bruta} = \frac{(p_2 - p_1) - \text{peso de ceniza}}{\text{peso muestra}}$$