Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L.*) mediante simultánea sacarificación (pululanasa-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTORES

Sofía Vanessa Huamán Quillay

Ligia Elizabeth Reyes Juarez

ASESOR

Roberto Jhalver Vega Paulino

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huamán, S. & Reyes, L. (2024). *Síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del almidón de cebada forrajera (Hordeum vulgare L.) mediante simultánea sacarificación (pululanasa-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Sofía Vanessa Huamán Quillay
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73006547
URL de ORCID	No aplica
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	Ligia Elizabeth Reyes Juarez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47900614
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor I	
Nombres y apellidos	Roberto Jhalver Vega Paulino
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40556214
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1231-4029
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08675623
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnábar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	20904674
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Walter Rivas Altez
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	09238422
Datos de investigación	
Línea de investigación	Microorganismos de interés sanitario, industrial, ambiental y bioprocesos. Enzimas y fermentaciones.
Grupo de investigación	Procesos Biotecnológicos Y Alimentarios (PROBIAL)
Agencia de financiamiento	PCONFIGI-2023. RR N°03202-R-18 CODIGO DE PROYECTO A18040061
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: UNMSM- Laboratorio del grupo de investigación de Procesos Biotecnológicos y Alimentarios “PROBIAL” País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Jr. Puno N° 1002 Latitud: -12.05777778 Longitud: -77.02305556 Edificio 2: UNT- Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes Departamento: La Libertad Provincia: Trujillo Calle: Jr. Diego de Almagro 344 Latitud: -8.114656 Longitud: -79.038595 Edificio 3: Universidad Nacional de Santa. Departamento: Ancash. Provincia: Santa Distrito: Nuevo Chimbote Av. Pacífico 508 Latitud: -9.12135 Longitud: -78.51271

Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2024
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología agrícola, biotecnología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L.*) mediante simultánea sacarificación (pululanasa-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario

Que presentan las Bachilleres en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

SOFÍA VANESSA HUAMÁN QUILLAY Y
LIGIA ELIZABETH REYES JUAREZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECIOCHO (18) - APROBADO CON MENCIÓN HONROSA

en conformidad con el Art. 34.° del Reglamento para la obtención Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 03 de diciembre de 2024.

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidente

Dra. Carmen Gladys Peña Suasnabar
Miembro

Mg. Walter Rivas Altez
Miembro

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Roberto Jhalver Vega Paulino en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 00058-FFB-D-2019 de la tesis de investigación, cuyo título es **Síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare* L.) mediante simultánea sacarificación (pululanasa-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario**, presentado por las egresadas Sofía Vanessa Huamán Quillay y Ligia Elizabeth Reyes Juarez para optar el título profesional de Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 5% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**
Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.



Firma del Asesor _____

DNI: 40556214

Nombres y Apellidos del Asesor: Roberto Jhalver Vega Paulino

____24____/____10____/__2024_____
Fecha

DEDICATORIA

A mis padres Hilda y Hubert por su sacrificio y apoyo incondicional brindado durante toda esta etapa de vida profesional.

A mis hermanos Fernando y Andrés por su cariño y motivación brindada

A mí querida compañera de tesis Elizabeth por su paciencia y dedicación en la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros por su apoyo y motivación constante.

A mi familia que siempre estuvo pendiente de mí y del proceso de desarrollo de este trabajo de investigación.

Sofía Huamán.

A Dios por permitirme terminar una etapa anhelada en mi vida profesional.

A mi querida madre Eudocia, por estar siempre motivándome a ser mejor persona cada día, por su comprensión y paciencia conmigo.

A mis hermanos Jimmy, Jairo y Lizardo que siempre los llevo conmigo y son el mejor ejemplo a seguir.

A mi quería compañera de tesis Sofía por la compresión y apoyo durante este proceso.

A mis familiares y amigos que me brindaron sus ánimos para lograr esta meta.

Elizabeth Reyes

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarnos y darnos la fortaleza necesaria para culminar este trabajo y por poner en nuestro camino a personas muy valiosas que han sido de gran ayuda para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, nuestra querida Alma Mater, a los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y a la Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos por orientarnos a ser buenos profesionales y formamos como profesionales competitivos en ciencias de los alimentos.

A nuestro asesor de tesis al Dr. Roberto Vega Paulino por su constante apoyo, guiándonos en cada etapa de este proceso con su valioso conocimiento brindado y motivándonos a seguir investigando.

Al equipo del Departamento de Bioquímica, Mg. Gloria Gordillo Rocha y colaboradores, por el apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis, que nos abrieron las puertas de los laboratorios y nos acogieron con mucho cariño.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, Dr. Medardo Quezada Álvarez e Ing. Anthony Fuentes Olivera por permitirnos trabajar y hacer uso del equipo de HPLC.

A todos nuestros amigos y compañeros por sus buenos consejos, por brindarnos su ánimo y motivación en todo momento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS ..... **XII**

LISTA DE FIGURAS ..... **XIII**

LISTA DE TABLAS ..... **XVII**

RESUMEN ..... **XVIII**

SUMMARY ..... **XIX**

I. INTRODUCCIÓN **1**

I.1. Planteamiento del problema **2**

I.2. Objetivos **3**

I.2.1. Objetivo general **3**

I.2.2. Objetivos específicos **3**

I.3. Importancia y alcance de la investigación **3**

I.4. Limitaciones de la investigación **4**

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA **5**

II.1. Marco teórico **5**

II.1.1. La cebada (*Hordeum vulgare L)* **5**

II.1.2. Variedades de cebada **5**

II.1.3. Características fisicoquímicas del almidón de cebada **7**

II.1.3.1. Composición química **7**

II.1.3.2. Producción y uso **8**

II.1.4. Prebióticos **9**

II.1.4.1. Oligosacáridos no digeribles **9**

II.1.4.1.1. Propiedades fisicoquímicas **10**

II.1.4.1.2. Propiedades fisiológicas **10**

II.1.4.1.3. Producción comercial **11**

II.1.5.2. Principales oligosacáridos **11**

II.1.6. Isomaltooligosacáridos **13**

II.1.6.1. Estructura química de los IMOs **13**

II.1.6.2. Características **14**

II.1.6.3. Aplicaciones de los IMOs 14
II.2. Antecedentes del estudio 18
II.3. Bases teóricas 23
II.3.1. α-amilasa 23
II.3.2. α-amilasa maltogénica 23
II.3.3. Pululanasa 24
II.3.4. Producción de isomaltooligosacáridos 25
II.3.4.1. Biotransformación 25
II.3.4.2. Síntesis enzimática de IMOs 25
II.3.4.2.1. Consecutiva sacarificación y transglucosilación 27
II.3.4.2.2. Simultánea sacarificación y transglucosilación 27
II.3.5. Mecanismos de transglucosilación de enzimas 28
II.3.5.1. Glicosidasas 28
II.3.5.1.1. α-glucosidasa 29
II.4. Glosario de términos 31
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 33
III.1. Hipótesis 33
III.2. Variables 33
MATERIALES Y MÉTODOS 35
IV.1. Área de estudio 35
IV.2. Diseño de investigación 35
IV.3. Muestra 35
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información 35
IV.4.1. Materiales, equipos y reactivos 35
IV.4.2. Metodología experimental 40
IV.4.2.1. Esquema de desarrollo experimental 40
IV.4.2.2. Recolección de la materia prima. 41
IV.4.2.3. Extracción y purificación del almidón de cebada 41
IV.4.2.4. Gelatinización del almidón 43
IV.4.2.5. Determinación de la actividad enzimática 43

IV.4.2.5.1. Ensayo de la actividad de α-amilasa termoestable (Termamyl 300L) 43

IV.4.2.5.2. Ensayo de la actividad de pululanasa (Promozyme D2) 43

IV.4.2.5.3. Ensayo de actividad de la amilasa maltogénica (Bakezyme Mam 10.000)....44

IV.4.2.5.4. Ensayo de la actividad de α-glucosidasa (Transglucosidase L) 44

IV.4.2.6. Licuefacción de almidón de cebada forrajera....47

IV.4.2.7. Simultánea sacarificación y transglucosilación....48

IV.4.3. Diseño experimental....48

IV.4.3.1. Diseño experimental fraccionado 2^{5-1}....48

IV.4.3.2. Diseño compuesto central rotacional....51

IV.4.4. Metodología analítica....53

IV.4.4.1. Análisis próximal....53

IV.4.4.2. Análisis de azúcares reductores....53

IV.4.4.3. Análisis de glucosa....53

IV.4.4.4. Determinación de materia seca....54

IV.4.4.5. Análisis de carbohidratos por HPLC....54

IV.5. Análisis estadístico....54

V. RESULTADOS....55

V.1. Extracción y purificación del almidón....55

V.2. Composición próximal del almidón....56

V.3. Determinación de las actividades enzimáticas....56

V.4. Licuefacción de almidón....59

V.5. Evaluación del comportamiento de las enzimas para realizar las reacciones de sacarificación....61

V.6. Diseño factorial fraccionado 2^{5-1}....64

V.7. Diseño factorial completo 2^4....68

V.8. Trayectoria del ascenso más pronunciado....77

V.9. Diseño compuesto central rotacional....79

V.10. Función de deseabilidad para la optimización simultánea de múltiples respuestas. 87

VI. DISCUSIÓN 91

VII. CONCLUSIONES 111

VIII. RECOMENDACIONES 112

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 113

X. ANEXOS 126

ANEXO 1. Fichas técnicas de las preparaciones enzimáticas comerciales (Transglucosidase L, Termamyl 300L, Bakezyme MAM 10.000 y Promozyme D2. 126

ANEXO 2. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}. 136

Anexo 2a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.....136

Anexo 2b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.....137

Anexo 2c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}. 138

ANEXO 3. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial completo 2^4.....139

Anexo 3a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño factorial completo 2^4. 139

Anexo 3b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño factorial completo 2^4. 140

Anexo 3c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño factorial completo 2^4. 141

ANEXO 4. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial completo 2^4. 142

Anexo 4a. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta $Y_{P/S}$ en el diseño factorial completo 2^4. 142

Anexo 4b. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta S_i en el diseño factorial completo 2^4. 143

Anexo 4c. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta Q_P en el diseño factorial completo 2^4. 143

ANEXO 5. Cálculos para determinar la trayectoria del ascenso más pronunciado de la respuesta $Y_{P/S}$. 144

ANEXO 6. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño compuesto central rotacional. 145

Anexo 6a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño compuesto central rotacional. 145

Anexo 6b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño compuesto central rotacional. 146

Anexo 6c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño compuesto central rotacional. 147

ANEXO 7. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño compuesto central rotacional. 148

Anexo 7a. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta $Y_{P/S}$ en el diseño compuesto central rotacional. 148

Anexo 7b. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta S_i en el diseño compuesto central rotacional. 149

Anexo 7c. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta Q_P en el diseño compuesto central rotacional. 149

ANEXO 8. Cromatograma de resultados en la síntesis de IMOs. 150

ANEXO 9. Deseabilidad general.....151

Anexo 10. Aspectos técnicos.....152

ABREVIATURAS

IMOs: Isomaltooligosacáridos

OND: Oligosacáridos no digeribles

GP: Grado de polimerización

SST: Simultánea sacarificación y transglucosilación

CST: Consecutiva sacarificación y transglucosilación

GOS: Glucooligosacáridos

FOS: Fructooligosacáridos

XOS: Xilooligosacáridos

SOS: Oligosacáridos de soya

MMC: Maltosilmaltosa cíclica

CTS: Tetraoligosacáridos cíclicos

BR: Arroz partido

PPW: Residuos del procesamiento de papa

GRAS: Generalmente reconocido como seguro

FDA: Food and Drug Administration

EFSA: European Food Safety Authority

FSANZ: Food Standards Australia New Zealand

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

CAD: Charged Aerosol Detector

ED: Equivalente Dextrosa

CGTase: ciclodextrina glucosiltransferasa

$Y_{P/S}$: Rendimiento de isomaltooligosacáridos

Si: Selectividad de isomaltotriosa

Q_P: Productividad volumétrica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los procesos de producción de oligosacáridos prebióticos. 12

Figura 2. Estructuras de los isomaltooligosacáridos. Los residuos de glucosilo están unidos a la maltosa o isomaltosa por enlaces glicosídicos α-(1,6), la panosa presenta enlace α-(1,6) y α-(1,4). 13

Figura 3. Mecanismo de acción de enzimas transglucosidasas y glucosidasas. 30

Figura 4. Esquema de la metodología experimental aplicada. 40

Figura 5. Esquema para la obtención de almidón de cebada forrajera purificado.....42

Figura 6. Proceso de extracción y purificación de almidón. (a) Grano de cebada forrajera, (b) harina de cebada, (c) suspensión de almidón de cebada, (d) filtración y lavado alcalino de suspensión de almidón, (e) suspensión neutra de almidón, (f) almidón purificado. 55

Figura 7. Liberación de azúcares reductores en función del tiempo de reacción catalizada por preparaciones enzimáticas comerciales de (a) α-amilasa termoestable Termamyl 300L, (b) pululanasa Promozyme D2 y (c) amilasa maltogénica Bakezyme MAM 10.000. 58

Figura 8. Liberación de azúcares glucosa y formación de panosa y maltotriosa en función del tiempo de reacción catalizada por la preparación enzimática comercial Transglucosidase L. 59

Figura 9. Valor ED frente a diferentes periodos de licuefacción de almidón al 40% (p/v) con 16.9 UI/mL Rx de α-amilasa comercial de *Bacillus licheniformis* denominada Termamyl 300L. 60

Figura 10. Actividad de enzima α-amilasa comercial de *Bacillus licheniformis,* denominada Termamyl 300L, por mililitro de reacción frente a diferentes concentraciones de almidón.....61

Figura 11. Formación de azúcares reductores a diferentes concentraciones de Promozyme D2 durante la sacarificación del almidón licuado proveniente de una suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v). 62

Figura 12. Formación de maltosa a diferentes concentraciones de Bakezyme Mam 10.000 durante la sacarificación del almidón licuado tratado con pululanasa proveniente de una suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v). (trat. pul.= tratado con pululanasa).....63

Figura 13. Gráfica de probabilidad normal de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} sobre: sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.) 66

Figura 14. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.) 67

Figura 15. Gráfica de probabilidad normal de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^4 sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.) 70

Figura 16. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial completo 2^4 sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.) 71

Figura 17. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta rendimiento en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4. En función de Bakezyme MAM 10.000 y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y temperatura =50 °C (a), almidón inicial y Transglucosidase L, Bakezyme MAM 10.000= 100 UI/g almidón licuado b.s y temperatura = 50 °C (b),

temperatura y Transglucosidase L, almidón inicial = 30 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000= 100 UI/g almidón licuado b.s (c). 74

Figura 18. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta selectividad de isomaltotriosa en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, Bakezyme MAM 10.000= 60 UI/g almidón licuado b.s y temperatura = 50 °C (a), temperatura y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y Bakezyme MAM 10.000= 60 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y temperatura, almidón inicial = 40 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 60 UI/g almidón licuado b.s (c). 75

Figura 19. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta productividad volumétrica en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4. En función de Bakezyme MAM 10.000 y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y temperatura = 55 °C (a), Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 55 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 100 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y Bakezyme MAM 10.000, temperatura = 55 °C y almidón inicial = 40 % (p/v) (c). 76

Figura 20. Rendimiento contra pasos sobre la trayectoria del ascenso más pronunciado. 78

Figura 21. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño compuesto central rotacional sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.) 82

Figura 22. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta rendimiento en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional. En función de Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, almidón inicial = 34 % (p/v) y temperatura = 52 °C (a), temperatura y Transglucosidase L, almidón inicial = 34 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (b), Bakezyme MAM 10.000 y temperatura, almidón inicial = 34 % (p/v) y Transglucosidase L = 11.5 U_T/g almidón licuado b.s (c). 84

Figura 23. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta selectividad de isomaltotriosa en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 52 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (a), Transglucosidase L y temperatura, almidón inicial = 34 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y Bakezyme MAM 10.000, temperatura = 52 °C y almidón inicial = 34 % (p/v) (c). 85

Figura 24. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta productividad volumétrica en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 52 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (a), Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, temperatura = 52 °C y almidón inicial = 34 % (p/v) (b), temperatura y almidón inicial, Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s y Transglucosidase L = 11.5 U_T/g almidón licuado b.s (c). 86

Figura 25. Curso del tiempo de la síntesis de IMOs catalizada por la simultánea sacarificación y transglucosilación de preparaciones enzimáticas comerciales bajo condiciones óptimas previstas para la función de deseabilidad general. 90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aplicación y cantidad máxima recomendada de IMOs agregados en varios alimentos.....16

Tabla 2. Enzimas y sustratos usados para la producción de IMOs.....26

Tabla 3. Valores de las variables independientes en los niveles del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.....49

Tabla 4. Matriz experimental del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.....50

Tabla 5. Valores de las variables independientes en los diferentes niveles del diseño compuesto central rotacional. 51

Tabla 6. Matriz experimental del diseño compuesto central rotacional. 52

Tabla 7. Composición proximal del almidón de cebada forrajera.....56

Tabla 8. Actividades enzimáticas de las preparaciones comerciales.....57

Tabla 9. Tiempos de licuefacción y dosis de enzima Termamyl 300L para alcanzar un ED entre 6 y 7. 60

Tabla 10. Resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.....64

Tabla 11. Resultados del diseño factorial completo 2^4.....68

Tabla 12. Experimentos del ascenso más pronunciado.....78

Tabla 13. Resultados del diseño compuesto central rotacional 80

Tabla 14. Resultados de la optimización simultánea de múltiples variables. 88

Tabla 15. Resultados la validación experimental a las 24 h de tiempo de reacción...88

RESUMEN

Los isomaltooligosacáridos (IMOs) son ingredientes alimentarios que han incrementado su demanda por sus propiedades tecnológicas y funcionales. El objetivo de este estudio fue la síntesis de IMOs a partir de almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L*.) mediante simultánea sacarificación y transglucosilación con enzimas de grado alimentario.

En una primera etapa se licuó el almidón de cebada (UNA La Molina-96) utilizando almidón entre 28 y 40% (p/v) y la enzima Termamyl 300L entre 11.8 y 16.9 UI/mL. El tiempo para alcanzar un equivalente de dextrosa entre 6 y 7 estuvo entre 46 y 50 minutos. Posteriormente, se realizó la simultánea sacarificación y transglucosilación del almidón licuado. Las variables de estudio fueron: almidón inicial %(p/v), Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s.), Bakezyme Mam 10.000 (UI/g almidón licuado b.s), Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.) y temperatura (°C). Se utilizó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1}, resultando que Promozyme D2 no tiene un efecto significativo ($p<0.05$). Luego, se aplicó un diseño compuesto central rotacional 2^4 para determinar las ecuaciones polinómicas de las variables dependientes en función de las independientes. La optimización se realizó utilizando una función de deseabilidad global, lográndose un rendimiento de 50.4 ± 0.03 % (p/p), selectividad de isomaltotriosa de 36.1 ± 0.7 % (p/p) y productividad de 7.1 ± 0.004 g/L.h a las 24 horas de reacción.

La síntesis de IMOs a partir de almidón de cebada ofrece una alternativa para su revalorización y es posible su optimización alcanzando rendimientos semejantes a los reportados con otras fuentes de almidón.

Palabras clave: Isomaltooligosacáridos, almidón de cebada, síntesis, deseabilidad.

SUMMARY

Isomaltooligosaccharides (IMOs) are food ingredients that have increased in demand due to their technological and functional properties. The aim of this study was the synthesis of IMOs from barley starch (Hordeum vulgare L.) by simultaneous saccharification and transglucosylation with food-grade enzymes.

In a first stage, barley starch (UNA La Molina-96) was liquefied using starch between 28 and 40% (w/v) and the Termamyl 300L enzyme between 11.8 and 16.9 IU/mL. The time to reach a dextrose equivalent between 6 and 7 was between 46 and 50 minutes. Subsequently, simultaneous saccharification and transglucosylation of the liquefied starch was performed. The study variables were: initial starch % (w/v), Promozyme D2 (IU/g liquefied starch b.s.), Bakezyme Mam 10,000 (IU/g liquefied starch b.s.), Transglucosidase L (TU/g liquefied starch b.s.) and temperature (°C). A 2^{5-1} fractional factorial design was used, resulting in Promozyme D2 having no significant effect ($p<0.05$). Then, a 2^4 rotational central composite design was applied to determine the polynomial equations of the dependent variables as a function of the independent ones. The optimization was performed using a global desirability function, achieving a yield of 50.4 ± 0.03 % (w/w), isomaltotriose selectivity of 36.1 ± 0.7 % (w/w) and productivity of 7.1 ± 0.004 g/L.h after 24 hours of reaction.

The synthesis of IMOs from barley starch offers an alternative for its revalorization and its optimization is possible, reaching yields similar to those reported with other starch sources.

Keywords: Isomaltooligosaccharides, barley starch, synthesis, desirability.

I. INTRODUCCIÓN

Los isomaltooligosacáridos (IMOs) son oligodextranos cuyas unidades de glucosa están unidas por enlace glicosídico α-(1,6) y pueden incluir enlaces α-(1,4), α-(1,2) o α-(1,3).[1-3] Comercialmente, están compuestos de isomaltosa, panosa e isomaltotriosa.[4] La producción de los IMOs se realiza a partir del almidón utilizando una combinación de enzimas en un proceso convencional de tres pasos. En primer lugar, el almidón es licuado por una α-amilasa termoestable. Luego, sigue la sacarificación por una pululanasa y/o β-amilasa para producir y acumular maltosa. El tercer paso es la transglucosilación catalizada por una α- glucosidasa para formar los enlaces α-(1,6) entre las unidades de glucosa.[5] Sin embargo, este proceso enzimático resulta muy costoso en términos de rendimiento y tiempo de procesamiento (productividad volumétrica).[1]

Actualmente, los jarabes de IMOs se utilizan como ingrediente de alimentos funcionales. Así, se incluye en muchos productos comerciales disponibles en Estados Unidos, Europa y Japón, tales como, barras de proteínas-fibra, batidos y otros suplementos dietéticos.[3] En los últimos años, la demanda de IMOs ha experimentado un crecimiento en el mercado, debido a las funciones como edulcorante bajo en calorías, prebióticas y por su estabilidad en el procesamiento de alimentos.[6] La biotecnología permite obtener nuevos y mejores ingredientes alimenticios. Por ello, el presente estudio se enfoca en la producción de jarabe de isomaltooligosacáridos (IMOs) a partir del almidón de cebada forrajera, ya que existe un creciente interés en usarlos como ingredientes de alimentos funcionales debido a sus efectos benéficos sobre la salud, además de mejorar la calidad fisicoquímica de los productos alimenticios.[1] El almidón de cebada es aproximadamente 65 % (p/p) del grano y en el Perú se destina a la alimentación animal; por lo que se propone una alternativa de valorización en un producto de síntesis.

I.1. Planteamiento del problema

En Asia, Estados Unidos, Europa, Australia-Nueva Zelanda y Canadá la demanda de alimentos funcionales ha generado diversos desafíos a nivel académico como industrial mejorando la tecnología de producción de IMOs.[1,2,7] Una problemática resulta en el alto costo en términos de rendimiento y tiempo de la producción convencional de los IMOs,[8] porque emplea tres pasos que consisten en la licuefacción, sacarificación y transglucosilación.[5]

En el Perú, hay poca investigación relacionada a la síntesis enzimática sostenible de oligosacáridos. Los IMOs pueden ser sintetizados a partir de diversas fuentes de almidón, principalmente del maíz.[9] Sin embargo, estas fuentes son alimentos de pan llevar, por lo que se debe evitar la utilización de estos alimentos como fuente de almidón para la producción industrial de IMOs. La elección de la fuente de almidón más adecuada es un factor crítico en términos de disponibilidad, costo y sostenibilidad. El Perú es un país rico en variedad de recursos naturales, es así que existen diversas fuentes de almidón. Sin embargo, la cebada forrajera (*Hordeum vulgare L.*), enfrenta un decrecimiento de áreas cultivadas y pasó de 22 137 hectáreas en el periodo agosto-julio 2017-2018 a 19 226 hectáreas en el 2018-2019.[10] Hay regiones alto andinas donde el cultivo de la cebada resulta ser apreciable, por ser un cultivo rústico, de ciclo vegetativo corto, con gran capacidad de adaptación, de buen rendimiento en condiciones agrestes y por requerir un nivel tecnológico tradicional.[11] El almidón de cebada es aproximadamente 65 % (p/p) del peso seco del grano y en el Perú se destina a la alimentación animal.[12,13,14] Por lo que, se convierte en una materia prima interesante y crea una oportunidad para revalorizar a la cebada forrajera, lo que podría mejorar la sostenibilidad de la producción.

Por lo tanto, se hace necesario investigar ¿Cuáles son las condiciones óptimas de la simultánea sacarificación y transglucosilación para la síntesis de isomaltooligosacáridos a partir de almidón de cebada forrajera con preparaciones enzimáticas comerciales?

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Desarrollar la síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L*) mediante simultánea sacarificación (pululanasa–α-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario.

I.2.2. Objetivos específicos

1. Determinar el tiempo de licuefacción para obtener jarabes de dextrinas con equivalentes dextrosa entre 6 y 7 usando diferentes concentraciones de almidón de cebada forrajera y enzima α-amilasa termoestable.
2. Establecer una efectiva estrategia de síntesis de IMOs a partir del almidón licuado de cebada forrajera mediante simultánea sacarificación (pululanasa– α-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

La cebada forrajera es una fuente rica en almidón, y su utilización para la síntesis de IMOs mediante procesos enzimáticos resulta en la innovación del uso de este recurso comúnmente destinado a la alimentación animal. Permitiendo la revalorización de la cebada forrajera en el país. La investigación también puede fomentar el aumento del cultivo de este recurso.

La investigación es relevante a nivel académico como en aplicaciones industriales, generando un impacto en el área de la biotecnología para obtener nuevos y mejores ingredientes alimenticios.

I.4. Limitaciones de la investigación

Durante el desarrollo de esta investigación, se identificaron algunas limitaciones como la falta de caracterización del porcentaje de amilosa y amilopectina del almidón de cebada, debido a la falta de equipos específicos para su análisis. Lo que hubiera podido brindar información adicional sobre los componentes estructurales del almidón. Otra limitante fue la falta de acceso a equipos avanzados, como el cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a espectrofotometría de masa (HPLC-MS), que hubiera permitido identificar IMOs con grados de polimerización superiores a 4.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. La cebada (*Hordeum vulgare L)*

La cebada (*Hordeum vulgare L*.) es una gramínea perteneciente a la familia *Poaceae* y el género *Hordeum*.[12] Se usa principalmente como alimento para animales y en maltas. En los últimos años, el uso de la cebada en la producción de alimentos ha despertado un interés creciente. Actualmente, es la cuarta cosecha de cereales más importante a nivel mundial, después del trigo, el maíz y el arroz. En el Perú, ocupa el tercer lugar entre los cereales más cultivados.[13]

II.1.2. Variedades de cebada

La cebada está representada principalmente por dos especies cultivadas: *Hordeum distichon L*. (2 hileras), que se emplea para la elaboración de la cerveza, y *Hordeum hexastichon L*. *(6 hileras),* que se usa como forraje para la alimentación animal; ambas especies se pueden agrupar como *Hordeum vulgare L. ssp. Vulgare*.[14]

En la actualidad se tiene diferentes variedades de cebada, las cuales se han adaptado a diferentes pisos altitudinales, éstas se presentan bajo diversas categorías que se encuentran en el mercado, desde básicas hasta comerciales, existiendo variedades como Zapata, Malvinas y la Romana, las cuales son las variedades sembradas por los campesinos de la sierra. Las variedades tales como UNA 80, UNA 95, UNA 96 y centenario, tienen rendimientos entre los 3500 y 7300 Kg/ha con un rendimiento promedio de 4,700 Kg/ha, siendo una alternativa para incrementar la producción, puesto que en el Perú el rendimiento promedio actualmente se estima en 1,283 Kg/ha.[15]

a. Cebada cervecera (Hordeum distichon)

Los registros datan que la variedad *Hordeum distichon* es una variedad utilizada como cebada cervecera. Esto se debe a que los granos de la cebada de dos hileras son mayores y representan mayor uniformidad en su tamaño, además debe de presentar

una regularidad mayor en la germinación, bajo nivel de proteínas y alto poder diastásico. El poder diastásico es a medida de la actividad de las enzimas de la malta para poder romper los carbohidratos complejos en azúcares reducidos.[14]

b. Cebada forrajera (Hordeum hexastichon L.)

La variedad de cebada hexástica o de seis hileras (*Hordeum hexastichon L.)* es un cultivo que se adapta a variados climas y que es afectado por diversos factores y por sus interacciones de las mismas. Es mayormente utilizada para la alimentación de ganado vacuno debido a sus propiedades nutritivas, por tal razón el área del cultivo de cebada forrajera ocupa casi dos tercios del total sembrado.[16]

Las cebadas forrajeras se cultivan principalmente en Norte América y Europa, las formas en las que se consumen son en la alimentación pecuaria: mediante pastoreo, en forraje para henificado o ensilado, uso del grano en dietas de engorde o mediante el uso de la paja como complemento alimenticio, debido a su composición química. El grano de cebada se considera una fuente importante de proteína, carbohidratos y minerales que pueden ser incluidas en las dietas de pequeños rumiantes, ganado monogástrico y aves de corral.[17]

b.1. Características de la Variedad UNA La Molina-96

La cebada UNA La Molina-96 fue desarrollado por el Programa de la UNALM, la cual es la institución encargada de la transferencia y tecnología de producción. Fue liberada para producción comercial en noviembre de 1996.[18]

Las características del cultivo es semiprecoz y de hábito primaveral, espiga entre los 60 y 70 días y madura entre 110-130 días. Es tolerable al acame o tumbado. Las semillas son de tamaño mediano, redondeadas, de cáscara medianamente gruesa, color amarillo claro a oscuro dependiendo de las condiciones climáticas presentes durante su desarrollo. Con buena capacidad de macollamiento, de plantas de color verde claro y con una altura promedio de 90 cm, espigas de 6 hileras, por lo que se considera dentro de la variedad de cebada forrajera, ligeramente inclinadas y de densidad intermedia. Se puede sembrar desde el nivel del mar hasta los 3600 m.s.n.m.

Posee un buen potencial de rendimiento que varía de 3500 a 7300 kg/ha. En campos comerciales de la sierra se obtuvo un rendimiento promedio de 4200 kg/ha. La variedad es resistente a Roya morena (*Puccinia hordei*), Roya amarilla Oidium, mildiu y tolerante a las manchas foliares causadas por *Cochliobolus sativus*.[18]

II.1.3. Características fisicoquímicas del almidón de cebada

El almidón es el componente más abundante en la cebada, estando presente en un 65% del peso seco del grano.[14] A pesar de la disponibilidad del almidón de cebada, se han realizado pocos estudios respecto a sus propiedades funcionales en comparación con los almidones de trigo y maíz.[19]

Los almidones nativos presentan baja resistencia al esfuerzo de corte, susceptibilidad a altas temperaturas y ácidos, son menos solubles y tienen una tendencia a la retrogradación y sinéresis debido a su carácter semicristalino.[20]

II.1.3.1. Composición química

El almidón es un polímero de glucosa que está constituido por la amilosa y amilopectina (una cadena ramificada). La amilosa representa el 17-28% y la amilopectina el 70-80%. Los gránulos de almidón depositados en las células del endospermo se encuentran conformados estructuralmente por amilosa y amilopectina, estos se clasifican según su tamaño, los gránulos grandes de tipo A y los pequeños de tipo B, con diámetros de 10 a 25 μm y menos de 6 μm.[21]

La amilosa es un α-glucano lineal relativamente largo que contiene alrededor del 99 % de los enlaces α-(1,4) y el 1% de enlaces α-(1,6), difiere en tamaño y estructura dependiendo de la botánica de origen.[22] La cebada contiene entre 44-47% de amilosa, mientras que la mayoría de los cereales contiene un 25%. Tiene un grado de polimerización (DP) de 103 Da. El peso molecular promedio en peso de la amilosa de cebada es de 1,03 × 105 g/mol.[23]

La amilopectina es una molécula predominante en los almidones, es un polímero ramificado y es mucho más larga que la amilosa. Se compone de enlaces glucosídicos

en α-(1,4) y α-(1,6).[23.] El peso molecular promedio en peso de la amilopectina de cebada fue de 1,15 × 106 g/mol y un promedio de grado de polimerización de 104 – 105 Da, es una de las moléculas más grandes en la naturaleza, con un número de 20 a 25 unidades de glucosa entre los puntos de ramificación.[24]

Todos los almidones están constituidos de una o ambas de estas moléculas. Sin embargo, la relación de una a otra varía. El almidón de maíz tiene aproximadamente 25-28% de amilosa y el remanente está constituido por amilopectina. La tapioca tiene aproximadamente 17% de amilosa, la patata tiene aproximadamente 20% de amilosa, el trigo tiene aproximadamente 25% de amilosa y el arroz tiene aproximadamente un 19% de amilosa, como puede predecirse, las propiedades con y sin cocción de estos almidones, varían de acuerdo con la relación de amilosa y amilopectina.[25]

II.1.3.2. Producción y uso

La cantidad de almidón de cebada producida en todo el mundo es muy pequeña en comparación al almidón de maíz, trigo, arroz, papa o tapioca.[26] Los concentrados de almidón de cebada que contiene hasta 78 % (b.s.) de almidón se producen en América del Norte. Se obtienen mediante molienda y clasificación por aire. La molienda desintegra el grano en partículas finas y la clasificación por aire los separa en función de las diferencias de densidad y masa, de lo que se obtiene una fracción de bajo rendimiento en proteínas y una fracción de alto rendimiento rica en almidón. Los concentrados de almidón producidos de esta manera se utilizan en formulaciones de alimentos, granulación de alimentos, como adhesivo en papel y para eliminación de arcilla en la industria minera. La presencia de impurezas como proteínas (7 - 10 %), β-glucano (2.5 %) y material de salvado en el concentrado de almidón limita sus aplicaciones en los alimentos.[26]

El almidón de cebada por su concentración de amilosa puede utilizarse en alimentos (en confitería, productos de panadería, snacks, salsas, sopas y producción de cervezas y sistemas alimentarios como espesantes, agente gelificante, agente de carga, aglutinante de agua, estabilizador coloidal, adhesivo, estabilizador de textura y regulador. El almidón con un contenido de amilopectina del 95 al 100% (almidón

ceroso) se utiliza en la industria alimentaria para mejorar las propiedades del producto, como la estabilidad, la textura, la uniformidad, el aumento de la capacidad de hinchamiento y la capacidad de retención del agua, así como mejorar la capacidad de congelación-descongelación de los alimentos. Algunos productos de almidón de cebada se pueden utilizar en alimentos “sin gluten” y “con muy bajo contenido de gluten” si el contenido de gluten restante está por debajo de los niveles establecidos por la legislación de la UE. Sin embargo, debido a la baja resistencia al corte, la resistencia al calor, la degradación térmica y la alta retrogradación, existen limitaciones en el uso del almidón en algunas aplicaciones industriales para ello se realizan modificaciones químicas y físicas del almidón para superar estas deficiencias y cumplir con las propiedades requeridas por la industria. La modificación química de los almidones tiene como objetivo producir espesantes con las propiedades reológicas deseadas durante el almacenamiento y el transporte.[27]

II.1.4. Prebióticos

El concepto prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995 para describir los ingredientes alimentarios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o el metabolismo de la comunidad bacteriana beneficiosa en el intestino, mejorando así el bienestar y la salud del huésped.[28-31]

En principio, cualquier carbohidrato que ingresa al colon puede considerarse potencialmente prebiótico. Una sustancia está calificada como prebiótica si cumple los siguientes criterios: 1) Resistencia a la acidez gástrica, 2) fermentación por la microbiota intestinal y 3) estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de aquellas bacterias intestinales que contribuyen a la salud y el bienestar.[31,32]

II.1.4.1. Oligosacáridos no digeribles

Entre los prebióticos reconocidos están los oligosacáridos no digeribles (OND). Los OND tienen enlaces glicosídicos α y β, cuyo átomo de carbono anomérico (C1 o C2) de las unidades de monosacáridos tienen una configuración en la cual los enlaces glucosídicos no pueden ser hidrolizados por la actividad de las enzimas digestivas

humanas.[32,33] Estos compuestos presentan importantes características fisicoquímicas y propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud por esta razón su uso como ingrediente alimentario ha aumentado rápidamente.[28]

II.1.4.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Los oligosacáridos son solubles en agua y típicamente de 0.3 - 0.6 veces tan dulces como la sacarosa. La dulzura depende de la estructura química, el grado de polimerización de los oligosacáridos presentes y los niveles de mono y disacáridos en la mezcla. La dulzura disminuye con la longitud de la cadena. En el caso de alimentos muy dulces, pueden ser utilizados como agentes de carga en conjunto con edulcorantes artificiales como el aspartamo o la sucralosa, por ejemplo, con la ventaja para enmascarar los gustos producidos por algunos de estos edulcorantes intensos. Además, en comparación con mono- y disacáridos, el mayor peso molecular de oligosacáridos proporciona mayor viscosidad.[34]

Los oligosacáridos también se pueden utilizar para alterar la temperatura de congelación de los alimentos y para controlar la intensidad del pardeamiento no enzimático. También, proporcionan una alta capacidad de retención de humedad, evitando secado excesivo y baja actividad de agua, que es conveniente para controlar la contaminación microbiana.[34] Otra característica de los OND, es el bajo valor calórico que aporta. Se estima que proporcionan entre 1.5 a 2.0 kcal/g, lo cual representa, aproximadamente, 30 - 50% del valor de los carbohidratos digeribles tales como la sacarosa (4.0 kcal/g).[35]

II.1.4.1.2. Propiedades fisiológicas

El cuerpo humano carece de las enzimas necesarias para hidrolizar los enlaces formados entre las unidades de algunos monosacáridos. Esta propiedad hace que los OND sean adecuado para su uso como alimentos dietéticos dulces y bajo en calorías. Además, tienen la capacidad de estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon, lo cual se asocia con un menor riesgo de infecciones y aumento de la motilidad intestinal, y con una mejora en la respuesta del sistema inmunitario. La

fermentación de los OND provoca una disminución del pH intestinal, lo que resulta en una reducción del microbiota patógeno, un aumento de la población de bifidobacterias, y un aumento de la disponibilidad de minerales.[33,36]

II.1.4.1.3. Producción comercial

Los oligosacáridos pueden obtenerse por extracción de fuentes naturales (leche, hortalizas, frutas), y por procesos químicos o biotecnológicos. En el último caso, las estructuras químicas y la composición de los oligosacáridos generados dependen del tipo y fuente de las enzimas, y las condiciones del proceso, incluida la concentración del sustrato.[34,37] Dependiendo del sustrato inicial, la producción de oligosacáridos puede implicar diferentes pasos: La hidrólisis de enlaces glicosídicos que dan lugar a monómeros, seguido de generación de disacáridos y otros oligómeros a través de la acción de las transferasas.[34,38]

Se han establecido procesos de producción industrial para extraer los OND de fuentes naturales, hidrolizando polisacáridos y por síntesis enzimática y química a partir de disacáridos. A excepción de los oligosacáridos de la soya (que se extraen directamente de la fuente) y lactulosa (producida por isomerización), los OND se producen utilizando procesos enzimáticos de transglicosilación (síntesis) o por hidrólisis controlada de polisacáridos, como el almidón o xilano,[35] los cuales suelen producir una gama de oligosacáridos que varían tanto en su grado de polimerización como en los enlaces glicosídicos.

II.1.5.2. Principales oligosacáridos

Los oligosacáridos como los FOSs, GOSs y lactulosa se han estudiado ampliamente por sus efectos prebióticos.[35,39] Sin embargo, otros oligosacáridos no digeribles con evidencia acumulada hasta la fecha son los IMOs, oligosacáridos de soja (SOS), xilooligosacáridos (XOS) y lactosacarosa.[40,41] Todos estos oligosacáridos, junto con los FOSs, GOSs y lactulosa, se reconocen en el sistema japonés de regulación de alimentos funcionales como ingredientes con efectos beneficiosos para la salud. En la **Figura 1** se presenta las fuentes de sustrato más comunes empleados en la

producción de oligosacáridos comerciales utilizados como agentes prebióticos. En general, los oligosacáridos de calidad alimentaria no son productos puros, sino son mezclas que contienen oligosacáridos de diferentes grados de polimerización.[35]

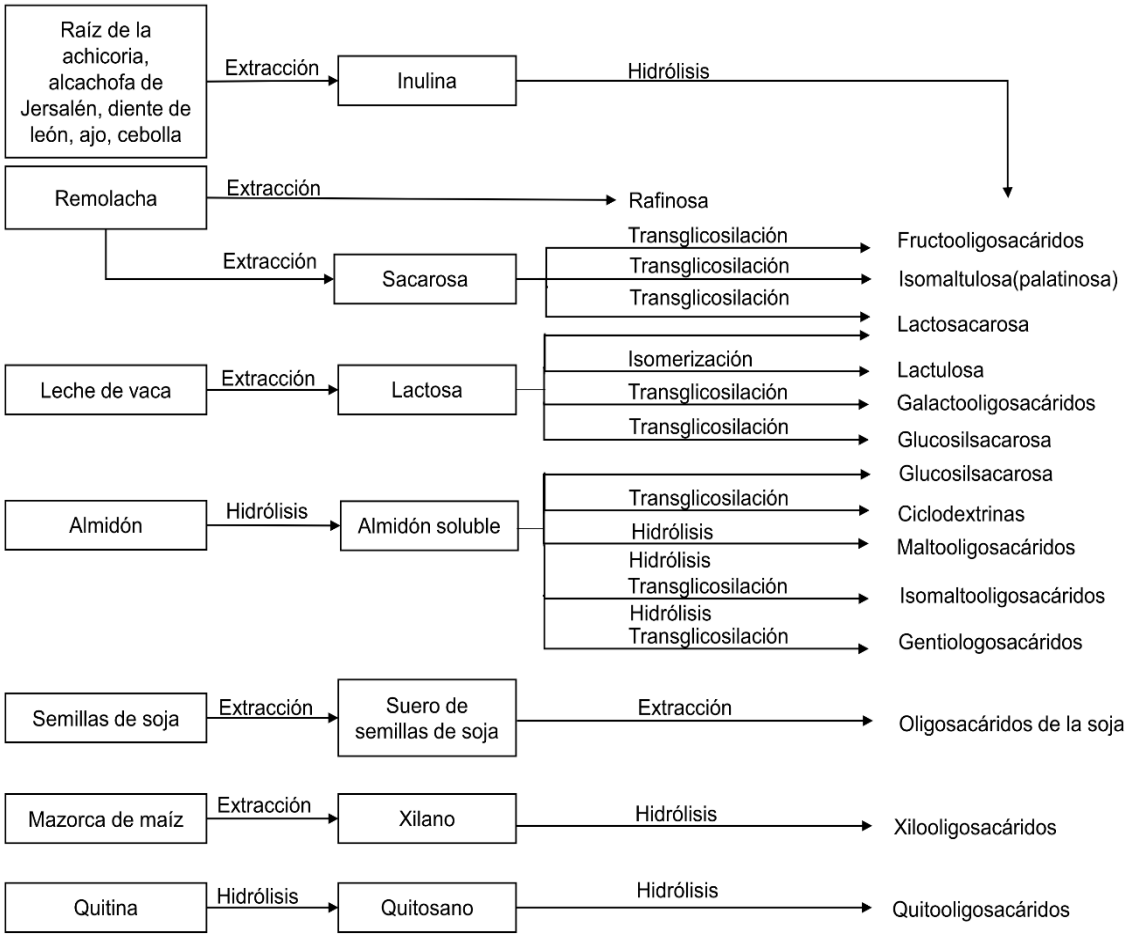


Figura 1. Representación esquemática de los procesos de producción de oligosacáridos prebióticos.

Fuente: Adaptado de Sako *et al*., 1999.[35]

II.1.6. Isomaltooligosacáridos

Los IMOs son un grupo de prebióticos emergentes que están recibiendo una atención creciente a sus diversas funciones biológicas, como la promoción del crecimiento de bifidobacterias en el intestino grueso de humanos y animales y la reducción de la cariogénesis.[41]

II.1.6.1. Estructura química de los IMOs

Los IMOs son una mezcla de oligosacáridos que consisten exclusivamente en enlaces α-(1,6) con un grado de polimerización que varía entre 2 y 10. Además, presentan ocasionalmente enlaces glucosídicos α-(1,4), α-(1,3) y α-(1,2).[1-3] La proporción de los diferentes tipos de enlaces glicosídicos depende del sustrato y el origen de la enzima transglucosidasa.[42,43] La literatura describe a los IMOs lineales y ramificados, entre ellos, la isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, panosa, isopanosa, series de panosa lineal, glucosamaltotriosa, nigerosa, nigerotriosa, kojibosa, centosa e isomaltosil-maltooligosacáridos como se muestra en la **Figura 2**.[1,7,44]

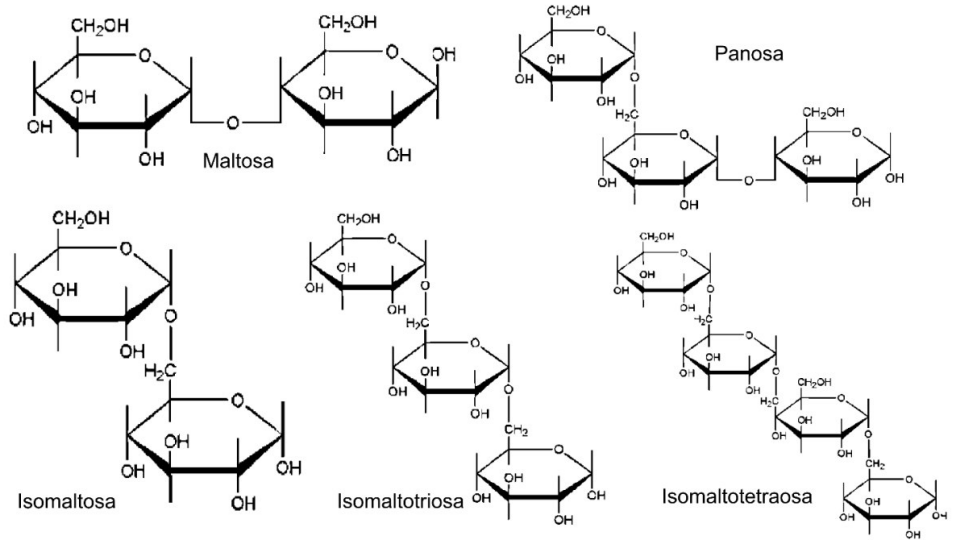


Figura 2. Estructuras de los isomaltooligosacáridos. Los residuos de glucosilo están unidos a la maltosa o isomaltosa por enlaces glicosídicos α-(1,6), la panosa presenta enlace α-(1,6) y α-(1,4).

Fuente: Sorndech *et a*l, 2018.[7]

II.1.6.2. Características

Los oligosacáridos tienen características organolépticas y fisicoquímicas deseables tales como el dulzor bajo, alta retención de la humedad, baja viscosidad, alta solubilidad y resistencia a la cristalización.[1,3,6]

Las funciones asociadas a la salud están relacionadas con la estructura química de los IMOs.[3] Además, la funcionalidad se puede clasificar por el grado de polimerización y los tipos de enlaces glicosídicos de los IMOs.[1,43] Se realizaron estudios en ratas para evaluar el efecto prebiótico de los IMOs y se determinó que los lactobacilos se limitan a metabolizar IMOs de cadena corta menor o igual a 5 GP como la panosa, mientras que las bífidobacterias prefieren IMOs de mayor a 5 GP.[1,45]

Los efectos benéficos a la salud son los siguientes:

- Estimulan el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon. Las bifidobacterias producen ácidos grasos de cadena corta, lo que conduce a una mejor salud intestinal global, estimulando el sistema inmune.
- Mejoran la absorción de los minerales calcio y fósforo en el intestino.
- Regulan el colesterol.
- Reducen el efecto cariogénico.
- Confieren inmunidad, así como a la prevención y resistencia a diversas enfermedades.[1-3]

II.1.6.3. Aplicaciones de los IMOs

Naturalmente los IMOs se encuentran en bajas concentraciones en alimentos fermentados como el sake, miso, salsa de soya, cerveza y miel.[1,2,6] Las funciones de los IMOs son versátiles. Muestran alta solubilidad y baja viscosidad, propiedades atribuidas a su pequeño tamaño molecular, las cuales son aplicados como ingrediente alimentario y farmacéutico.[3,30]

En el ámbito comercial, los IMOs se producen a partir de almidón extraído de diversas fuentes (batata, patata, tapioca, arroz y plátano).[46] Los IMO no son digeridos por enzimas humanas, sino fermentados por la flora intestinal, que ejercen su efecto

prebiótico.[47] Además del efecto prebiótico, los IMOs tienen un índice glucémico bajo y actúan como un edulcorante bajo en calorías que proporciona beneficios para la salud a las personas diabéticas.[5] Como ingrediente alimentario, se ha comprobado que son efectivos para retardar la retrogradación del almidón y la pérdida de humedad en la masa de pan durante almacenamiento en congelación. Además, se pueden utilizar como humectantes, edulcorantes bajos en calorías.[6,48]

Hoy en día, los IMOs están en la declaración de exención segura (GRAS) de la FDA, EFSA y FSANZ.[49,50] Tales aprobaciones apoyan el uso extensivo de los IMOs, como un ingrediente alimentario funcional seguro en varios países. Estados Unidos y Japón comercializan IMOs como suplementos dietéticos y alimentos funcionales.[41,51] Los IMOs en forma de líquido (jarabe) y en polvo son ampliamente aceptadas por los clientes. Se recomiendan dosis máximas para diferentes alimentos para prevenir las enfermedades gastrointestinales, molestias, especialmente la producción de gas que conduce a la flatulencia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Aplicación y cantidad máxima recomendada de IMOs agregados en varios alimentos

Categoría de alimentos	Porción (g o mL)	Nivel máximo usado por porción (g o mL)
Bebidas		
Bebidas refrescantes de bajas calorías	240 g	15.6 g
Bebidas energizantes	240 g	12.0 g
Bebidas deportivas e isotónicas	240 g	15.6 g
Jugos de frutas	140 g	12.0 g
Jugos de verduras	100 g	12.0 g
Otras bebidas refrescantes	240 g	12.0
Productos Lácteos		
Leche saborizada	250 g	12.0 mL
Leche de soya saborizada	250 g	12.0 mL
Leche o yogur con cultivos activos	175 g	17.0 mL
Reemplazo de comida a base de leche	40 g	8.0 g
Granos/ Productos de cereales		
Barras de cereal	50 g	5.0 g
Barras de cereal para desayuno	50 g	12.5 g
Productos de panadería	60 g	10.0 g
Bocaditos	30 g	2.0 g
Confitería de azúcar		
Caramelos duros	10 g	9.7 g
Caramelos blandos/ Barra de chocolate	30 g	8.2 g
Alimentos nutricionalmente completos y fortificados		
Barras de reemplazo de comida	40 g	8.0 g
Carnes y alternativos		
Mantequilla de maní	30 mL	3.0 mL
Otros alimentos		
Condimentos	15 mL	5.0 mL
Toppings	25 mL	10.0 mL

Datos de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), E.U. Food Standards Agencia (EFSA) y Australia New Zealand Food Standard (FSANZ)

Fuente: Sorndech *et a*l, 2018.[7]

El 26 de marzo del 2021, la empresa BioNeutra North América Inc. presentó una solicitud a la Comisión Europea (CE) en conformidad con los reglamentos requeridos para la ampliación del uso de los IMOs como nuevo ingrediente alimentario. La solicitud indica que se amplie el uso de los IMOs para incluir en helados y postres lácteos, café y te instantáneos, edulcorantes de mesa, pasteles, magdalenas, tartas, cereales, para el desayuno, condimentos, salsas, gelatinas, pudines, rellenos, mermeladas y jaleas, yogures, bebidas a base de leche, aperitivos y salsas dulces, coberturas y jarabes. La población destinataria es la población en general. También se propone el uso en complementos alimenticios a una dosis máxima de 30 g/día para la población mayor de 10 años. Actualmente los IMOs están autorizados para su comercialización como ingrediente alimentario en bebidas (refrescos de valor energético reducido, bebidas energéticas, bebidas deportivas e isotónicas, zumos de frutas, verduras procesadas y zumos de verduras y otros refrescos), productos a base de cereales (barritas de cereales, galletas, bizcochos, barritas de cereales para el desayuno), productos de confitería (caramelos duros, caramelos blandos/barritas de chocolate) y alimentos nutricionalmente completos y fortificados (barritas sustitutivas de comidas, sustitutivas de comidas a base de leche). Además del status actual dentro de la UE, Los IMOs están aprobados y consumidos en otros países, incluidos Australia, Nueva Zelanda, Canadá, China, India, Israel, Japón, Corea y los EE.UU.[49]

II.2. Antecedentes del estudio

El método tradicional para la producción de IMOs a partir del almidón presenta tres etapas sucesivos: licuefacción de almidón, sacarificación y transglucosilación con rendimientos del 40 % (p/p) de IMOs.[9] En recientes años, varias investigaciones se han enfocado a mejorar el rendimiento y la productividad volumétrica, reportando variaciones del método de producción, ya sea por la fuente de almidón utilizada, la técnica de producción y las enzimas aplicadas que reducen las tres etapas de producción.

En cuanto a los antecedentes internacionales, se presenta la investigación de Saman *et al*.[52] quienes tuvieron como objetivo evaluar la producción de IMOs a partir de harina de arroz y almidón de yuca mediante la síntesis con el método tradicional de tres etapas (CST). Diseñaron una investigación experimental cuantitativa en la que utilizaron α-amilasa, la combinación de β-amilasa y pululanasa, y transglucosidasa para las etapas de licuefacción, sacarificación y transglucosilación, respectivamente. Los resultados de IMOs obtenidos fueron de 106.4 g/L (43 %) para arroz glutinoso, 169.1 g/L (68 %) para arroz no glutinoso y 97.9 g/L (39 %) para almidón de yuca. Los autores concluyeron que la harina de arroz no glutinoso fue la materia prima más adecuada para la producción de IMOs.

Ranasinghage *et al.*[46] evaluaron la concentración óptima de maltosa y maltodextrina en la solución de arroz sacarificado para la transglucosilación, con el fin de reducir el tiempo de producción de IMOs y preservar sus propiedades prebióticas. La investigación fue experimental cuantitativa, sintetizaron IMOs mediante el método tradicional de síntesis CST en la que emplearon enzimas Kleistase T10S, Biozyme LC, y Transglucosidase L para en las etapas de licuefacción, sacarificación y transglucosilación, respectivamente. Se determinaron las condiciones para obtener la mayor cantidad de maltosa en la solución (149.1 g/L) que además contenía 31.39 g/L de maltodextrina y 5.28 g/L de glucosa, posteriormente, después de 6 h de transglucosilación se alcanzó un máximo de IMOs de 49.7 g/L (65 %). Además, el comportamiento del índice prebiótico y las puntuaciones de actividad prebiótica

mostraron una relación directa con la concentración de IMO. Los autores concluyen que los IMOs pueden ser sintetizados a partir de una fuente económica de maltosa con buenos rendimientos.

Por otro lado, Basu *et al*.[44], estudiaron un nuevo enfoque en la producción de IMOs a partir de almidón soluble, mediante la simultánea sacarificación y transglucosilación (SST). Diseñaron una investigación experimental cuantitativa en la que utilizaron Fungamyl 800L y α-glucosidasa de *Aspergillus niger* aislada por estos autores. Optimizaron el proceso mediante el algoritmo simplex de Nelder-Mead y posteriormente extrapolaron el proceso optimizado a dos fuentes de almidón sostenible: los residuos de procesamiento de papa (PPW) y arroz partido (BR). Los resultados demostraron una producción de IMOs de 95.1 ± 1.2 g/L (38 %) al final de 12 h en comparación con 89,7 ± 2.6 g/L (36 %) que se obtuvo mediante CST al final de 24 h. Los rendimientos de IMOs del proceso SST optimizado extrapolado para PPW y BR fueron de 92.2 ± 3.4 g/L (37 %) y 85.1 ± 4.3 g/L (34 %), respectivamente. Los resultados concluyen que la estrategia de simultánea sacarificación y transglucosilación es una alternativa para la producción sostenible de IMOs en comparación con el método tradicional.

De igual manera Niu *et al.*[9] desarrollaron la simultánea sacarificación y transglucosilación para la síntesis de IMOs a partir del almidón licuado de maíz. La investigación fue experimental cuantitativa, en la que optimizaron cada etapa del proceso (licuefacción del almidón, sacarificación y transglucosilación). Para el desarrollo utilizaron un coctel de preparaciones enzimáticas comerciales, las cuales consistieron en una pululanasa (PulA) recombinante de *Bacillus naganoensis* producida por *Bacillus licheniformis,* una α-amilasa (BAA) de *Bacillus amyloliquefaciens*, una β-amilasa de salvado de cebada (BBA) y la α-transglucosidasa (An-TGasa) de *Aspergillus niger*. Después de 13 h de reacción, se produjo 49,09 ± 1.56 % de IMOs (calculados a partir de la cantidad total de isomaltosa , isomaltotriosa y panosa) y una productividad especifica de 3.78 ± 0.12 $g/g.h^{-1}$. Los autores concluyen que el método desarrollado ofrece una alternativa para la producción eficiente de IMOs.

En otro estudio reportado por Kaulpiboom *et al*.,[45] estudiaron el uso de nuevas enzimas desarrolladas para la producción de IMOs a partir de almidón licuado de yuca tratado con pululanasa al 10 % v/v. Diseñaron una investigación experimental cuantitativa, en la metodología utilizaron amilomaltasa recombinante de tipo salvaje (WT) o amilomaltasa mutada en Y101S en combinación de transglucosidasa de *Aspergillus niger*. Además, los IMOs sintetizados se caracterizaron y compararon con IMOs comerciales. Estos investigadores observaron que al incubar una suspensión de almidón al 30 % (p/v) con 120 U/mL de amilomaltasa y 6 U/mL de transglucosidasa por 1 hora a 40 °C se alcanzó un rendimiento de 67 % de IMOS (de los productos de oligosacáridos totales) con la aplicación simultánea de ambas enzimas. Los IMOs sintetizados a partir de ambas enzimas fueron significativamente mayores a los IMOs comerciales, también se observó menor proporción de IMOs de cadena larga cuando se utilizó amilomaltasa-Y101S. Por otro lado, los IMOs sintetizados tuvieron menor grado de dulzura, mientras que la viscosidad, higroscopicidad y el color marrón de la reacción de Maillard fueron mayores comparados con los IMOs comerciales. En cuanto a las propiedades prebióticas los IMOs sintetizados presentaron similar efecto a los IMOs comerciales. Así, estos autores mostraron la ventaja de combinar enzimas modificadas de amilomaltasa con la enzima transglucosidasa de *A. niger* en la producción de IMOs de cadena larga con propiedades prebióticas.

Además, Duong *et al*.[53] desarrollaron un procedimiento eficiente y de bajo costo para producir IMOs a partir de almidón de camote. La investigación fue experimental cuantitativa, optimizaron las etapas de licuefacción y la simultánea sacarificación y transglucosilación. Obtuvieron 68.85 ± 1.82 g/L (28 % b.s) de IMOs (isomaltosa, isomaltotriosa e isomaltotetraosa) después de un total de 12.5 h de reacción con la enzima Spezyme Xtra para la licuefacción y la combinación de β-amilasa, pululanasa y α-transglucosidasa para la reacción SST. Posteriormente purificaron los IMOs con células de *Saccharomyces cerevisiae* var. *Diastaticus* BE 134. Los autores concluyen que el método desarrollado de dos etapas ofrece una alternativa eficiente.

También se han desarrollado procesos de producción de IMOs en una sola etapa a partir de almidón, este proceso fue utilizado por Plongbunjong *et al*.[54] quienes tenían

como uno de los objetivos producir IMOs a partir de almidón de arroz de origen comercial (DPO Ltd., Tailandia) para usarla como una fuente alternativa de fibra dietaria en un producto de papilla de arroz instantánea. La investigación fue experimental cuantitativa, en la síntesis de IMOs la metodología consistió en un proceso de un solo paso. Se dosificó la combinación de α-amilasa y transglucosidasa en el reactor enzimático que contenía 35 %(p/v) de suspensión de almidón. Se mantuvo a 60 °C a un pH de 6. Encontraron que después de 6 h el rendimiento de IMO fue de 84%. Los IMOs encontrados fueron isomaltohexaosa, isomaltotetraosa, D-panosa e isomaltosa. El producto fue liofilizado para su posterior mezcla con papilla de arroz instantánea y evaluación de las propiedades prebióticas. En conclusión, la mezcla mostró tener efecto prebiótico.

En el Perú, no existen estudios reportados acerca de la síntesis enzimática de IMOs. Como se ha mencionado, varios estudios muestran el uso del almidón de varias fuentes de alimentos para la producción de IMOs, sin embargo, estas fuentes son alimentos de pan llevar, por lo que se debe evitar la utilización de estos alimentos como fuente de almidón para la producción industrial de IMOs. Una materia prima alternativa es el almidón de cebada (*Hordeum vulgare L*.) porque la mayor parte de este cereal se destina al malteado y el resto a la alimentación animal. Las producciones de cebada que no reúnen la calidad maltera en la industria cervecera se destina a la alimentación de animales.[11,12] En el Perú, MIDAGRI reportó que las hectáreas cultivadas de cebada forrajera están decreciendo y pasó de 22 137 hectáreas en el período agosto-julio 2017-2018 a 19 226 hectáreas en el 2018-2019.[10] Hay regiones alto andinas donde el cultivo de la cebada resulta ser apreciable, por ser un cultivo rústico, de ciclo vegetativo corto, con gran capacidad de adaptación, de buen rendimiento en condiciones agrestes y por requerir un nivel tecnológico tradicional.[14]

Como se puede ver, en la literatura están disponibles muchas estrategias de producción con diferentes enfoques y enzimas; por lo que la composición de los jarabes de IMOs difiere entre ellos. Las actividades de las enzimas y su origen determinan sus especificidades y por lo tanto su grado de polimerización de los IMOs, tipos de enlaces y secuencia de enlaces de los IMOs producidos.[1,43] Es preciso indicar

que la enzima clave para la síntesis de IMOs a partir de almidón es la α-glucosidasa con actividad de transglucosilación. El reemplazo del almidón de maíz por el almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L.*) para la producción comercial de IMOs constituye una opción interesante, la cual a la fecha no se ha reportado. Sin embargo, este proceso enzimático no es fácil de desarrollar, es necesario una estrategia y la apropiada selección de enzimas, de tal manera de reducir los costos, tiempos y/o etapas de producción. Además, se debe tomar en cuenta el costo de las enzimas, el cual es uno de los factores más importantes para la producción de jarabes de IMOs de alta calidad y cómo reducir el costo de producción de los jarabes mediante la selección y aplicación de las enzimas apropiadas es un desafío de investigación en esta área, especialmente desde el punto de vista industrial.

Como se ha mencionado en las investigaciones previas, algunos investigadores han utilizado enzimas recombinantes heterólogas; sin embargo, no son aceptadas por el consumidor final a pesar de sus numerosas ventajas.[55] Por lo que, en miras de un proceso industrial, se debe considerar la regulación de estos productos y la respuesta del consumidor. Una alternativa es usar preparaciones enzimáticas comerciales de bajo costo para uso en la industria alimentaria, las cuales están reguladas por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos y la Unión Europea. Estas preparaciones enzimáticas comerciales tienen ventajas económicas y técnicas, como precio bajo, versatilidad y estabilidad de la actividad enzimática bajo condiciones de reacción de procesos industriales.[55]

II.3. Bases teóricas

II.3.1. α-amilasa

La enzima α-amilasa (1,4-α-D-glucano-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) es una endoamilasa de la familia 13 glicosil hidrolasa (GH-13). Esta enzima facilita la ruptura del almidón al catalizar la hidrólisis mediante la escisión de los enlaces glucosídicos α-(1,4) en el interior de la cadena de amilosa o amilopectina. Producto de la hidrólisis del almidón se obtienen una mezcla de glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas. Las α-amilasas requieren de calcio para mantener la estabilización de la estructura tridimensional de la enzima y también mejora la afinidad enzima-sustrato ya que actúa como activador alostérico.[56,57] La preparación enzimática Termamyl contiene α-amilasa termoestable, proveniente de *Bacillus licheniformis* modificado genéticamente y es de grado alimentario. Esta enzima es estable a temperaturas cercanas a 100 °C en presencia de iones de calcio y pH de 5.5-6.5. (Anexo 1)

El mecanismo de la hidrólisis enzimática de la familia GH-13 sucede en el sitio activo de la enzima, en donde dos aminoácidos actúan como donador de protones y nucleófilo. Estas enzimas tienen un mecanismo de retención de la configuración anomérica comienza con el ataque del nucleófilo al centro anomérico con un carácter ácido por el carboxilato ácido, así, resulta en un intermedio covalente glicosil-enzima (glicosilación); luego, el carboxilato ácido desprotonado actúa como base, uniendo una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar el complejo glicosil-enzima y obtener el producto hidrolizado (deglicosilación).[58]

II.3.2. α-amilasa maltogénica

La α-amilasa maltogénica (1,4-α-D-glucano-maltohidrolasa, EC 1.2.1.133) pertenece a la familia 13 glicosil hidrolasa, es una exoamilasa que cataliza sucesivamente la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α-(1,4) del extremo no reductor en la amilopectina, amilosa y polisacáridos relacionados al almidón. La enzima también presenta preferencias por sustratos de cadena lineal, ya que no

hidroliza enlaces glucosídicos α-(1,4) cuando están adyacentes a enlaces glucosídicos α-(1,6). Las moléculas de maltosa se obtienen sucesivamente como resultado de la hidrólisis.[59,60] La preparación enzimática Bakezyme Mam 10.000 es una α-amilasa maltogénica proveniente de la cepa *Bacillus subtilis*, utilizado ampliamente en la industria panadera. Esta enzima se inactiva por encima de los 65 °C, mientras que su forma activa se encuentra entre los 50 y 65 °C. (Anexo 1)

II.3.3. Pululanasa

La pululanasa es una endoenzima también perteneciente a la familia glicosil hidrolasa. Conocida como una enzima desramificante en las industrias basadas en el procesamiento del almidón. Esta enzima hidroliza los enlaces glucosídicos α-(1,6) y α-(1,4) en el pululano, almidón y oligosacáridos relacionados con el almidón.[61] Existen 5 tipos de pululanasa. Entre ellas, la preparación enzimática Promozyme D2 es una pululanasa recombinante tipo I (1,6-α-D-dextrina-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.41), miembro de la familia GH13 derivada de la cepa *Bacillus acidopullulyticus*, las de tipo I se caracterizan por hidrolizar los enlaces glucosídicos α-(1,6) del pululano y amilopectina u oligosacáridos ramificados, generando como productos maltotriosa y oligosacáridos lineales, respectivamente. Además, no hidrolizan glucógeno, amilosa o panosa. La pululanasa tipo II (amilopululanasa) hidroliza los enlaces glucosídicos α-(1,6) y α-(1,4). La hidrolasa del pululano tipo I (neopululanasa), y tipo II (isopululanasa) son enzimas que liberan como producto panosa e isopanosa ya que sólo hidrolizan los enlaces glucosídicos α-(1,4) en el pululano, además, tienen acción como ciclodextrinasas. La hidrolasa del pululano tipo III hidroliza los enlaces glucosídicos α-(1,6) y α-(1,4) sólo en el pululano y tiene como productos maltotriosa, panosa, maltosa y glucosa. La pululanasa tipo I es activa en un rango de temperatura entre 37-70 °C y en condiciones de pH de 3.5 a 6.0.[61-63]

II.3.4. Producción de isomaltooligosacáridos

Los IMOs se producen naturalmente en varios alimentos fermentados, pero la extracción de estos IMOs para una alta producción no es económicamente viable. Así, la síntesis enzimática se convierte en una tecnología muy importante para la producción de estos compuestos. Para ello, existen dos métodos para la producción de IMOs que se detallan a continuación[1]:

II.3.4.1. Biotransformación

Implica la fermentación de la sacarosa con un aceptor de maltosa en presencia de *Leuconostoc mesenteroides* que expresa la enzima dextransacarasa (1,6-α-D-glucano 6-α-D-glucosiltransferasa) [GT]. Este método produce IMOs lineales, pero predominan los ramificados (enlaces α-1,2, α-1,3, α-1,4 y α-1,6).[64] Asimismo, los caldos de fermentación pueden contener una cantidad significativa de fructosa y/o manitol. Los productos comerciales fabricados de esta manera generalmente se purifican para eliminar el color y metabolitos ácidos (lácticos, ácidos acéticos, etc.) que pueden contribuir a los sabores desagradables.[41]

II.3.4.2. Síntesis enzimática de IMOs

La producción de IMOs "industriales" tradicionalmente consiste en la transglucosilación de almidón sacarificado por una enzima α-glucosidasa, típicamente de *Aspergillus niger sp*.[53] Este método produce una mezcla de IMOs lineales y ramificados (enlaces α-(1,4)) con una concentración máxima de 40% (p/p) y con una concentración de glucosa de 40 % (p/v).[9,52]

En la síntesis de IMOs, después de la etapa de sacarificación, la transglucosilación es favorecida por las concentraciones altas de sustrato que resulta en una serie IMOs. Los principales IMOs son panosa (DP3), isomaltosa (DP2) y tetrasacáridos (DP4). Durante la síntesis se obtiene panosa como principal producto de transglucosilación, porque la maltosa exhibe las funciones de donador y aceptor; el mecanismo resulta en la liberación un grupo glucosilo de una molécula de maltosa seguido de la transferencia del residuo de glucosilo a la posición 6-OH de otra molécula de maltosa. También se

forma isomaltosa que resulta de la transferencia del residuo de glucosilo a la posición 6-OH de una molécula de glucosa o se obtiene de la hidrólisis de panosa en el enlace glicosídico α-(1,4).[65]

En los últimos años, muchas de las investigaciones se han centrado en mejorar la eficiencia en la producción de IMOs, como la fusión de diferentes enzimas, enzimas unidas a células viables, enfoques simultáneos de sacarificación y transglucosilación, mezclas enzimáticas y enzimas de diseño recombinantes como se presenta en la **Tabla 2**.[7,9]

Tabla 2. Enzimas y sustratos usados para la producción de IMOs.

Enzima	Sustrato
Enzimas individuales	
α-glucosidasa	Maltosa
Endodextranasa	Dextrano
Enzimas dextransucrasa y dextranasa fusionadas	Sacarosa
Glucansucrasa	Jarabe de Malto-oligosacáridos, mezcla de sacarosa con maltosa
Ciclo-isomaltooligosacárido glucanotransferasa	Dextrano
Enzimas combinadas	
α-amilasa y α-glucosidasa	Almidón
Amilomaltasa y α-transglucosidasa	Maltotriosa, almidón
α-amilasa y α-transglucosidasas	Dextrinas
α-amilasa, amilomaltasa y α-amilasa maltogénica	Almidón
α-amilasa, β-amilasa y α-transglucosidasa	Harina
α-amilasa, α-amilasa maltogénica y α-transglucosidasa	Almidón
α-amilasa, β-amilasa, pululanasa e invertasa	Almidón
α-amilasa, enzima modificada, β-amilasa y α-transglucosidasa	Almidón
Pululanasa, α-amilasa, β-amilasa y α-transglucosidasa	Almidón

Fuente: Sorndech *et al.*, 2018.[7]

II.3.4.2.1. Consecutiva sacarificación y transglucosilación

Los IMOs “industriales” son productos de una reacción de transferencia de unidades de glucosilo de un donador (maltosa o un isomaltooligosacárido) a un aceptor distinto que el agua catalizada por una α-glucosidasa con fuerte actividad de transglicosilación. Inicialmente, el almidón se licua usando una α-amilasa termoestable (EC 3.2.1.1). La segunda etapa consiste en la sacarificación con una pululanasa (EC. 3.2.1.41) y β-amilasas (EC 3.2.1.2). La pululanasa hidroliza los enlaces α-(1,6) y la β-amilasa hidroliza las cadenas lineales de amilasa a maltosa. Posteriormente, la actividad de transglucosilación de la α-glucosidasa (EC 3.2.1.20) produce mezclas de IMOs cuyos enlaces glicosídicos entre unidades de glucosa son α-(1,6). Además, los oligosacáridos también contienen unos pocos enlaces glicosídicos α-(1,4) debido al origen del sustrato. También, se produce glucosa como producto secundario.[45,66]

Esta estrategia tiene dos principales desventajas: (1) encontrar condiciones óptimas separadas (pH, temperatura, tiempo, etc.) para cada proceso y (2) los productos de la sacarificación, especialmente la glucosa, inhibe fuertemente la actividad de la α-glucosidasa en la etapa de transglucosilación. La inhibición es un factor crítico en la producción de la IMOs.[65]

II.3.4.2.2. Simultánea sacarificación y transglucosilación

Los procesos enzimáticos de sacarificación y transglucosilación se realizan simultáneamente en una sola etapa, lo cual resulta más fácil la operación del proceso.[44] Por lo tanto, se mejora la productividad volumétrica y el efecto de la acumulación de glucosa es mitigada porque se forma simultáneamente con la formación de los oligosacáridos.[9,44] Los puntos críticos a evaluar son: (1) condiciones de pH y temperatura óptimas compatibles de las enzimas y (2) dosificación óptima de enzimas para que la transglucosilación se favorezca sobre la hidrólisis del sustrato.[44]

La ventaja de combinar enzimas de forma simultánea es reducir el número de pasos de procesamiento, el tiempo de incubación y la obtención de un mayor rendimiento de IMOs.

II.3.5. Mecanismos de transglucosilación de enzimas

La síntesis de oligosacáridos es catalizada por diversas enzimas, entre ellas, las glicosidasas (α-glucosidasa, β-glucosidasa, β-galactosidasa, etc) y transferasas (transglucosidasa, transfructosidasa, etc). Estas enzimas pueden transferir residuos de glicosilo desde un donante a un aceptor, formando nuevos enlaces glicosídicos. Sin embargo, las transferasas no se limitan solo a la transferencia de glucosilos, sino que también actúan sobre una variedad de grupos funcionales, incluso a concentraciones diluidas.[65,67]

II.3.5.1. Glicosidasas

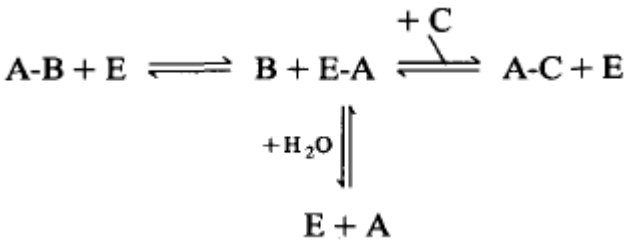
Las glicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos y también pueden sintetizar enlaces glicosídicos bajo ciertas condiciones.[59,60] Sintetizan oligosacáridos mediante dos mecanismos: la hidrólisis inversa, en la cual revierten la reacción de hidrólisis para acoplar directamente fracciones de glicosilo, y la transglucosilación, donde transfieren un residuo de glicosilo desde un donante activado a un aceptor, formando nuevos enlaces glicosídicos.[42,67]

Hidrólisis inversa:

$$\text{A-H} + \text{B-OH} \overset{\textit{Glicosadasa}}{\rightleftharpoons} \text{A-B} + \text{H}_2\text{O}$$

Donde: A y B son fracciones de glicosilo

Transglicosilación:



Donde: A-B, donante de glicósido; E, glicosidasa; C, aceptor.

En la hidrólisis inversa, el desplazamiento del equilibrio de la reacción final hacia la síntesis dependerá de las condiciones termodinámicas, como aumentar la concentración de reactivo, reducir la actividad de agua (adición de solventes orgánicos) o eliminar los productos formados.[67]

En la transglicosilación: el mecanismo implica un intermediario covalente enzima-sustrato y puede generar un nuevo enlace. La reacción se controla cinéticamente, ya que el producto formado puede ser un sustrato potencial para la misma enzima. El rendimiento se mejora al usar aceptores eficientes, aumentar la concentración de donadores y aceptores, reducir la actividad de agua y eliminar el producto final.[67,68]

II.3.5.1.1. α-glucosidasa

La α-glucosidasa (α-D-glucano-hidrolasa, E.C. 3.2.1.20) es una exoenzima que pueden catalizar tanto la hidrólisis como la síntesis de enlaces glucosídicos (transglucosilación) con retención de la configuración anomérica.[42] La estructura de la enzima presenta dos residuos de ácido carboxílico en su sitio activo: uno actúa como nucleófilo y el otro como catalizador ácido / base, como se puede ver en la **Figura 3**. La **Figura 3** muestra el desarrollo de la reacción mediante un mecanismo de doble desplazamiento, donde se forma el complejo glucosil-enzima y rompe el enlace glicosídico C-O. Este paso es asistido por el residuo carboxílico que actúa como ácido general. Seguidamente ocurre el ataque de un nucleófilo (un carbohidrato o una molécula de H_2O) sobre el intermediario glucosil-enzima con la ayuda de la base conjugada del segundo residuo carboxílico. Como resultado, la configuración anomérica del producto es igual a la del donante original. La distribución del intermediario glucosil-enzima entre la hidrólisis y productos de transferencia depende

de la relación k_2 [H_2O]/k_3 [Aceptador]. A medida que la concentración del producto aumenta hasta alcanzar un máximo, las velocidades de síntesis (k_3) e hidrólisis (k_2) se igualan y la reacción debe detenerse rápidamente antes de que la hidrólisis del producto se convierta en el proceso predominante. Los rendimientos que se alcanzan utilizando el enfoque cinético son aproximadamente el 40 % de los productos de la transglucosilación.[66]

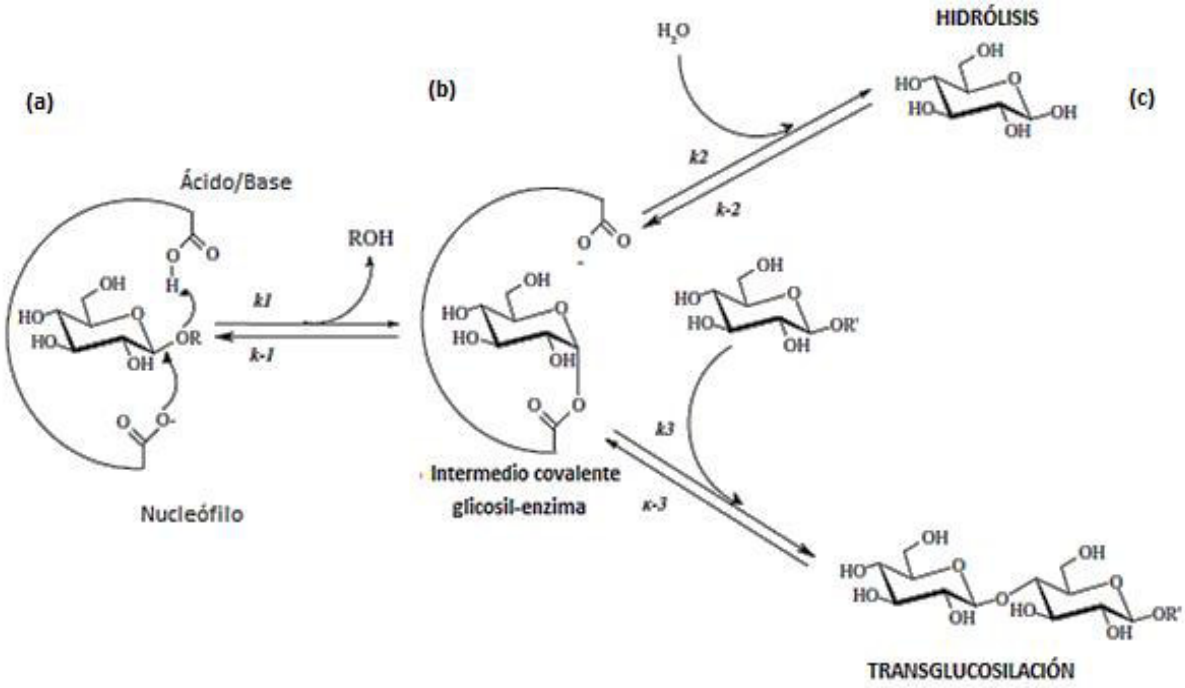


Figura 3. Mecanismo de acción de enzimas transglucosidasas y glucosidasas.
(a) Los dos residuos de ácido carboxílico del sitio activo de la enzima están distanciados aproximadamente a 5.5 Å e interactúan con la molécula de glucosa. (b) Formación de un intermedio covalente glucosil-enzima. (c) La enzima exhibe actividad de transglucosilación y actividad hidrolítica.
Fuente: Polaina et al.[66]

II.4. Glosario de términos

- Alimentos funcionales: de acuerdo con la definición de la FAO, “es un alimento que proporciona un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica, demostrando beneficios médicos o de salud específicos, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades”.[69]
- Dextrinas: son mezclas de polímeros compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos α-1,4 o α-1,6. Son de bajo peso molecular y su estructura es similar a la amilopectina.[70]
- Dextrano: son glucanos compuesto por unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces glicosídicos α-1,6 y varias ramas laterales unidas con α-1,2, α-1,3 o α-1,4. Pueden ser de bajo (<40 kDa) o de alto peso molecular (>40 kDa).[71]
- Oligodextranos: denominación empleada a dextranos de bajo peso molecular (>40 kDa).[71]
- Equivalente dextrosa: El equivalente de dextrosa es una medida del poder reductor de una molécula dada en relación con el peso seco. Los valores de DE oscilan entre 0 y 100. La glucosa, el producto final de la hidrólisis del almidón, tiene un valor DE de 100, mientras que el almidón tiene un valor DE cercano a 0. Los valores de DE de otros productos de hidrólisis de almidón oscilan entre estos valores. El valor de DE es inversamente proporcional al grado de polimerización (DP).[72]
- Biocatalizador: denominación empleada a enzimas. Las enzimas son catalizadores que aceleran reacciones específicas con alta selectividad.[73]
- Enzimas inmovilizadas: enzimas físicamente confinadas o localizadas en una determinada región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas, y que pueden utilizarse de forma repetida y continua".[74]
- Enzima recombinante: Son proteínas producidas por organismos genéticamente modificados. Las enzimas recombinantes son enzimas aisladas que se encuentran disponibles comercialmente y se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética. Proporcionan una fuente constante y

controlable de isoformas enzimáticas específicas, lo que permite la identificación de enzimas involucradas en biotransformaciones. Sin embargo, es importante señalar que estas enzimas son artificiales y pueden diferir en actividad de sus contrapartes nativas.[45]

- Almidón soluble: es el almidón crudo que ha sido modificado mediante tratamientos relativamente suave con ácidos, por oxidación o por calentamiento con glicerol.[75]
- Microbiota intestinal: conjunto de diversos microorganismos que residen en el intestino. Las especies aerotolerantes (*Streptococcus* y *Lactobacillus*) residen en el intestino delgado, mientras que especies anaerobias, en el intestino grueso. En un estado sano y equilibrado entre bacterias tipo beneficiosas y tipo patógenas, la microbiota intestinal tiene funciones protectoras, estructurales y metabólicas.[76]
- Gelatinización: es un proceso irreversible que implica la ruptura de la estructura granular ocasionado por el calor y agua. Los enlaces hidrógeno entre amilosa y amilopectina del almidón se debilitan resultando en la separación de ambas moléculas. La lixiviación de la amilosa a la solución acuosa resulta en una mezcla viscosa, debido a que la fuerte interacción entre moléculas de amilosa forma una red tridimensional que atrapa el agua resultando en la formación de gel. La amilopectina también contribuye a la formación de una mezcla más viscosa y menos firme.[77]
- Licuefacción: es la hidrólisis parcial del almidón gelatinizado en la que la amilosa y amilopectina se rompen a polisacáridos más pequeños como consecuencia, se reduce la viscosidad y se vuelve soluble. Este proceso es utilizado para producir jarabes y puede realizarse con ácidos o enzimas.[78]

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

- **Hipótesis nula:** Es posible el desarrollo de la síntesis de IMOs a partir del almidón de cebada forrajera mediante una estrategia de simultánea sacarificación (pululanasa - α-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario para alcanzar rendimientos y productividades específicas más altos que el método convencional de producción (40% g/g y 0.0085 g/g.h).[9]
- **Hipótesis alternativa:** No es posible el desarrollo de la síntesis de IMOs a partir del almidón de cebada forrajera mediante una estrategia de simultánea sacarificación (pululanasa - α-amilasa maltogénica) y transglucosilación con preparaciones enzimáticas comerciales de grado alimentario para alcanzar rendimientos y productividades específicas más altos que el método convencional de producción (40% g/g y 0.0085 g/g.h).[9]

III.2. Variables

Variables independientes

Variables independientes en la licuefacción de almidón

- La concentración de α-amilasa activa Termamyl 300L por mililitro de reacción (UI/mL).

Variables independientes en la simultánea sacarificación y transglucosilación

- Porcentaje de almidón en la suspensión %(p/v)
- La concentración de pululanasa Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s)
- La concentración de α-amilasa maltogénica Bakezyme Mam 10000 (UI/g almidón licuado b.s.)
- La concentración de la Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)

- La temperatura en el proceso enzimático de sacarificación-transglucosilación.

Variables dependientes

Variables dependientes en la etapa de licuefacción de almidón

- Equivalente de dextrosa (ED)

Variables dependientes en la etapa de simultánea sacarificación y transglucosilación

- Rendimiento $Y_{P/S}$ (g/g)
- Productividad volumétrica especifica Q_P (g/L.h)
- Selectividad global de isomaltotriosa S_i (g/g)

MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio asignado al Grupo de Investigación de Procesos Biotecnológicos y Alimentarios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El análisis próximal se realizó en el Laboratorio de Investigación de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa de Chimbote. El análisis de carbohidratos por HPLC se realizó en el Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

IV.2. Diseño de investigación

Es un tipo de investigación experimental y cuantitativo.

IV.3. Muestra

La muestra usada es el almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L)* de la variedad de cebada forrajera UNA La Molina-96 adquirida del Programa de cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.4.1. Materiales, equipos y reactivos

Materiales

- Probetas de vidrio 100 y 1000 mL.
- Matraces de Erlenmeyer de 25, 50 y 100 mL.
- Tubos de ensayo de 15 mL con tapa rosca.
- Vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Viales y septum de silicona con tapa rosca para HPLC.
- Insertos para HPLC.
- Microtubos de 2 mL.

- Jeringas descartables de 5 mL.
- Filtros de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore).
- Membranas de nylon de 47 mm de diámetro y 0.20 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania).
- Guantes quirúrgicos.
- Puntas para micropipeta 20 µL, 100 µL, 1000 µL y 5 mL.
- Micropipetas de 20 µL, 100 µL, 1000 µL y 5 ml.
- Balón kejdahl 500 mL.
- Balón de fondo plano 250 mL.
- Material de vidrio para sistema soxhlet.

Reactivos químicos

- Los estándares de maltosa monohidratada y panosa fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La glucosa fue de Merck KGaA (Darmstadt Germany). Maltotriosa fue de Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Isomaltotriosa, isomaltosa y maltotetraosa fueron de Megazyme (Bray, Irlanda). Pululano reducido en borohidruro fue procedente de Megazyme (Bray, Irlanda).
- Kit enzimático para glucosa Glicemia Enzimática AA de Weiner Laboratorios S.A.I.C (Rosario, Argentina)
- Acetato de sodio anhidro fue procedente de Fermont (Monterrey, México)
- Molibdato de amonio de Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO, USA)
- Arsenato de sodio dibásico heptahidratado de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ácido láctico 85% (J.T. Baker, USA)
- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de calcio dihidratado (JT Baker, USA)
- Ácido acético glacial p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Etanol absoluto p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Hidróxido de sodio en perlas p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Ácido clorhídrico 37% (p/p) p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)

- Ácido sulfúrico 95 - 97% (p/p) p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Tartrato de sodio y potasio p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Carbonato de sodio anhidro p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Bicarbonato de sodio p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Sulfato de sodio anhidro p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Sulfato de cobre pentahidratado p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Sulfato de potasio p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Éter de petróleo p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Rojo de metilo p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)
- Ácido bórico p.a. (Merck KGaA, Darmstadt Germany)

Enzimas de grado alimentario:

- α-amilasa *Termamyl 300L* (Novozymes, Dinamarca)
- Pululanasa *Promozyme D2* (Novozymes, Dinamarca)
- Amilasa maltogénica *Bakezyme Mam 10.000* (DSM, Holanda)
- Transglucosidase L (Amano Enzyme, Inc., Japón)

Equipos:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)
  - Marca: Thermo Scientific
  - Modelo: UltiMate 3000
  - Detector: CAD (Charged aerosol detector)
- Columna cromatográfica
  - Marca: Shodex (Showa Denko K.K., Japón)
  - Modelo: SUGAR SZ5532
- Balanza Analítica
  - Marca: KERN
  - Modelo: ABT 220 – 4M
  - Rango: 10 mg – 220 g
- Centrifuga

- Marca: BIOBASE
- Modelo: BKC-TH16R II

- Tester de pH
  - Marca: HANNA Instruments
  - Modelo: HI 98128 (pHep ® 5)
  - Rango: 1 a 14 pH
- Agitador magnético
  - Marca: VELP SCIENTIFICA
  - Modelo: MULTISTIRRER 6
  - Rango: 80 a 1500 rpm
- Baño maría de agua circulante
  - Marca: Digisystem Laboratory Instruments Inc.
  - Modelo: DSB-500
  - Rango: 25 a 100°C
- Incubadora Digital
  - Marca: Beltec Scientific
  - Modelo: PH-070(A)
- Espectrofotómetro UV-visible
  - Marca: Thermo Scientific™
  - Modelo: Genesys 10S UV-VIS
- Refrigerador
  - Marca: SAMSUNG
  - Modelo: Digital invertir
- Licuadora
  - Marca: Oster
  - Modelo: BLSTBC4129
- Estufa
  - Marca: Memmert
  - Modelo: ufe600
  - Rango: 20 a 300°C

- Mufla
  - Marca: Thermo scientific
  - Modelo: F6010
  - Rango: 400 a 650°C
- Cocinilla eléctrica
  - Marca: Practika
  - Modelo: HP202-D4

IV.4.2. Metodología experimental

IV.4.2.1. Esquema de desarrollo experimental

En la **Figura 4** se presenta el esquema del desarrollo experimental que se realizó en este estudio. La metodología se dividió en tres etapas como se muestra a continuación:

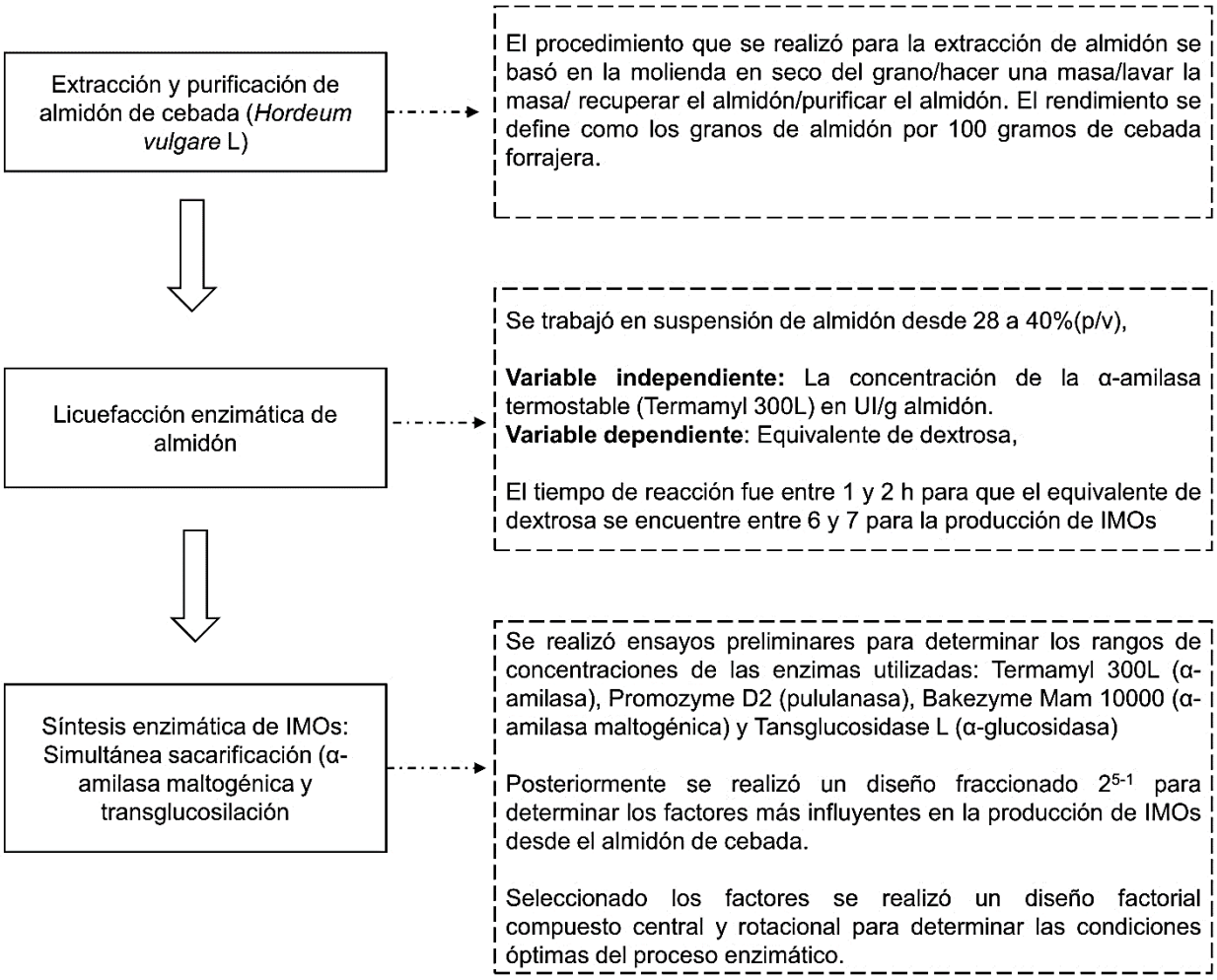


Figura 4. Esquema de la metodología experimental aplicada.

Fuente: propia.

IV.4.2.2. Recolección de la materia prima.

La cebada forrajera (*Hordeum vulgare L)* recolectada bajo el criterio de inclusión de variedad fue la cebada forrajera comercial *UNA La Molina-96,* adquirida del Programa de cereales de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

IV.4.2.3. Extracción y purificación del almidón de cebada.

El procedimiento de extracción y purificación del almidón de los granos de cebada se realizó siguiendo el protocolo descrito por Vasanthan *et al*.[79] y se presenta esquemáticamente en la **Figura 5.**

La primera etapa consistió en eliminar la cáscara de la cebada, luego se llevó a una licuadora para la obtención de harina. Por cada 50 g de harina se homogeneizó con 500 mL de agua destilada. La suspensión se filtró a través de simples mallas de tela de diferentes diámetros de poro utilizando agua destilada para lavar el residuo suspendido. Posteriormente, a un volumen conocido del filtrado se le agregó una solución de NaOH de concentración conocida para alcanzar una concentración final de 0.05 N. Luego, se agitó por 30 min y se centrifugó a 5500 rpm por 15 min. El sedimento se enjuagó dos veces con NaOH de 0.05 N y se neutralizó con una solución de HCl 0.1 N. El almidón se lavó 3 veces con agua destilada y luego con etanol al 80 % (v/v) y, finalmente, se dejó secar a 35 °C.

El porcentaje del rendimiento del almidón purificado se calcula como la masa del almidón purificado entre la masa inicial de los granos de cebada íntegro multiplicado por 100, como se indica en la Ec. (1)

$$\%\text{Rendimiento} = \frac{\text{almidón purificado (g)}}{\text{granos de cebada(g)}} \text{x}100 \qquad \text{Ec. (1)}$$

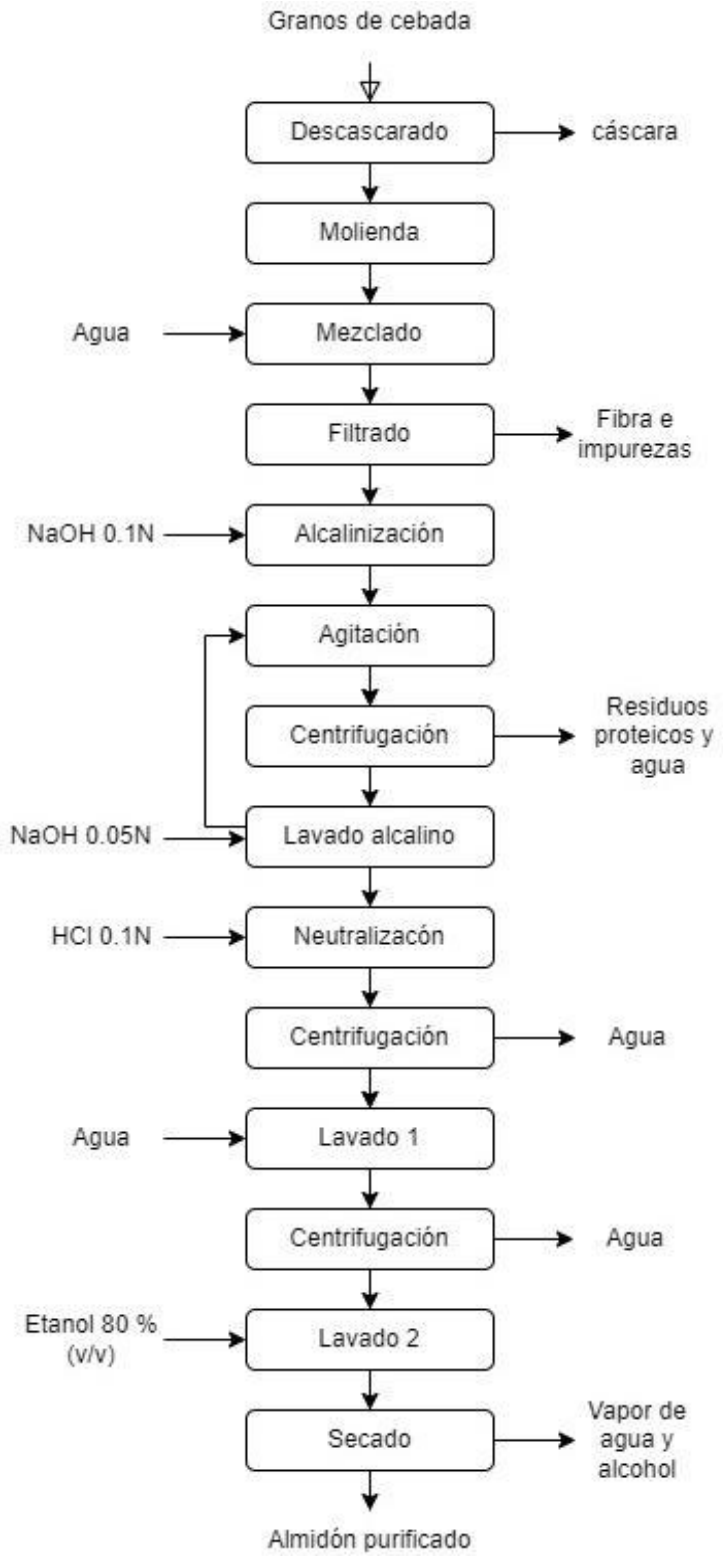


Figura 5. **Esquema para la obtención de almidón de cebada forrajera purificado.**

Fuente: propia.

IV.4.2.4. Gelatinización del almidón

La gelatinización es la primera etapa para la transformación enzimática del almidón. La gelatinización consistió en contactar una cantidad determinada de almidón y solución tampón o agua destilada, dependiendo del experimento, y se mantuvo a ebullición durante unos 5 min hasta su solubilización. Se aseguró que el almidón no se carbonice y, posteriormente, se verificó el pH de la solución.

IV.4.2.5. Determinación de la actividad enzimática

IV.4.2.5.1. Ensayo de la actividad de α-amilasa termoestable (Termamyl 300L)

La actividad de la α-amilasa se ensayó por duplicado midiendo la velocidad de reacción inicial de acuerdo al procedimiento descrito por *Basu et al*.[44] 20 µL de la enzima adecuadamente diluida (1:100) en tampón fosfato de potasio de 50 mM se incubó con 980 µL de almidón soluble al 0.51 % (p/v) preparado en tampón fosfato de potasio de 50 mM a pH 6,0 que contuvo 40 ppm de Ca^{2+} ($CaCl_2$ disuelto en la solución tampón). La mezcla de reacción se agitó a 150 rpm y se incubó a 95 °C. La reacción se detuvo a intervalos de tiempo regulares hasta los 8 min por la adición de 50 µL de ácido láctico al 85 % para reducir el pH de la reacción menor de 3.0 e inmediatamente enfriar en un baño con hielo por 5 min. Un experimento control se usó para cada ensayo, el cual consistió en reemplazar los 20 ul de enzima diluida con tampón fosfato de potasio 50 mM. Los azúcares reductores liberados se estimaron mediante el método de Somogy-Nelson y expresados como glucosa. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de glucosa por minuto a partir del almidón soluble bajo las condiciones ensayadas.

IV.4.2.5.2. Ensayo de la actividad de pululanasa (Promozyme D2)

La actividad se ensayó por duplicado midiendo la velocidad de reacción inicial de acuerdo con el procedimiento descrito por McCleary *et al*.[80] con ligeras modificaciones. Brevemente, 20 µL de pululanasa, diluido en tampón acetato de sodio de 50 mM a pH

5.0, se adicionó a 1980 µL de una solución de 10 g/L de pululano reducido en borohidruro disuelto en el mismo tampón. La mezcla de reacción se agitó a 150 rpm e incubó a 55 °C. Se retiraron alícuotas de 0.3 mL de la mezcla de reacción a intervalos regulares de tiempo hasta los 5 min y la reacción se detuvo colocando las muestras en agua hirviendo por 5 min seguido por enfriamiento en un baño con hielo por 5 min. Un experimento control se usó para cada ensayo, reemplazando la enzima por tampón acetato de sodio de 50 mM a pH 5.0. Los azúcares reductores formados se midieron de acuerdo con el método de Somogy-Nelson utilizando glucosa como el azúcar estándar. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores, expresados como glucosa por minuto bajo las condiciones ensayadas.

IV.4.2.5.3. Ensayo de actividad de la amilasa maltogénica (Bakezyme Mam 10.000)

El ensayo se realizó por duplicado, la mezcla de reacción consistió en 1.9 mL de solución de almidón soluble al 1 % (p/v) en tampón acetato de sodio de 50 mM a pH 5.5 y 100 µL de enzima adecuadamente diluida en el mismo tampón, previa una disolución de una masa conocida de enzima. La mezcla de reacción se agitó a 150 rpm y se incubó a 55 °C. Se retiraron alícuotas de 0.4 mL de la mezcla de reacción en intervalos regulares de tiempo hasta los 5 min y la reacción se detuvo colocando las muestras en agua hirviendo por 5 min seguido de enfriamiento en un baño con hielo por 5 min. Un experimento control se usó para cada ensayo, el cual consistió en reemplazar la enzima por un volumen equivalente de tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.5. Los azúcares reductores formados se midieron de acuerdo con el método de Somogy-Nelson utilizando maltosa como el azúcar estándar. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcares reductores, expresados como maltosa, por minuto bajo las condiciones ensayadas.

IV.4.2.5.4. Ensayo de la actividad de α-glucosidasa (Transglucosidase L)

Las actividades de transglucosilación e hidrólisis se determinaron por la velocidad de reacción inicial de formación de trisacáridos (panosa y maltotriosa) y la liberación de glucosa de la hidrólisis de maltosa, respectivamente. La glucosa se produjo en ambos casos (actividades de transglucosilación e hidrólisis) como se muestra en los esquemas de las reacciones químicas:

$$GG + GG \longrightarrow GGG + G$$
$$GG + H_2O \longrightarrow G + G$$

donde GG es maltosa, GGG son los trisacáridos y G es glucosa.

Una unidad de actividad de transglucosilación (U_T) se definió como la cantidad de enzima requerida para sintetizar 1 µmol de trisacáridos por min. Mientras, una unidad de actividad hidrolítica (U_H) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de glucosa procedente de la hidrólisis por min a partir de maltosa. Las actividades de hidrolisis y transglucosilación se calcularon como se muestra en la Ec. (2) y Ec. (3).[8]

$$U_H = V_H = \frac{V_{TG} - V_T}{2} \qquad \text{Ec. (2)}$$

$$U_T = V_T = V_P + V_M \qquad \text{Ec. (3)}$$

donde V_H es la velocidad de formación de glucosa a partir de la reacción de hidrólisis de maltosa y V_T es la velocidad de transglucosilación, que representa la suma de las velocidades de formación de panosa (V_P) y maltotriosa (V_M), V_{TG} es la velocidad total de formación de glucosa, U_H representa la actividad hidrolítica y U_T, la actividad de transglucosilación.

Las condiciones experimentales para el ensayo fueron las siguientes:

El ensayo se realizó por duplicado, la reacción consistió en 1.9 mL de solución maltosa de 300 g/L disuelta en tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.0 y 0.1 mL de solución

enzimática diluida. La mezcla se incubó a 50 °C con agitación a 150 rpm. Se tomaron 400 µL de mezcla de reacción a intervalos de 1 min hasta los 7 min de reacción. Para detener la reacción, las muestras se sometieron a calor en agua hirviendo por 3 min. Un experimento control se usó para cada ensayo, el cual consistió en reemplazar la enzima por un volumen equivalente de tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.0. Posteriormente, se determinó la composición de carbohidratos por HPLC.

IV.4.2.6. Licuefacción de almidón de cebada forrajera

El almidón lentamente se degrada por α-amilasas, por lo que la gelatinización y la licuefacción son etapas previas para que el almidón sea susceptible a la sacarificación. Los experimentos se realizaron con suspensiones de almidón en el rango desde 28 a 40 % (p/v) con un volumen de 15 mL. La suspensión también contuvo 40 ppm de Ca^{2+} (como $CaCl_2$) para la estabilización de la α-amilasa termoestable. El pH de la suspensión de almidón gelatinizado fue 6.0 y se ajustó con NaOH de 0.5 N y/o HCl de 0,1 N. Se utilizó la α-amilasa comercial de *Bacillus licheniformis* denominada Termamyl 300L en diferentes proporciones según la concentración de almidón.

La mezcla de reacción se agitó a 150 rpm y se mantuvo a 95 °C. La licuefacción se realizó entre 1 y 2 h hasta alcanzar el equivalente de dextrosa (ED) entre 6 y 7. Se retiraron muestras de 1 mL a intervalos regulares de tiempos. La reacción se detuvo por la adición de 2 µL de ácido láctico al 85 % para reducir el pH de la reacción menor de 3.0, subsecuentemente, la muestra se colocó en agua hirviendo por 5 min[81] y se enfrió rápidamente en un baño con hielo para evitar la retrogradación del almidón licuado. Posteriormente, se determinó los azúcares reductores por el método de Somogy-Nelson.

$$ED = \frac{m}{M} \text{ x } 100\% \qquad \text{Ec (4).}$$

dónde:

ED= equivalente dextrosa.

m = concentración de azúcares reductores expresados como glucosa (g/L).

M = suspensión de almidón en gramos de masa seca por litro (g/L).

IV.4.2.7. Simultánea sacarificación y transglucosilación

En la producción de IMOs, la sacarificación enzimática es el proceso que transforma el almidón licuado a maltosa mientras que la transglucosilación es el proceso enzimático de síntesis de enlaces glicosídicos α-(1,6) entre unidades de glucosa a partir de maltosa. En esta etapa, se adicionó simultáneamente la pululanasa denominada *Promozyme D2* (hidroliza los enlaces glicosídicos α-(1,6) en el almidón licuado), la amilasa maltogénica denominada *Bakezyme Man 10.000* (actúa sobre las cadenas de amilosa, removiendo sucesivas unidades de maltosa del extremo no reductor) y la α-glucosidasa denominada *Transglucosidase L* (con actividad de transglucosilación), según las condiciones establecidas en el diseño experimental. La mezcla de reacción consistió en 15 mL de almidón licuado a pH 5.0 y se agitó a 150 rpm. Se retiraron alícuotas de 1 mL de la mezcla de reacción a 24 horas. La reacción se detuvo en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su posterior análisis por HPLC.

IV.4.3. Diseño experimental

IV.4.3.1. Diseño experimental fraccionado 2^{5-1}

La finalidad de este diseño experimental fue identificar las variables independientes más significativas para el proceso de síntesis enzimática de IMOs según lo descrito en la sección *IV.*4.2.7. Los niveles de las variables independientes se presentan en la **Tabla 3** y se codificaron como se indica en la Ec. (5).

$$x_i = \frac{2(X_i - X_{central})}{\Delta X_i} \qquad \text{Ec. (5)}$$

donde x_i es el nivel codificado de la variable *ith*, X_i es el nivel de la variable natural *ith*, $X_{central}$ es la variable natural en el punto central y ΔX_i es el valor de cambio del nivel de la variable natural *ith*.

Tabla 3. Valores de las variables independientes en los niveles del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}

Variables independientes	Símbolo	Niveles codificables		
		-1	0	1
Almidón inicial %(p/v)	X_1	30	35	40
Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s.)	X_2	7	10	13
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	X_3	20	60	100
Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	X_4	10	17.5	25
Temperatura (°C)	X_5	50	55	60

Fuente: Propia

Para determinar los niveles de las variables independientes de la **Tabla 4** tales como X_2 y X_3 se efectuaron ensayos preliminares con almidón licuado proveniente de la suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v). La mezcla de reacción tuvo un pH 5.0 y se incubó a 55 °C. La concentración de Promozyme D2 se estudió en el rango desde 1.5 a 23.3 UI/g almidón licuado b.s. Para los experimentos de sacarificación con Bakezyme Mam 10.000 en el rango desde 5.2 a 69.5 UI/g almidón licuado b.s, se fijó la concentración de Promozyme D2 a 14.6 UI/g almidón licuado b.s. Los niveles de las variables X_1, X_4 y X_5 se determinaron de los datos de la literatura y de las fichas técnicas de las preparaciones enzimáticas comerciales (**Anexo 1**).[82]

En la **Tabla 4** se presenta la matriz experimental del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} con 16 experimentos y 2 puntos centrales, las cuales se ejecutaron de manera aleatoria. Las respuestas del diseño fueron el rendimiento de IMOs, la selectividad de isomaltotriosa y la productividad volumétrica después de 24 h de reacción. El rendimiento ($Y_{P/S}$) se definió como los gramos de IMOs por 100 gramos de almidón licuado en base seca (b.s.) (%, g/g). La selectividad (S_i) se definió como los gramos de isomaltotriosa por 100 gramos de IMOs sin considerar la isomaltotriosa (%, g/g).[83]

La productividad volumétrica (Q_P) se definió como los gramos de IMOs por volumen de reacción y tiempo (g/L.h).

En principio, las variables de respuesta se pueden describir por el modelo lineal como se muestra en la Ec. (6).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon_i \qquad \text{E.c. (6)}$$

Tabla 4. Matriz experimental del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}

Corrida experimental	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0

Fuente: propia

IV.4.3.2. Diseño compuesto central rotacional

La finalidad del diseño fue encontrar la optimización de las respuestas dependientes ($Y_{P/S}$, S_i y Q_P). En estos experimentos se trabajaron con una concentración enzimática fija de Promozyme D2 a 10 UI/g almidón licuado b.s. Los niveles de las variables independientes se presentan en la **Tabla 5** y se codificaron como se indicó en la Ec. (5).

Tabla 5. Valores de las variables independientes en los diferentes niveles del diseño compuesto central rotacional.

Variables independientes	Símbolo	Niveles codificables				
		-2	-1	0	1	2
Almidón inicial %(p/v)	X_1	28	30	32	34	36
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	X_2	60	65	70	75	80
Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	X_3	8.5	11.5	14.5	17.5	20.5
Temperatura (°C)	X_4	50	52	54	56	58

Fuente: Propia

En la **Tabla 6** se presenta la matriz experimental del diseño con 27 experimentos, los cuales se ejecutaron de manera aleatoria. Las variables dependientes fueron el $Y_{P/S}$, S_i y Q_P a las 24 h de reacción.

Tabla 6. Matriz experimental del diseño compuesto central rotacional.

Corrida experimental	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25 (C)	0	0	0	0
26 (C)	0	0	0	0
27 (C)	0	0	0	0

Fuente: propia.

En principio, las variables de respuesta se pueden describir por el modelo cuadrático como se muestra en la Ec. (7).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad \text{E.c. (7)}$$

IV.4.4. Metodología analítica

IV.4.4.1. Análisis próximal

Se determinó la composición fisicoquímica del almidón de cebada forrajera según métodos oficiales: humedad (AOAC 925.09), ceniza (AOAC 923.03), grasa cruda (AOAC 920.39), proteína cruda (AOAC 984.13), fibra cruda (AOAC 920.86), carbohidratos totales como extracto libre de nitrógeno (ELN), azúcares reductores y glucosa.

IV.4.4.2. Análisis de azúcares reductores

Se determinó por el método de Somogy-Nelson usando glucosa anhidra y maltosa como estándares (0.1 - 0.4 g/L y 0.1 - 0.7 g/L, respectivamente).

Para determinar las actividades enzimáticas de α-amilasa Termamyl 300L y pululanasa, se disolvió la glucosa en tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 6.0 conteniendo 40 ppm de Ca^{2+} y en tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.0, respectivamente. Para determinar la actividad enzimática de amilasa maltogénica se disolvió maltosa en tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.5.

Para determinar los azúcares reductores en la licuefacción, se disolvió la glucosa en agua conteniendo 40 ppm de Ca^{2+} a pH 6.0.

IV.4.4.3. Análisis de glucosa

El contenido de glucosa se estimó mediante un kit enzimático (Glicemia Enzimática AA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante usando glucosa anhidra como azúcar estándar (0.25 - 5.0 g/L). El ensayo consistió en agregar 10 µL de muestra y 1

mL de reactivo a un microtubo. Luego, se homogenizó e incubó a 37 °C por 5 min y se realizó la lectura a 505 nm.

IV.4.4.4. Determinación de materia seca

El método consistió en la pérdida de humedad de la muestra a 45 °C y a 50 °C para almidón y almidón licuado respectivamente. La materia seca representa la masa total de un alimento menos su contenido de agua, ese contenido se expresa en porcentaje.

IV.4.4.5. Análisis de carbohidratos por HPLC

Los productos de reacción se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando el equipo Thermo Scientific, modelo UltiMate 3000 con un detector CAD (*Charged Aerosol Detector*, valor de función de potencia de 1.50) e inyección automática de la muestra. La columna cromatográfica usada fue Shodex SUGAR Series® SZ5532 (6 x150 mm, tamaño de partícula de 6 mm), la cual se trabajó a 50 °C. Las muestras se diluyeron con agua Mili-Q y se filtraron a través de filtros de jeringa de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. La inyección de la muestra fue de 10 µL y la fase móvil fue acetonitrilo/agua (70:30) a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min. El tiempo del análisis cromatográfico fue de 24 minutos. Los datos se analizaron usando el software Chromeleon, versión 7.2.

Los siguientes parámetros se utilizaron para el detector CAD: La velocidad de recopilación de datos se ajustó a 10 Hz, utilizando una constante de filtro de 5 s. La temperatura del evaporador CAD se ajustó a 50 ± 2 °C. La presión de nitrógeno gaseoso para el nebulizador se ajustó a la configuración optimizada, recomendada por el fabricante, específica para el nebulizador (método analítico).

IV.5. Análisis estadístico

A partir de los resultados de los diseños experimentales se realizó los análisis de varianza (ANOVA), de sus siglas en inglés, para determinar si las variables estudiadas son significativas. Las gráficas tridimensionales y el cálculo de los ANOVA se realizarán en el ambiente del software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc, USA).

V. RESULTADOS

V.1. Extracción y purificación del almidón

El almidón se obtuvo de los granos de cebada forrajera siguiendo el *apartado IV.4.2.3.* Todas las etapas descritas fueron necesarias para reducir las interferencias en las etapas posteriores de la acción enzimática. La **Figura 6** ilustra el proceso para la obtención de almidón purificado a partir de los granos de cebada forrajera. El rendimiento del almidón purificado respecto a los granos de cebada íntegro fue 31.2 % ± 1.33 %.



Figura 6. Proceso de extracción y purificación de almidón. (a) Grano de cebada forrajera, (b) harina de cebada, (c) suspensión de almidón de cebada, (d) filtración y lavado alcalino de suspensión de almidón, (e) suspensión neutra de almidón, (f) almidón purificado.

V.2. Composición próximal del almidón

La composición proximal del almidón se evaluó después de su purificación. Los resultados se muestran en la **Tabla 7**. Como se puede observar, los porcentajes de grasa, proteína, fibra cruda y azúcares reductores son bastante bajos y no hubo presencia de glucosa.

Tabla 7. Composición proximal del almidón de cebada forrajera.

Composición	Resultados %
Humedad	15.86
Ceniza	0.13
Grasa cruda	0.15
Proteína cruda	1.11
Fibra cruda	0.42
Carbohidratos totales (ELN)	82.33
Azúcares reductores	0.83
Glucosa	0

Fuente: propia.

V.3. Determinación de las actividades enzimáticas

En la **Tabla 8** se presenta las actividades enzimáticas de las preparaciones comerciales ensayadas en condiciones controladas. Las enzimas Termamyl 300L, Promozyme D2, Bakezyme Mam 10.000 presentaron actividad hidrolítica definida, mientras que la Transglucosidase L al ser una α-glucosidasa exhibió dos actividades enzimáticas: la actividad hidrolítica (U_H) y la actividad de síntesis (U_T).[68] Estas actividades se calcularon como indica el *apartado IV.4.2.5*.

Tabla 8. Actividades enzimáticas de las preparaciones comerciales.

Preparaciones enzimáticas	Valor
Termamyl 300L (UI/mL)	2950 ± 10.7
Promozyme D2 (UI/mL)	1142 ± 8.3
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g)	35986 ± 251.2
Transglucosidase L (U_T/mL)	4259 ± 125.4
Transglucosidase L (U_H/mL)	225 ± 90.8

Fuente: propia.

La **Figura 7** muestra la liberación gradual de azúcares reductores en un rango tiempo de reacción catalizada por las enzimas. Por ejemplo, Termamyl 300L y Bakezyme Mam 10.000 mostraron actividad hidrolítica al romper los enlaces glicosídicos en el almidón soluble y se liberó azúcares reductores expresados como glucosa y maltosa, respectivamente. La enzima 1,4-α-D-glucano-glucanohidrolasa, proveniente de *Bacillus licheniformis.* (Termamyl 300L), exhibe características licuantes al cortar al azar los enlaces α-1,4-glucosídicos. Por otro lado, la enzima 1,4-α-D-glucano-maltohidrolasa (Bakezyme Mam 10.000) presenta características sacarificantes. Esta enzima, actúa sobre los enlaces glucosídicos α-(1,4) del extremo no reductor que no están adyacentes a los enlaces glucosídicos α-(1,6) en el almidón, liberando maltosa.[61,62] La **Figura 7** también muestra la liberación gradual de azúcares reductores en 5 minutos de reacción proveniente de la actividad hidrolítica de la enzima 1,6-α-D-dextrina-glucanohidrolasa (Promozyme D2), que escinde específicamente en los enlaces glucosídicos α-(1,6) del pululanano con el extremo reducido, liberando moléculas de maltotriosa.[63,84]

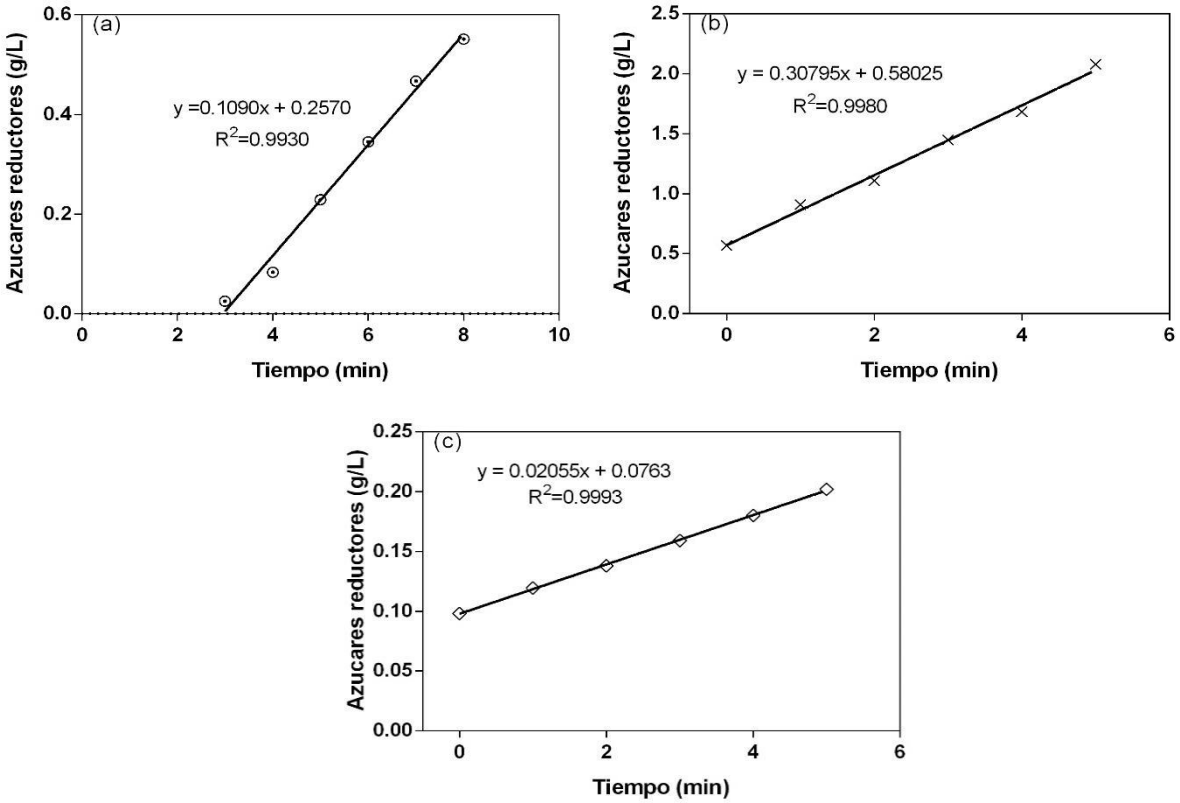


Figura 7. **Liberación de azúcares reductores en función del tiempo de reacción catalizada por preparaciones enzimáticas comerciales de (a) α-amilasa termoestable Termamyl 300L, (b) pululanasa Promozyme D2 y (c) amilasa maltogénica Bakezyme MAM 10.000. (n=2)**

Símbolos: ⊙: azúcares (glucosa) liberados por la enzima α-amilasa, x: azúcares (glucosa) liberados por la enzima pululanasa y ◇: azúcares (maltosa) liberados por la enzima amilasa maltogénica.

La preparación comercial Transglucosidase L es una α-glucosidasa de una alta actividad de síntesis. En la **Figura 8,** se observa el aumento gradual de glucosa debido a la actividad hidrolítica. La glucosa liberada proviene de la escisión del enlace glucosídico α-(1,4) de la maltosa y como subproducto de la síntesis de trisacáridos. Se evidencia la síntesis gradual de panosa y maltotriosa a lo largo del tiempo, proveniente de la transglicosilación de la glucosa hacia el grupo 6-OH y 4-OH de la maltosa (panosa y maltotriosa, respectivamente).[8]

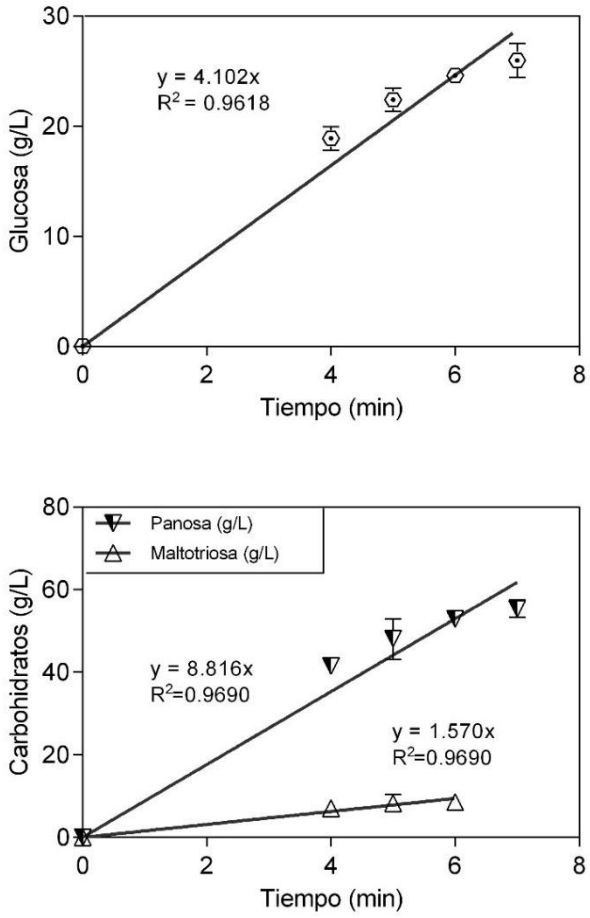


Figura 8. Liberación de azúcares glucosa y formación de panosa y maltotriosa en función del tiempo de reacción catalizada por la preparación enzimática comercial Transglucosidase L. (n=2).

V.4. Licuefacción de almidón

Después de la extracción y purificación del almidón se determinó el tiempo de licuefacción para alcanzar un valor de ED entre 6 y 7. Un valor ED muy alto o bajo influye directamente en la calidad de los IMOs. Como ejemplo, en la **Figura 9** se presenta los resultados de los ensayos de licuefacción de almidón de 40 % (p/v). Como se puede ver, se necesita un tiempo de licuefacción de aproximadamente de 59 min para controlar el valor de ED entre 6 y 7.[9]

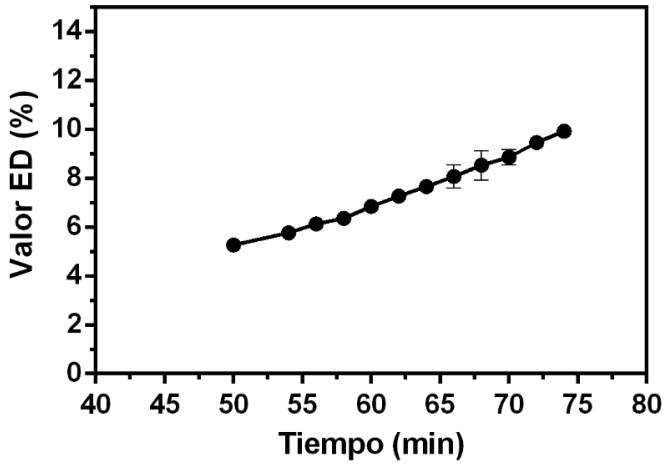


Figura 9. Valor ED frente a diferentes periodos de licuefacción de almidón al 40% (p/v) con 16.9 UI/mL Rx de α-amilasa comercial de *Bacillus licheniformis* denominada Termamyl 300L.

En la **Tabla 9** se presenta un resumen del tiempo de licuefacción y la actividad enzimática por mililitro de reacción en las suspensiones de almidón, abarcando un rango del 28 al 40 % (p/v), con el objetivo de alcanzar el equivalente dextrosa deseado.

Tabla 9. Tiempos de licuefacción y dosis de enzima Termamyl 300L para alcanzar un ED entre 6 y 7.

Concentración de almidón (p/v)	UI/mL Rx	Tiempo (min)
28%	11.8	46
30%	12.7	48
32%	13.5	50
34%	14.3	52
36%	15.2	54
40%	16.9	59

Fuente: propia.

La enzima α-amilasa realiza la escisión de los enlaces glucosídicos α-(1,4) presentes en las moléculas de amilosa y amilopectina, generando una mezcla resultante de dextrinas lineales y ramificadas.[84] La **Figura 10** ilustra que se requiere una mayor actividad enzimática por mililitro de reacción a medida que incrementa la concentración de almidón para que la reacción no supere una hora.

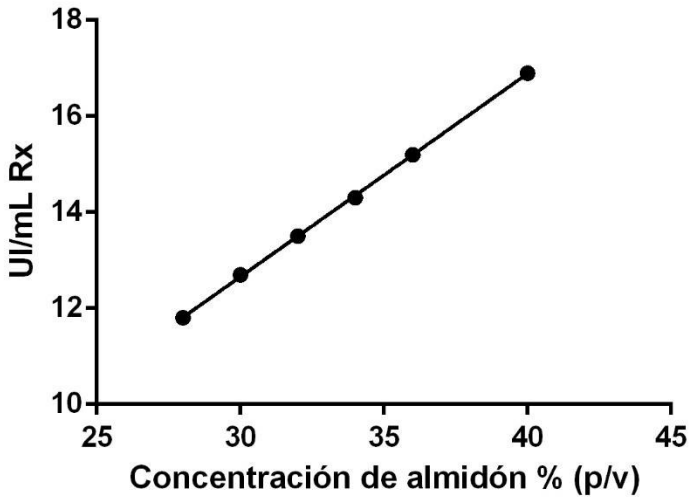


Figura 10. Actividad de enzima α-amilasa comercial de *Bacillus licheniformis,* denominada Termamyl 300L, por mililitro de reacción frente a diferentes concentraciones de almidón.

V.5. Evaluación del comportamiento de las enzimas para realizar las reacciones de sacarificación

La **Figura 11** muestra la cinética de sacarificación del almidón licuado proveniente de la suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v), usando la preparación Promozyme D2 en la concentración desde 1.5 a 23.3 UI/g almidón licuado b.s. Los datos experimentales no tienen réplica porque estos ensayos son preliminares. La finalidad fue evaluar y determinar un rango de la concentración enzimática para el diseño experimental fraccionado.

Los resultados indican que conforme incrementó la concentración enzimática se incrementó también la concentración de azúcares reductores, expresados como glucosa, hasta la concentración de 14.6 UI/g almidón licuado b.s. Además, se alcanzó una meseta de la concentración de azúcares reductores conforme incrementó el tiempo de reacción. Este fenómeno se debió a que los enlaces glucosídicos α-(1,6) accesibles para la enzima se agotaron. Así, el almidón es desramificado por esta enzima, resultando en cadenas lineales de amilosa. Por lo tanto, las variables de concentración enzimática y tiempo eficaces se encuentran cercanos a 14.6 UI/g de almidón licuado b.s y 7 horas, respectivamente.

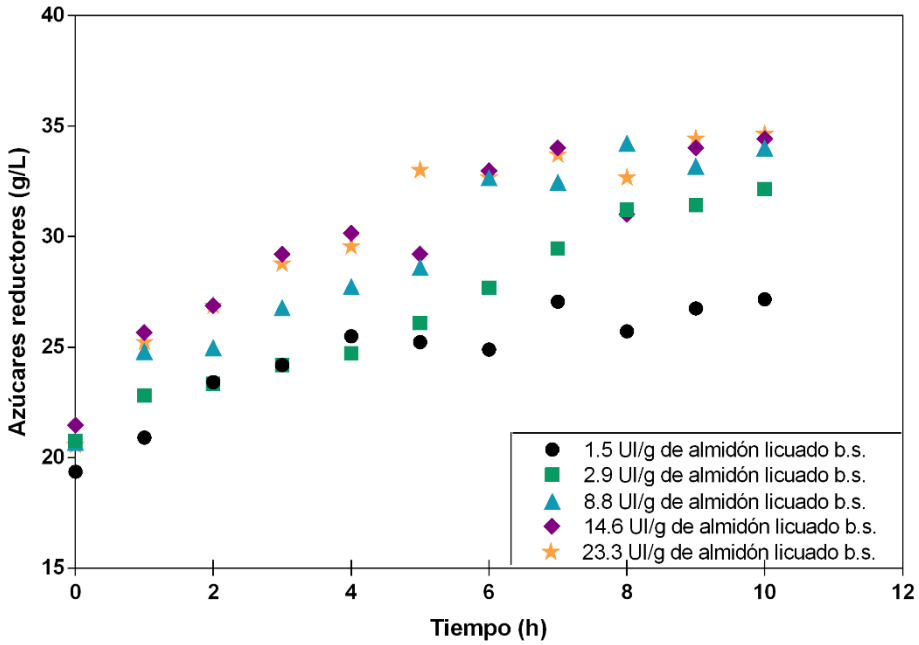


Figura 11. Formación de azúcares reductores a diferentes concentraciones de Promozyme D2 durante la sacarificación del almidón licuado proveniente de una suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v).

Después de 7 horas de sacarificación con Promozyme D2, tratado con 14.6 UI/g de almidón licuado b.s, las suspensiones fueron posteriormente sometidas a tratamiento enzimático con la enzima comercial Bakezyme Mam 10.000. La **Figura 12** muestra la evaluación del rango de concentración enzimático de Bakezyme Mam 10.000 desde

5.2 a 69.5 UI/g de almidón licuado y tratado con pululanasa (Promozyme D2) b.s. proveniente de la suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v). Los resultados indican que conforme incrementó la concentración enzimática se incrementó también la concentración de maltosa liberada por la enzima. Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos α-(1,4) del almidón desramificado desde los extremos no reductores formando como producto maltosa.[60]

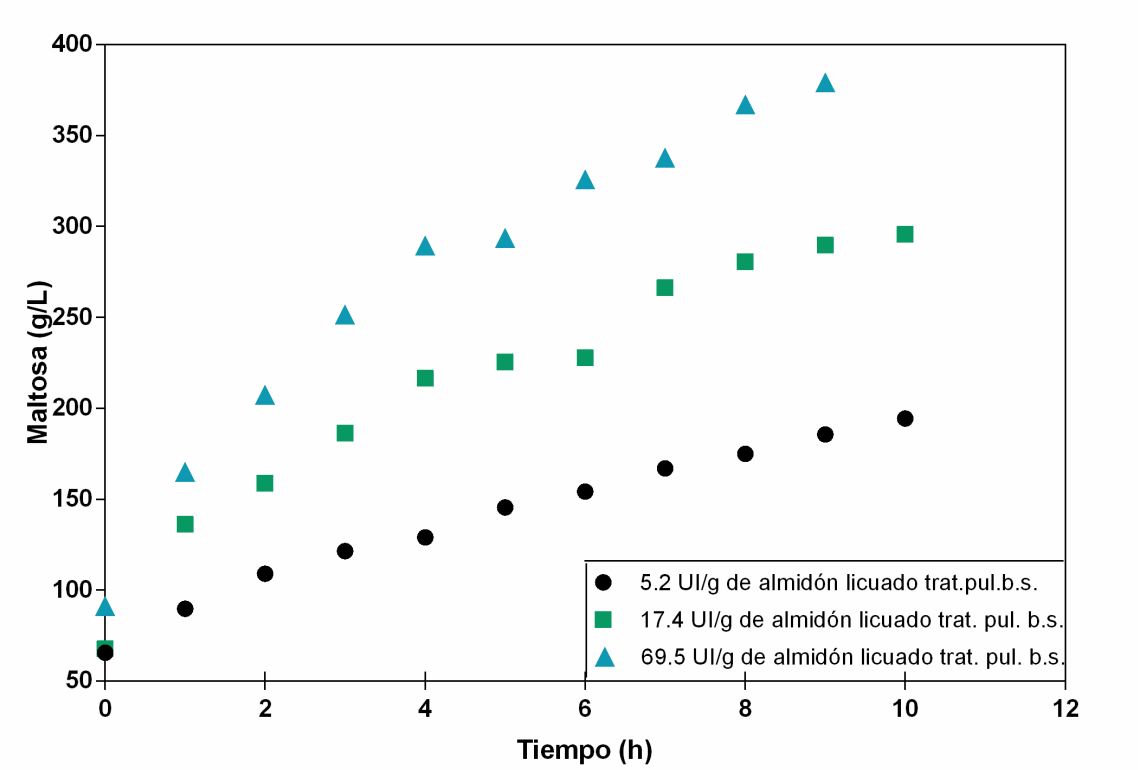


Figura 12. Formación de maltosa a diferentes concentraciones de Bakezyme Mam 10.000 durante la sacarificación del almidón licuado tratado con pululanasa proveniente de una suspensión de almidón inicial de 35 % (p/v). (trat. pul. = tratado con pululanasa).

V.6. Diseño factorial fraccionado 2^{5-1}

En la **Tabla 10** se presentan los resultados del diseño experimental fraccionado 2^{5-1} después de 24 h de reacción, según las condiciones descritas en el *apartado IV.4.3.1.* Como se puede ver, $Y_{P/S}$ varió desde 39.71 % a 57.51 % (g/g msl) obteniendo los resultados más altos en las corridas 5,7 y 8. S_i varió desde 23.89 % a 38.57 % (g/g), obteniéndose los valores más altos en las corridas 2, 3 y 8. Q_P varió de 5.4 a 10.1 g/L.h.

Tabla 10. Resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.

Corrida experimental	Rendimiento % (g/g)	Selectividad % (g/g)	Productividad volumétrica (g/L.h)
1	53.56	32.99	6.5
2	41.90	37.55	7.4
3	55.00	36.93	6.7
4	47.84	35.39	8.4
5	57.51	33.13	7.0
6	46.33	33.51	8.1
7	55.98	31.18	6.8
8	57.51	38.57	10.1
9	51.85	30.45	6.3
10	40.06	25.90	7.0
11	44.51	23.89	5.4
12	42.86	31.75	7.5
13	53.57	27.27	6.5
14	44.22	33.03	7.7
15	50.18	31.51	6.1
16	39.71	26.15	6.9
17 (C)	47.39	33.47	7.1
18 (C)	45.72	32.74	6.8

Fuente: propia.

En la **Figura 13** se presenta la gráfica de probabilidad normal de las estimaciones de los efectos en $Y_{P/S}$, S_i y Q_P. Aquellos efectos en torno a la media cero y alineados en una línea recta denotan una distribución normal. Estos efectos, de magnitud reducida, no son significativos. En contraste, los efectos significativos se encuentran claramente apartados de esta línea recta. Cabe destacar que la variable Promozyme D2 y todas las interacciones en las que interviene no son significativas. Por lo tanto, se excluyó esta variable del experimento para enfocar la atención en los factores más influyentes en los resultados del estudio.

Adicionalmente, en la **Figura 14** se presentan los diagramas de Pareto, que ilustran de manera evidente que la variable Promozyme D2 exhibe un efecto no-significativo a un nivel de significancia de 0.05. Estos resultados respaldan la decisión de descartar la variable Promozyme D2. Los resultados estadísticos se corroboran mediante el ANOVA para las variables $Y_{P/S}$, S_i y Q_P, como se detalla en el **Anexo 2**.

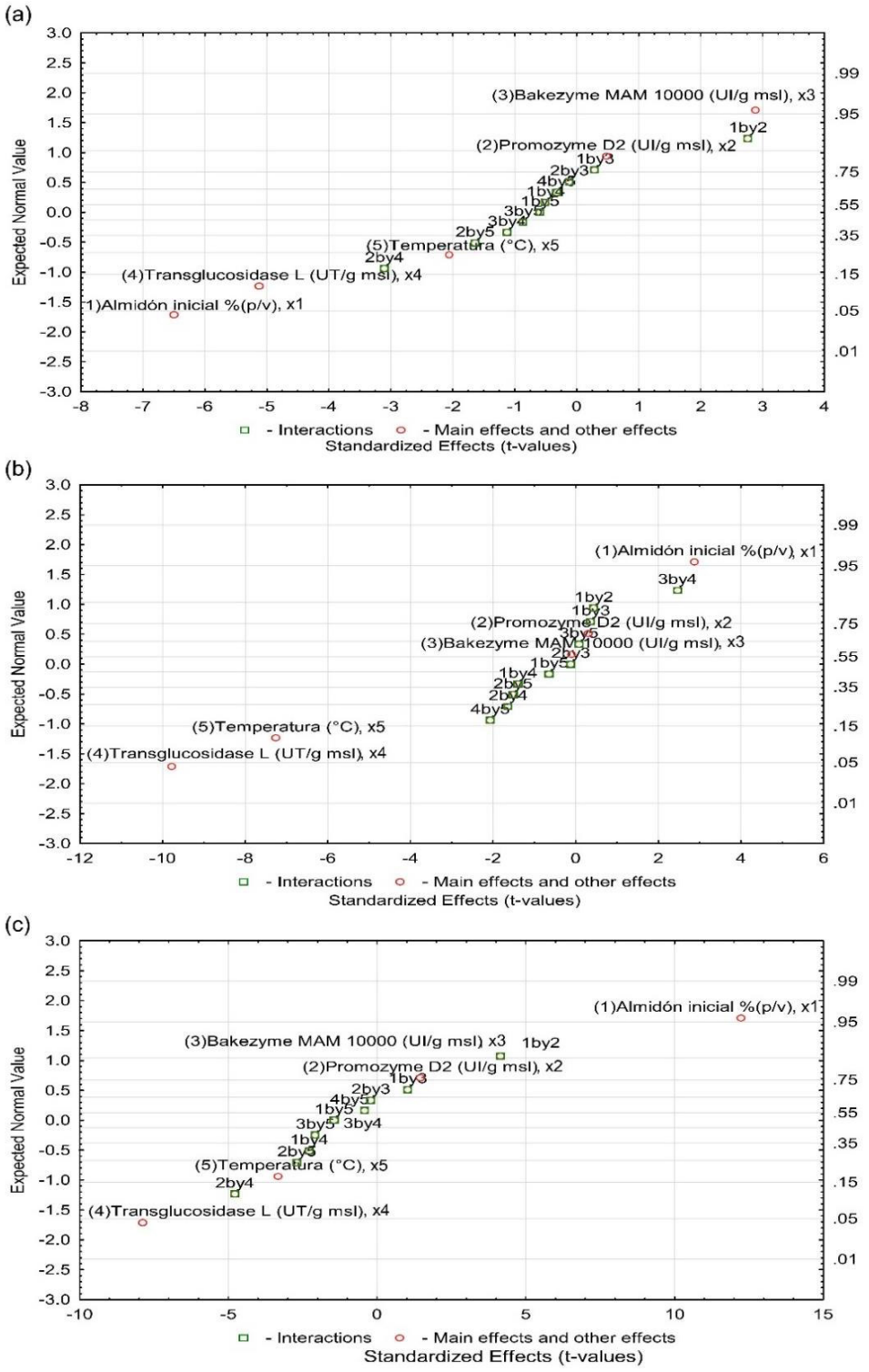


Figura 13. **Gráfica de probabilidad normal de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} sobre: sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P**. (msl: masa seca licuada.)

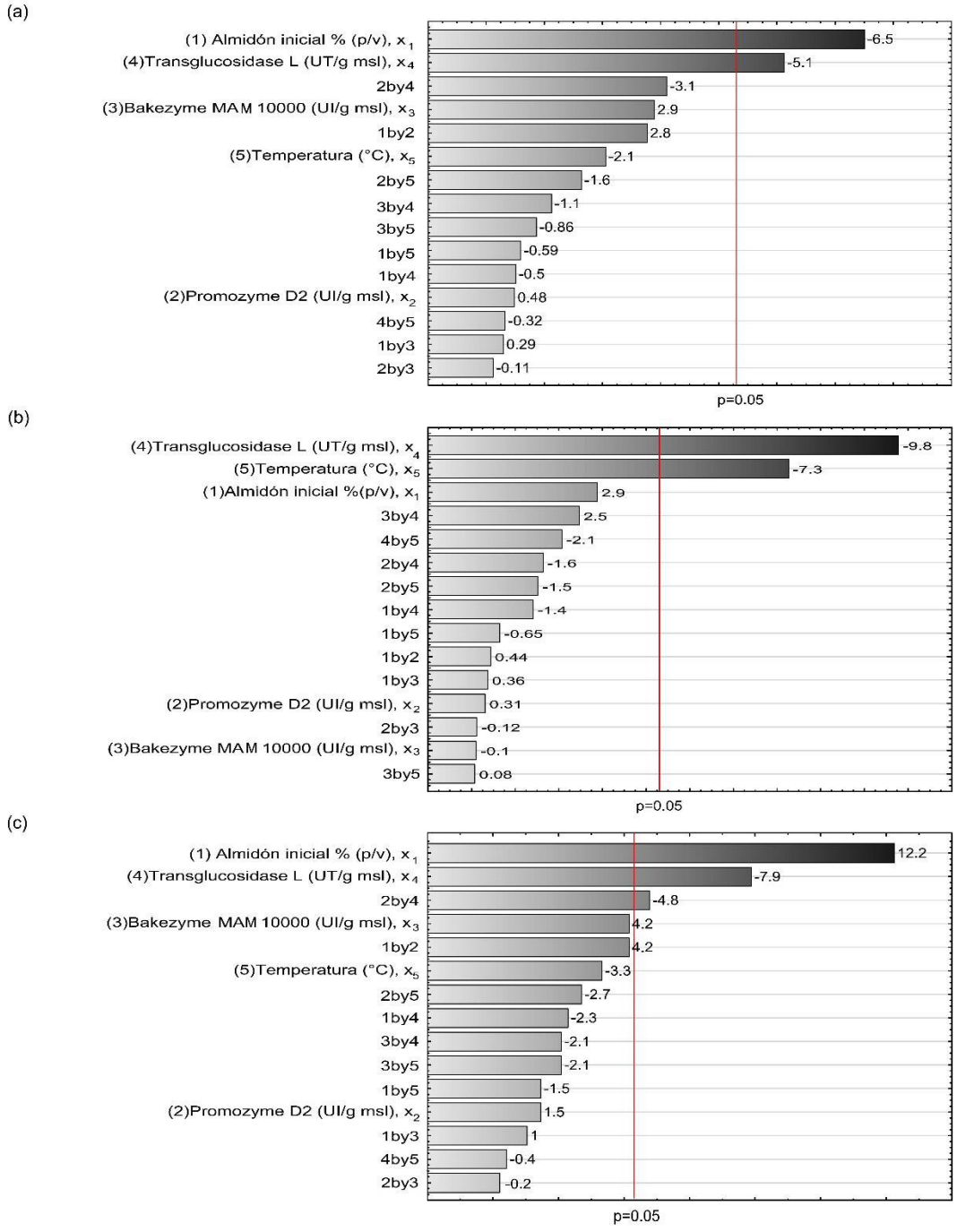


Figura 14. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.)

V.7. Diseño factorial completo 2^4

Los resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} indicaron que la variable independiente Promozyme D2 no tiene efecto significativo en el diseño, por lo que se retiró esta variable y se realizó un diseño factorial completo de cuatro variables. Para ello se mantuvo fijo una concentración de Promozyme D2 de 10 UI/g almidón licuado b.s. Como se puede ver en la **Tabla 11**, los resultados de $Y_{P/S}$ variaron desde 39.71 % a 57.51 % (g/g msl) obteniendo los resultados más altos en las corridas 3,4 y 11. S_i varió desde 23.89 % a 38.57 % (g/g), obteniéndose los valores más altos en las corridas 1, 2 y 4. Q_P varió de 6.1 a 10.1 g/L.h.

Tabla 11. Resultados del diseño factorial completo 2^4.

Corrida experimental	Rendimiento % (g/g)	Selectividad % (g/g)	Productividad volumétrica (g/L.h)
1	55.00	36.93	6.7
2	41.90	37.55	7.4
3	57.51	33.13	7.0
4	57.51	38.57	10.1
5	51.85	30.45	6.3
6	42.86	31.75	7.5
7	50.18	31.51	6.1
8	44.22	33.03	7.7
9	53.56	32.99	6.5
10	47.84	35.39	8.4
11	55.98	31.18	6.8
12	46.33	33.51	8.1
13	44.51	23.89	5.4
14	40.06	25.90	7.0
15	53.57	27.27	6.5
16	39.71	26.15	6.9
17 (C)	47.39	33.47	7.1
18 (C)	45.72	32.74	6.8

Fuente: propia.

En la **Figura 15a** se presenta la gráfica de probabilidad normal de los efectos para $Y_{P/S}$. Las variables Bakezyme Mam 10.000, concentración de almidón y Transglucosidase L no presentan una distribución normal. De manera similar, en la **Figura 15c**, la gráfica de probabilidad normal para Q_P indica que las variables concentración de almidón, Transglucosidase L y Bakezyme Mam 10.000 no se ajustan a una distribución normal. Los efectos negativos indican que los valores más altos del rendimiento se observaron en el nivel bajo de estas variables. Además, en la **Figura 15b**, la gráfica de probabilidad normal de los efectos para S_i sugiere que los efectos principales de las variables Transglucosidase L, temperatura y concentración de almidón, también carecen de seguir una distribución normal, por lo que los efectos de las variables mencionadas son significativos.

Tras examinar los gráficos de Pareto (**Figura 16**), se decidió eliminar ciertos efectos, como las interacciones de baja influencia, conservando los efectos principales. Los efectos principales corresponden a las variables de estudio, que son la concentración de almidón, Bakezyme Mam 10.000, Transglucosidase L y temperatura, junto con las interacciones de orden inferior. Dado que los efectos de las interacciones de orden superior al ser insignificantes se agrupan en el término “error” en el análisis de varianza (ANOVA) para cada variable de respuesta: $Y_{P/S}$, S_i y Q_P. Este proceso se detalla en el **Anexo 3**.

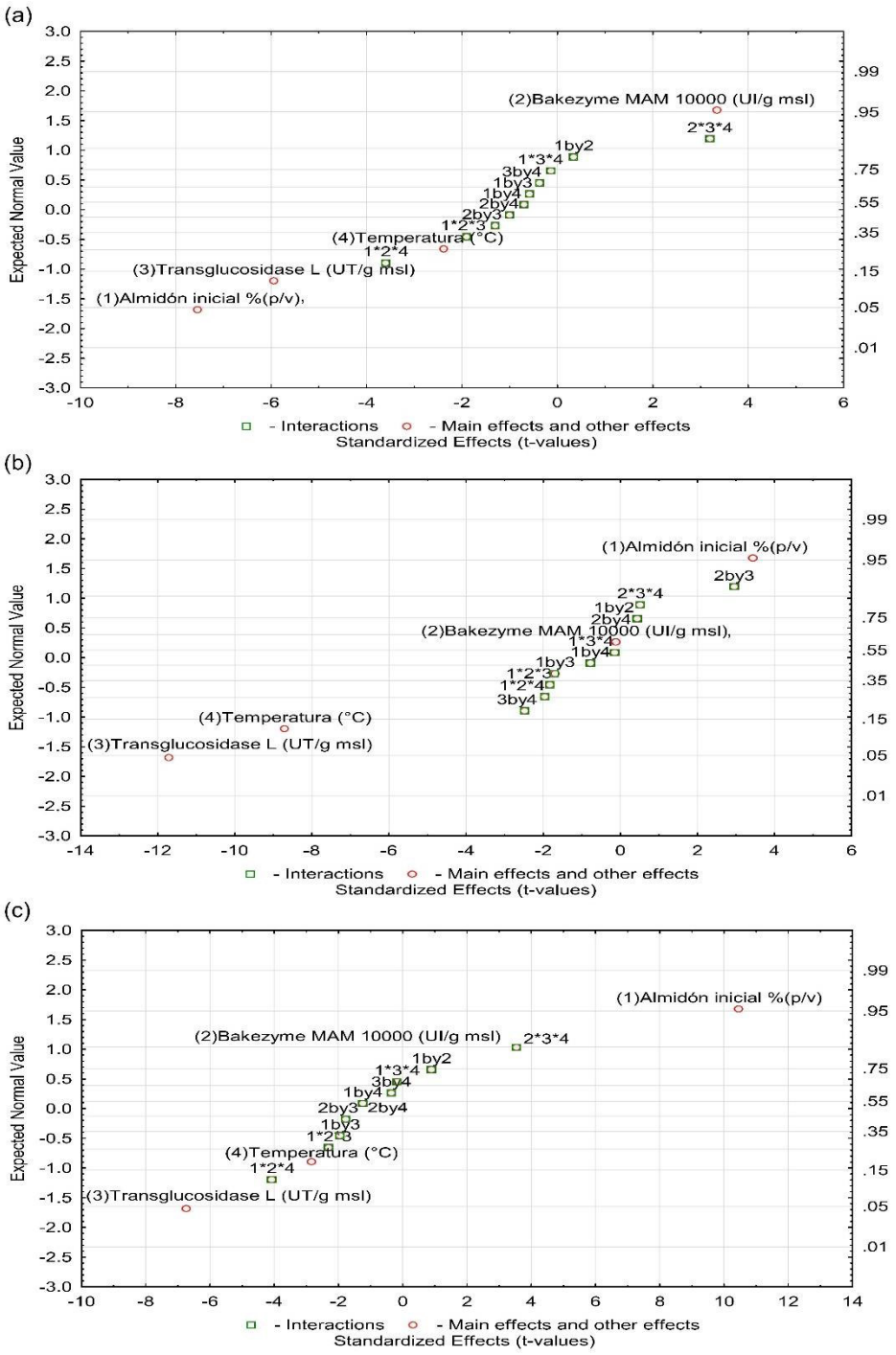


Figura 15. Gráfica de probabilidad normal de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial fraccionado 2^4 sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.)

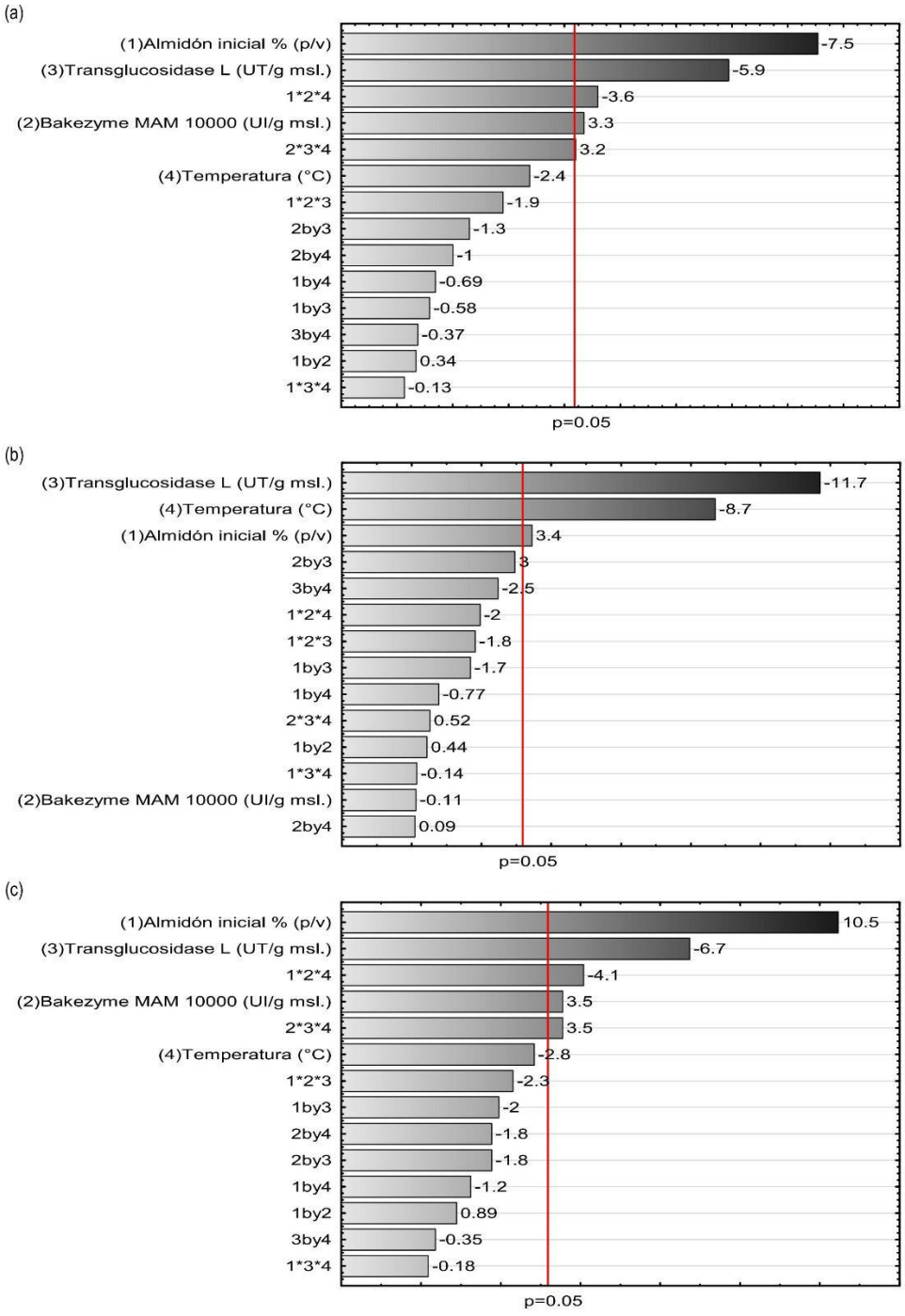


Figura 16. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño factorial completo 2^4 sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.)

Los resultados de la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta $Y_{P/S}$ (**Anexo 3a**) confirmaron estadísticamente la significancia de las variables almidón inicial, Transglucosidase L y Bakezyme MAM 10.000, así como de las interacciones 1*2*4 y 2*3*4, con un valor-p ≤0.05. Además, después del ajuste, la temperatura se reveló como una variable significativa, al igual que la interacción 1*2*3. Esto indica que el rendimiento de jarabe de IMOs se ve influenciado por estas cuatro variables principales del estudio.

En cuanto a la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta S_i (**Anexo 3b**), se confirmó estadísticamente la significancia de las variables almidón inicial, Transglucosidase L y temperatura fueron significativos con un valor-p ≤0.05. Por otro lado, se observó que la enzima Bakezyme MAM 10.000 solo tiene efecto cuando interactúa con las otras variables significativas.

En relación con la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta Q_P (**Anexo 3c**), se confirmó estadísticamente la significancia de las variables almidón inicial, Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, así como de las interacciones 1*2*4 y 2*3*4, con un valor-p ≤0.05. Sin embargo, la temperatura solo tiene un efecto cuando interactúa con las otras variables significativas.

La variabilidad de la respuesta observada encuentra su explicación en el modelo reducido, representado en la forma codificada de la Ec. (7), (8) y (9) para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i, Q_P; respectivamente. La obtención de los coeficientes de la mencionada ecuación se llevó a cabo mediante un análisis de regresión múltiple, empleando el método de mínimos cuadrados. Los signos positivos y negativos indican que los factores deben aumentar o disminuir respectivamente para mantener el balance de la ecuación.

$$Y_{P/S} = 48.65 - 3.86x_1 + 1.71x_2 - 3.04x_3 - 1.22x_4 - 0.97x_1x_2x_3 - 1.84x_1x_2x_4 + 1.64x_2x_3x_4 \quad \text{Ec. (7)}$$

$$S_i = 31.97 + 0.91x_1 - 3.08x_3 - 2.29x_4 - 0.44x_1x_3 + 0.78x_2x_3 - 0.65x_3x_4 - 0.48x_1x_2x_3 - 0.52x_1x_2x_4 \quad \text{Ec. (8)}$$

$$Q_P = 7.13 + 0.74x_1 + 0.25x_2 - 0.48x_3 - 0.29x_1x_2x_4 + 0.25x_2x_3x_4 \quad \text{Ec. (9)}$$

Donde las variables x_1, x_2, x_3 y x_4 son las variables codificadas de acuerdo con la Ec. (5). x_1: almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Los valores-p de las pruebas *t* de Sudent para los coeficientes de regresión para cada respuesta se detallan en el **Anexo 4**. Los resultados concluyen que las variables contribuyen significativamente en el modelo (valor $p \leq 0.05$).

Las **Figuras 17, 18 y 19** presentan gráficas de contorno de las superficies de respuesta en rendimiento, selectividad de isomaltotriosa y productividad volumétrica de jarabes de IMOs. Estas figuras ofrecen una perspectiva detallada de cómo varían estas métricas en función de dos variables mientras se mantienen constantes los valores de otras dos variables en el nivel ensayado que más favorece. Esto simplifica la interpretación de cómo influyen los factores en el desempeño general del sistema.

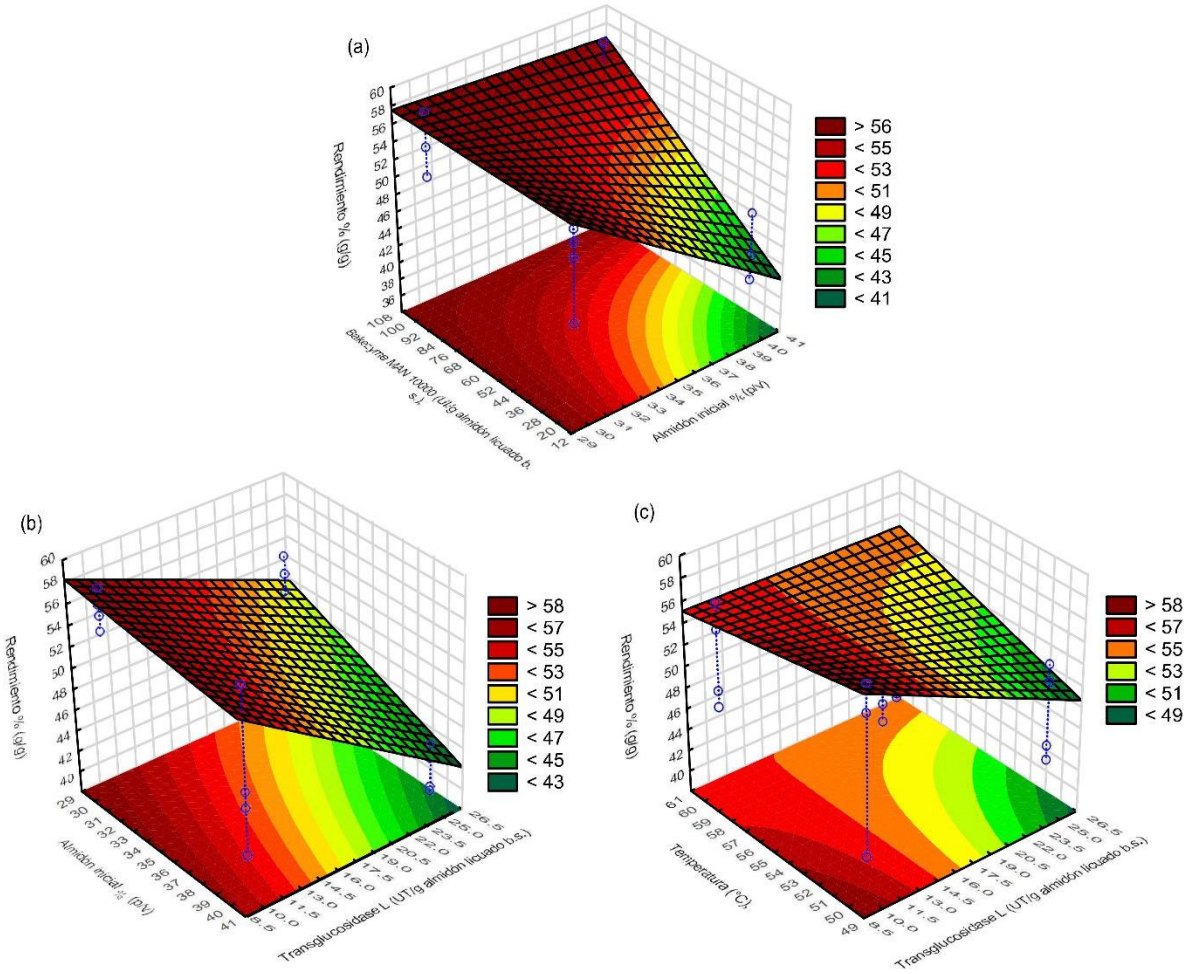


Figura 17. **Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta rendimiento en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4.** En función de Bakezyme MAM 10.000 y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y temperatura =50 °C (a), almidón inicial y Transglucosidase L, Bakezyme MAM 10.000= 100 UI/g almidón licuado b.s y temperatura = 50 °C (b), temperatura y Transglucosidase L, almidón inicial = 30 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000= 100 UI/g almidón licuado b.s (c).

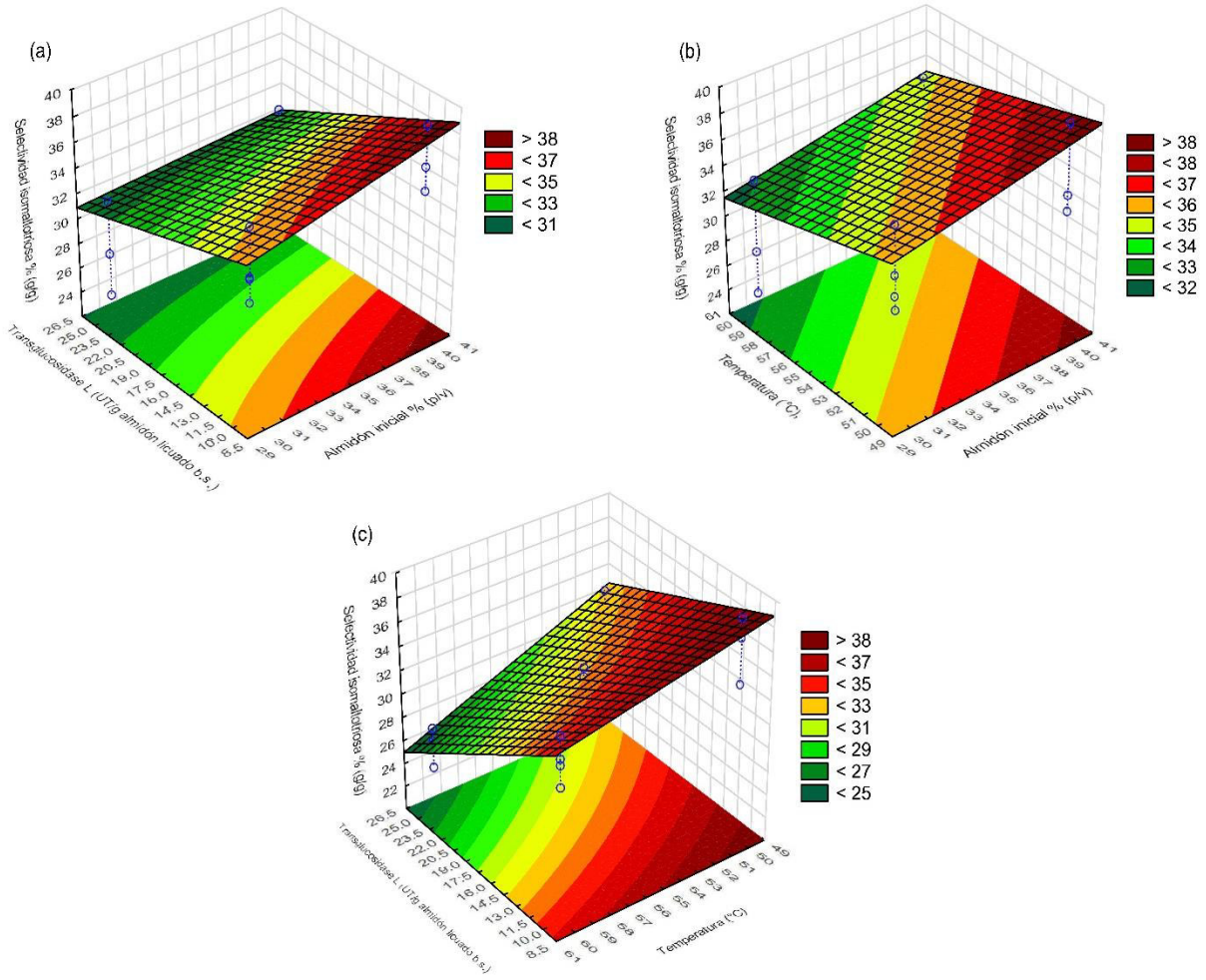


Figura 18. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta selectividad de isomaltotriosa en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, Bakezyme MAM 10.000= 60 UI/g almidón licuado b.s y temperatura = 50 °C (a), temperatura y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y Bakezyme MAM 10.000= 60 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y temperatura, almidón inicial = 40 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 60 UI/g almidón licuado b.s (c).

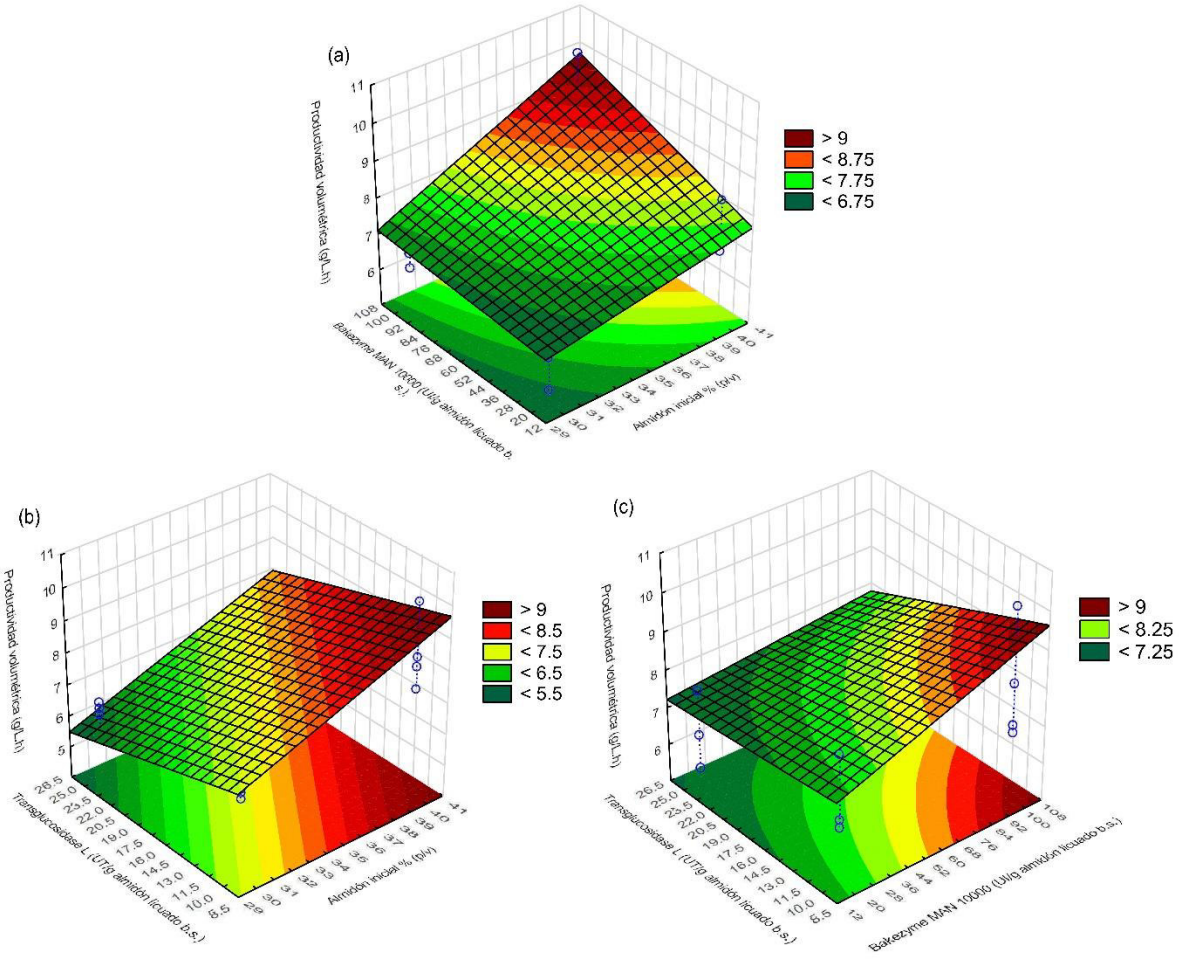


Figura 19. **Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta productividad volumétrica en un tiempo de reacción de 24 h del diseño factorial completo 2^4.** En función de Bakezyme MAM 10.000 y almidón inicial, Transglucosidase L = 10 U_T/g almidón licuado b.s y temperatura = 55 °C (a), Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 55 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 100 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y Bakezyme MAM 10.000, temperatura = 55 °C y almidón inicial = 40 % (p/v) (c).

V.8. Trayectoria del ascenso más pronunciado

A partir del diseño factorial completo se obtuvo el modelo matemático de primer orden de superficie de respuesta (Ec. (7), Ec (8) y Ec. (9)). Se calcularon los valores de las variables independientes que producen un valor de respuesta máxima, mediante el procedimiento del ascenso más pronunciado. Este procedimiento, según Montgomery[85], se emplea con el propósito de identificar el valor máximo o mínimo de una función de respuesta mediante la adaptación de los niveles de las variables independientes consideradas. La estrategia implica la exploración a lo largo de la trayectoria del ascenso más pronunciado mediante saltos o pasos proporcionales a los coeficientes de regresión de la función de respuesta hasta discernir un valor óptimo.

Por consiguiente, en este estudio se evaluó la respuesta de rendimiento de IMOs para llegar a la región óptima del diseño, ya que el rendimiento tiene un gran impacto en la industria, siendo representativo de la sostenibilidad en un mercado altamente competitivo.[8,86.] De la ecuación $Y_{P/S}$ **Ec. (7)** se concluyó que el almidón inicial, la enzima Transglucosidase L y temperatura deben disminuir, pero la enzima Bakezyme Mam 10.000 debe aumentar para que el rendimiento aumente. Por lo tanto, se consideró un paso o incremento de -2.5 % en la dirección de x_1 (almidón inicial %) y posteriormente se calcularon los pasos de las variables x_3, x_4 y x_5 en relación con x_1 para la respuesta de rendimiento (**Anexo 5**).

En la **Tabla 12** se muestra el diseño tanto en variables codificadas como naturales y los resultados experimentales del ascenso más pronunciado para la respuesta $Y_{P/S}$. El experimento se trabajó por duplicado en un tiempo de reacción de 24 horas.

Tabla 12. Experimentos del ascenso más pronunciado.

Pasos	x_1	x_3	x_4	x_5	ε_1	ε_3	ε_4	ε_5	$Y_{p/s,}$ %(g/g)
centro	0	0	0	0	35	60	17.5	55	46.6±0.8
Δ	-0.5	0.221	-0.394	-0.158	-2.5	8.84	-2.96	-0.79	-
Centro+Δ	-0.5	0.221	-0.394	-0.158	32.5	68.8	14.5	54.2	46.7±0.1
Centro+2Δ	-1	0.442	-0.788	-0.316	30.0	77.7	11.6	53.4	44.5±0.1
Centro+3Δ	-1.5	0.663	-1.182	-0.474	27.5	86.5	8.6	52.6	40.6±0.1
Centro+4Δ	-2.0	0.884	-1.576	-0.632	25.0	95.4	5.7	51.8	38.2±0.4

Fuente: propia.

En la **Figura 20** se muestra el rendimiento en cada paso de la trayectoria del ascenso más pronunciado. Se visualizó el incremento de la respuesta en el primer paso con un valor de 46.7 ± 0.1 %, posterior a ello, se observa un decremento del rendimiento. Por lo tanto, el modelo se ajustará en la región cercana al punto (ε_1= 32.5, ε_3=68.8, ε_4=14.5, ε_5=54.2).

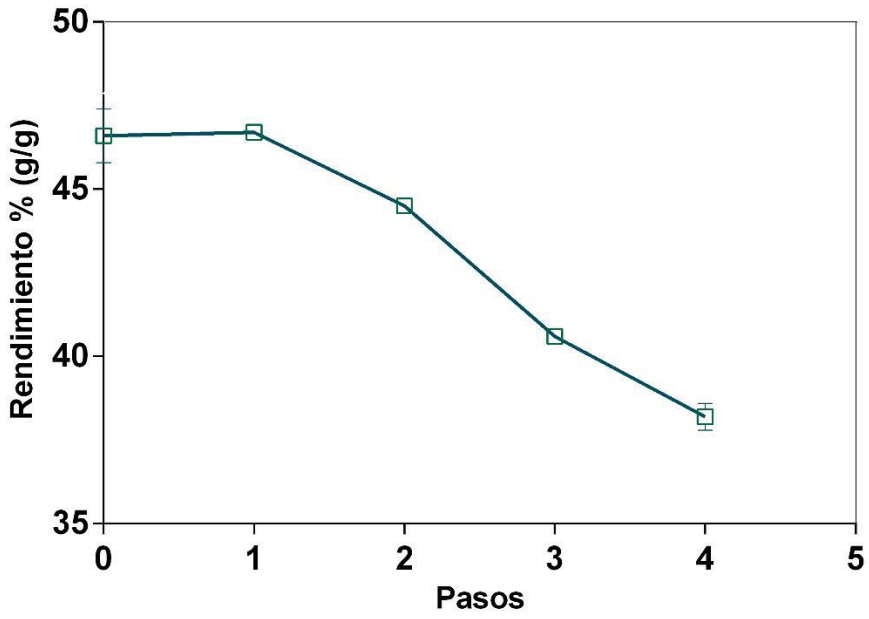


Figura 20. Rendimiento contra pasos sobre la trayectoria del ascenso más pronunciado.

V.9. Diseño compuesto central rotacional

Los resultados del diseño compuesto central rotacional son presentados después de un tiempo de reacción de 24 horas en las condiciones descritas en el *apartado IV.4.3.2.* En la **Tabla 13** se observa que $Y_{P/S}$ varió desde 45.0 a 56.4% obteniendo los resultados más altos en las corridas 1,9 y 21. S_i varió de 22.9 a 26.5% obteniendo los valores más altos en las corridas 9, 19 y 23. Q_P varió de 5.8 a 7.8 g/L.h obteniendo los valores más altos en las corridas 9, 13 y 18.

Tabla 13. Resultados del diseño compuesto central rotacional

Corrida experimental	Rendimiento % (g/g)	Selectividad % (g/g)	Productividad volumétrica (g/L. h)
1	56.4	33.1	7.0
2	50.1	31.9	6.3
3	50.6	31.9	6.3
4	46.7	29.8	5.8
5	53.4	32.9	6.7
6	49.7	31.1	6.2
7	51.8	32.4	6.5
8	50.6	31.6	6.3
9	55.7	36.0	7.8
10	51.9	33.9	7.3
11	50.1	33.2	7.0
12	49.0	31.4	6.9
13	52.9	34.5	7.4
14	52.4	33.8	7.3
15	45.0	33.4	6.3
16	50.7	33.1	7.1
17	50.4	31.1	5.9
18	52.1	34.3	7.6
19	52.9	34.4	7.0
20	52.2	33.3	6.9
21	54.0	32.3	7.1
22	45.8	30.1	6.0
23	53.6	34.5	7.1
24	48.5	30.9	6.4
25 (C)	49.5	31.7	6.5
26 (C)	50.8	32.8	6.7
27 (C)	50.9	32.8	6.7

Fuente: propia.

En la **Figura 21** se presenta los diagramas de Pareto del diseño compuesto central rotacional para cada respuesta: $Y_{P/S}$, S_i y Q_P. La enzima Transglucosidase L y temperatura ejercen efectos (significativos) lineales fuertes sobre $Y_{P/S}$, así como almidón inicial, Transglucosidase L y temperatura sobre S_i y Q_P. Se aprecia en los gráficos que, la enzima Bakezyme MAM 10.000 exhibe efecto cuadrático (significativo) en todas las tres respuestas y la Transglucosidase L ejerce efecto cuadrático (significativo) sobre S_i.

Tras la información visualizada en los gráficos de Pareto (**Figura 21**), se decidió eliminar ciertos efectos no significativos. Dado que los efectos de las interacciones de orden superior al ser insignificantes se agrupan en el término “error” en el análisis de varianza (ANOVA) para cada variable de respuesta: $Y_{P/S}$, S_i y Q_P. Este proceso se detalla en el **Anexo 6**.

Los resultados de la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta $Y_{P/S}$ (**Anexo 6a**) confirmaron la significancia estadística del efecto lineal de la Transglucosidase L y temperatura, las interacciones entre temperatura y demás variables (2*4, 1*4 y 3*4), así como el efecto cuadrático de Bakezyme MAM 10.000, con un valor-p ≤0.05.

En cuanto a la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta S_i (**Anexo 6b**), se confirmó la significancia estadística del efecto lineal del almidón inicial, temperatura y Transglucosidase L, la interacción 2*3, el efecto cuadrático de Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L fueron significativos con un valor-p ≤0.05. Además, después del ajuste, las interacciones 1*3 y 2*4 se revelaron como efectos significativos.

Respecto a la tabla ANOVA del modelo reducido para la respuesta Q_P (**Anexo 6c**), se confirmó estadísticamente la significancia del efecto lineal del almidón inicial, Transglucosidase L y temperatura, así como de las interacciones 1*4, 2*4 y 3*4 y efecto cuadrático de Bakezyme MAM 10.000 con un valor-p ≤0.05.

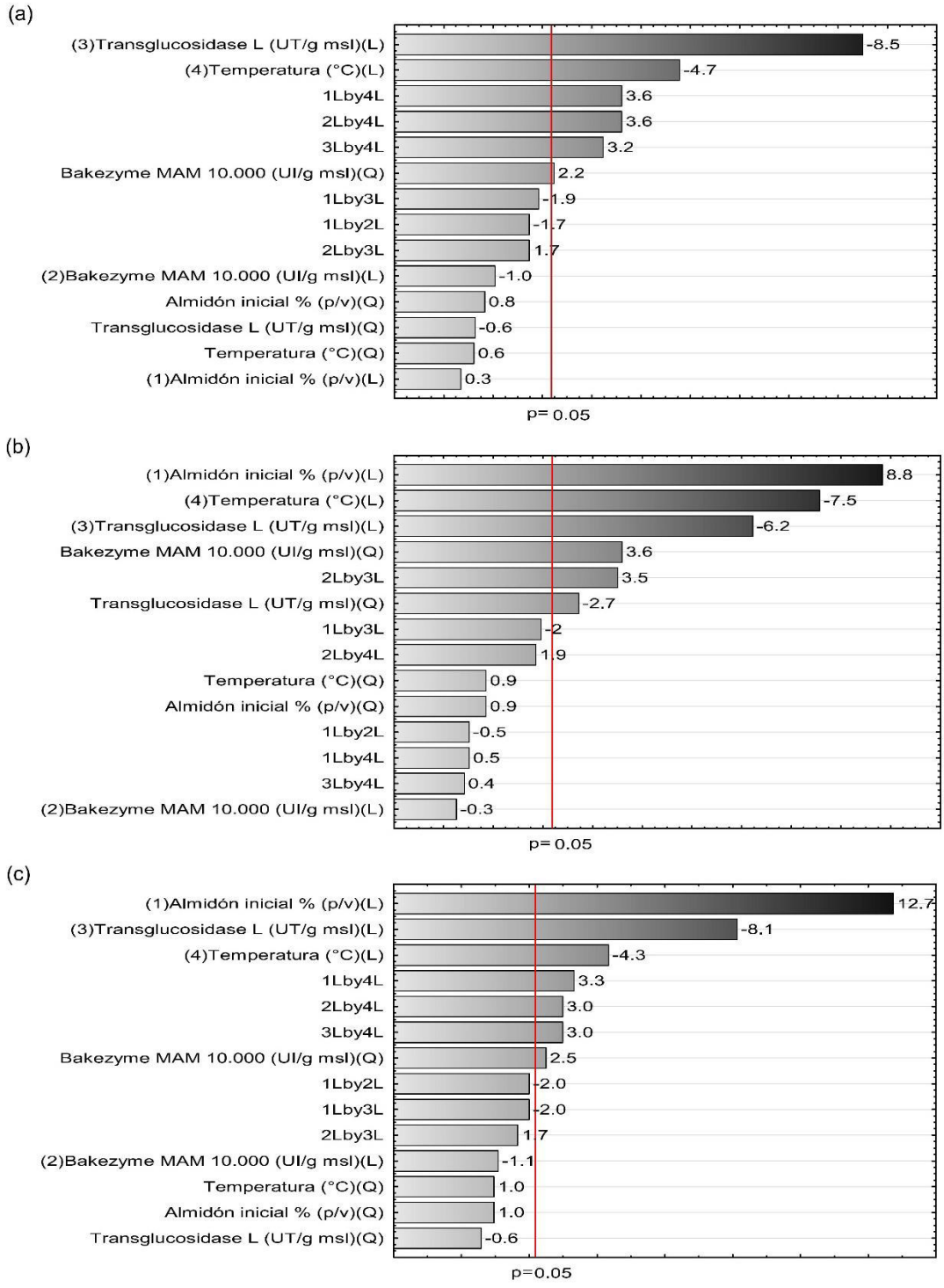


Figura 21. Diagrama de pareto de los efectos estimados de las variables independientes del diseño compuesto central rotacional sobre: (a) $Y_{P/S}$, (b) S_i y (c) Q_P. (msl: masa seca licuada.)

El modelo de segundo orden se ajusta a la explicación del modelo reducido representado en la forma codificada de la Ec. (10), (11) y (12) para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P, respectivamente.

$$Y_{P/S} = 50.6 + 0.48x_2^2 - 1.85x_3 - 1.04x_4 + 0.96x_1x_4 + 0.96x_2x_4 + 0.86x_3x_4 \quad \text{Ec. (10)}$$

$$S_i = 32.67 + 0.33x_2^2 - 0.33x_3^2 + 0.88x_1 - 0.62x_3 - 0.75x_4 - 0.24x_1x_3 + 0.42x_2x_3 + 0.23x_2x_4 \quad \text{Ec. (11)}$$

$$Q_P = 6.68 + 0.07x_2^2 + 0.39x_1 - 0.25x_3 - 0.13x_4 + 0.13x_1x_4 + 0.11x_2x_4 + 0.11x_3x_4 \quad \text{Ec. (12)}$$

Donde las variables x_1, x_2, x_3 y x_4 son las variables codificadas de acuerdo con la Ec. (5). x_1: almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Los valores-p de las pruebas *t* de Student para los coeficientes de regresión para cada respuesta se detallan en el **Anexo 7**. Los resultados concluyen que las variables contribuyen significativamente en el modelo (valor p≤0.05).

Las gráficas de superficies de respuestas se en presentan en las **Figuras 22, 23 y 24** en rendimiento, selectividad de isomaltotriosa y productividad volumétrica, respectivamente. Estas figuras ofrecen una perspectiva detallada de cómo varían estas métricas en función de dos variables mientras se mantienen constantes los valores de otras dos variables en el nivel ensayado que más favorece.

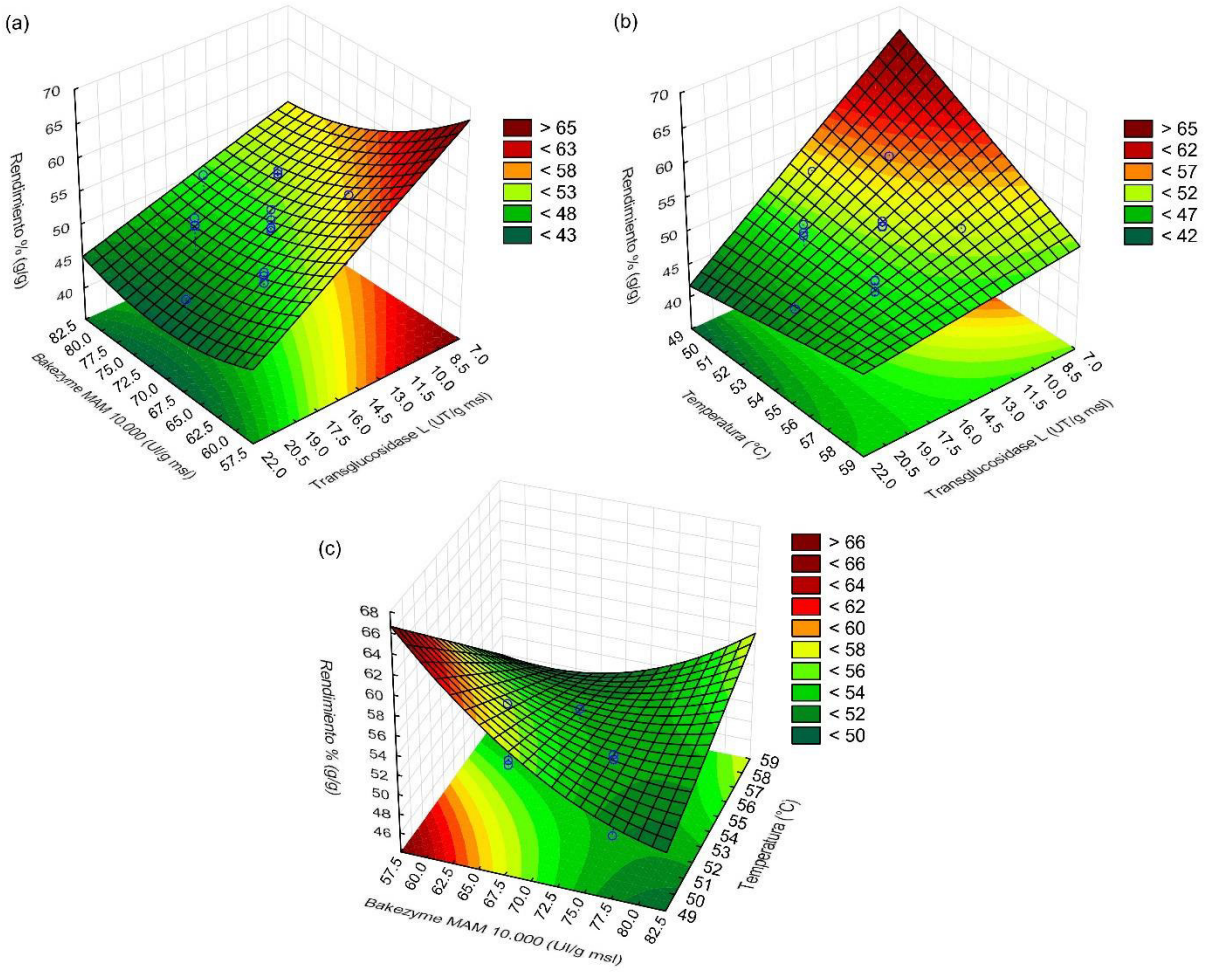


Figura 22. **Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta rendimiento en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional.** En función de Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, almidón inicial = 34 % (p/v) y temperatura = 52 °C (a), temperatura y Transglucosidase L, almidón inicial = 34 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (b), Bakezyme MAM 10.000 y temperatura, almidón inicial = 34 % (p/v) y Transglucosidase L = 11.5 U_T/g almidón licuado b.s (c).

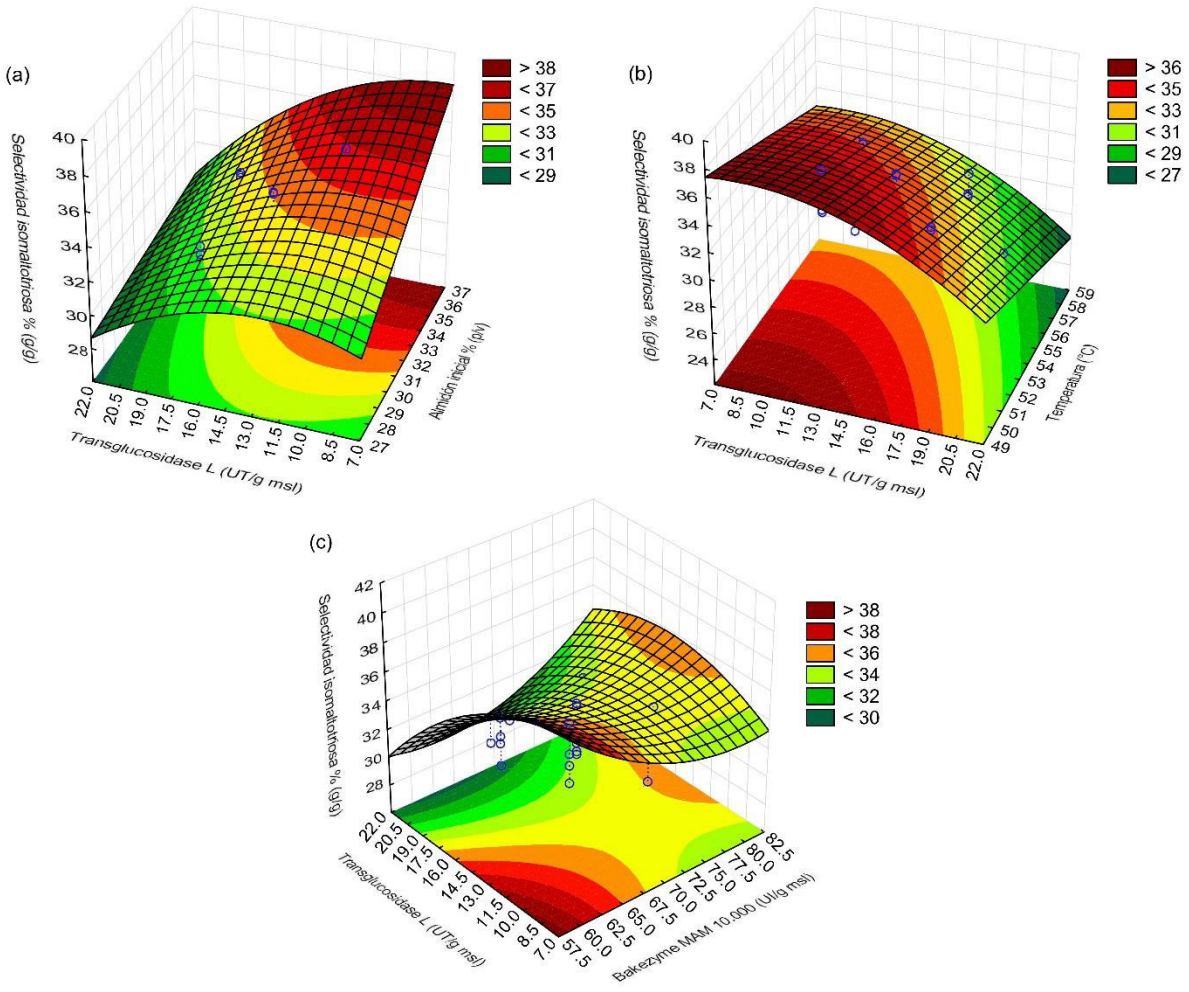


Figura 23. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta selectividad de isomaltotriosa en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 52 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (a), Transglucosidase L y temperatura, almidón inicial = 34 % (p/v) y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (b), Transglucosidase L y Bakezyme MAM 10.000, temperatura = 52 °C y almidón inicial = 34 % (p/v) (c).

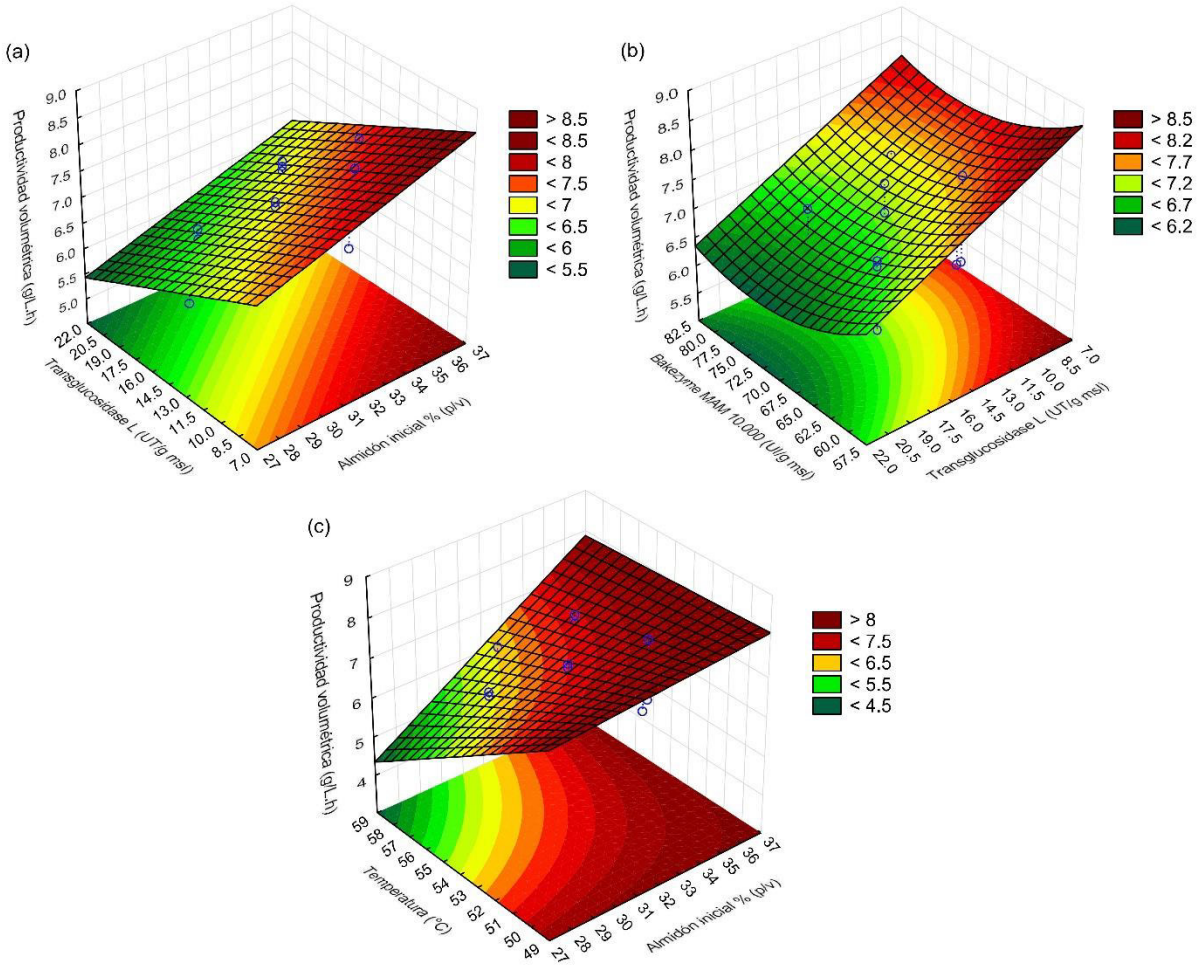


Figura 24. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para la respuesta productividad volumétrica en un tiempo de reacción de 24 h del diseño compuesto central rotacional. En función de Transglucosidase L y almidón inicial, temperatura = 52 °C y Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s (a), Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, temperatura = 52 °C y almidón inicial = 34 % (p/v) (b), temperatura y almidón inicial, Bakezyme MAM 10.000 = 65 UI/g almidón licuado b.s y Transglucosidase L = 11.5 U_T/g almidón licuado b.s (c).

V.10. Función de deseabilidad para la optimización simultánea de múltiples respuestas.

Para optimizar simultáneamente múltiples variables de respuesta, se empleó el enfoque de la función de deseabilidad general. Este enfoque permitió identificar las condiciones operativas óptimas que maximizan la deseabilidad combinada de todas las variables de respuesta al integrar las funciones de deseabilidad individuales en una única función denominada deseabilidad general. Para ello cada variable de respuesta se convierte en una función de deseabilidad individual, que varía entre 0 y 1. Un valor de 1.0 se asigna cuando la variable de respuesta alcanza el objetivo deseado, mientras que un valor de 0.0 indica que está fuera del rango aceptable. [8,85]

Las funciones de deseabilidad para $Y_{P/S}$ y Q_P (Ec. (13) y (15)) se establecieron dentro de unos límites inferior y superior, los cuales se definieron de acuerdo con las especificaciones del proceso requeridas. La función de S_i (Ec. (14)) se estableció de manera que la variable de respuesta objetivo alcance su valor máximo basado en los datos experimentales.

$$d_1\begin{cases}0 & Y_{P/S} < 54\\ \frac{1}{2}Y_{P/S} - 27 & 54 \le Y_{P/S} \le 56\\ 29 - \frac{1}{2}Y_{P/S} & 56 \le Y_{P/S} \le 58\\ 1, & Y_{P/S} > 58\end{cases} \qquad \text{Ec. (13)}$$

$$d_2\begin{cases}0 & S_i < 30\\ \frac{S_i}{5} - 6 & 30 \le S_i \le 35\\ 1, & S_i > 35\end{cases} \qquad \text{Ec. (14)}$$

$$d_3\begin{cases}0 & Q_P < 6.8\\ Q_P - 6.8 & 6.8 \le Y_{P/S} \le 7.8\\ 10.75 - 12.5Q_P & 7.8 \le Y_{P/S} \le 8.6\\ 1, & Q_P > 8.6\end{cases} \qquad \text{Ec. (15)}$$

La optimización de múltiples respuestas se trabajó en Statistica 10.0. La función general del diseño se presenta en la ecuación Ec. (16)

$$D = \left(d_1.d_2.d_3\right)^{\frac{1}{3}} \qquad \text{Ec. (16)}$$

En la **Tabla 14** se presentan las condiciones operativas óptimas para la función de deseabilidad general de 0.99981 (**Anexo 9**).

Tabla 14. Resultados de la optimización simultánea de múltiples variables.

Variables independientes	Condiciones óptimas
Almidón inicial %(p/v)	34
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	66
Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	12.3
Temperatura (°C)	51

Fuente: propia.

La validación experimental de la condición óptima se realizó por duplicado bajo las condiciones indicadas en la **Tabla 14.** Se utilizó 10 UI/g almidón licuado b.s de Promozyme D2 en todos los experimentos. Las variables de respuesta $Y_{P/S}$, S_i y Q_P se determinaron a las 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22 y 24 h de reacción. Los azúcares se determinaron por HPLC. La **Tabla 15** presenta los resultados de las variables de respuesta a las 24 h de reacción, tanto teóricas como experimentales. Los resultados teóricos se calcularon mediante las ecuaciones Ec. (10), (11) y (12).

Tabla 15. Resultados la validación experimental a las 24 h de tiempo de reacción.

Variables de respuesta	Resultados teóricos	Resultados experimentales
$Y_{P/S}$, % (g/g)	54.5	50.4 ± 0.03
S_i, % (g/g)	35.9	36.1 ± 0.7
Q_P, (g/L.h)	7.5	7.1 ± 0.004

Fuente: propia.

La **Figura 25** ilustra gráficamente la cinética de síntesis de IMOs mediante simultánea sacarificación y transglucosilación del modelo optimizado. Los puntos de las gráficas representan los ensayos del modelo de validación de optimización Después de 24 horas de reacción se obtiene 99.9 ± 0.6 g/L de isomaltosa, 45 ± 0.7 g/L de isomaltotriosa, 24.8 ± 0.03 g/L de panosa, 125.6 ± 2.2 g/L de glucosa, 15.4 ± 0.2 g/L de maltosa y 2.2 ± 0.1 g/L de maltotriosa.

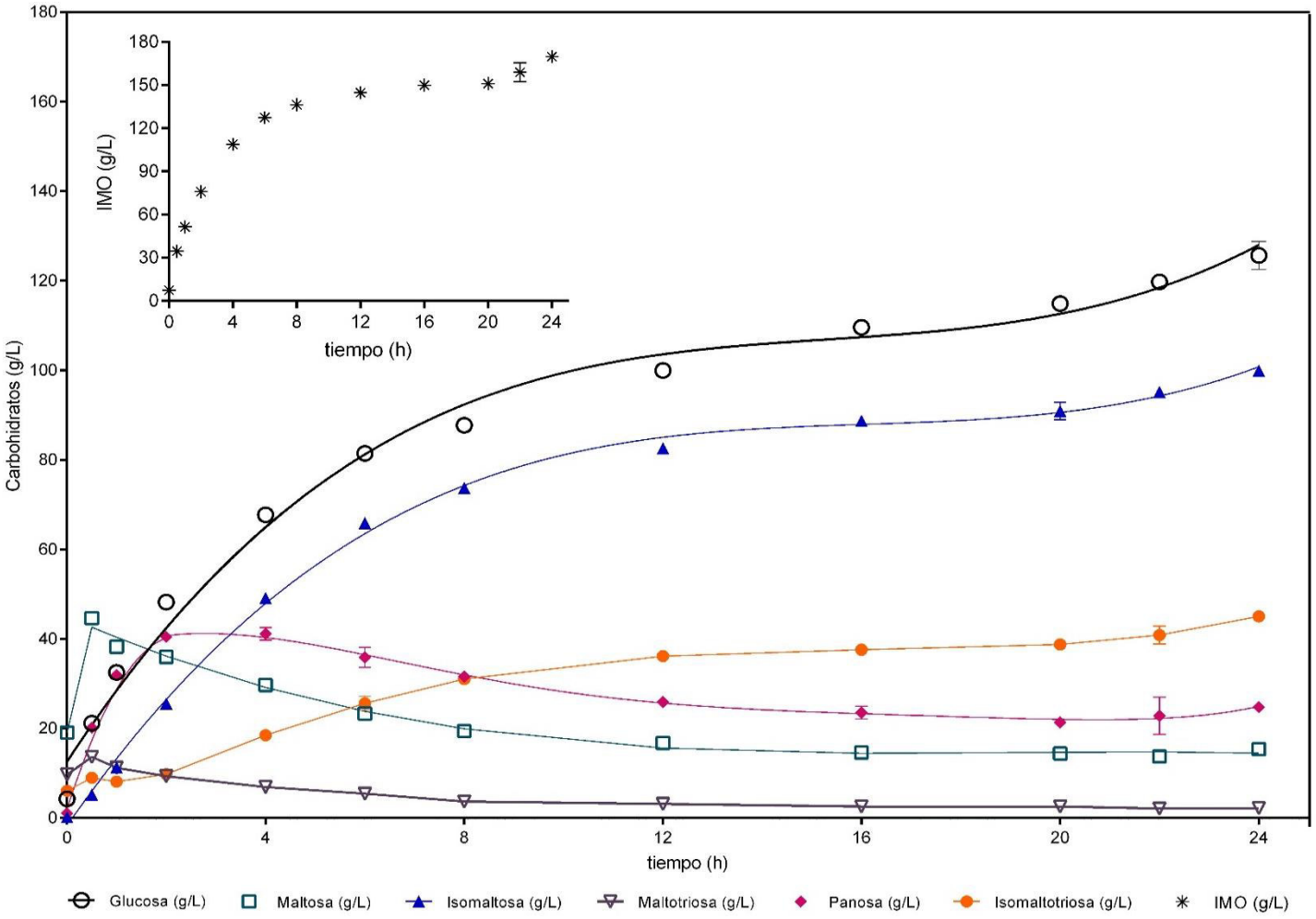


Figura 25. Curso del tiempo de la síntesis de IMOs catalizada por la simultánea sacarificación y transglucosilación de preparaciones enzimáticas comerciales bajo condiciones óptimas previstas para la función de deseabilidad general.

VI. DISCUSIÓN

Varios estudios han examinado diversas fuentes de almidón para la producción de IMOs. Históricamente, el almidón de maíz[9] ha sido ampliamente utilizado como sustrato en la producción comercial de IMOs. Sin embargo, otras fuentes de almidón han sido objeto de investigación como alternativas sostenibles. En este estudio, se investigó la producción de Isomaltooligosacáridos utilizando preparaciones enzimáticas comerciales y como sustrato se empleó el almidón de cebada (*Hordeum vulgare L*).

La extracción y purificación que se realizó siguió el método alcalino. Según los resultados del *apartado V.1.*, se obtuvo un rendimiento del 31.2 ± 1.33 % de almidón purificado a partir de los granos de cebada forrajera. Además, se determinó la composición proximal (**Tabla 7**), la cual reveló valores bajos en proteína (1.11 %), grasa (0.15 %), fibra (0.42 %) y ceniza (0.13 %), lo que sugiere la alta pureza del almidón obtenido. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Anderson et al,[87] quienes aislaron almidón de cebada a escala de laboratorio utilizando una combinación de extracción acuosa y alcalina. Trabajaron con tres diferentes cebadas y reportaron un rango de rendimiento entre 25 a 34 % p/p (b.s), una pureza aproximada del 96 %, niveles de proteína del 0.2 al 0.3 % y ceniza 0.1 %. Por otro lado, Gao *et al*.[88] utilizaron una combinación de métodos de extracción acuosa y alcohólica. Ellos obtuvieron rendimientos superiores del 22.5 - 39.2 % de la materia seca total en seis genotipos de cebada descascarada, con una pureza de 98.3% y proteína 0.9%. Existen métodos enzimáticos que mejoran la pureza del almidón al descomponer con mayor facilidad la matriz proteica de los gránulos de almidón, además de ser más respetuosos con el medio ambiente. Sin embargo, la pureza de la enzima es un factor crítico que puede incrementar los costos.[8] Por otro lado, se considera que la extracción alcalina para el aislamiento del almidón es el método químico más económico y eficiente.[89]

Es importante tener en cuenta la morfología de los gránulos de almidón, las proteínas, la finalidad prevista para el producto y, en el caso de la cebada, los β-glucanos.[16,90] Los β-glucanos producen una alta viscosidad en soluciones acuosas que afectan en la purificación del almidón.[3] En un estudio realizado por Fan *et al*.[91] se compararon dos

métodos de extracción de almidón: la homogeneización en agua y extracción homogeneizada en condiciones alcalinas. Se encontró que el aislamiento con hidróxido de sodio tuvo una gran influencia en la eliminación de β-glucanos y no mostró cambios en las propiedades estructurales del almidón aislado.

Es bien conocido que la determinación de la actividad enzimática de cualquier extracto biológico se realiza en condiciones experimentales definidas.[92] En la **Tabla 8** se muestra las actividades de las preparaciones enzimáticas ensayadas como se indica en la sección IV.4.2.5. Esta actividad es un parámetro muy importante que determina la concentración de enzima activa para calcular la dosis de estos preparados enzimáticos en las etapas de licuefacción y la simultánea sacarificación y transglucosilación. Cuando se mide como la velocidad de reacción inicial representa el máximo potencial catalítico de una enzima bajo un set dado de condiciones experimentales.[8,92]

Termamyl 300L, Promozyme D2 y Bakezyme MAM 10.000 solo presentan actividad hidrolítica hacia los sustratos ensayados, cuyos valores no se pueden comparar con datos de la literatura porque las condiciones de ensayo fueron diferentes. Por ejemplo, una α-amilasa termoestable para la licuefacción de almidón procedente de Fujian Fuda Biotech Development Co., Ltd, fue reportada con 40000 U/mL; sin embargo, su actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 g de almidón en 1 h a pH 6.0 y 60 ºC.[9] En otro estudio más reciente, el sustrato de la α-amilasa termoestable fue p-nitrofenil maltoheptaósido.[53] En este trabajo de investigación se usó el protocolo reportado por Basu *et al*.[44], pero desafortunadamente en ese estudio no se reporta la actividad amilolítica de Termamyl SC.

Tranglucosidase L, cuya enzima activa es α-glucosidasa, muestra una actividad hidrolítica y una actividad de transferasa en maltosa (**Tabla 8**). La actividad hidrolítica es comúnmente reportada como la velocidad de glucosa total en el medio de reacción,[9,44,53] pero esta determinación es un pobre predictor del comportamiento catalítico máximo porque la actividad hidrolítica es sobreestimada si se toma en cuenta el esquema del mecanismo de reacción (**Figura 3**). Por esta razón, esos ensayos no

deberían ser usados para determinar la actividad de transglicosilación de α-glucosidadas para la síntesis de IMOs. Por lo tanto, nosotros usamos la metodología reportada por el grupo de investigación PROBIAL para determinar la actividad hidrolítica y transglicosilación en maltosa.[8] Desafortunadamente, no hay datos en la literatura para comparar estos valores experimentales usando este enfoque. Cabe indicar que la glucosa producida por la hidrólisis no se puede cuantificar directamente, por lo que debe determinarse a partir de los balances de masa de glucosa y productos transglicosilados en la mezcla de reacción considerando el mecanismo de reacción (**Figura 3**). Los cálculos se detallan en la metodología (ver sección IV.4.2.5.).

La etapa de licuefacción del almidón desempeña un papel esencial para sintetizar IMOs. Se busca obtener sustratos susceptibles a la sacarificación con un valor ED entre 6 y 7.[9] La dosis utilizada de enzima α-amilasa para la licuefacción del almidón de cebada fue cercana a lo recomendado en la literatura, que oscila entre 500 g a 700 g de enzima líquida de *B. licheniformis* por tonelada de sustancia de almidón seco, equivalente a 400 mL y 560 mL de enzima por tonelada de almidón seco, respectivamente.[84] En este estudio, se utilizó dosificaciones cercanas al equivalente de 230.5 mL de Termamyl 300L por tonelada de almidón de cebada seca.

Se logró obtener la adecuada dosificación de enzima Termamyl 300L para diferentes concentraciones de almidón (28 - 40 % p/v) que permita alcanzar valores ED 6-7. Estas dosificaciones permitieron obtener tiempos de licuefacción entre 46 y 59 minutos (**Tabla 9**). Además, los resultados mostraron que, a mayor concentración de almidón la viscosidad aumenta, sumado a la poca movilidad del agua, se reduce la difusión efectiva de la enzima y el sustrato, prolongando así el tiempo de licuefacción del almidón.[78] Como consecuencia directa de este fenómeno, fue necesario aumentar la actividad enzimática por volumen de reacción (UI/mL) conforme aumentaba la concentración de almidón, como se ilustra en la **Figura 10**.

Es importante destacar que durante el proceso de licuefacción del almidón en rango de 28 – 40 %, se logró alcanzar un valor de ED entre 6 y 7 sin dificultades. Sin embargo, según Li *et a*l.[78] concentraciones superiores al 45 % de almidón retardaron la

licuefacción debido a que dificulta la destrucción de la estructura granular y conduce a una gelatinización incompleta. Y para el caso específico de concentraciones del 60 % de almidón no lograron obtener una solución licuada.

Cui *et al*.[93] observaron un cambio gradual en el valor ED durante la etapa inicial de la licuefacción de almidón de castaña al 30 % p/v, utilizando una dosis de α-amilasa de 12 UI/g de almidón. Este cambio gradual se aceleró durante periodos prolongados. Se necesitaron 90 minutos para alcanzar un valor ED de 5.4. Por otro lado, aumentar la dosificación de enzima Termamyl 300L en este estudio puede reducir los tiempos de licuefacción. No obstante, es fundamental tomar precauciones, ya que la rápida actividad de la enzima puede dificultar detener oportunamente la licuefacción del almidón cuando se alcanza un valor ED entre 6 y 7. Por lo tanto, es crucial ajustar la dosificación de manera adecuada para garantizar que la actividad enzimática no se vea inhibida por la concentración del sustrato. Estos resultados son fundamentales para comprender y optimizar el proceso de síntesis de IMOs a partir de almidón de cebada, contribuyendo al desarrollo de estrategias más eficientes y sostenibles en la producción de jarabes de IMOs de interés industrial. Lograr tiempos de licuefacción entre 46 y 59 minutos se considera beneficioso, ya que estos tiempos no superan el estándar industrial de licuefacción, que normalmente oscila entre 1 y 2 horas.[94] Esta indica una mejora en la eficiencia del proceso sin comprometer la viabilidad industrial.

El creciente interés en los alimentos funcionales como son los IMOs ha impulsado a países como Japón y Corea del Sur a adoptarlos de manera significativa.[7,41,51] Informes del mercado de isomaltooligosacáridos anticipan que esta tendencia perdure hasta el 2033.[51] Este aumento en la demanda está generando un impulso en la industria alimentaria, que busca reducir los costos de producción.[3,7]

Como una alternativa viable se empleó preparaciones enzimáticas comerciales de bajo costo específicamente formuladas para uso en la industria alimentaria. En esta investigación se utilizó Bakezyme MAM 10.000 (amilasa maltogénica), Promozyme D2 (pululanasa) y Transglucosidase L (α-glucosidasa) en la síntesis de IMOs. Para ello, en el proceso de síntesis de IMOs implica elegir un conjunto representativo de las

variables y niveles más relevantes para el experimento, entre los cuales se incluyen las enzimas mencionadas anteriormente, la concentración de almidón y temperatura de reacción. Además de conseguir mayor eficiencia utilizando actividades acopladas de transglucosilación e hidrólisis de amilasa maltogénica y pululanasa en un sólo proceso.[9]

Teniendo en cuenta que se contaba con 5 variables independientes o factores, el diseño factorial fraccionado 2^{5-1} resultó ventajoso al seleccionar un subconjunto de todas las combinaciones posibles para su evaluación, sin incurrir en los costos y el tiempo asociados con un diseño factorial completo. De acuerdo con Montgomery,[85] este enfoque metodológico nos proporciona información valiosa para identificar aquellos factores que tienen efectos significativos, con el fin de tamizar estratégicamente y reducir los factores del diseño experimental.

Según los resultados del *apartado V.6.*, se determinó que la variable Promozyme D2 y todas las interacciones en las que interviene no son significativas para las tres respuestas ($Y_{P/S}$, S_i y Q_P). Por lo tanto, se decidió mantener constante la concentración de enzima Promozyme D2 a 10 UI/g almidón licuado b.s y excluir de su participación del diseño de experimentos, con el fin de enfocar la atención en los factores más influyentes en los resultados del estudio.

Los factores más influyentes como lo son la concentración de almidón, temperatura, la enzima Bakezyme MAM 10.000 y la enzima Transglucosidase L se investigaron con más detalle en el diseño factorial completo 2^4. Los resultados del análisis de varianza del modelo reducido para cada respuesta fueron verificados al mostrar un coeficiente de determinación (R^2) de 0.952, 0.984 y 0.907 para los modelos lineales de las respuestas $Y_{P/S}$, S_I y Q_P; respectivamente. Estos valores superan el umbral de 0.90; que de acuerdo con Haaland,[95] explica de manera efectiva la variabilidad en las variables de respuesta. (**Anexo 3**).

Así mismo, los resultados del análisis de varianza del modelo reducido para las respuestas $Y_{P/S}$ y S_i (**Anexos 3a** y 3**b**) presentan coeficientes de determinación ajustado (R^2 Ajust) de 0.919 y 0.969, valores menores y cercanos a su respectivo R^2 y

superiores a 0.90. Esto aseguró que los factores seleccionados fueran idóneos para el modelo.[95] Este hallazgo sugirió que el modelo mantiene su capacidad predictiva incluso con ajustes adicionales. Sin embargo, el análisis de varianza del modelo reducido para Q_P tuvo un R^2 ajust (0.857) cercano a su respectivo R^2. (**Anexo 3c**).

Adicionalmente, la coherencia entre las predicciones del modelo lineal y los factores significativos de la variable respuesta se confirmó mediante la falta de significancia en la prueba de falta de ajuste determinadas en el análisis de varianza de los modelos reducidos. Los valores-p para la falta de ajuste para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_p resultaron ser mayores a 0.05, como se indica en el **Anexo 3**. Además, se observa que los valores-p asociados con la curvatura para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_p no alcanzaron significancia estadística (valor-p>0.05). En consecuencia, los resultados respaldan la validez de un modelo lineal para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_p y ahora es posible describir las superficies de respuesta. Al examinar las **Figuras 17, 18 y 19**, se observa que los puntos centrales están situados dentro del plano que pasa por los puntos experimentales. Esta observación explica gráficamente la falta de significancia de la curvatura del modelo lineal, como se refleja en el análisis de varianza de los modelos reducidos (**Anexos 3**).

Los resultados de la **Figura 17a** muestran el comportamiento de la enzima maltogénica Bakezyme MAM 10.000 frente al sustrato. Se observó que el rendimiento es el más alto cuando el almidón se encuentra en el nivel bajo (30 % p/v) y la concentración de Bakezyme MAM 10.000 en el nivel alto (100 UI/g almidón licuado b.s). En estas condiciones, la enzima hidroliza el almidón a niveles bajos (30 % p/v), lo que genera una elevada concentración de moléculas de maltosa, maltotriosa y MOS,[53,81] que son el sustrato para la Transglucosidase L. Como consecuencia, se genera mayor IMOs en 24 horas de reacción debido a que la actividad de transglucosilación supera a la actividad hidrolítica de la enzima Transglucosidase L.[96] También se predice buenos rendimientos cuando el almidón inicial se encuentra en el todo el rango de estudio (30 – 40 % p/v) y la concentración de enzima Bakezyme MAM 10.000 se mantiene en el nivel más alto (100 UI/g almidón licuado b.s). Por otro lado, el rendimiento desciende a medida que la concentración de la enzima maltogénica disminuye y el almidón inicial

se encuentra en niveles altos, este fenómeno se debe a que la sacarificación generada por la enzima se ve perjudicada por el aumento de la viscosidad del sustrato (40 % p/v).[97] En consecuencia, la actividad de transglucosilación se ve reducida. Los resultados de Duong *et al*.[53] respaldan los hallazgos de este estudio, al demostrar que un aumento en la concentración de enzima β-amilasa resulta en una mayor liberación de moléculas de maltosa y maltotriosa. Este incremento en la concentración de maltosa y maltotriosa reduce la actividad de agua en el medio de reacción y suprime la actividad hidrolítica de la enzima transglucosidasa.[98] La mejora en el rendimiento de maltosa y maltotriosa, promueve la transglucosilación.[9,53]

La información presentada en la **Figura 17b** muestra que la superficie de respuesta para rendimiento es más sensible a los cambios de concentración de enzima Transglucosidase L que a las variaciones en la concentración de almidón inicial. El rendimiento disminuye a medida que la concentración de la enzima Transglucosidase L aumenta de 10 a 25 U_T/g almidón licuado b.s, porque la actividad hidrolítica de esta enzima se convirtió en predominante.[99] Algunos estudios han investigado el efecto de la concentración de biocatalizador en la síntesis de IMOs. Duong *et al*.[53] evaluaron el efecto de la concentración de la enzima transglucosidasa en la síntesis de IMOs. Observaron que a concentraciones elevadas de enzima transglucosidasa (30 U/g), la velocidad de hidrólisis de los enlaces glucosídicos α-(1,4) aumentó, lo que generó una mayor liberación de glucosa del sustrato. Sin embargo, el incremento en la concentración de la enzima también resultó en la hidrólisis de los IMOs formados, lo que disminuyó el rendimiento. Esta tendencia se relaciona con las conclusiones de Ohja *et al*.,[98] quienes informaron un decremento en la formación de IMOs al aumentar la concentración de enzima α-glucosidasa unida a células de *Microbacterium sp.* a 30 UI, manteniendo constante la concentración de maltosa como sustrato.

Por otro lado, nuestros resultados indican que se pueden lograr buenos rendimientos de IMOs cuando la concentración de enzima Transglucosidase L se mantiene en nivel bajo (10 U_T/g almidón licuado b.s) y la concentración de almidón se mantiene en el rango de estudio 30 – 40 % p/v, aunque el rendimiento más alto en el estudio se obtuvo a 30 % p/v de almidón inicial. Este fenómeno tiene su explicación en el efecto de la

cantidad de sustrato en el medio de reacción. Mangas-Sanchez *et al*.[96] encontró que la velocidad de transglicosilación aumentó al aumentar las concentraciones iniciales de maltosa hasta 160 mM, formando más moléculas de panosa en la reacción de transglucosilación catalizada por la enzima transglucosidasa de *Aspergillus niger*; sin embargo, concentraciones superiores a 160 Mm observó una disminución en la formación de panosa. Kumar *et al*.[99] explica que este fenómeno realmente ocurre debido a las diferencias en la energía libre de Gibbs. Mientras que la hidrólisis de la maltosa muestra una energía libre de Gibbs negativa considerable (-31.7 ± 3.1 KJ/mol), las reacciones de transglucosilación exhiben valores cercanos a cero en condiciones estándar, lo que indica una formación mínima o nula de productos. Por consiguiente, el incremento en la concentración del sustrato impulsa el avance de la reacción de transglucosilación hasta un cierto nivel de concentración de sustrato porque luego se observa inhibición de sustrato de la reacción de transglucosilación.[97]

Otro estudio en Niu *et al*.[9] demuestra que a elevadas concentraciones de enzima transglucosidasa (An-TGase) de 500, 1000 y 2000 U/g tuvo un ligero descenso en el rendimiento, pero reducen el tiempo de transglucosilación en la síntesis de IMOs a partir de almidón de maíz (25 % p/v). Al ser dosificaciones muy altas no resulta económico puesto que la enzima An-TGase tiene un costo alto en el proceso y optaron por escoger concentración de enzima entre 500 y 1000 U/g.

Estudios describen el comportamiento de la enzima α-glucosidasa, la cual presenta actividad hidrolítica y de transglucosilación, actúa hidrolizando los enlaces α-(1,4)-glicosídicos del extremo no reductor de la maltosa y los MOS para liberar α-D-glucosa, posteriormente transfiere está molécula en la posición α-(1,6) del grupo hidróxilo del extremo no reductor del aceptor glucósido (transglucosilación) o agua (hidrólisis).[5,100] Su comportamiento depende de la concentración de enzima, temperatura y concentración de sustrato.[53,94,98]

Después de analizar la respuesta rendimiento de IMOs y la relación entre la enzima Transglucosidase L y la concentración de almidón inicial (**Figura 17b**), concluimos que a concentraciones más bajas de almidón (30 % p/v) y enzima Transglucosidase L (10

U_T/g almidón licuado b.s) se favorece el rendimiento. En cambio, concentraciones altas de almidón inicial (40 % p/v) favorecen la selectividad de isomaltotriosa (**Figura 18a**)**.** El aumento de sustrato para la reacción de transglucosilación incrementa la formación de isomaltotriosa, sin embargo, también aumentan los residuos como glucosa, maltosa y otros MOS.[9,53] Por consiguiente, el cálculo de rendimiento se ve disminuido. Vega *et al.*,[100] informó mediante la metodología de superficie de respuesta, cómo la selectividad de 1-kestosa en la síntesis de fructooligosacáridos se favorece ligeramente con el aumento de sustrato (sacarosa), mientras mantienen a nivel bajo la concentración de biocatalizador y temperatura.

Los resultados también revelaron un aumento en la respuesta de rendimiento de IMOs (**Figura 17c**) y selectividad de isomaltotriosa (**Figura 18c**) en el nivel bajo de temperatura, alrededor de 50 °C, y de la enzima Transglucosidase L (10.0 U_T/g almidón licuado b.s). La **Figura 17c** indica que el efecto lineal de la concentración de Transglucosidase L es más fuerte que el efecto de la temperatura, como se puede evidenciar en la carta de Pareto. De esta manera, se demuestra que la temperatura podría estar en el rango de 50 a 60°C con una ligera mejora de la síntesis en el nivel bajo de temperatura, mientras se mantenga la concentración de la enzima en su nivel bajo de estudio (10 U_T/g almidón licuado b.s). Como se ha mencionado anteriormente la velocidad de hidrólisis de la maltosa es más rápida que la velocidad de síntesis de IMOs; por lo tanto, una menor concentración enzimática se favorece la actividad de síntesis en lugar de la actividad hidrolítica de la enzima Transglucosidase L. Asimismo, la temperatura es un factor que incrementa la velocidad de reacción. Según los resultados, la reacción hidrolítica se ve más favorecida a medida que la temperatura aumenta (**Figura 17c y 18c**); mientras, la síntesis de IMOs se favorece conforme la temperatura desciende. Esto se refleja en la respuesta de selectividad al sintetizar más moléculas de isomaltotriosa (**Figura 18c**).

Este hallazgo es consistente con los resultados reportados por Duong *et al*.[53] quienes encontraron que en el rango de 40 a 55°C se favorece la síntesis de IMOs en la reacción simultánea de sacarificación y transglicosilación con las enzimas β-amilasa,

pululanasa y transglucosidasa, pero el aumento de temperatura en el rango de 60 a 70 °C tuvo un efecto negativo sobre la síntesis de IMOs.

La selectividad para la isomaltotriosa también se favorece a 50 °C (nivel bajo) y el valor es mayor a concentraciones de almidón altas (> 38 % p/v) (**Figura 18b**). La gráfica de superficie de respuesta revela un efecto lineal fuerte entre el sustrato y temperatura. Las concentraciones altas de almidón indican que hay sustrato para formar isomaltosa, panosa y mayor concentración de isomaltotriosa. Por otro lado, una disminución en la temperatura favorece la transglucosilación, lo que resulta en un aumento en la síntesis de isomaltotriosa. Sin embargo, a medida que aumenta la temperatura, la velocidad de hidrólisis de la α-glucosidasa aumenta sobre la velocidad de síntesis.[96]

La selectividad nos permite evaluar el tipo de IMOs predominante en el proceso de síntesis de IMOs. Los IMOs varían entre cadenas largas y cortas. El tipo de IMO sintetizado depende del sustrato, el grado de licuefacción del almidón, tipo de enzima y regioselectividad, factores que inciden en la composición y naturaleza del tipo de isomaltooligosacárido. Las α-glucosidasas como la Transglucosidase L son preferibles que las glucosiltransferasas por su disponibilidad y posibilidad de utilizar sustratos simples, sin embargo, la regioselectividad de esta enzima es pobre. En muchos casos, se ha observado que las α-glucosidasas de diferentes fuentes catalizan la síntesis de diferentes enlaces.[101]

Los IMOs disponibles comercialmente, obtenidos mediante el método convencional a partir del almidón (α-amilasa, pululanasa, β-amilasa y α-glucosidasa), usualmente incluyen sacáridos de cadena corta como isomaltosa, panosa e isomaltotriosa. Siendo isomaltosa y panosa los productos mayoritarios.[9,102] En este estudio, utilizando las preparaciones comerciales Termamyl 300L, Bakezyme Mam 10.000, Promozyme D2 y Transglucosidase L, los resultados en los cromatogramas (**Anexo 8**) mostraron picos altos sugiriendo mayor formación de isomaltosa e isomaltotriosa que de panosa después de 24 horas de reacción. Además, se observa que la concentración de glucosa es alta.

Por ejemplo, Chockchaiwasdee y Poosaran,[81] informaron sobre la formación de isomaltotriosa e isomaltotetraosa, siendo la isomaltotriosa sintetizada en mayor cantidad a partir de almidón de plátano, utilizando α-amilasa Termamyl SC, Fungamyl 800L o β-amilasa, pululanasa y Transglucosidase L en una reacción de simultánea sacarificación y transglucosilación (SST). Además, Duong *et al*.[53] reportaron la formación de isomaltooligosacáridos con DP_2, DP_3 y DP_4, excluyendo la panosa. Utilizaron α-amilasa, β-amilasa, pululanasa y α-transglucosidasa en una reacción SST a partir de almidón de camote. Chen *et al*.[102] también describieron la formación de isomaltosa, panosa y pentasacáridos utilizando enzimas α-glucosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* U2, β-amilasa, pululanasa y α-amilasa fúngica a partir de almidón de maíz.

La literatura menciona que un grado menor de dextrinización (ED) entre 6 y 8 produce un mayor contenido de maltosa durante la reacción, mientras que un grado mayor de ED, aproximadamente de 12, conduce a mayor formación de glucosa.[53] Niu *et al*.[9] utilizaron un coctel de enzimas compuesto por α-amilasa, β-amilasa, pululanasa recombinante y α-transglucosidasa a partir de almidón de maíz. Informaron que el aumento de los valores de ED a 12, 20 y 30 acortó el tiempo de transglucosilación y resultó más beneficioso para la formación de isomaltosa, isomaltotriosa y panosa.

Las superficies representadas en la **Figura 19a y 19b** proporcionan evidencia de un aumento lineal en la productividad volumétrica al mantener concentraciones iniciales elevadas de almidón inicial superior al 39 % (p/v) dentro de la región experimental, frente a las variables Bakezyme Mam 10.000 y Transglucosidase L. Se observa que concentraciones más elevadas de sustrato después de 24 horas de reacción resultaron en una mayor generación de gramos de IMOs por unidad de volumen de reacción. Observamos que la productividad volumétrica y selectividad son favorecidas, por una alta concentración de almidón (40 % p/v) (**Figuras 18a, 18b, 19a y 19b**). La presencia de un mayor contenido de almidón permite obtener mayor contenido de maltosa, maltotriosa y MOS en el medio de reacción, lo que beneficia la síntesis de IMOs.

Para lograr una hidrólisis eficiente del almidón en un tiempo reducido, se requiere una concentración alta de la enzima maltogénica Bakezyme Mam 10.000 (100 UI/g almidón licuado b.s), lo que se refleja en los máximos valores de productividad volumétrica (**Figura 19a**). La enzima Transglucosidase L, en el nivel bajo de estudio (10 U_T/g almidón licuado b.s), también contribuye positivamente a la productividad volumétrica (**Figura 19b**), efecto evidenciado en el rendimiento y selectividad de isomaltotriosa. Finalmente, la combinación entre la enzima Transglucosidase L en el nivel bajo de estudio (10 U_T/g almidón licuado b.s) y enzima Bakezyme MAM 10.000 en el nivel alto de estudio (100 UI/g almidón licuado b.s) también favorece la productividad volumétrica. Esto se debe a que a mayor concentración de la enzima Bakezyme MAM 10.000 se libera más maltosa, la cual actúa como sustrato para la reacción de transglucosilación. (**Figura 19c**).

La exploración de la trayectoria del ascenso más pronunciado permitió acercarnos a la región del óptimo. El resultado se obtuvo en el primer salto o paso que fue de 32.5 % (p/v) para la variable almidón inicial, 68.8 UI/g almidón licuado b.s para Bakezyme MAM 10.000, 14.5 UT/g almidón licuado b.s para Transglucosidase L y 54.2 °C para la temperatura (**Tabla 12, Figura 20**). Los nuevos experimentos (**Tabla 5**) cercanos a la región del óptimo se realizan para comprobar que el entorno se ajusta a un modelo de segundo orden con el diseño central compuesto (**Tabla 13**).[85]

Continuando con el proceso para llegar a la región del óptimo para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P, el diseño compuesto rotacional permite la optimización de las condiciones de experimentación. La región del óptimo presenta curvaturas entre los efectos a estudiar por ello los modelos de segundo orden son los más adecuados.[85]

Los resultados del análisis de varianza (**Anexo 6**) arrojaron modelos de segundo orden adecuados para las respuestas $Y_{P/S}$, S_I y Q_P. Fueron verificados al mostrar un coeficiente de determinación (R^2) de 0.906, 0.942 y 0.914 para los modelos reducidos de las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P; respectivamente (**Anexo 6**). Estos valores están por encima de 0.90,[95] lo que describe la variabilidad en las variables de respuesta. Además, la falta de ajuste no significativa ($p>0.05$) para los modelos reducidos de las

tres respuestas de estudio ($Y_{P/S}$, S_i y Q_P), indica que estos modelos describen adecuadamente las respuestas dentro de los niveles estudiados (**Anexo 6**).

Igualmente, los resultados del análisis de varianza del modelo reducido para las respuestas $Y_{P/S}$, S_I y Q_P (**Anexo 6**) muestran coeficientes de determinación ajustado (R^2 Ajust) de 0.856, 0.916 y 0.882, respectivamente. Estos valores son ligeramente menores pero cercanos a su respectivo R^2, lo que garantiza que los factores seleccionados sean adecuados para el modelo, indicando que el modelo mantiene su capacidad predictiva incluso con ajustes adicionales.

Tras examinar los gráficos de Pareto (**Figura 21**) junto a las tablas de ANOVA de los modelos reducidos (**Anexo 6**), permitieron escoger los posibles niveles para cada variable independiente, con la finalidad de favorecer las tres respuestas estudiadas ($Y_{P/S}$, S_i y Q_P). Por lo tanto, las variables que se mantienen constantes en los gráficos de superficie de respuesta y contorno se trabajaron teniendo en cuenta Transglucosidase L a 11.5 U_T/g almidón licuado b.s (Nivel bajo), Temperatura a 52°C (Nivel bajo), almidón inicial a 34 % p/v (Nivel alto) y Bakezyme MAM 10.000 a 65 UI/g almidón licuado b.s (Nivel bajo). La enzima Bakezyme MAM 10.000 presentó efecto en el lado positivo como negativo (efecto cuadrático) para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P. Sin embargo, gráficamente se observó que su efecto influye más en lado negativo dentro de la región experimental.

En la **Figura 22a** se ilustran los efectos de concentración de Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L sobre la respuesta $Y_{P/S}$. El efecto de la concentración de Transglucosidase L es significativo y tiene una mayor influencia (**Figura 21a y 22a**). El aumento de concentración de las variables Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L provoca un descenso en la respuesta $Y_{P/S}$. El aumento en la concentración de enzima de transglucosilación aumenta la velocidad de hidrólisis, lo que resulta en la hidrólisis de los IMOs formados.[53,98] La figura predice el valor más alto para la respuesta $Y_{P/S}$ con Transglucosidase L a 8.5 U_T/g almidón licuado b.s y Bakezyme MAM 10.000 a 60.0 UI/g almidón licuado b.s.

Los resultados presentados en la **Figura 22b** demuestran la influencia significativa de los efectos de la temperatura y enzima Transglucosidase L sobre el rendimiento. La transglucosilación se favorece a temperaturas más bajas, mientras que temperaturas más altas favorecen la hidrólisis. Por ello, el rendimiento de IMOs ($Y_{P/S}$) más alto se obtiene cuando la temperatura desciende a 50 °C y la concentración de Transglucosidase L es de 8.5 UT/g almidón licuado b.s (Nivel bajo). También, el gráfico predice un descenso en la respuesta $Y_{P/S}$ (**Figura 22b**) a medida que las concentraciones de Transglucosidase L aumentan. Como se mencionó anteriormente, la concentración de Transglucosidase L influye en la velocidad de hidrólisis y de transglucosilación.

En la **Figura 22c** se ilustran los efectos de la temperatura y concentración de Bakezyme MAM 10.000 sobre la respuesta $Y_{P/S}$. La figura muestra una superficie de respuesta con un punto silla, que dentro de la región experimental muestra el rendimiento más alto en los niveles bajos de Bakezyme MAM 10.000 y temperatura, 60.0 UI/g almidón licuado b.s y 50°C, respectivamente. En cambio, en el otro extremo (Bakezyme MAM 10.000 = 80.0 UI/g almidón licuado b.s y temperatura = 58 °C) hubo una ligera tendencia a incrementar la respuesta $Y_{P/S}$. Este tipo de gráfico se debe al efecto significativo fuerte de la temperatura y al efecto cuadrático que presenta Bakezyme MAM 10.000 (**Figura 21a y 22c**).

En la **Figura 23a** se ilustran los efectos de la concentración de Transglucosidase L y almidón inicial, donde la respuesta S_i decreció cuando se incrementó la concentración de Transglucosidase L y descendió el almidón inicial. En el gráfico de superficie de respuesta se observó la región óptima que genera mayor valor en la respuesta S_i en el nivel bajo de Transglucosidase L (8.5 UT/g almidón licuado b.s) y nivel alto de almidón inicial (36 % p/v). Dentro de la región experimental 36 % (p/v) de almidón inicial aporta mayor contenido de sustrato para que se favorezca la velocidad de transglucosilación sobre la velocidad de hidrólisis, mientras que un aumento en la concentración de enzima Transglucosidase L favorece la hidrólisis primaria (genera glucosa) y secundaria (descompone los isomaltooligosacáridos formados). Se presume que la velocidad hidrolítica primaria es más rápida que la velocidad de

transglicosilación porque la hidrólisis de los enlaces α-(1,4) es dos veces más rápida que la hidrólisis de enlaces α-(1,6).[44]

Controlar la actividad de transglucosilación sobre la actividad de hidrólisis de la enzima Transglucosidase L es un factor muy importante en la producción de IMOs. Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de enzima, concentración de almidón y temperatura influyen significativamente en la formación de isomaltotriosa. La **Figura 23b** muestran los efectos de la Transglucosidase L y temperatura sobre la respuesta S_i. En el gráfico de superficie de respuesta se observa la región óptima que genera mayor selectividad de isomaltotriosa. Se dio en el rango de 8.5 a 16 UT/g almidón licuado b.s para Transglucosidase L y temperaturas entre 50 a 53 °C. Del mismo modo, en la **Figura 23c**, los niveles bajos de la enzima Transglucosidase L incrementaron la respuesta de S_i frente a los niveles bajos de concentración de Bakezyme MAM 10.000 (60 UI/g almidón licuado b.s). El efecto cuadrático significativo que presenta la enzima Bakezyme MAM 10.000 y el efecto significativo en los niveles bajos de Transglucosidase L se ilustran en la superficie de respuesta bajo la forma de una silla de montar, ya que al nivel alto de Bakezyme MAM 10.000 (80 UI/g almidón licuado b.s) presentó un ligero aumento sobre la respuesta S_i.

La **Figura 24a** presenta una superficie de respuesta de un plano entre los efectos de Transglucosidase L y almidón inicial sobre la respuesta Q_P, los contornos lineales indican la falta de interacción entre estas dos variables. Se incrementó la respuesta Q_P en niveles altos de almidón inicial (32 – 36 % p/v) y nivel bajo de Transglucosidase L (8.5 - 13.0 UT/g almidón licuado b.s). Al tener mayor concentración de sustrato (almidón inicial) y usando bajas concentraciones de la enzima de transglucosilación entonces la productividad volumétrica incrementa.

En la **Figura 24b** se ilustran los efectos de Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L sobre la respuesta Q_P. La figura presentó una superficie de respuesta de cresta invertida ascendente y líneas de contornos tipo parábola, donde se observa la interacción entre estas dos variables. Los valores altos de Q_P se dio en los niveles altos o bajos de Bakezyme MAM 10.000. Sin embargo, la gráfica de superficie predice el

valor más alto sobre la respuesta Q_P, dentro de la región experimental, cuando Bakezyme MAM 10.000 se encuentra en el nivel bajo (60.0 UI/g almidón licuado b.s). En cambio, la respuesta mínima en la curva parabólica con Bakezyme MAM 10.000 se da a 72.5 UI/g almidón licuado b.s. Por otro lado, se observó que los valores de la respuesta Q_P incrementan linealmente cuando desciende la concentración de Transglucosidase L.

Los resultados de la **Figura 24c** ilustran los efectos de almidón inicial y temperatura sobre la respuesta Q_P. La respuesta Q_P alcanzó su máximo valor con el incremento o descenso de temperatura 50 °C o 58 °C, respectivamente y con una concentración de 36 % p/v de almidón (nivel alto). Las interacciones entre estas dos variables se presentan en la **Figura 24c** con las líneas de forma elíptica demostrando gráficamente el efecto significativo fuerte, como se puede evidenciar en el ANOVA (**Anexo 6c**). También, los resultados evidenciaron valores altos de Q_P a concentraciones bajas de almidón (28 % p/v) y temperatura (50 °C). En este caso, los valores altos de Q_P se deben más al efecto de los niveles bajos de temperatura que favorecen la transglucosilación. Asimismo, se observa valores altos de Q_P a concentraciones altas de almidón (36 % p/v) y temperatura (58 °C). En esta condición las concentraciones altas de sustrato favorecen fuertemente la síntesis de IMOs sobre el efecto de una alta temperatura.

El enfoque de la función de deseabilidad general proporcionó las condiciones operativas óptimas para las variables independientes, permitiendo alcanzar la máxima respuesta de S_i. Para lograrlo, se consideraron las respuestas $Y_{P/S}$ y Q_P dentro de especificaciones de un proceso competitivo. Debido a que existe un conflicto entre estos parámetros. Cuando la productividad volumétrica es alta al inicio de la reacción, la selectividad disminuye debido a la una gran cantidad de maltosa residual que puede transformarse en IMOs. Además, el rendimiento se favorece con una mayor concentración de sustrato.[8] La deseabilidad general dio como resultado 0.99981 (**Anexo 9**), un valor muy cercano a 1 indica que las variables independientes se ajustan muy bien a las condiciones óptimas.[85] Este resultado logra alcanzar la máxima selectividad teórica. Las condiciones operativas óptimas obtenidas con la función de

deseabilidad fueron almidón inicial de 34 % (p/v), Bakezyme Mam 10.000 a una concentración de 66 UI/g almidón licuado b.s, Transglucosidase L a una concentración de 12.3 U_T/g almidón licuado b.s y 51 °C (**Tabla 14**)

Bajo las condiciones operativas óptimas, la síntesis de IMOs a partir del licuado de almidón de cebada al 34% (p/v) alcanzó el 93 % del rendimiento teórico, mientras que la selectividad de isomaltotriosa estuvo cercano al 100 % y la productividad volumétrica llegó al 95 % del teórico después de 24 h de tiempo de reacción (**Tabla 15**). Por lo que los resultados experimentales fueron consistentes con los obtenidos mediante la función de deseabilidad general. Niu *et al*,[9] obtuvo un rendimiento de IMOs de 49.09 % (isomaltosa, isomaltotriosa y panosa) a partir de almidón licuado mediante la SST y el uso de un coctel de enzimas compuesto por pululanasa recombinante, α-amilasa, β-amilasa y α-transglucosidasa de *Aspergillus niger* 49.09 %. Cui *et al*,[93] obtuvo un rendimiento de 30.53% de IMOs a partir de almidón de castaño chino mediante CST y un complejo de enzimas α-amilasa fungal, β-amilasa, pululanasa y α-glucosa transglucosidasa. Mientras que el método desarrollado en este estudio resulta una alternativa más atractiva con un rendimiento de 50.4 %.

La **Figura 25** ilustra la cinética de conversión de almidón licuado en IMOs mediante la simultánea sacarificación y transglucosilación bajo condiciones óptimas. La transglucosilación por la enzima α-glucosidasa se basa en el doble desplazamiento de glicosilación y desglicosilación. En la primera etapa el sustrato forma el complejo intermedio glucosil-enzima, la segunda etapa la enzima transfiere un residuo glucosídico de un donante de glucósido al grupo hidroxilo 6-OH del extremo no reductor del aceptor con retención en la configuración anomérica.[3,8,66] Como productos de la transglucosilación después de 24 h de tiempo de reacción se observó la isomaltosa (99.9 ± 0.6 g/L), seguido de isomaltotriosa (45 ± 0.7 g/L) y panosa (24.8 ± 0.03 g/L). La literatura menciona que la síntesis de IMOs a partir de maltosa resultan en panosa (DP3) como principal producto, seguida de isomaltotriosa (DP3), isomaltosa (DP2) y tretrasacáridos (DP4).[64,93] Sin embargo, cuando el sustrato maltosa se agota los IMOs pueden actuar como donadores de glucósilo y como aceptores alargando la cadena del oligosacárido; así, compiten por el sitio activo de la enzima α-

glucosidasa.[103] En la **Figura 25** se observó que la enzima formó isomaltosa e isomaltotriosa como IMOs mayoritarios. Estos resultados concuerdan con Ranasinghage et al,[46] quienes utilizaron Transglucosidase L “Amano” en arroz licuado mediante SST, los IMOs estaban compuestos principalmente isomaltosa e isomaltotriosa, además de isomaltotetraosa, isopanosa e isomaltohexosa en bajas concentraciones.

La cinética de la panosa (**Figura 25**) alcanza su máxima concentración entre 2 a 4 h de reacción. Después de este periodo, la concentración disminuye hasta las 12 h de reacción, y luego mantiene un descenso estable entre las 12 y 24 h. Mientras tanto, la isomaltosa comienza a aumentar significativamente, posiblemente debido a la degradación de la panosa, ya que este es un mejor sustrato para la enzima.[103] Algunos estudios sugieren que la reducción de la panosa se debe a la actividad hidrolítica secundaria de la enzima Transglucosidase L.[96,99] Como consecuencia, libera isomaltosa y glucosa como potenciales aceptores y donadores de glucosilos. Simultáneamente, la isomaltosa también se forma en la reacción de transglucosilación entre maltosa como donante y glucosa como aceptor. Casa-Villegas *et a*l,[103] sostienen que la isomaltosa se forma por transglucosilación debido a la acumulación de glucosa, que compite por el sitio de unión en la enzima a medida que avanza la reacción. Por ello, la cinética de la isomaltosa en la **Figura 25** muestra un aumento progresivo al tener concentraciones elevadas de glucosa.

Por otro lado, el mecanismo de transglucosilación de las α-glucosidasa también genera IMOs de cadena más larga utilizando como sustrato los IMOs ya formados.[3,8,46] Posiblemente la enzima cataliza la transglucosilación que transfiere el residuo glucosilo del intermedio enzima-maltosa al grupo OH de la posición 6 de isomaltosa, lo que resulta en la síntesis de isomaltotriosa. En la **Figura 25**, se observa un incremento lineal de isomaltotriosa que alcanzó una concentración de 31 ± 0.1 g/L después de 8 h de reacción y aumentó hasta 45 g/L después de 24 h de reacción. En contraste, la maltosa mostró un aumento debido a la sacarificación, alcanzando su valor máximo de 24.4 ± 1.0 g/L después de 1 h de reacción, seguido de una disminución lineal hasta las 8 h de reacción, tiempo que participó como sustrato

donador del residuo glucosilo para formar isomaltosa e isomaltotriosa. Mientras que, la glucosa aumentó rápidamente después de 1 h de reacción y continuó aumentado durante las 24 h de reacción (125.6 ± 2.2 g/L). Las enzimas Bakezyme 10.000 (α-amilasa maltogénica) y Promozyme D2 (pululanasa), enzimas sacarificantes, hidrolizan los enlaces α-(1,6) y α-(1,4) del extremo no reductor de las cadenas de amilasa, respectivamente, obteniendo maltosa como producto primario y glucosa como secundario.[60,61] Simultáneamente, la enzima Transglucosidase L exhibe una relación mutualista con las otras enzimas y convierte el sustrato liberado, maltosa, en IMOs dejando libre una molécula de glucosa. La enzima Transglucosidasa L no solo exhibe actividad de transferasa sino también hidrolítica, una molécula de agua en el medio de reacción compite por el intermedio glucosil-enzima liberando dos moléculas de glucosa. Este fenómeno también explica las concentraciones altas de glucosa liberadas en 24 h de reacción tanto por la síntesis como hidrólisis. La síntesis se controló cinéticamente por las altas concentraciones de maltosa favoreciendo la transglucosilación sobre la hidrólisis.[65,66,68] Se formó un poco de maltotriosa durante las 0.5 h de tiempo de reacción La formación de maltotriosa al inicio de la reacción es uno de los productos de hidrólisis de la amilopectina mediada por la enzima pululanasa (Bakezyme Mam 10.000).[53] Posteriormente, la maltotriosa se consumió durante la conversión de IMOs.

El recuadro de la **Figura 25** muestra el perfil cinético de IMOs que se generó durante la transglucosilación. Después de 8 h de reacción, los IMOs aumentaron rápidamente, a causa del incremento de isomaltosa e isomaltotriosa. Después de este tiempo, el incremento se produjo de manera más lenta, alcanzando una concentración de 169.7 ± 0.1 g/L a las 24 h de reacción. Este suceso probablemente se debió a la competencia de los glucósidos formados, ya que la maltosa, que es la molécula con mayor afinidad, disminuyó.

Como se ha mencionado anteriormente, la estrategia de simultánea sacarificación y transglucosilación en la producción de IMOs permitió alcanzar mejores rendimientos (50.4 ± 0.03 %) y productividad volumétrica (7.1 ± 0.004 g/L.h, equivalente a 0.021 ± 0.001 g/g.h de productividad específica, en comparación con el método convencional

(40% g/g y 0.0085 g/g.h).[9,104] El uso de un cóctel de enzimas comerciales de bajo costo para la industria alimentaria (Termamyl 300L, Promozyme D2, Bakezyme Mam 10.000 y Transglucosidase L) y el reemplazo del almidón de maíz por el almidón de cebada forrajera (*Hordeum vulgare L*.) resultó en una alternativa sostenible para la producción de jarabe de IMOs.

VII. CONCLUSIONES

De la presente investigación se concluye que:

- Se determinó que el tiempo de licuefacción de almidón de cebada forrajera estuvo en el rango de 46 a 59 min para obtener un jarabe de dextrinas con un equivalente de dextrosa entre 6 y 7 utilizando concentraciones de almidón de cebada forrajera entre 28 y 40% (p/v) y la enzima α-amilasa Termamyl 300L entre 11.8 y 16.9 UI/mL rx. Para la condición óptima, el tiempo de licuefacción del almidón al 34 % (p/v) con 14.3 UI/mL rx de enzima α-amilasa Termamyl 300L fue 52 minutos.
- Se estableció una efectiva estrategia de síntesis de IMOs a partir de almidón licuado de cebada forrajera mediante sacarificación y transglucosilación simultánea con preparaciones enzimáticas comerciales Promozyme D2, Bakezyme Mam 10.000 y Transglucosidase L de las cuales, se determinó que la Promozyme D2 exhibe un efecto no-significativo a un nivel de significancia de 0.05.
- Se realizó la optimización experimental de la síntesis de isomaltooligosacáridos a partir de almidón licuado de cebada forrajera usando una función de deseabilidad, las condiciones óptimas fueron: 34 % (p/v) almidón de cebada forrajera, 51 °C, las enzimas Promozyme D2, Bakezyme MAM 10.000 y Transglucosidase L, fueron dosificadas a 10 UI/g almidón licuado b.s, 66 UI/g almidón licuado b.s y 12.3 U_T/g almidón licuado b.s; respectivamente, en 24 horas de reacción. Se obtuvo un rendimiento de 50.4 ± 0.03 %, selectividad de isomaltotriosa de 36.1 ± 0.7 % y productividad volumétrica de 7.1 ± 0.004 g/L.h. Además, se logró identificar que la composición de los IMOs obtenidos consistía principalmente de isomaltosa (99.9 ± 0.6 g/L), seguido de isomaltotriosa (45 ± 0.7 g/L) y panosa (24.8 ± 0.03 g/L).

VIII. RECOMENDACIONES

En base a la experiencia de la presente investigación se recomienda:

- Explorar estrategias de purificación de IMOs mediante fraccionamiento o fermentación selectiva con levaduras para eliminar los azúcares digeribles como glucosa, maltosa y maltotriosa, así, los jarabes de IMOs mejorarán sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y se podrán incluir en alimentos para diabéticos.
- Emplear técnicas de espectrometría de masas para identificar los pequeños picos cromatográficos desconocidos en las muestras inyectadas al HPLC.
- Realizar pruebas *in vitro* para determinar la funcionalidad prebiótica del jarabe de isomaltooligosacáridos.
- Realizar una evaluación técnica-económica para la factibilidad de una planta productora de isomaltooligosacáridos a partir de almidón de cebada forrajera y harina de cebada forrajera.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sorndech W. Isomaltooligosaccharides as prebiotics and their health benefits. En: Panesar PS, Anal AK, editores. 1st ed. *Probiotics, prebiotics and synbiotics.* Wiley; 2022. p. 361–77. Doi: https://doi.org/10.1002/9781119702160.ch15
2. Rini DM, Xu W, Suzuki T. Current research on the role of isomaltooligosaccharides in gastrointestinal health and metabolic diseases. *Prev Nutr Food Sci.* 2024;29(2):93–105. Doi: 10.3746/pnf.2024.29.2.93
3. Tiangpook S, Nhim S, Prangthip P, Pason P, Tachaapaikoon C, Ratanakhanokchai K, et al. Production of a series of long-chain isomaltooligosaccharides from maltose by Bacillus subtilis AP-1 and associated prebiotic properties. Foods. 2023;12(7):1499. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/foods12071499.
4. Huang S-X, Hou D-Z, Qi P-X, Wang Q, Chen H-L, Ci L-Y, et al. Enzymatic synthesis of non-digestible oligosaccharide catalyzed by dextransucrase and dextranase from maltose acceptor reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;523(3):651–7. Doi: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.010
5. Maurya R, Ali U, Kaul S, et al. Inmobilization of α-tranglucosidase on silica-coated magnetic nanoparticles and its application for production of isomaltooligosaccharide from the potato peel. Sci. Rep 13, 2023;13:12708. Doi: https://doi.org/10.1038/s41598-023-38266-8
6. Song JY, Kim YM, Lee BH, Yoo SH. Increasing the dietary fiber contents in isomaltooligosaccharides by dextransucrase reaction with sucrose as a glucosyl donor. Carbohydr Polym. 2020; 230:115607. Doi: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115607
7. Sorndech W, Nakorn KN, Tongta S, Blennow A. Isomaltooligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications. Lebensm Wiss Technol. 2018; 95:135-142.
8. Berrocal C, Chico H, Carranza E, Vega R. Desirability function for optimization of the synthesis of high-panose isomaltooligosaccharides from maltose

catalyzed by a novel commercial enzyme preparation from Aspergillus niger. Biochem Eng J. 2021;171(108003):10800. Doi: https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108003

9. Niu D, Qiao J, Li P, Tian K, Liu X, Singh S et al. Highly efficient enzymatic preparation of isomaltooligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. Electron J Biotechnol. 2017; 26:46-51.
10. Ministerio de desarrollo agrario y riego (MIDAGRI). Producción agrícola. Anuarios. Lima: SIEA. [citado el 26 de agosto de 2024].
11. Llacsa J, Gamarra JA, Gómez CA, Martínez A, Gómez LR, Viera MA. Evaluación de genotipos promisorios de cebada (Hordeum vulgare L.) en los Andes centrales de Perú. Rev Investig Vet Peru [Internet]. 2020;31(2): e17856. Disponible en: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17856
12. Pinedo, T, Rojas, I y Bautista, C. Manual de cultivo de cebada UNALM. La Molina. Lima- Perú. 2020. Disponible en: https://proyeccion.lamolina.edu.pe/direccion02/manual-de-cultivo-de-cebada/
13. Hoyle A, Brennan M, Jackson GE, Hoad S. Increased grain density of spring barley (Hordeum vulgare L.) is associated with an increase in grain nitrogen. J Cereal Sci.2019;89(102797):102797. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102797
14. Carrillo F. y Minga F. Agronomic characterization of 16 varieties of malting barley carried out in the Tunshi experimental center. Pol.Con. Edición 54. Vol. 6, N°1.2021. pp. 637-655. Doi: 10.23857/pc. v6i1.2169
15. Gutierrez, F. Adaptación de tres variedades de cebada *(Hordeum vulgare L.)* a diferentes pisos altitudinales del distrito de Vinchos-Ayacucho. [Tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Agrarias; 2011.
16. Foster, E. and Prentice N. Barley. *In*: nutritional quality of cereal grains; genetic and agronomic improvement-agronomy.Monograph no. 28. South Segoe Road, Madison, USA. 337-396 pp. 1987.Doi: 10.2134/agronmonogr28

17. Gashaw, A. Review on Structure, Functional and Nutritional Composition of Barley (Hordeum vulgare).Journal of Nutrition and Food Processing.2021. 4(2); DOI: http://dx.doi.org/10.31579/2637-8914/046
18. Chancasanampa, S. Componentes de rendimiento de líneas avanzadas de cebada hexástica (*Hordeum hexastichum L.*) del CIMMYT – México en condiciones de la C.C. Pucará-Huancayo.[Tesis].Universidad Nacional del Centro del Perú – Facultad de Agronomía – Huancayo – Perú.2020.
19. Ma X, Zhou W, Guo T, Li F, Li F, Ran T, et al. Effects of dietary barley starch contents on the performance, nutrient digestion, Rumen fermentation, and bacterial community of fattening Hu sheep. Front Nutr. 2022;8. Doi: http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.797801
20. Kwon, C., Kim, H. R., Moon, T. W., Lee, S. H., & Lee, C. J. Structural and Physicochemical Characteristics of Granular Malic Acid-Treated Sweet Potato Starch Containing Heat-Stable Resistant Starch. Journal of Chemistry. 2019. 1–10. DOI:10.1155/2019/2903252
21. Geng, L., Mengdi, L., Zhang, G. and Lingzhen Y. Barley: potential for producing healthy and functional foods. Food Quality and Safety.2022. 6, 1-13. DOI: https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac012
22. Balet, S., Gous, P., Fox, G., Lloyd, J., & Manley, M. Characterisation of starch quality from barley varieties grown in South Africa. International Journal of Food Science & Technology.2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.14299
23. Punia, S. Barley starch: Structure, properties and in vitro digestibility - A review. International Journal of Biological Macromolecules. Volumen 155.2020. Pag 868-875. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.219
24. Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. The structural characteristics of starches and their functional properties. CyTA - Journal of Food.2018.16(1),1003–1017.DOI: http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2018.1518343
25. Prieto MJ, Rubio HC, Román GA, Méndez MM, González RC, Prieto GF. Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativun Jess*). Correlación

entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. Multiciencias.2009. Vol.9 núm. 2.

26. Linko Y. En: Sparrow DHB, Lance RCM, Henry RJ, editor. Alternative End Uses of Barley. Victoria, Australia: Royal Australian Chemical Institute; 1988. p. 87–92.
27. Lukinac, J; Jukié, M. Barley in the Production of Cereal- Based Products. Plants. 2022. Doi: 10.3390/plants11243519
28. Yang S, Wu C, Yan Q, Li X, Jiang Z. Nondigestible functional oligosaccharides: Enzymatic production and food applications for intestinal health. Annu Rev Food Sci Technol. 2023;14(1):297–322. Doi: http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-052720-114503
29. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi S, et al. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. Foods. 2019;8(3):92. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/foods8030092
30. Lordan C, Thapa D, Ross RP, Cotter PD. Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. Gut Microbes. 2020;11(1):1–20. Doi: http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2019.1613124
31. Yoo S, Jung S-C, Kwak K, Kim J-S. The role of prebiotics in modulating gut Microbiota: Implications for human health. Int J Mol Sci. 2024;25(9):4834. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/ijms25094834
32. Bedu-Ferrari C, Biscarrat P, Langella P, Cherbuy C. Prebiotics and the human gut microbiota: from breakdown mechanisms to the impact on metabolic health. Nutrients [Internet]. 2022;14(10):2096. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/nu14102096
33. Yuan M, Zhang Z, Liu T, Feng H, Liu Y, Chen K. The role of nondigestible oligosaccharides in alleviating human chronic diseases by regulating the gut Microbiota: A review. Foods. 2024;13(13):2157. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/foods13132157

34. Chen Y-J, Sui X, Wang Y, Zhao Z-H, Han T-H, Liu Y-J, et al. Preparation, structural characterization, biological activity, and nutritional applications of oligosaccharides. Food Chem X [Internet]. 2024;22(101289):101289. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101289
35. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent advances in research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. Int Dairy J. 1999; 9:69–80.
36. Cardoso BB, Amorim C, Silvério SC, Rodrigues LR. Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities. En: Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier; 2021. p. 41–95.
37. Mano MCR, dos Santos PN, Paulino BN, Molina G. Enzyme technology applied to biomolecule synthesis for the food industry. En: Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology. Elsevier; 2022. p. 57–69.
38. Chelliah R, Kim NH, Park S, Park Y, Yeon S-J, Barathikannan K, et al. Revolutionizing renewable resources: Cutting-edge trends and future prospects in the valorization of oligosaccharides. Fermentation. 2024;10(4):195. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/fermentation10040195
39. Guarino M, Altomare A, Emerenziani S, Di Rosa C, Ribolsi M, Balestrieri P, et al. Mechanisms of action of prebiotics and their effects on Gastro-intestinal disorders in adults. Nutrients. 2020;12(4):1037. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/nu12041037
40. Vera C, Illanes A, Guerrero C. Enzymatic production of prebiotic oligosaccharides. Curr Opin Food Sci. 2021; 37:160–70. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.013
41. Madsen L. R.; Stanley S, Swan P, Oswald J. A Survey of commercially available isomaltooligosaccharide-based food ingredients. J. Food Sci. 2017; 82: 401−408.
42. Casa-Villegas M, Marín-Navarro J, Polaina J. Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides. Amylase. 2018;2(1):17-29.

43. Prebiotic type spotlight: Isomaltooligosaccharides (IMOs) – global prebiotic association [Internet]. Prebioticassociation.org. [citado el 26 de agosto de 2024]. Disponible en: https://prebioticassociation.org/prebiotic-type-spotlight-isomaltooligosaccharides-imos/
44. Basu A, Mutturi S, Prapulla S. Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. Process Biochem. 2016; 51(10):1464-1471.
45. Kaulpiboon J, Rudeekulthamrong P, Watanasatitarpa S, Ito K, Pongsawasdi P. Synthesis of long-chain isomaltooligosaccharides from tapioca starch and an in vitro investigation of their prebiotic properties. J. Mol Catal B-Enzym. 2015; (120):127-135.
46. Ranasinghage NBDP, Sangdeaun Wattanasirithum L, Areerat P, Gonu H, Withayagiat U. Improvement of IMO production and prebiotic properties using optimal substrate and transglucosylation period. Biocatal Agric Biotechnol. 2023;51(102791):102791. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102791
47. Keawyok K, Waree W, Jodnak S. Prebiotic properties of isomaltooligosaccharides from cassava as a potential ingredient in high-protein drinks for athletes. Bioact Compd Health Dis. 2023;6(3):38. Doi: http://dx.doi.org/10.31989/bchd.v6i3.1063
48. Panwar D, Panesar PS, Saini A. Prebiotics and their role in functional food product development. En: Panesar PS, Anal AK, editores. 1st ed. *Probiotics, prebiotics and synbiotics.* Wiley; 2022. p. 233–71. Doi: http://dx.doi.org/10.1002/9781119702160.ch11
49. European Food Safety Authority. Isomalto-oligosaccharides related health claims. EFSA Journal [Internet]. 2010. [Actualizado, 2010, citado: 05 May 2019]. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1801/
50. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). Isomalto-oligosaccharide as a novel food. [Internet]. 2015. [Actualizado 2015; citado: 05 May 2019]. Disponible en: http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1123IMOasaNovelFood.aspx/.

51. Choudhury NR. Isomalto-oligosaccharide Market [Internet]. Futuremarketinsights.com. [citado el 23 de febrero de 2024]. Disponible en: https://www.futuremarketinsights.com/reports/isomalto-oligosaccharide-market.

52. Saman P, Kuancha C, Chaiongkarn A, Moonmangmee S, Fungsin B. Isomalto-oligosaccharides production from rice flour and cassava starch. J Food Sci Agric Technol. 2019;5(0):188–92. Doi: http://rs.mfu.ac.th/ojs/index.php/jfat/article/view/276

53. Duong Hong Q, Hoang Minh T, Nguyen Thi HG, Nguyen Thi TH, Nguyen NH, Nguyen Thi TL, et al. Synthesis of isomaltooligosaccharides (IMOs) from sweet potato starch by simultaneous saccharification and transglycosylation using Saccharomyces cerevisiae var. Diastaticus BE 134 to improve purity of IMOs. J Food Qual. 2021:1–12. Doi: https://www.hindawi.com/journals/jfq/2021/1987219/

54. Plongbunjong V, Graidist P, Knudsen KEB, Wichienchot S. Isomaltooligosaccharide synthesised from rice starch and its prebiotic properties in vitro. Int J Food Sci Technol. 2017 ;52(12):2589–95. Doi: http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.13545

55. Vega-Paulino R, Zúniga-Hansen ME. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. J Mol Catal B-Enzym. 2012; 76: 44-51.

56. John J. Biochemical and biotechnological aspects of microbial amylases. En: Polysaccharide-Degrading Biocatalysts. Elsevier; 2023. p. 191-204. Doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99986-1.00013-2

57. Abedi E, Kaveh S, Mohammad Bagher Hashemi S. Structure-based modification of a-amylase by conventional and emerging technologies: Comparative study on the secondary structure, activity, thermal stability and amylolysis efficiency. Food Chem. 2024;437(137903):137903. Doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137903

58. Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure. 1995;3(9):853–9. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00220-9
59. Zheng Y, Zhang H, Li R, Zhu X, Zhu M. Effects of maltogenic α-amylase treatment on the proportion of slowly digestible starch and the structural properties of pea starch. Food Biosci. 2022;48(101810):101810. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101810
60. Liu P, Ma L, Duan W, Gao W, Fang Y, Guo L, et al. Maltogenic amylase: Its structure, molecular modification, and effects on starch and starch-based products. Carbohydr Polym. 2023;319(121183):121183. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121183
61. Hii SL, Tan JS, Ling TC, Ariff AB. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. Enzyme Res. 2012; 2012:1–14. Doi: http://dx.doi.org/10.1155/2012/921362
62. Zhong Y, Xu J, Liu X, Ding L, Svensson B, Herburger K, et al. Recent advances in enzyme biotechnology on modifying gelatinized and granular starch. Trends Food Sci Technol. 2022; 123:343–54. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.019
63. Kahar UM, Latif NA, Amran SI, Liew KJ, Goh KM. A bibliometric analysis and review of pullulan-degrading enzymes—past and current trends. Catalysts. 2022;12(2):143. Doi: http://dx.doi.org/10.3390/catal12020143
64. Day DF, Chung C-H, inventor. Isomaltooligosaccharides from Leuconostoc as neutraceuticals. US Patent 7291607 B2. 2004
65. Basu S, Mutturi SG, Prapulla SG. Modeling of enzymatic production of isomaltooligosaccharides: a mechanistic approach. Catal Sci Technol. 2015;5:2945–2958.
66. Polaina J, MacCabe A. Industrial Enzymes. Ed. Springers. 2007;141-147.
67. Monsan P, Paul F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol Rev. 1995;16(2–3):187–92. Doi: http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00165.x

68. Cobucci-Ponzano B, Perugino G, Trincone A, Mazzone M, Di Lauro, B, Giordano A, Rossi M, Moracci, M. Applications in biocatalysis of glycosyl hydrolases from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. Biocatal. Biotransform. 2003; 21:215–221.
69. Fao.org. [citado el 30 de agosto de 2024]. Disponible en: https://www.fao.org/faoterm/viewentry/en/?entryId=170967
70. Moldoveanu SC. Analytical pyrolysis of polymeric carbohydrates. In: Analytical Pyrolysis of Natural Organic Polymers. Elsevier; 2021. p. 111–269. Doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818571-1.00004-2
71. Díaz-Montes E. Dextran: sources, structures, and properties. Polysaccharides. 2021;2(3):554–65. Doi: https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033
72. Bláhová M, Štefuca V, Hronská H, Rosenberg M. Maltooligosaccharides: properties, production and applications. Molecules. 2023;28(7):3281. Doi: 10.3390/molecules28073281
73. Hauer B. Embracing nature's catalysts: A viewpoint on the future of biocatalysis. ACS Catal. 2020;10(15):8418–27. Doi: http://dx.doi.org/10.1021/acscatal.0c01708
74. Khan, M.R. Immobilized enzymes: a comprehensive review. Bull Natl Res Cent 45, 207 (2021). Doi: https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0
75. Soluble starch[Internet]. Merriam-webster.com. [citado el 6 de septiembre de 2024]. Disponible en: https://www.merriam-webster.com/dictionary/soluble%20starch
76. Reyes Diaz RA, Cruz Lara NM. Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo del síndrome metabólico: revisión narrativa. Rev Nutr Clin Metab [Internet]. 2024;7(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.35454/rncm.v7n1.551
77. Ojogbo E, Ogunsona EO, Mekonnen TH. Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. Materials Today Sustainability. 2020;7–8(100028):100028. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028
78. Li Z, Liu W, Gu Z, Li C, Hong Y, Cheng L. The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. Food Hydrocoll. 2015;48:189–196. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.030

79. Vasanthan T, Ratnajothi. Barley Starch: Production, properties, modification and uses. En: BeMiller J, Whistler R, editor. Starch. 3rd ed. Academic Press; 2009. p. 601-628.
80. McCleary BV, Mangan D, McKie V, Cornaggia C, Ivory R, Rooney E. Colourimetric and fluorometric substrates for measurement of pululanasa activity. Carbohydr Res. 2014; 393:60-69.
81. Chockchaisawasdee S, Poosaran N. Production of isomaltooligosaccharides from banana flour. J Sci Food Agric. 2013; 93: 180-186.
82. Amano Enzyme. Transglucosidase L "Amano". [Internet]. [Citado: 02 Marzo 2020]. Disponible en: http://amano-enzyme.com/es/our-services/.
83. Fogler HS. Reacciones múltiples. En: Mendoza GT, editor. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. 3rd ed. México: Pearson Publications Company; 2001. p. 310-366.
84. BIOTOL Board. High fructose corn syrups. En: Biotechnological innovations in food processing. Oxford, England: Butterworth-Heinemann; 1991. p.145-185.
85. Montgomery DC. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Limusa S.A. De C.V.; 2005. 686 p.
86. Vega R, Zúniga-Hansen ME. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. Bioresour Technol. 2011 ; 102(22):10180–6. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.025
87. Andersson AAM, Andersson R, Åman P. Starch and by-products from a laboratory-scale barley starch isolation procedure. Cereal Chem. 2001;78(5):507–513. Doi: http://dx.doi.org/10.1094/cchem.2001.78.5.507
88. Gao J, Vasanthan T, Hoover R. Isolation and characterization of high-purity starch isolates from regular, waxy, and high-amylose hulless barley grains. Cereal Chem. 2009 ;86(2):157–163. Doi: http://dx.doi.org/10.1094/cchem-86-2-0157
89. Li M, Tian Y, Dhital S. Starch Extraction. En: Starch and Starchy Food Products. Boca Raton: CRC Press; 2022. p. 17–40.

90. El Halal SLM, Kringel DH, Zavareze E da R, Dias ARG. Methods for extracting cereal starches from different sources: A review. Starke. 2019 ;71(11–12). Doi: http://dx.doi.org/10.1002/star.201900128.
91. Fan X, Zhu J, Dong W, Sun Y, Lv C, Guo B, et al. Comparison of pasting properties measured from the whole grain flour and extracted starch in barley (Hordeum vulgare L.). PLoS One. 2019;14(5). Doi: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0216978
92. Bisswanger H. Practical enzymology. John Wiley & Sons; 2019
93. Cui J, Li Y, Wang Q, Li J, Ou Y, Wang J, et al. Production, purification and analysis of the isomalto-oligosaccharides from Chinese chestnut (Castanea mollissima Blume) and the prebiotics effects of them on proliferation of Lactobacillus. Food Bioprod Process. 2017; 106:75–81. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.003
94. Olsen HS. Enzymatic production of glucose syrups. En: Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives. Boston, MA: Springer, 1995. p. 26–64. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-2159-4_2
95. Haaland PD. Experimental Desing in Biotechnology. Marcel Dekker Inc.; 1989. p.76-77.
96. Mangas-Sánchez J, Adlercreutz P. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. J Mol Catal B Enzym. 2015;122:51–55. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.014
97. Sabadash N, Hrabovska O, Fesych I, Avramenko A, Serhiienko A. Effect of the combined use of β-amylase and pullulanase on the carbohydrate composition of maltose syrups. Ukr Food J. 2021 ;10(4):761–773. Doi: http://dx.doi.org/10.24263/2304-974x-2021-10-4-10
98. Ojha S, Mishra S, Chand S. Production of isomalto-oligosaccharides by cell bound α-glucosidase of Microbacterium sp. Lebenson Wiss Technol. 2015;60(1):486–494. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.009
99. Kumar S, Tissopi T, Mutturi S. The successful synthesis of industrial isomaltooligosaccharides lies in the use of transglycosylating α-glucosidases: A

review. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2023 ;5(100325):100325. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100325

100. Vega R, Zúniga-Hansen ME. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. Bioresour Technol. 2011;102(22):10180–10186. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.025

101. Malá Š, Dvořáková H, Hrabal R, Králová B. Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α-glucosidases with different substrate specificity. Carbohydr Res. 1999;322(3–4):209–218. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6215(99)00222-0

102. Chen P, Xu R, Wang J, Wu Z, Yan L, Zhao W, et al. Starch biotransformation into isomaltooligosaccharides using thermostable alpha-glucosidase from Geobacillus stearothermophilus. PeerJ. 2018;6(e5086). Doi: http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5086

103. Casa-Villegas M, Marín-Navarro J, Polaina J. Synthesis of Isomaltooligosaccharides by Saccharomyces cerevisiae Cells Expressing Aspergillus niger α-Glucosidase. ACS Omega. 2017;2(11):8062–8068. Doi: http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.7b01189

104. Rastall TCAR. Manufacture of prebiotic oligosaccharides. En: G.R. Gibson and R.A. Rastall, editores. *Prebiotics: Development and Application*. England: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. p. 29–55.

105. Vega R, Zuniga-Hansen ME. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. Food Chem. 2015; 173:784–9. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.119

106. Seo E-S, Nam S-H, Kang H-K, Cho J-Y, Lee H-S, Ryu H-W, et al. Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextransucrase with high concentration of sucrose. Enzyme Microb Technol. 2007; 40(5):1117–23. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.017

107. Kim J-R, Yook C, Kwon H-K, Hong S-Y, Parl C-K, Park K-H. Physical and physiological properties of isomaltooligosaccharides and fructooligosaccharides. Korean J. Food Sci. Technol. 1995;27(2):170-175.

108. Voragen AGJ. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. Trends Food Sci Technol [Internet]. 1998;9(8–9):328–35. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(98)00059-4

X. ANEXOS

ANEXO 1. Fichas técnicas de las preparaciones enzimáticas comerciales (Transglucosidase L, Termamyl 300L, Bakezyme MAM 10.000 y Promozyme D2.

Transglucosidase L "Amano"

Transglucosidase L "Amano" is a α-glucosidase (EC 3.2.1.20) manufactured by unique fermentation process with a selected strain belonging to Aspergillus niger.
Transglucosidase L "Amano" acts on oligosaccharides, and forms isomaltose, panose and other branched oligosaccharides.

ACTION

Transglucosidase activity is determined by the use of methyl-α-D-glucoside as substrate. Transglucosidase L "Amano" catalyzes the decomposition of methyl-α-D-glucoside, and converts to D-glucose and methanol. D-glucose formed is assayed by the use of 4-aminoantipyrin-phenol reagent contain glucose oxidase and peroxidase.

Methyl-α-D-glucoside $\xrightarrow{\text{Transglucosidase}}$ D-Glucose + Methanol

D-Glucose $\xrightarrow{\text{Glucose oxidase}}$ Gluconic acid + H_2O_2

H_2O_2 + 4-Aminoantipyrin + Phenol $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$ Quinone dye

One unit of enzyme activity is defined as the enzyme quantity which produces 1 μg of glucose per 60 minutes under the prescribed condition.

ACTIVITY

Not less than 300,000 units/ml by Amano method

CHARACTERISTICS

1) Light brown liquid
2) Optimum temperature : 60℃
3) Optimum pH : 5.0
4) Stable pH range : 4.0 ~ 6.0

APPLICATION

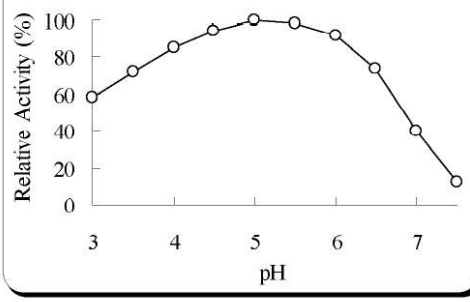
Transglucosidase L "Amano" is used for the production of branched oligosaccharides. Optimal saccharification conditions depend on pH, temperature, substrate concentration and enzyme dosage. The recommended conditions are as follows.

pH : 5.0 ~ 5.5
Temperature : 55 ~ 60℃
Enzyme dosage : 0.7 ~ 1.4 L/ton of dry substrate

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

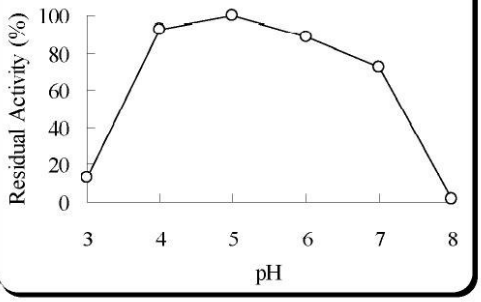
1. Physical Properties

Fig. 1. pH Activity



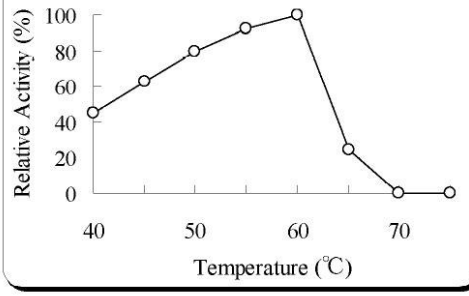
The standard assay of transglucosidase activity was carried out at 40℃ under different pH conditions. The optimum pH of transglucosidase is about 5.0

Fig. 2. pH Stability



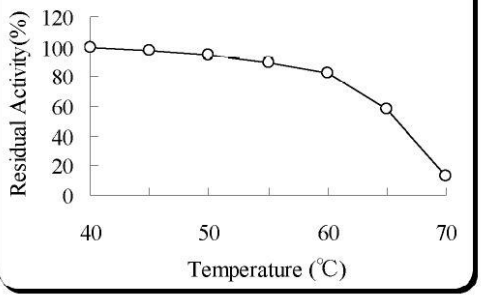
The residual activity at 40℃ were measured after 30 minutes treatment. Transglucosidase is stable in pH 4.0 ~ 6.0.

Fig. 3. Temperature Activity



The standard assay of transglucosidase at pH 5.0 was carried out at different temperatures. The optimum temperature of transglucosidase is about 65℃.

Fig. 4. Thermostability



The residual activity of transglucosidase at pH 5.0 was measured after 30minutes treatment. Transglucosidase is not stable at 60℃ in the absence of substrate, but is stable in the presence of substrate.

2. Production of Transformed Oligosaccharides

30% Liquified Corn Starch (DE 5～15)

↓ Addition of Transglucosidase L "Amano" (1.0 L / t DS) and Biozyme L (0.6 L / t DS)

Reacted 58℃ and pH 5.5 for 48 hours

↓

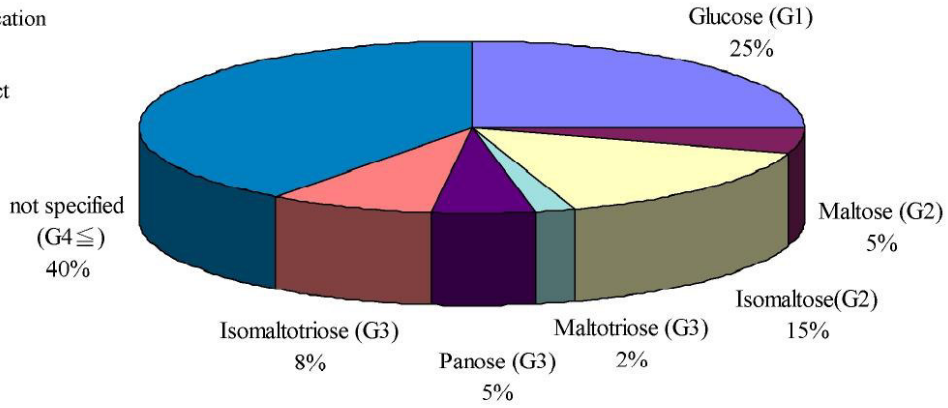
Boiled to denature the enzyme

↓

Purification

↓

product



3. Substrate specificity

The substrate specificity of Transglucosidase L "Amano" is shown in Table 1. The rates of the reactions with various substrates were measured quantitatively from the initial velocities. Transglucosidase L "Amano" hydrolyzed maltose and maltotriose much faster than soluble starch and had a high specificity for maltooligosaccharides.

Table 1. The Substrate Specificity

Substrate (1% solution)	Relative Activity
Methyl-α-D-glucoside	1
Methyl-α-maltoside	137
Methyl-α-maltotrioside	190
Ethyl-α-D-glucoside	4
4-Nitrophenyl-α-D-glucoside	—
4-Nitrophenyl-β-D-glucoside	—
Maltose	222
Maltotriose	134
Nigerose	—
Kojibiose	21
Phenyl-β-D-glucoside	—
Soluble starch	5

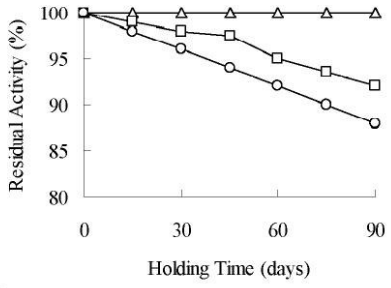
HANDLING PRECAUTIONS

Contact with eyes, skin or respiratory tract may cause irritation. Inhalation of aerosol or dust may cause sensitization or allergic reaction in sensitized individuals. If enzyme comes in contact with skin or eyes, flush thoroughly and repeatedly with water.

STORAGE

When Transglucosidase L "Amano" is stored at temperature of less than 20℃, the declared activity is maintained for at least 2 months. Transglucosidase L "Amano" does not lose activities when it gets cloudy or precipitated out.

Fig.5. Transglucosidase L "Amano"



IMPORTANT

The information and recommendations contained herein are to the best of our knowledge reliable. However, nothing herein is to be construed as a warranty or representation in respect of safety in use, suitability, efficacy, merchantability or otherwise, including freedom from patent infringement. Users shall make their own tests for their particular purpose. We do not accept any liability for any loss, damage or infringement arising from the use of the information and recommendations contained herein.

SAMPLE

CERTIFICATE OF ANALYSIS

No. 000122279

Date AUG. 07,2009

Messrs. PUCV

Product: Transglucosidase L "Amano"

Lot No.: TGUH0250947L Quantity: 50 ML Date Assayed: Feb.23,2009

Test Items	Specification	Test Results
pH:	4.5 ～ 5.5	5.1
Heavy Metals(as Pb):	Not more than 40 μg/g	Not more than 40 μg/g
As(as Arsenic Trioxide):	Not more than 3 μg/g	Not more than 3 μg/g
Lead(Pb):	Not more than 10 μg/g	Not more than 10 μg/g
Transglucosidase activity: pH5.0	Not less than 300,000 U/mL	358,000 U/mL
S-Amylase activity: F.L.S. Method pH4.5	Not more than 300 U/mL	74 U/mL
Total viable aerobic count:	Not more than 10,000 /mL	Not more than 10,000 /mL
Coliforms:	Not more than 30 /mL	Not more than 30 /mL
Escherichia coli:	Negative/25mL	Negative/25mL
Salmonella:	Negative/25mL	Negative/25mL
	Judgment	Pass

Remark:

SAMPLE

Quality Control Manager

Prepared by

Amano Enzyme Inc.

Head Office
2-7,1-chome,Nishiki,Naka-ku,Nagoya,Aichi 460-8630 JAPAN
Tel: +81.(0)52.211.3032 Fax: +81.(0)52.211.3054
Nagoya Plant
Kunotsubo,Kitanagoya,Aichi 481-8533 JAPAN

Enzyme information

Termamyl®

Description:

Termamyl® is a liquid enzyme containing outstanding heat-stable alpha amylase, expressed and produced by a genetically modified laboratory strain of *Bacillus licheniformis*. It is an enzyme that hydrolyses 1,4 alpha glucosidic linkages in amylose and amylopectin. Starch is rapidly broken down to soluble dextrins and oligosaccharide,

Specification:

Termamyl® is a clear brown liquid

Activity:

One Kilo alpha-amlase Unit is the amount of enzyme which breaks down 5.26g starch per hour. Novozymes standard method for determination of alpha-amylase is based on the following standard conditions:

Substrate soluble starch
Reaction time 7-20 minutes
Temperature 37°C
pH 5.6

The presence of Ca ions and pHs of 5.5 - 6.5 can have a stabilizing effect on the enzyme even at temperatures close to or a little above 100°C.

Applications:

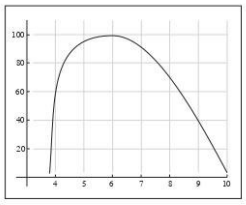
Teramyl® is used in the following industries:

Starch industry - the enzyme is used for continuous liquefaction of starch in steam jet cookers or similar equipment operating at temperatures up to 110°C and thereby taking advantage of the extreme heat stability of this enzyme.

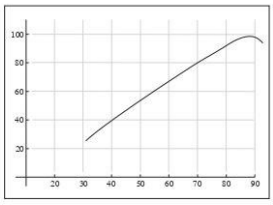
Alcohol industry - the enzyme is used for thinning of starch in distilling mashes. The heat stable of the enzyme is important advantage in the thinning of mashes .

Brewing industry - Termamyl® is used for adjunct liquidification (unmalted grains such as corn, rice, rye, oats, barley, and wheat used in brewing beer which supplement the main mash ingredient - malted barley). Due to the heat stability of the enzyme, the cooking programme can be simplified, it also means more of the adjunct can be used.

Sugar industry - Termamyl® is used to break down starch present in cane sugar. The starch content in the raw sugar is reduced which improves refinery filtering.



The influence of pH on the activity of Terrmamyl®



The influence of temperature on the activity of Termamyl®

Safety:

The product is non-flammable. In the case of spillage or accidental contact with skin or eyes, rinse by flushing with water. Any spillage of the enzyme should be wiped up immediately with a paper towel and disposed of in a waste bin. Do not allow spillages of the enzyme or diluted enzyme to dry to a powder.

Enzyme Information sheet is based on information provide by Nonozymes

Product Specification Sheet

BAKEZYME® MAM 10.000

Product Information

Product description	Enzyme preparation for food use containing maltogenic amylase (IUB: glucan 1,4-α-maltohydrolase) derived from a selected strain of *Bacillus subtilis*
Product number	10877
Application market	Baking
Appearance	off-white to creamish microgranulate (product color may vary from batch to batch)
Standardised activity	11000 NMAU/g ± 5 %
Usable ranges	Active at proofing temperatures and at temperature up to 50-65° C. Enzyme will be inactivated quickly above 65° C
Status	• GMO production strain • Food intolerance info available on request • Halal approved • Kosher approved

Regulatory information

The product complies with general specifications for food enzyme preparations as published by JECFA, FCC and in French "Arrêté auxillaires technologiques du 19 octobre 2006" and with FDA current GMP standards (21 CFR 110).

Composition

Carrier	maltodextrin, sodium chloride, vegetable oil

Chemical properties

Dry Matter	> 90 %
Particle size distribution	> 90% between 63 and 224 µm
Heavy metals	< 30 ppm (as Pb)
Lead	< 5 ppm
Arsenic	< 3 ppm
Cadmium	< 0.5 ppm
Mercury	< 0.5 ppm

Microbiological properties

Total plate count	$< 5 * 10^4$ CFU per g
Coliforms	< 30 CFU per g
Escherichia coli	absent in 25 g
Salmonella	absent in 25 g
Staphylococcus aureus	absent in 1 g
Sulphate reducers	< 30 CFU per g
Anti bacterial activity	absent by test
Mycotoxins	absent by test

Nutrient data

Typical & Content is based on calculated values from ingredients/additives

Carbohydrates	63.3 %
Fat (Vegetable)	1.1 %
Protein	12.2 %
Ash (Minerals)	17.0 %
Energy (kJ) per 100 g	1339 kJ
Energy (kcal) per 100 g	320 kcal

GRANOTEC

Stability data

- Store in a dry and cool place, protected from sunlight and moisture.
- When stored in recommended condition, the shelflife is 2 years after production. Hereafter a re-assay is advisable.

Packaging

15 kg bag in box

Safety & handling

Please refer to the Material Safety Data Sheet available on request.

Intellectual Property

Outside US: In order to use the Maltogenic Alpha-Amylase together with a Phospholipase under the claims of European patent EP 1073339, Canadian patent CA 2326412 or Australian patent AU754470 one needs to buy the Phospholipase from a person or a legal entity who has a sub-licensable license under these patents or is the owner thereof.

Contact

DSM Food Specialties B.V.
www.dsm-foodspecialties.com

Head Office
A. Fleminglaan 1
P.O. Box 1
2600 MA Delft
The Netherlands
tel. +31 15 279 4001
fax. +31 15 279 4020

USA
45 Waterview Blvd
Parsippany, NJ 07054-1298
USA
tel. +1 973 257 1063
fax +1 973 257 8248

Asia
152 Beach Road
#13-07/08 Gateway East
Singapore 189721
Singapore
tel. +65 6393 6128
fax. +65 6295 6650

China
11f, The Headquarters Building
No 168 Middle Xi Zang Road
Shanghai 20001
China
tel. +86 21 6141 8188
fax +86 21 6141 7008

Latin America
Av. Eng. Billings 1729 - Prédio 9
05321 - 900 Jaguaré
São Paulo SP
Brasil
tel. +55 11 3719 8237
fax +55 11 3719 4985

Although diligent care has been used to ensure that the information provided herein is accurate, nothing contained herein can be construed to imply any representation or warranty for which we assume legal responsibility, including without limitation any warranties as to the accuracy, currency or completeness of this information or of non-infringement of third party intellectual property rights. The content of this document is subject to change without further notice. Please contact us for the latest version of this document or for further information. Since the user's product formulations, specific use applications and conditions of use are beyond our control, we make no warranty or representation regarding the results which may be obtained by the user. It shall be the responsibility of the user to determine the suitability of our products for the user's specific purposes and the legal status for the user's intended use of our products.
DSM Food Specialties B.V. | A. Fleminglaan 1 | 2613 AX Delft | The Netherlands | info.food@dsm.com | Trade Register Number 27235314

Date of issue: 12/15/2011

DSM Food Specialties

DSM

Granotec Peru S.A.
Av. los Ingenieros 112
LIMA 03 LIMA
PERU

Print date : 19-May-2017
Your purchase order : 2017E-913118
Our order number : 481580

Certificate of Analysis

Material: Our / Your reference

10877 - BAKEZYME MAM 10.000, 15 kg box

Batch: 417696601 / Production date: 11-May-2017 / Best before date: 11-May-2019
Retest date: not applicable

Characteristic	Unit	Value	Specification
Maltogenic amylase activity (NMAU/g)	U/g	10870	10450 - 11550
Dry matter	%	95.7	>= 90.0
Total plate count	CFU/g	< 10	<= 50000
Coliforms	CFU/g	< 10	<= 30
Salmonella in 25g		conforms to	negative by testing

In addition to the results listed on the certificate of analysis we confirm that batch 417696601 meets the specification limits as listed in the applicable product data sheets.

This document is a non-signed computer form generated after release by the QA manager
BTCUSER

GRANOTEC
Nutrición y Biotecnología para la Salud

PULLULANASE, LIQUID

Promozyme® D2

Promozyme® D2 is a thermostable pullulanase that provides rapid debranching. That allows you to quickly and consistently meet your final sugar specifications.

Product features, details and benefits

Benefits

pH robustness

This product enables peak performance despite process pH changes. That means your plant will continue to meet targets, even if pH levels drift.

For syrups with medium to high maltose levels

This product delivers medium to high final maltose levels in high maltose syrup production.

High temperature tolerance

This product delivers peak performance even in high temperature applications. That means lower cooling costs after liquefaction and minimal risk of microbial growth.

Low calcium performance

This product allows for good performance at conditions with low/no calcium added.

Details

Promozyme® D2 reduces levels of branched oligosaccharides and increases your maltose yield.

Safe handling

This product contains enzymes. While enzymes are safe to use in consumer applications, they need correct handling in working environments to ensure workers' safety.

Indeed, repeated inhalation of enzyme dust or aerosols resulting from improper handling may induce sensitization and may cause allergic type 1 reactions in sensitized individuals.

Please follow the precautionary handling recommendations below:

- Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray
- Avoid contact with eyes, skin, or clothing
- In case of inadequate ventilation wear respiratory protection
- IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing
- If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or a doctor
- Store in a dry place. Store in a closed container
- Dispose of contents/containers in accordance with local regulations



ANEXO 2. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.

Anexo 2a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón inicial %(p/v)	238.2	1	238.2	42.3	0.023
(4)Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	148.0	1	148.0	26.3	0.036
2 by 4	54.3	1	54.3	9.6	0.090
(3)Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	47.0	1	47.0	8.3	0.102
1 by 2	43.0	1	43.0	7.6	0.110
(5)Temperatura (°C)	23.7	1	23.7	4.2	0.177
2 by 5	15.1	1	15.1	2.7	0.243
3 by 4	7.1	1	7.1	1.3	0.379
3 by 5	4.2	1	4.2	0.7	0.479
1 by 5	2.0	1	2.0	0.4	0.613
1 by 4	1.4	1	1.4	0.3	0.664
(2)Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s.)	1.3	1	1.3	0.2	0.677
4 by 5	0.6	1	0.6	0.1	0.779
1 by 3	0.5	1	0.5	0.1	0.797
2 by 3	0.1	1	0.1	0.01	0.919
Residual	11.3	2	5.6		
Total SC	597.7	17			

R-sqr=0.98115; Adj:0.83974

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 2b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(4)Transglucosidase L (UT/g almidón licuado b.s.)	151.9	1	151.9	95.6	0.010
(5)Temperatura (°C)	83.9	1	83.9	52.8	0.018
(1)Almidón inicial %(p/v)	13.1	1	13.1	8.3	0.103
3 by 4	9.7	1	9.7	6.1	0.132
4 by 5	6.8	1	6.8	4.3	0.175
2 by 4	4.2	1	4.2	2.7	0.244
2 by 5	3.7	1	3.7	2.3	0.268
1 by 4	3.1	1	3.1	2.0	0.295
1 by 5	0.7	1	0.7	0.4	0.584
1 by 2	0.3	1	0.3	0.2	0.705
1 by 3	0.2	1	0.2	0.1	0.750
(2)Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s.)	0.1	1	0.1	0.1	0.789
2 by 3	0.02	1	0.02	0.01	0.916
(3)Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	0.02	1	0.02	0.01	0.930
3 by 5	0.01	1	0.01	0.01	0.947
Residual	3.2	2	1.6		
Total SC	281.0	17			

R-sqr=0.98869; Adj:0.90384

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 2c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño factorial fraccionado 2^{5-1}.

FACTOR	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón inicial %(p/v)	8.7	1	8.7	149.9	0.007
(4)Transglucosidase L (UT/g almidón licuado b.s.)	3.6	1	3.6	62.2	0.016
2 by 4	1.3	1	1.3	22.8	0.041
(3)Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	1.0	1	1.0	17.2	0.053
1 by 2	1.0	1	1.0	17.2	0.053
(5)Temperatura (°C)	0.6	1	0.6	11.0	0.080
2 by 5	0.4	1	0.4	7.3	0.114
1 by 4	0.3	1	0.3	5.2	0.150
3 by 4	0.3	1	0.3	4.3	0.174
3 by 5	0.3	1	0.3	4.3	0.174
1 by 5	0.1	1	0.1	2.1	0.283
(2)Promozyme D2 (UI/g almidón licuado b.s.)	0.1	1	0.1	2.1	0.283
1 by 3	0.1	1	0.1	1.1	0.408
4 by 5	0.01	1	0.01	0.2	0.718
2 by 3	0.003	1	0.003	0.04	0.855
Residual	0.1	2	0.1		
Total SC	17.9	17			

R-sqr=0.99353; Adj:0.94497

Significancia para valores p≤0.05

ANEXO 3. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial completo 2^4.

Anexo 3a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño factorial completo 2^4.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón inicial % (p/v)	238.2	1	238.2	83.9	$3.5x10^{-6}$
(3)Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	148.0	1	148	52.1	$2.9x10^{-5}$
1*2*4	54.3	1	54.3	19.1	$1.4x10^{-3}$
(2)Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	47.0	1	47.0	16.6	$2.3x10^{-3}$
2*3*4	43.0	1	43.0	15.1	$3.0x10^{-3}$
(4)Temperatura (°C)	23.7	1	23.7	8.3	$1.6x10^{-2}$
1*2*3	15.1	1	15.1	5.3	$4.4x10^{-2}$
Residual	**28.4**	**10**	**2.84**		
Curvatura	9.9	1	9.9	7.1	$2.3x10^{-1}$
Falta de ajuste	17.1	8	2.1	1.5	$5.6x10^{-1}$
Error puro	1.4	1	1.4		
Total SC	**597.7**	**17**			

R-sqr=0.952; Adj:0.919

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 3b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño factorial completo 2^4.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(3)Transglucosidase L (Uт/g almidón licuado b.s.)	151.9	1	151.9	300.3	$3.2x10^{-8}$
(4)Temperatura (°C)	83.9	1	83.9	165.9	$4.2x10^{-7}$
(1)Almidón inicial % (p/v)	13.1	1	13.1	26.0	$6.5x10^{-4}$
2 by 3	9.7	1	9.7	19.1	$1.8x10^{-3}$
3 by 4	6.8	1	6.8	13.4	$5.2x10^{-3}$
1*2*4	4.2	1	4.2	8.4	$1.8x10^{-2}$
1*2*3	3.7	1	3.7	7.2	$2.5x10^{-2}$
1 by 3	3.1	1	3.1	6.2	$3.5x10^{-2}$
Residual	**4.6**	**9**	**0.5**		
Curvatura	2.9	1	2.9	10.9	$1.87x10^{-1}$
Falta de ajuste	1.4	7	0.2	0.7	$7.2x10^{-1}$
Error puro	0.3	1	0.3		
Total SC	**281**	**17**			

R-sqr=0.984; Adj:0.969

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 3c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño factorial completo 2^4.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón inicial % (p/v)	8.7	1	8.7	57.6	$1.1x10^{-5}$
(3)Transglucosidase L (U_T/g almidón licuado b.s.)	3.6	1	3.6	23.9	$4.8x10^{-4}$
1*2*4	1.3	1	1.3	8.8	$1.3x10^{-2}$
2*3*4	1	1	1	6.6	$2.6x10^{-2}$
(2)Bakezyme MAM 10.000 (UI/g almidón licuado b.s.)	1	1	1	6.6	$2.6x10^{-2}$
(4)Temperatura (°C)	0.6	1	0.6	4.2	$6.4x10^{-2}$
Residual	**1.7**	**11**	**0.2**		
Curvatura	0.1	1	0.1	1.6	$4.3x10^{-1}$
Falta de ajuste	1.5	9	0.2	3.8	$3.8x10^{-1}$
Error puro	0.05	1	0.05		
Total SC	**17.9**	**17**			

R-sqr=0.907; Adj:0.857

Significancia para valores p≤0.05

ANEXO 4. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño factorial completo 2^4.

Anexo 4a. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta $Y_{P/S}$ en el diseño factorial completo 2^4.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	48.65	48.65	0.397	122.5	0.0	47.76	49.54
x_1	-7.72	-3.86	0.421	-9.2	$3.5x10^{-6}$	-4.8	-2.92
x_2	3.43	1.71	0.421	4.1	$2.3x10^{-3}$	0.78	2.65
x_3	-6.08	-3.04	0.421	-7.2	$2.9x10^{-5}$	-3.98	-2.1
x_4	-2.43	-1.22	0.421	-2.9	$1.6x10^{-2}$	-2.16	-0.28
$x_1. x_2. x_3$	-1.94	-0.97	0.421	-2.3	$4.4x10^{-2}$	-1.91	-0.03
$x_1. x_2. x_4$	-3.68	-1.84	0.421	-4.4	$1.4x10^{-3}$	-2.78	-0.9
$x_2. x_3. x_4$	3.28	1.64	0.421	3.9	$3.0x10^{-3}$	0.7	2.58

x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores $p \leq 0.05$

IC: Intervalo de confianza

Anexo 4b. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta S_i en el diseño factorial completo 2^4.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	31.97	31.97	0.168	190.7	$1.5x10^{-17}$	31.59	32.35
x_1	1.81	0.91	0.178	5.1	$6.5x10^{-4}$	0.5	1.31
x_3	-6.16	-3.08	0.178	-17.3	$3.2x10^{-8}$	-3.48	-2.68
x_4	-4.58	-2.29	0.178	-12.9	$4.2x10^{-7}$	-2.69	-1.89
$x_1. x_3$	-0.88	-0.44	0.178	-2.5	$3.5x10^{-2}$	-0.84	-0.04
$x_2. x_3$	1.56	0.78	0.178	4.4	$1.8x10^{-3}$	0.38	1.18
$x_3. x_4$	-1.3	-0.65	0.178	-3.7	$5.2x10^{-3}$	-1.05	-0.25
$x_1. x_2. x_3$	-0.96	-0.48	0.178	-2.7	$2.5x10^{-2}$	-0.88	-0.08
$x_1. x_2. x_4$	-1.03	-0.52	0.178	-2.9	$1.8x10^{-2}$	-0.92	-0.11

x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores p≤0.05

IC: Intervalo de confianza

Anexo 4c. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta Q_P en el diseño factorial completo 2^4.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	7.13	7.13	0.092	77.8	$2.0x10^{-16}$	6.93	7.33
x_1	1.48	0.74	0.097	7.6	$1.1x10^{-5}$	0.52	0.95
x_2	0.5	0.25	0.097	2.6	$2.6x10^{-2}$	0.04	0.46
x_3	-0.95	-0.48	0.097	-4.9	$4.8x10^{-4}$	-0.69	-0.26
x_4	-0.4	-0.2	0.097	-2.1	$6.4x10^{-2}$	-0.41	0.01
$x_1. x_2. x_4$	-0.58	-0.29	0.097	-3	$1.3x10^{-2}$	-0.5	-0.07
$x_2. x_3. x_4$	0.5	0.25	0.097	2.6	$2.6x10^{-2}$	0.04	0.46

x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores p≤0.05

IC: Intervalo de confianza

ANEXO 5. Cálculos para determinar la trayectoria del ascenso más pronunciado de la respuesta $Y_{P/S}$.

Los cálculos de los incrementos para cada variable experimental, resultan a partir de la ecuación del modelo lineal del rendimiento Ec. (7) y la ecuación Ec. (5).
El incremento respecto al centro de las variables del diseño factorial se define:

$$\Delta x_1 = \frac{\Delta \varepsilon_1}{5}$$

$$\Delta x_2 = \frac{\Delta \varepsilon_2}{40}$$

$$\Delta x_3 = \frac{\Delta \varepsilon_3}{7.5}$$

$$\Delta x_4 = \frac{\Delta \varepsilon_4}{5}$$

Se definió un incremento Δε1 = -2.5 %, puesto que la variable porcentaje de almidón inicial es conocida en la literatura y es el coeficiente más grande en el modelo. Se halló los pasos en unidades codificadas y su posterior conversión a unidades naturales.

$$\Delta \varepsilon_1 = -2.5 \Rightarrow \Delta x_1 = -0.5$$

$$\Delta x_2 = \frac{1.71}{-3.86} \times -0.5 = 0.221 \Rightarrow \Delta \varepsilon_2 = 0.221(40) = 8.84$$

$$\Delta x_3 = \frac{-3.04}{-3.86} \times -0.5 = -0.394 \Rightarrow \Delta \varepsilon_3 = -0.394(7.5) = -2.96$$

$$\Delta x_4 = \frac{-1.22}{-3.86} \times -0.5 = -0.158 \Rightarrow \Delta \varepsilon_4 = -0.158(5) = -0.79$$

ANEXO 6. Análisis de varianza de los efectos estimados de las variables dependientes $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño compuesto central rotacional.

Anexo 6a. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente $Y_{P/S}$ en el diseño compuesto central rotacional.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(3)Transglucosidase L (U_T/g msl)(L)	82.1	1	82.1	80.8	0.000
(4)Temperatura (°C)(L)	26.0	1	26.0	25.6	0.000
1L by 4L	14.8	1	14.8	14.6	0.001
2L by 4L	14.8	1	14.8	14.6	0.001
3L by 4L	11.9	1	11.9	11.7	0.003
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g msl)(Q)	6.1	1	6.1	6.0	0.025
1L by 3L	4.2	1	4.2	4.1	0.058
1L by 2L	3.4	1	3.4	3.4	0.084
2L by 3L	3.4	1	3.4	3.4	0.084
Residual	**17.3**	**17**	**1.0**		
Falta de ajuste	16.1	15	1.1	1.8	0.422
Error puro	1.2	2	0.6		
Total SC	**184.2**	**26**			

R-sqr=0.906; Adj:0.856

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 6b. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente S_i en el diseño compuesto central rotacional.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón inicial % (p/v)(L)	18.4	1	18.4	101.3	0.000
(3)Transglucosidase L (U_T/g msl)(L)	9.1	1	9.1	50.3	0.000
(4)Temperatura (°C)(L)	13.5	1	13.5	74.4	0.000
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g msl)(Q)	2.8	1	2.8	15.6	0.001
Transglucosidase L (U_T/g msl)(Q)	2.8	1	2.8	15.4	0.001
2L by 3L	2.9	1	2.9	15.9	0.001
1L by 3L	0.9	1	0.9	5.0	0.039
2L by 4L	0.8	1	0.8	4.5	0.049
Residual	**3.3**	**18**	**0.2**		
Falta de ajuste	2.5	16	0.2	0.4	0.897
Error puro	0.8	2	0.4		
Total SC	**55.9**	**26**			

R-sqr=0.942; Adj:0.916

Significancia para valores p≤0.05

Anexo 6c. Análisis de varianza de los efectos estimados de la variable dependiente Q_P en el diseño compuesto central rotacional.

FACTOR/EFECTO	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
(1)Almidón % (p/v)(L)	3.7	1	3.7	116.0	0.000
(3)Transglucosidase L (U_T/g msl)(L)	1.5	1	1.5	47.3	0.000
(4)Temperatura (°C)(L)	0.4	1	0.4	13.4	0.002
1L by 4L	0.3	1	0.3	7.9	0.011
2L by 4L	0.2	1	0.2	6.4	0.021
3L by 4L	0.2	1	0.2	6.4	0.021
Bakezyme MAM 10.000 (UI/g msl)(Q)	0.1	1	0.1	4.4	0.049
Residual	**0.6**	**19**	**0.03**		
Falta de ajuste	0.6	17	0.03	2.5	0.319
Error puro	0.03	2	0.01		
Total SC	7.0	26			

R-sqr=0.914; Adj:0.882

Significancia para valores p≤0.05

ANEXO 7. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para las respuestas $Y_{P/S}$, S_i y Q_P en el diseño compuesto central rotacional.

Anexo 7a. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta $Y_{P/S}$ en el diseño compuesto central rotacional.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	50.6	50.6	0.26	194.3	7×10^{-30}	50.05	51.15
x_2 (Q)	0.96	0.48	0.195	2.5	2.5×10^{-2}	0.07	0.89
x_3 (L)	-3.7	-1.85	0.206	-9	7.2×10^{-8}	-2.28	-1.42
x_4 (L)	-2.08	-1.04	0.206	-5.1	9.7×10^{-5}	-1.48	-0.61
x_1(L). x_4 (L)	1.93	0.96	0.252	3.8	1.4×10^{-3}	0.43	1.49
x_2(L). x_4(L)	1.93	0.96	0.252	3.8	1.4×10^{-3}	0.43	1.49
x_3(L). x_4(L)	1.73	0.86	0.252	3.4	3.3×10^{-3}	0.33	1.39

x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores $p \leq 0.05$

IC: Intervalo de confianza

Anexo 7b. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta S_i en el diseño compuesto central rotacional.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	32.67	32.67	0.142	230.1	0	32.37	32.97
x_1 (L)	1.75	0.88	0.087	10.1	8.1×10^{-9}	0.69	1.06
x_2 (Q)	0.66	0.33	0.084	3.9	9.4×10^{-4}	0.16	0.51
x_3 (L)	-1.23	-0.62	0.087	-7.1	1.3×10^{-6}	-0.8	-0.43
x_3 (Q)	-0.66	-0.33	0.084	-3.9	1.0×10^{-3}	-0.51	-0.15
x_4 (L)	-1.5	-0.75	0.087	-8.6	8.2×10^{-8}	-0.93	-0.57
x_1(L). x_3(L)	-0.47	-0.24	0.106	-2.2	3.9×10^{-2}	-0.46	-0.01
x_2(L). x_3(L)	0.85	0.42	0.106	4	8.6×10^{-4}	0.2	0.65
x_2(L). x_4(L)	0.45	0.23	0.106	2.1	4.9×10^{-2}	0.01	0.45

x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores p≤0.05

IC: Intervalo de confianza

Anexo 7c. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión para la respuesta Q_P en el diseño compuesto central rotacional.

Factor	Efecto	Coef. Regre.	Error estándar	t (10)	Valor-p	95 % IC bajo	95 % IC alto
Mean/Interc.	6.68	6.68	0.046	145.2	2.1×10^{-30}	6.58	6.78
x_1 (L)	0.78	0.39	0.036	10.8	1.6×10^{-9}	0.32	0.47
x_2 (Q)	0.15	0.07	0.035	2.1	4.9×10^{-2}	0.0003	0.14
x_3 (L)	-0.5	-0.25	0.036	-6.9	1.5×10^{-6}	-0.33	-0.17
x_4 (L)	-0.27	-0.13	0.036	-3.7	1.6×10^{-3}	-0.21	-0.06
x_1(L). x_4(L)	0.25	0.13	0.045	2.8	1.1×10^{-2}	0.03	0.22
x_2(L). x_4(L)	0.23	0.11	0.045	2.5	2.1×10^{-2}	0.02	0.21
x_3(L). x_4(L)	0.23	0.11	0.045	2.5	2.1×10^{-2}	0.02	0.21

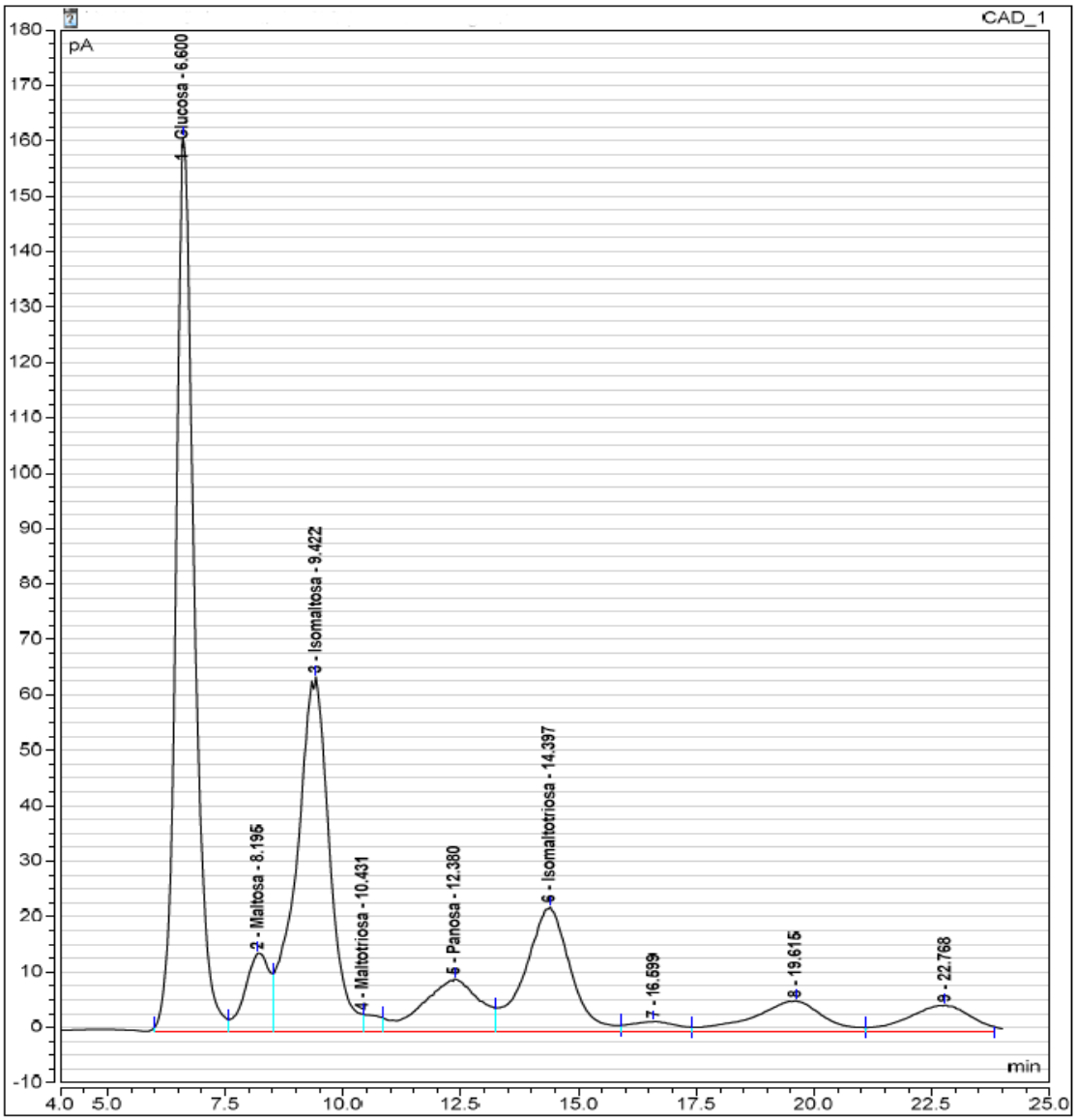
x_1: Almidón inicial, x_2: Bakezyme MAM 10.000, x_3: Transglucosidase L, x_4: temperatura.

Significancia para valores p≤0.05

IC: Intervalo de confianza

ANEXO 8. Cromatograma de resultados en la síntesis de IMOs.

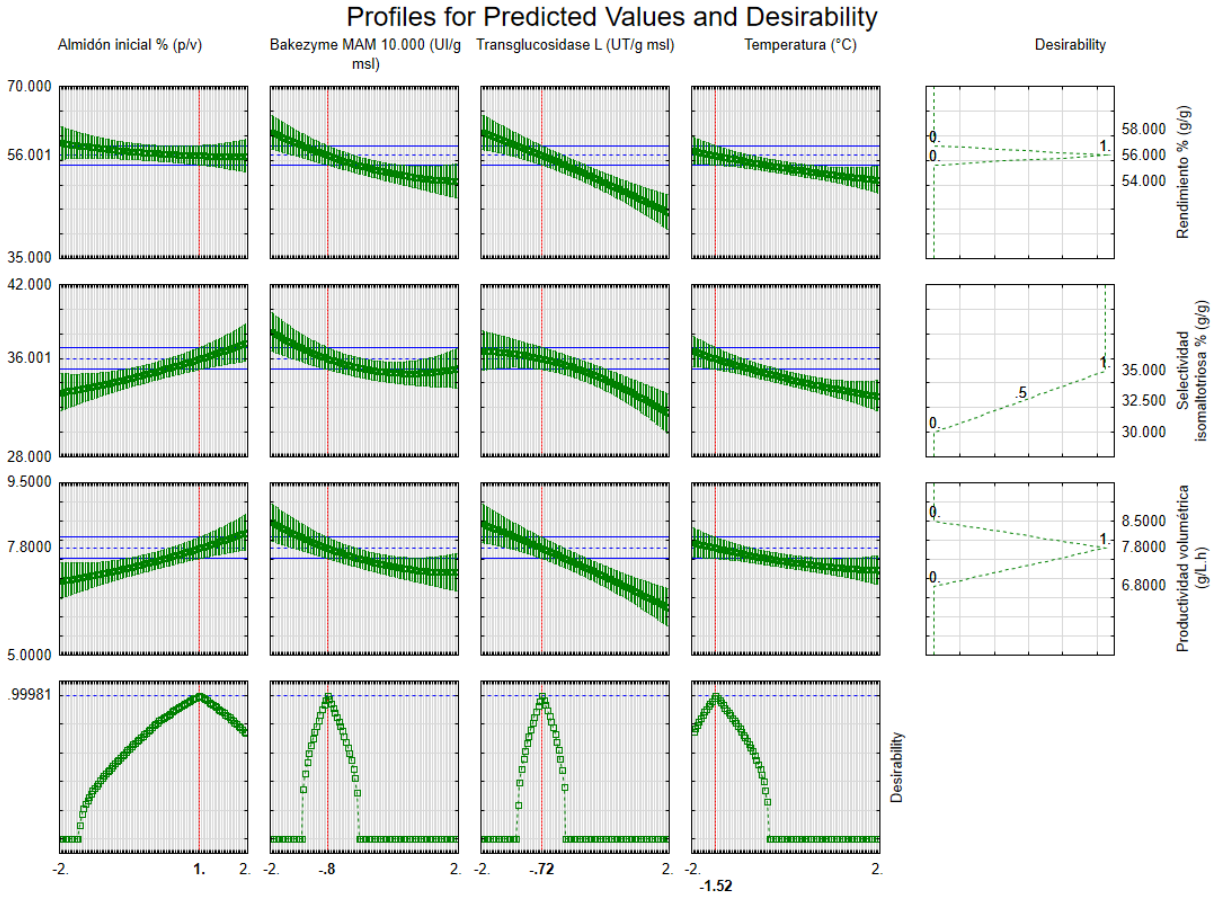
El cromatograma muestra los resultados de la validación experimental óptima de síntesis de IMOs a partir de almidón de cebada forrajera a las 24 h de reacción.



1=Glucosa, 2=Maltosa, 3=Isomaltosa, 4=Maltotriosa, 5=Panosa, 6=Isomaltotriosa, 7,8 y 9 son oligosacáridos >DP4. No se detectó maltotriosa.

ANEXO 9. Deseabilidad general

Se establecieron las condiciones de la deseabilidad individual para cada respuesta. El objetivo deseable individual es tener un rendimiento entre 54 y 58 % (g/g), una selectividad superior al 35 % (g/g) y productividad volumétrica entre 6.8 y 8.5 g/L.h. La optimización simultánea de respuestas mediante la función de deseabilidad general resultó de 0.99981. La condición óptima obtenida para las variables almidón inicial % (p/v), Bakezyme MAM 10.000 (UI/g msl), Transglucosidase L (U_T/g msl) y temperatura (°C) fueron de 1, -0.8, -0.72 y -1.52, respectivamente. Estos resultados se mostraron en unidades codificadas. (msl= masa seca licuada).



Anexo 10. Aspectos técnicos

Aspectos técnicos en la etapa de licuefacción

La determinación de la actividad enzimática tiene como objetivo exclusivo establecer la concentración de enzima activa en un preparado enzimático, ya sea de origen comercial o producido en laboratorio. Esta medición de actividad enzimática se realiza bajo condiciones estandarizadas, utilizando un ensayo específico. Para α-amilasas, existen varios protocolos descritos en la literatura, y en nuestro caso, adoptamos el protocolo de Basu *et al*.[44]. El propósito es que este ensayo, realizado bajo condiciones controladas, pueda ser reproducido en cualquier laboratorio, obteniendo la misma actividad enzimática de Termamyl 300L (concentración de enzima activa) en U/mL de preparado. En general, los ensayos de actividad enzimática emplean un tampón, y en este estudio se utilizó un tampón fosfato de potasio de 50 mM. a pH 6. La concentración obtenida en U/mL nos permitió conocer cuánta enzima activa había en el preparado y, a partir de esa información, calcular la cantidad necesaria para el proceso de licuefacción.

La aplicación de la enzima en el proceso de licuefacción no utiliza solución tampón. En este contexto, el objetivo es que la enzima catalice la hidrólisis de los enlaces glicosídicos α-(1,4) de las cadenas de amilosa y amilopectina. Este proceso industrial, conocido como licuefacción del almidón, ha sido ampliamente estudiado. Olsen[94] describe el proceso de licuefacción en mezclar almidón con agua y cationes Ca^{+2} a un pH específico, formando una suspensión. En esta etapa se utiliza una concentración precisa de la enzima Termamyl 300 L, basada en los resultados obtenidos en el ensayo estandarizado de actividad enzimática, la cual es efectiva hasta temperaturas de 105 ºC. El almidón licuado resultante se emplea en la producción de jarabes de glucosa, maltosa y fructosa. Desde un punto de vista industrial, no es recomendado utilizar un tampón debido al alto costo en la etapa de purificación en el que se utilizan membranas de intercambio catiónico y aniónico para eliminar las sales provenientes del tampón para cumplir con los estándares alimentarios o farmacéutico.

Aspectos técnicos sobre la inhibición de la actividad enzimática de la α-amilasa después de la licuefacción

La inactivación de esta enzima se realizó con un método químico (pH 3) y físico (calor). La enzima Termamyl 300L es estable y cataliza la licuación del almidón a 105 °C, que junto a la combinación de bajo pH 3 se consigue inactivar efectivamente su actividad.

La literatura menciona que los carbohidratos sufren reacción de hidrólisis en condiciones de pH ácidos, como consecuencia el contenido de azúcares reductores aumentará. Sin embargo, el grado de hidrólisis depende del tipo de carbohidrato que actúe como reactante. Según el artículo de Vega y Zúñiga-Hansen[105], titulado *"The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products"*, se afirma lo siguiente: "Es bien sabido que la estabilidad de un oligosacárido depende de su estructura química; en este sentido, los fructooligosacáridos de cadena corta presentan una desventaja potencial (las piranosas están más fuertemente enlazados que los furanosas)."

Los oligosacáridos de piranósidos (almidón, dextrinas, isomaltooligosacáridos) son resistentes a la hidrólisis. Seo *et al*.[106] menciona que sintetizaron isomaltooligosacáridos (oligosacáridos de glucosa unidos por enlace glicosídico α-(1,4) con dextransucrasa y sacarosa. Los isomaltooligosacáridos fueron estables químicamente a 120 ºC en el rango de pH desde 2 a 4. En otro estudio, Kim *et al*.[107] reporta que los isomaltooligosacáridos son estables químicamente hasta 140 ºC por 60 min a pH 5.5.

De manera similar, Voragen en su revisión de 1998,[108] señala que "La estabilidad puede variar considerablemente entre las diferentes clases de oligosacáridos, dependiendo de los residuos de azúcar presentes, la forma de los anillos, la configuración anomérica y los tipos de enlace. Generalmente, los enlaces β son más fuertes que los enlaces α; las hexosas están más fuertemente enlazados que las pentosas y los desoxiazúcares, y los piranosas son más estables que los furanosas."