

Universidad de La Salle
Ciencia Unisalle

Ingeniería de Alimentos

Facultad de Ingeniería

1-1-2005

Aislamiento de α -amilasa bacteriana a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 21556 y su aplicación en harinas de panificación

Ricardo Mario Martínez Montealegre
Universidad de La Salle, Bogotá

David Leonardo Flechas Hernández
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos

Citación recomendada

Martínez Montealegre, R. M., & Flechas Hernández, D. L. (2005). Aislamiento de α -amilasa bacteriana a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 21556 y su aplicación en harinas de panificación. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/407

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ingeniería at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ingeniería de Alimentos by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

NOTA DE ADVERTENCIA

“Los conceptos y opiniones emitidos en este trabajo son responsabilidad de los autores y no comprometen en nada al Director ni a la Universidad de la Salle”

**AISLAMIENTO DE α -AMILASA BACTERIANA A PARTIR DE *Bacillus subtilis*
ATCC 21556 Y SU APLICACIÓN EN HARINAS DE PANIFICACION**

**Ricardo Mario Martínez Montealegre
David Leonardo Flechas Hernández**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
BOGOTA
2005**

**AISLAMIENTO DE α -AMILASA BACTERIANA A PARTIR DE *Bacillus subtilis*
ATCC 21556 Y SU APLICACIÓN EN HARINAS DE PANIFICACION**

**Ricardo Mario Martínez Montealegre
David Leonardo Flechas Hernández**

**Trabajo de Grado presentado como
Requisito para optar por el título de
Ingeniero de alimentos**

**Director
Lena Prieto
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
BOGOTA
2005**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
1. GENERALIDADES DE LA ENZIMA α - AMILASA BACTERIANA	5
1.1 ENZIMAS	5
1.2 DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO	6
1.3 AMILASAS	7
1.3.1 Modo de acción enzimática	7
1.3.2 Sustrato	7
1.3.3 α - Amilasa bacteriana	8
1.3.4 Acción de la α - Amilasa bacteriana en el almidón dañado	9
1.3.5 Poder de gasificación	10
1.3.6 Efecto anti-envejecimiento de las amilasas	10
1.3.7 Efecto de la amilasa en la gomosidad de la miga	11
1.3.8 Diferencia en el modo de acción	12
1.4 FERMENTACION ENZIMATICA	12
1.4.1 Parámetros de fermentación	13
1.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS	15
1.5.1 Eliminación de partículas sólidas	16
1.5.2 Purificación y concentración	16
1.5.3 Precipitación	16
1.5.4 Separación en dos fases liquidas	17
1.5.5 Concentración y envasado	17
1.5.6 Liofilización	17

1.6 PANIFICACION	18
2. METODOLOGIA DE LA EXPERIMENTACION	20
2.1 PREPARACION Y ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO	20
2.2 PREPARACION DE INOCULOS	20
2.3 ZONA DE HIDRÓLISIS	21
2.4 PREPARACION DE LOS MEDIOS LIQUIDOS PARA LA FERMENTACION	21
2.5 BIOFERMENTADOR	23
2.6 PARAMETROS DE CONTROL EN EL PROCESO DE FERMENTACION	24
2.6.1 Tiempo optimo de fermentación	25
2.7 DETERMINACION DE BIOMASA	25
2.8 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA α -AMILASA BACTERIANA	25
2.9 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA	26
2.10 DETERMINACION DE ALMIDON HIDROLIZADO POR LA ENZIMA	27
2.10.1 Curva de calibración	27
2.10.2 Determinación del porcentaje de almidón presente en la muestra	28
2.10.3 Determinación de la velocidad de hidrólisis	28
2.11 METODOS DE PANIFICACION	28
2.12 PRUEBAS DE APLICACIÓN DE LA ENZIMA OBTENIDA	29

2.13 NUMERO DE CAIDA	29
2.14 ANALISIS DE PANIFICACION	31
3. RESULTADOS Y ANALISIS DE LA EXPERIMENTACION	33
3.1 DETERMINACION DE LA ZONA DE HIDRÓLISIS	33
3.2 MEDIOS LIQUIDOS DE LAS FERMENTACIONES	33
3.3 TIEMPO ÓPTIMO DE FERMENTACION	35
3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMA	38
3.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DE LA ENZIMA OBTENIDA	38
3.6 DETERMINACION DE ALMIDON HIDROLIZADO	39
3.6.1 Almidón hidrolizado usando MIX2	40
3.6.2 Variación de la cantidad total de almidón hidrolizado para diferentes concentraciones de la enzima MIX2	41
3.6.3 Velocidad de hidrólisis de almidón para la acción de la enzima MIX2	43
3.6.4 Variación de la cantidad total de almidón hidrolizado para diferentes concentraciones de almidón en el sustrato	44
3.6.5 Velocidad de hidrólisis del almidón para diferentes concentraciones de almidón en el sustrato	46
4. APLICACIÓN DE LA α -AMILASA BACTERIANA Y FUNGICA EN PRUEBAS DE PANIFICACION	47
4.1 DENOMINACION DE LAS PRUEBAS REALIZADAS	47
4.2 EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE PANIFICACION SIN MEJORANTES	48

4.3 EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE PANIFICACION CON MEJORANTES	55
4.4 NUMERO DE CAIDA USANDO MIX2 Y TENASE	58
4.5 CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	58
4.6 PÉRDIDA DE PESO EN LAS MUESTRAS ALMACENADAS	61
4.7 PERDIDA DE HUMEDAD EN LAS MUESTRAS ALMACENADAS	70
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFIA	78

TABLA DE CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21556	6
Figura 2. Modelo de una pieza de una molécula de amilopectina	8
Figura 3. Actividad de la α -amilasa frente a la temperatura	9
Figura 4. Efecto de la α -amilasa en la firmeza de la miga	11
Figura 5. Liofilizador	18
Figura 6. Agitador Orbital	23
Figura 7. Esquema de Biofermentador	24
Figura 8. <i>Falling number</i> Tipo 1400	30
Figura 9. Zona de hidrólisis del <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21556 en agar LB con 2% de almidón	33
Figura 10. Actividad amilolítica en el tiempo de la fermentación con los medios líquidos seleccionados	36
Figura 11. Variación del pH en el tiempo de la fermentación con los medios líquidos seleccionados	36
Figura 12. Formación de la biomasa en el tiempo de fermentación con los medios líquidos seleccionados	37
Figura 13. Agitación del extracto enzimático con los floculantes	38

Figura 14. Actividad amilolitica de las enzimas TENASE y MIX2 en UA/g	39
Figura 15. Curva para la determinación del porcentaje de almidón presente en una solución	40
Figura 16. Cantidad total de almidón hidrolizado en 10 minutos usando 5mL de enzima MIX2	41
Figura 17. Hidrólisis de almidón con 10, 15 y 5 mL de enzima MIX2	43
Figura 18. Velocidad de hidrólisis de almidón variando la concentración de enzima	44
Figura 19. Cantidad de almidón hidrolizado variando la concentración de este en el sustrato	46
Figura 20. Velocidad de hidrólisis VS concentración de almidón (mg)	46
Figura 21. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de α -amilasa bacteriana MX2 sin mejorantes	49
Figura 22. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones con α -amilasa bacteriana TENASE de la casa comercial MERQUIAND sin mejorantes	50
Figura 23. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones con α -amilasa fúngica GRYNDAMIL perteneciente al molino de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. sin mejorantes	51
Figura 24. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de la mezcla con α -amilasa GRYNDAMIL de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. y α -amilasa bacteriana MIX2	52

Figura 25. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de la mezcla con α -amilasa GRYNDAMIL de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. y α -amilasa bacteriana TENASE	52
Figura 26. Muestra patrón sin adición de enzimas ni mejorantes	53
Figura 27. Volumen de las muestras sin mejorantes	55
Figura 28. Prueba de panificación MIX2 y TENASE elaboradas con mejorantes	56
Figura 29. Prueba de panificación elaborada con GRYNDAMIL con todos los mejorantes en las proporciones sugeridas por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HAINAS PROCOHARINAS S.A.	56
Figura 30. Volumen de las muestras elaboradas con mejorantes	57
Figura 31. Porcentaje de pérdida de peso usando diferentes concentraciones de MIX2	62
Figura 32. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de TENASE	64
Figura 33. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de GRYNDAMIL	65
Figura 34. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL Y TENASE	66
Figura 35. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL Y TENASE	66

Figura 36. Pérdida porcentual de peso utilizándola mezcla MIX2, GRYNDAMIL Y TENASE	69
Figura 37. Pérdida de peso de la muestra patrón	70
Figura 38. Humedad inicial y final de cada muestra	71
Figura 39. Porcentaje de la pérdida de humedad de cada muestra	72

TABLA DE CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Influencia del pH y la temperatura en las amilasas	12
Cuadro 2. Composición de los medios líquidos	22
Cuadro 3. Composición medio líquido E1 modificado	24
Cuadro 4. Actividad amilolítica, pH y biomasa de los medios líquidos después de 72 horas de fermentación	34
Cuadro 5. Fermentación realizada en el medio líquido E1	34
Cuadro 6. Fermentación realizada en el medio líquido E1 modificado	35
Cuadro 7. Fermentación realizada en el medio líquido López modificado	35
Cuadro 8. Fermentaciones realizadas en el medio líquido E1 modificado	37
Cuadro 9. Actividad amilolítica TENASE y MIX2	38
Cuadro 10. Curva de concentración almidón VS Absorbancia	40
Cuadro 11. Almidón hidrolizado en mg utilizando las enzimas MIX2	41
Cuadro 12. Variación de la cantidad de enzima MIX2 y su efecto en la cantidad de almidón hidrolizado	42
Cuadro 13. Cantidad de almidón hidrolizado variando la cantidad de este en el sustrato	45
Cuadro 14. Denominación de las enzimas usadas en las prueba de panificación	48

Cuadro 15. Volumen (cm ³) y altura (cm) de las pruebas sin mejorantes	54
Cuadro 16. Volumen (cm ³) y altura (cm) de todas las pruebas de panificaron con mejorantes	57
Cuadro 17. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con MIX2	58
Cuadro 18. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con TENASE	59
Cuadro 19. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con GRYNDAMIL	59
Cuadro 20. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con GRYNDAMIL y TENASE	59
Cuadro 21. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con GRYNDAMIL Y MIX2	60
Cuadro 22. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con todos los mejorantes	60
Cuadro 23. Textura de la miga durante el almacenamiento en la muestra patrón sin enzimas ni mejorantes	60
Cuadro 24. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de MIX2	61
Cuadro 25. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de TENASE	63
Cuadro 26. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de GRYNDAMIL	64

Cuadro 27. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y TANASE	66
Cuadro 28. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y MIX2	67
Cuadro 29. Pérdida porcentual de peso utilizando MIX2, GRYNDAMIL y TANASE	68
Cuadro 30. Pérdida porcentual de peso de la muestra patrón (sin enzima y mejorantes)	69
Cuadro 31. Variación de peso de la muestra durante el almacenamiento	71

TABLA DE CONTENIDO ANEXOS

ANEXO 1 Contenido de humedad para las muestras de análisis.

ANEXO 2 Cálculo de suplementación de malta

ANEXO 3 Hoja comercial de la enzima **TENASE 1200** de la casa comercial **MERQUIAND**

ANEXO 4 Fichas técnicas de los equipos empleados en el desarrollo de este trabajo de grado.

INTRODUCCION

En términos generales, la biotecnología se puede definir como un conjunto de técnicas en el que se utilizan organismos vivos, partes de ellos o moléculas derivadas de organismos vivos para fabricar o modificar productos. Además, comprende aquellas técnicas de modificación genéticas de variedades de plantas, animales o microorganismos para su utilización con un propósito específico. El objetivo fundamental de la biotecnología de alimentos es la investigación acerca de los procesos de elaboración de productos alimenticios mediante la utilización de organismos vivos, o procesos biológicos o enzimáticos, así como la obtención de alimentos genéticamente modificados mediante técnicas biotecnológicas.¹

Uno de los campos de aplicación de la biotecnología es la catálisis fermentativa, la cual se basa en la utilización de complejos enzimáticos obtenidos a partir de microorganismos, en procesos industriales. Las enzimas son biocatalizadores únicos por sus cualidades y son utilizadas en la práctica mundial para la intensificación de procesos tecnológicos en los cuales se usa material de origen animal y vegetal.

Este trabajo grado se enfocó en el campo de la biotecnología enzimática, para obtener la enzima α -amilasa bacteriana a partir del *Bacillus subtilis* ATCC 21556 empleando los recursos del Laboratorio de Biotecnología de la sede la Floresta. Por otra parte, la Línea de Investigación de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de Alimentos realizó una investigación titulada "BIOTECNOLOGÍA DE LAS ENZIMAS MICROBIANAS PECTINASA Y AMILASA" para la obtención de α -amilasa bacteriana, es necesario continuar con el aislamiento de dicha enzima y aplicarla en procesos industriales para demostrar los beneficios que pueden ofrecer a la industria de Alimentos.

Para el desarrollo de este trabajo de grado se realizaron pruebas de fermentación y aislamiento de la enzima α -amilasa bacteriana de cepas del *Bacillus subtilis*

¹Lucas, E. Biotecnología de alimentos. Monografías. Disponible en Internet en www.bioenlace.com/alimentos/enzimatica.asp. 2003

ATCC 21556 en medios líquidos teniendo como base los medios señalados en la investigación mencionada anteriormente. La cuantificación de la actividad amilolítica se realizó con la técnica colorimétrica Gracheva. Según la experimentación el tiempo óptimo de fermentación fue de 120 horas, tiempo en el cual se observó el pico más alto en la formación de α -amilasa. El medio de cultivo seleccionado fue el **E1** modificado que presentó una mayor actividad amilolítica en el extracto enzimático, este medio contenía lactosa y almidón como inductores principales de fermentación. La enzima denominada como **MIX 2** corresponde a la enzima aislada y purificada del medio anteriormente mencionado. Después de aislar la enzima α -amilasa se aplicó para las pruebas de panificación en los laboratorios de control de calidad de la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. donde se realizaron diferentes pruebas de panificación en las cuales se evaluaron características como miga y volumen según el criterio de esta empresa, los cuales son señalados en la metodología de este trabajo de grado. Todas estas pruebas fueron realizadas por triplicado como lo sugieren los parámetros adoptados por la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A.

Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas calibre 2, a temperatura ambiente durante 11 días. Tiempo en el cual se analizó la pérdida de peso de cada una de las muestras.

Los resultados obtenidos de las pruebas de panificación muestran que el uso de la enzima **MIX 2** da como resultado una miga de buen color y apariencia; por el contrario la enzima de tipo comercial denominada TENASE presentó una miga gomosa, poco uniforme y de color crema. Las muestras realizadas con **MIX 2** tuvieron una pérdida porcentual de peso más alta en comparación con las muestras realizadas con α -amilasa fúngica y α -amilasa bacteriana TENASE, es de señalar que la humedad inicial de las muestras realizadas con **MIX 2** fue mayor que todas las demás muestras.

En los siguientes capítulos se presenta: una revisión bibliográfica sobre enzimas, amilasas, actividad amilolítica, aislamiento y purificación de enzimas, la metodología que se empleó en la experimentación para la preparación de medios

e inóculos, el control de parámetros de fermentación, determinación de actividad amilolítica, aislamiento y purificación de la enzima obtenida, su aplicación y evaluación en la industria de panificación, los resultados de la experimentación con sus correspondientes análisis; y por último, las pruebas de panificación que se realizaron.

OBJETIVO GENERAL

Aislar α -amilasa bacteriana a partir del microorganismo *Bacillus subtilis*, para su aplicación y comparación frente a otra enzima de tipo comercial en procesos de panificación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las variables de fermentación y del aislamiento de la enzima α -amilasa producida por el *Bacillus subtilis* para establecer los parámetros del proceso de obtención a nivel de laboratorio
- Definir un proceso de panificación donde se aplique la enzima obtenida para demostrar su efectividad y posteriormente compararla frente a otra enzima de tipo comercial en este mismo proceso.
- Evaluar las características de las diferentes muestras teniendo en cuenta el color de la miga, la uniformidad de esta y su textura, así como pérdida de peso y humedad durante el almacenamiento para cada una de las muestras.
- Comparar las características del producto final en un tiempo determinado empleando la enzima obtenida en el laboratorio, la enzima comercial y sin enzima.

1. GENERALIDADES DE LA ENZIMA α -AMILASA BACTERIANA

Los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas potencialmente útiles, algunas enzimas se obtienen mediante procesos de fermentación en superficie (cultivo semisólido) pero otras se producen por cultivo sumergido usando medios líquidos y tanques cerrados de fermentación que permiten un mejor control de las condiciones del proceso. Los microorganismos de grupos *Aspergillus sp*, *Bacillus sp* y otros, producen una enorme gama de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son secretadas al exterior celular. Son capaces de desarrollarse fácilmente y rápidamente en su medio de cultivo, siendo la fuente primaria de las enzimas industriales.

1.1 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas constituidas por una larga cadena de aminoácidos y su estructura básica está unida por enlaces peptídicos, pueden presentar tres configuraciones espaciales específicas (secundaria, terciaria o cuaternaria) y tienen un peso molecular entre 12.000 y 300.000 daltons[•] En general las enzimas comparten las propiedades de la mayoría de las proteínas globulares que son: solubilidad en agua pero no en solventes orgánicos y desnaturalización por temperatura extrema, pH e hidrólisis por acción de proteasas.²

Las enzimas son catalizadoras de reacciones químicas que se unen a una o más sustancias llamadas sustratos, produciendo una disminución en la cantidad de energía de activación necesaria para dicha reacción, además las enzimas incrementan el rango de reacción química sin degradarse y sin tener ningún cambio en su estructura, las enzimas no son consumidas en la reacción y por lo tanto pueden continuar catalizando la reacción siempre y cuando el sustrato esté presente.

Las enzimas se caracterizan por dos fenómenos:

- La especificidad: se refiere cuando una enzima cataliza una o varias reacciones siempre y cuando los sustratos tengan la misma estructura básica.

[•] Daltons. Unidad de peso molecular

² Stauffer C. Enzymes used in Bakery Products I. Fundamentals of Enzymes. AIB Research Department Volumen XVI Abril de 1994

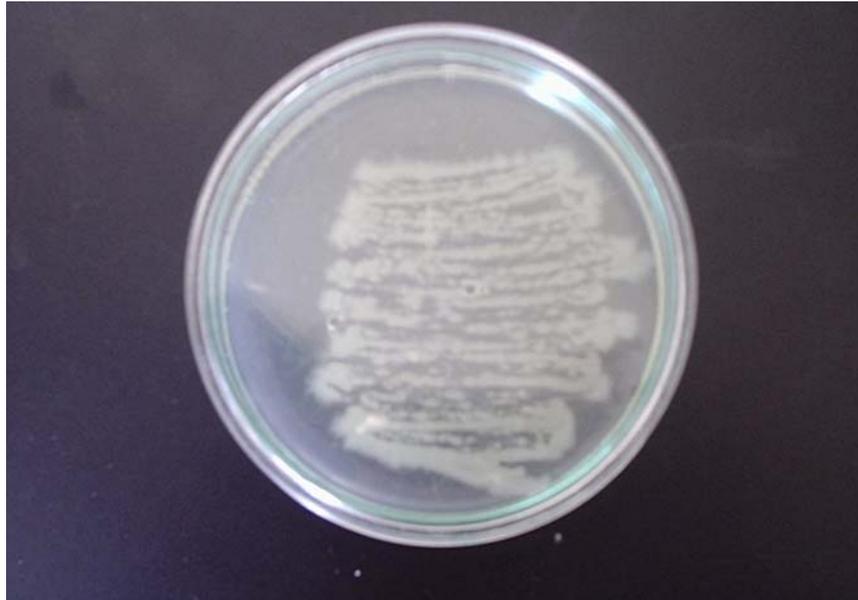
- La inhibición competitiva: consiste en que un sustrato y un inhibidor semejante al sustrato compiten por los sitios de enlace de la enzima.³

1.2 DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO

En el presente trabajo de grado se empleo el genero *Bacillus subtilis* sp, estos son microorganismos del genero Bacillus, su habitad es generalmente el suelo y el tracto intestinal de los animales, son aerobios y la gran mayoría tiene la enzima catalasa.

El *Bacillus subtilis* ATCC 21556 (ver Figura 1.) Es un microorganismo grampositivo, mesofilo, aerobio, asimila glucosa, arabinosa y xilosa sin producir gases, licua la gelatina, convierte los nitratos en nitritos, produce esporas ovas o cilindricas, son fermentativas, usualmente hidrolisan caseina y almidón. no patógeno, , no produce endotoxinas y secreta proteínas hacia el medio.

Figura 1. *Bacillus subtilis* ATCC 21556



³ Murray R. Mayes P. Bioquímica de Harper tercera edición. Editorial El Manual Moderno. Mexico DF, Mexico 2001.

1.3 AMILASAS

Las amilasas fueron las primeras enzimas añadidas a la masa del pan, hoy en día es el tópico más estudiado en cuanto a mejoradores utilizadas en harina para panificación. Su principal uso en esta industria de panificación es el de generar azúcares fermentables (aumentando la capacidad de producción de CO₂) pero investigaciones recientes muestran que estas enzimas tienen la capacidad de retardar el endurecimiento de la miga y tienen a su vez un efecto de antienvjecimiento en el pan.⁴

1.3.1 Modo de acción enzimático. La α -amilasa, endo – amilasa o 1.4 α - glucan-glucanohidrolasa, hidroliza al azar los enlaces α - 1,4 del almidón gelatinizado, provocando una drástica disminución de viscosidad (licuefacción) y generando una distribución de productos de bajo peso molecular. Produce igualmente las α -dextrinas, considerando que no puede hidrolizar los enlaces α - 6 de la amilopectina. La solubilidad de las dextrinas está sujeta a la acción de la β -amilasa y de la amiloglucosidasa, de la maltosa y de la glucosa respectivamente.⁵

1.3.2 Sustrato. Las moléculas del almidón son de dos tipos. En el primero, la amilosa, que constituye el 20% del almidón ordinario, los grupos C₆H₁₀O₅ están dispuestos en forma de cadena continua y rizada, semejante a un rollo de cuerda; en el segundo tipo, la amilopectina, se produce una importante ramificación lateral de la molécula.

Las amilasas hidrolizan almidón (amilosa, amilopectina) y sus derivados. Sus derivados incluyen dextrinas las cuales son poli glucósidos con más de 10 unidades de glucosa y oligosacaridos los cuales contienen de 3 a 10 unidades de glucosa. La amilosa es un polímero glucosídico lineal con un grado de polimerización (DP)* de 100 a 200 unidades de glucosa y un peso molecular entre 150.000 y 300.000 Daltons¹. La amilopectina (ver figura 2) es una estructura ramificada con un peso molecular de 10 a 40 Mega daltons, el lado pequeño de la cadena tiene un grado de polimerización de alrededor de 25 y está adherido a la

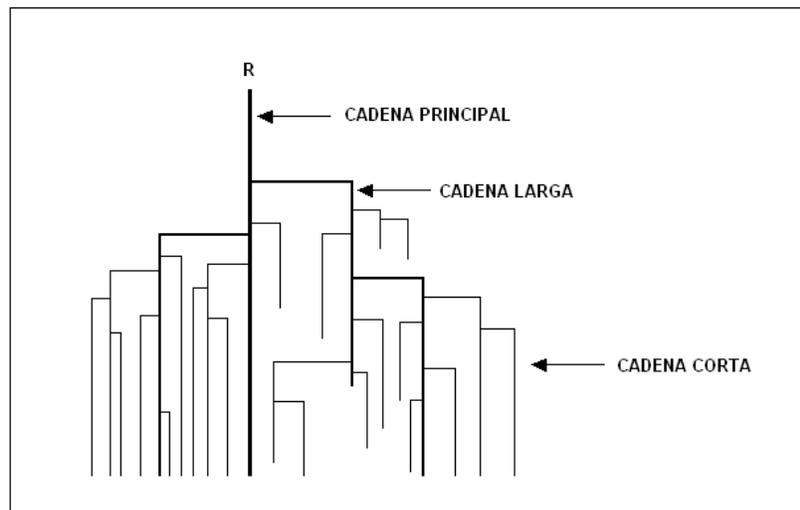
⁴ Stauffer C. *Enzymes used in Bakery Products II. Applications of Enzymes.* AIB Research Department Volumen XVI mayo de 1994

⁵ Stauffer C. *Enzymes used in Bakery Products I. Fundamentals of Enzymes* AIB Research Department Volumen XVI Abril de 1994

* El grado de polimerización hace referencia al número de unidades (glucosa) que se repiten una molécula.

cadena larga por un enlace α 1-6, la cadena larga gira y se conecta con la cadena principal por el mismo enlace α 1-6. La cadena principal contiene el único grupo reductor en toda la molécula de amilopectina. Los grupos locales de las cadenas corta y larga forman regiones ordenadas llamadas cristalinas. Estas están conectadas por secciones amorfas de la cadena de amilopectina.

Figura 2. Modelo de una pieza de una molécula de amilopectina



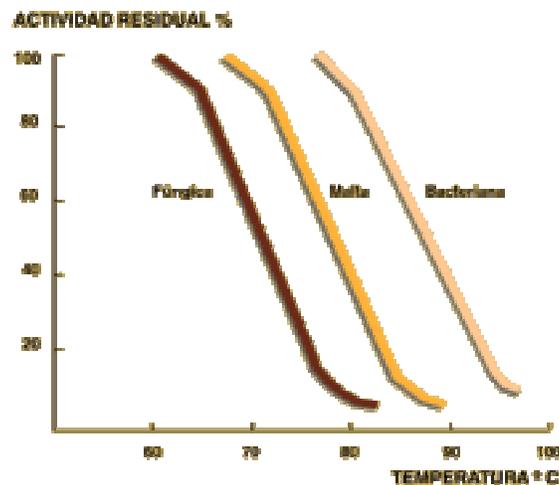
Fuente: Stauffer Clyde Enzymes used in bakery products Technical Bulletin. 1994

1.3.3 α -Amilasa bacteriana. La hidrólisis del almidón durante el desarrollo de la masa, la suaviza levemente para un mejor deslizamiento en la charola, pero esto no es suficiente incentivo para el uso de las enzimas; sin embargo, la actividad de anti-ranciedad sí lo es.

Se generó un gran interés por la habilidad de la amilasa de hidrolizar almidón gelatinizado durante el horneado. Esta acción hace que la retrogradación del almidón durante el almacenado se retarde y, por tanto, aumenta el período de vida de anaquel mediante la disminución del endurecimiento de la miga. Esta función de post-horneado requiere un grado de estabilidad al calor por parte de la enzima de manera que resista la desnaturalización a temperaturas de gelatinización (65°C a 80°C o 338K a 353K). La amilasa fúngica se desnaturaliza a estas temperaturas, y la amilasa de origen de la malta es mínimamente estable en este rango. La amilasa bacteriana es bastante estable, hasta el punto de que alguna actividad

permanece hasta el final del horneado (ver figura 3). La excesiva hidrólisis del almidón, acarrea problemas en la textura del pan, incluyendo bajo volumen, densidad y textura gomosa de la miga, debido a la dificultad para controlar su actividad, la amilasa bacteriana se ha visto limitada para productos de alta humedad, excepto en el área de extensión en la vida útil de almacenamiento.⁶ Para contrarrestar este exceso de suavidad, las amilasas se han producido con un punto intermedio de estabilidad de calor. Estas enzimas hidrolizan el almidón después de la gelatinización pero se inactivan completamente al final del horneado. La vida de anaquel del pan hecho con estas amilasas es varios días mayor que el pan hecho con agentes anti-ranciedad, tales como los mono y diglicéridos.⁷

Figura 3. Actividad de la α Amilasa frente a la temperatura



Fuente: Tejero F. Las enzimas en Panificación, Molinería y panadería digital.com 2002

1.3.4 Acción de la α amilasa en el almidón dañado. El grano intacto de almidón es resistente a la acción enzimática, mientras que el grano que ha sido mecánicamente dañado es susceptible a ser hidrolizado por las amilasas. El grano de almidón mecánicamente desmenuzado o almidón dañado que es como se conoce comúnmente en la industria, absorbe mas agua que un grano sano haciendo una contribución significativa a los requerimientos de absorción de la

⁶ Mathewson P. Enzymes, Eagan Press. St Paul. Minnesota USA, 1998

⁷ Enzimas Poderosas. Disponible en www.barkingbussines.com

harina. La acción de la amilasa en el grano de almidón dañado produce dextrinas y oligosacáridos reduciendo su habilidad de inmovilizar agua, esto incrementa la movilidad de la masa y produce baja consistencia. Por ejemplo 5 SKB* de α amilasa bacteriana por gramo de harina provocan un decrecimiento de más o menos 20% en la consistencia de la masa en un análisis farinográfico⁸.

1.3.5 Poder de gasificación. Las α -amilasas son también adicionadas a la harina para generar azúcares fermentables (maltosa) para la actividad de la levadura. Este poder de gasificación es determinado por la cantidad de gas formado en una masa que contenga levadura durante 5 horas de fermentación. Algunas harinas contienen azúcares fermentables, la actividad enzimática es la diferencia en el poder de gasificación entre harinas simples y aquellas a las que se les ha adicionado amilasa. Es de tener en cuenta que generalmente la harina contiene suficiente β -amilasa que es capaz de convertir todas las cadenas de almidón y dextrinas en maltosa pero el incremento en el poder de gasificación depende de la adición de α amilasa.⁹

1.3.6 Efecto Antienviejimiento por acción de las amilasas. El envejecimiento del pan está relacionado con la retrogradación de la amilopectina, este fenómeno de envejecimiento se ve reflejado en una masa muy firme. La efectividad de las amilasas en el antienviejimiento del pan está sujeto a dos factores: el rango de la firmeza de la miga y el alcance de la firmeza de la miga. Un pan blanco estándar (sin aditivos) almacenado en un cuarto a una temperatura constante presenta la mitad del incremento de la firmeza de la miga en un periodo de 2.5 días. Esto es llamado "vida media" de envejecimiento. Una mayor vida media conlleva a un rango de envejecimiento más lento. Después de un tiempo suficiente (6 vidas medias) la firmeza de la miga alcanza su valor máximo. La diferencia entre ésta y la firmeza medida justo después del enfriamiento del pan define el alcance de

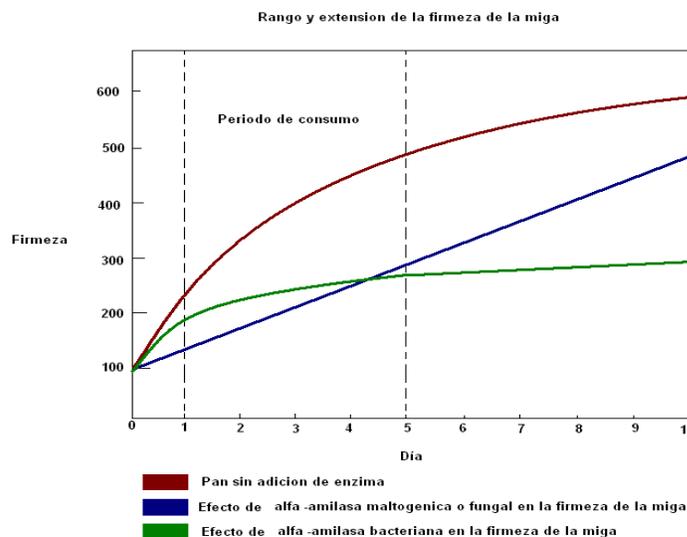
* SKB hace referencia a Stantstedt, Knee, Blish.; mide la capacidad de la enzima para degradar una solución de almidón puro, a un pH de 4,6, durante 60 minutos a 30°C.

⁸ Stauffer C. *Enzymes used in Bakery Products II. Applications of Enzymes*. AIB Research Department Volumen XVI mayo de 1994

⁹ Stauffer C. *Enzymes used in Bakery Products II. Applications of Enzymes*. AIB Research Department Volumen XVI mayo de 1994

firmeza de la miga. Las diferencias entre el efecto antienviejecimiento en muestras con enzima bacteriana, fúngica y sin enzima son mostradas en la figura 4.¹⁰

Figura 4. Efecto de la α -amilasa en la firmeza de la miga



Fuente: Stauffer Clyde. Enzymes used in bakery products Technical Bulletin. 1994

1.3.7 Efecto de la amilasa en la gomosidad de la miga. Si se usa la α -amilasa bacteriana ligeramente en exceso en la elaboración de pan, es posible que la miga de este se vuelva gomosa después de un día o dos de almacenamiento. Existen dos explicaciones para este fenómeno; la primera es la termoestabilidad de la α -amilasa bacteriana que permite que algunas enzimas que resisten al proceso de panificación continúen hidrolizando el almidón durante el almacenamiento, la segunda tiene que ver con el grado de polimerización 25 – 35 de las dextrinas formadas por la α -amilasa bacteriana las cuales están relacionadas a la gomosidad del producto.

Las dos explicaciones a este fenómeno son válidas pero, quizás estos dos factores contribuyen al desarrollo de este problema. Una α -amilasa bacteriana con una termoestabilidad intermedia no produce una miga gomosa, aun cuando

¹⁰ Mathewson P. Enzymes, Eagan Press. St Paul. Minnesota USA, 1998

es usada en mayores cantidades a sus niveles óptimos de funcionamiento. Por otra parte, otras enzimas aplicadas a la masa contienen óptimas cantidades de α -amilasa bacteriana (termoestable) las cuales previenen también la gomosidad de la miga en el pan.

1.3.8 Diferencias en el modelo de acción. Cuando las amilasas están presentes en el proceso de panificación, ellas forman dextrinas de la gelatinización del almidón. Cuando la α -amilasa fúngica o la amilasa cereal son usadas, sus dextrinas en promedio tienen un grado de polimerización alrededor de 10. Por otra parte la α -amilasa bacteriana forma dextrinas con un grado de polimerización de 20 -35. Estas dextrinas, junto a la acción residual de la enzima en el almidón durante el almacenamiento del pan, pueden contribuir a la gomosidad de este cuando la α amilasa bacteriana ha sido usada como un agente antienviejimiento, si esta enzima presenta un grado intermedio de termo estabilidad los problemas de gomosidad no ocurren.

1.4 FERMENTACIÓN ENZIMÁTICA

Las enzimas son obtenidas por el proceso de fermentación en condiciones controladas, para la producción de estas se utilizan cepas de alto rendimiento.

Muchas de las enzimas son extracelulares es decir que la célula las expulsa al medio, es por esta razón que se hace necesaria la separación de las células y las enzimas por medio de filtración o centrifugación.

El filtrado o sobrenadante que contiene la enzima se concentra o se precipita, seca y muele para obtener la enzima en forma de polvo.

Existen cinco condiciones previas para una fermentación:

- El microorganismo debe producir un producto útil, propagarse con facilidad y mantener características biológicas y bioquímicas uniformes para dar rendimientos consistentes.
- Debe ser posible disponer de materias primas económicas, de fácil adquisición y de composición uniforme.
- Rendimientos aceptables
- Intervalo de fermentación rápido
- El producto debe ser fácil de recuperar y purificar.

Existen varios tipos de fermentación pero en el caso del desarrollo de este trabajo de grado se va a trabajar con proceso de fermentación discontinua, es decir en el tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de la fermentación se añade oxígeno (en forma de aire). La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células.

Después de la inoculación se observan cuatro fases de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

1.4.1 Parámetros de fermentación. El pH, la temperatura y la concentración de sustrato son determinantes en el funcionamiento de las enzimas es decir que cada enzima tiene un rango de pH y temperatura optima y la concentración de sustrato debe estar relacionada con la concentración de enzima presente.

Como muchas enzimas son proteínas, su estructura ternaria es fundamental para su funcionamiento, un aumento de temperatura puede destruir los puentes de hidrógeno, y distorsionar zonas de la estructura ternaria. La mayoría de las enzimas trabajan a pH de 6 a 8 que es donde se presenta el mayor rango de eficacia, hay excepciones como la pepsina que trabaja a pH de 2 y la lipoxigenasa que trabaja a pH de 9, las temperaturas y pH óptimos de trabajo para cada uno de los diferentes tipos de α -amilasas así como sus temperaturas de inactivación se observan en el cuadro 1. La concentración de sustrato debe ser alta comparada con la concentración de la enzima esto implica que la totalidad de la enzima va a estar acoplada al sustrato provocando una velocidad de reacción alta.

Cuadro 1. Influencia del pH y la temperatura en las amilasas

	pH Optimo	T° Optima	T° de inactivacion 50%	T° inicio y fin inactivacion
Amilasas				
Beta-amilasa trigo	4 – 5	55	65	55-75
Alfa-amilasa trigo	4.6	60-66	73	65-90
Alfa-amilasa fúngica				
No purificadas	5 – 7	65	71	66-79
Cristalizadas	4.5	50	-	55
<hr/>				
Alfa-amilasa bacteriana				
No purificada	5 – 7	70	79-85	70-100
Cristalizada	6	55-66	-	-

Fuente: Rafael Miranda. Actividad de las amilasas en panificación. Molinería y panadería digital.com 2002

- **Cofactores.** Muchas enzimas necesitan la presencia de sustancias, no proteicas adicionales, para su funcionamiento, a estas sustancias se les denomina cofactores, que pueden ser iones como el magnesio, que participa en las reacciones en las que se transfiere un grupo fosfato de una molécula a otra, y otros iones como potasio, calcio, zinc, cobre, manganeso, hierro y sodio. En otros casos la unión entre aminoácidos e iones mantiene la estructura terciaria en ciertos pliegues y en otros la estructura cuaternaria.
- **Coenzimas.** Las coenzimas son moléculas orgánicas pequeñas, muchas son vitaminas como es el caso de la riboflavina (B2), tiamina (B1) y nicotinamida. Estas coenzimas pueden reciclarse y volver a ser usadas, por eso el organismo sólo necesita pequeñas cantidades de estas sustancias.¹¹
- **Otros parámetros.** La fuerza iónica del medio, la presión (especialmente si uno de los reactivos es gaseoso), las soluciones tampón (*buffers*) empleados, la pureza de los reactivos y de la enzima¹²

¹¹ Izquierdo M. Biología. 2003 Disponible en Internet www.paleontologia.co.uk

¹² Parra S, Tibaduiza A. Enzimas: Aplicaciones en Biotecnología, Procesos Industriales y Terapia. Tesis. Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Universidad de La Salle. Bogotá. D.C. 1996

1.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

Para la extracción de la enzima se hace necesario conocer su localización, si la enzima es intracelular se hace necesario un método que requiera algún grado de ruptura de la célula, hay que considerar el mecanismo menos destructivo pero que a su vez libere una buena porción de enzima, si por el contrario la enzima es extracelular no hay necesidad de realizar ningún proceso de ruptura celular.

No existe un procedimiento único, o un conjunto de procedimientos mediante los cuales todas y cada una de las enzimas puedan aislarse, se siguen una serie de etapas de separación para cualquier enzima, con lo que se podrá obtener un alto grado de purificación y rendimiento.

Para obtener este objetivo es necesario eliminar el material inactivo o de las enzimas no deseadas, mientras se consigue un alto rendimiento.

En la extracción se debe obtener una síntesis adecuada del tejido que contiene la enzima sin provocar pérdidas de actividad. En el caso de las de origen microbiano, la proteína se libera en el medio de cultivo y se separa de las células mediante centrifugación.

En el proceso de purificación se tienen en cuenta cinco etapas básicas:

- Desarrollo de los métodos de análisis adecuados.
- Selección de la mejor fuente a partir de la cual se puede purificar la proteína.
- Solubilización de la molécula deseada.
- Estabilización de la molécula repetidamente en cada etapa de su purificación.
- Desarrollo de una serie de procesos de aislamiento y concentración.¹³

Normalmente el proceso de purificación comprende seis etapas: eliminación de ácidos nucleicos, eliminación de restos celulares, purificación preliminar, concentración, purificación final, concentración y envasado. Para la elaboración de este trabajo de grado se realizaron las operaciones de eliminación de partículas sólidas, purificación y concentración, precipitación, separación de dos fases líquidas, concentración, envasado y liofilización.

¹³ Parra S, Tibaduiza A. Enzimas: Aplicaciones en Biotecnología, Procesos Industriales y Terapia. Tesis . Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Universidad de La Salle. Bogotá. D.C. 1996.

1.5.1 Eliminación de partículas sólidas. Una vez precipitados los ácidos nucleicos, deben ser eliminados los restos celulares. Estos restos están compuestos por ácidos nucleicos precipitados, paredes celulares, grandes fragmentos de membrana, etc. Para lograr la eliminación de estas partículas existen dos métodos la centrifugación o la filtración, la elección del método dependerá de la escala a la que se desee producir la enzima y en parte a la naturaleza de los sólidos presentes.

Aunque la centrifugación es un buen método para eliminar material viscoso o gelatinoso, difícil de filtrar, no es un procedimiento muy apropiado para emplear con grandes volúmenes de precipitados floculados que pueden bloquear las condiciones de alimentación de la centrifuga. En estas condiciones la filtración ofrece mejores perspectivas.

1.5.2 Purificación y concentración. La eliminación de los ácidos nucleicos y los restos celulares presentes en los extractos deja un líquido sobrenadante que contiene la enzima deseada. El siguiente paso del proceso consiste en la eliminación de los contaminantes no deseados, moléculas pequeñas, orgánicas e inorgánicas, otras proteínas y toda la cantidad de agua presente. Hay una serie de métodos disponibles para purificar y concentrar la enzima deseada, algunos consiguen las dos cosas a la vez, otros sólo una de ellas. Entre estos métodos encontramos los siguientes:

1.5.3 Precipitación. Este es un método de separación de proteínas con mucha tradición que está idealmente indicado para la purificación inicial a partir de un extracto que contenga la enzima. La precipitación puede ser de tipo negativo o positivo, o sea, que se pueden precipitar las impurezas o la enzima, esto último tiene cierta ventaja porque de esta manera se puede suspender la enzima precipitada en un pequeño volumen de líquido consiguiendo la concentración además de la purificación.

Para la precipitación se pueden usar diversos agentes, ajustando el pH de 7 hasta 4 o 5, se consigue muchas veces eliminar los componentes solubles de las paredes celulares y numerosas proteínas no deseadas, sin embargo este método solo puede usarse en los casos en que la enzima deseada es estable y soluble a pH bajo. También se emplean como agentes de precipitación diversos polímeros y

algunos disolventes orgánicos aunque tienen la desventaja de que son inflamables.

Una desventaja general de los métodos de precipitación es que hay que realizarlos por tandas y esto resulta difícil cuando se trata de producción a gran escala donde se emplean procesos continuos.

1.5.4 Separación en dos fases líquidas. Este método tiene dos grandes ventajas, la fácil separación de proteínas por un lado y paredes celulares y residuos semisolubles por otro, además de la posibilidad de funcionar en continuo. El principio de esta técnica se fundamenta en que al poner en contacto una solución de proteínas con una mezcla de dos polímeros inmiscibles, los dos polímeros se separan en fases distintas y las proteínas quedan selectivamente repartidas entre una fase y la otra. La razón de la separación de los polímeros en fases y de la adsorción de las proteínas, está en las características físicas de las moléculas implicadas; las moléculas idénticas o similares tienden a agregarse entre sí que hacerlo con moléculas diferentes.

1.5.5 Concentración y envasado. El grado de concentración final y sus características, así como la presentación de la enzima dependerán del uso al que vaya a ser destinada la enzima o si su transporte se realiza en grandes cantidades y a grandes distancias. Hay que tener en cuenta que este último paso se debe realizar empleando el mínimo número de operaciones.

Cuando la enzima es de uso analítico o se utiliza para trabajo de investigación a pequeña escala la presentación suele ser en forma liofilizada o como suspensión. Si la enzima purificada va a ser inmovilizada es posible dejarla como solución relativamente pura pero bastante diluida.¹⁴

1.5.6 Liofilización. La liofilización es un proceso de secado mediante sublimación, que se ha desarrollado con el fin de reducir las pérdidas de los compuestos que se afectan en gran medida durante los procesos convencionales de secado. En el desarrollo de este trabajo de grado se liofilizó la enzima en un liofilizador marca LABCONCO, el cual se muestra en la figura 5.

¹⁴ Trevan M. D., Boffey S., Goulding K.H. Y Stanbury P. Biotecnología: principios biológicos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España) 1990.

La liofilización involucra varias etapas:

- Congelación a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo del producto congelado, generalmente a baja presión.
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas, Generalmente, al liofilizar adecuadamente un material se puede almacenar por períodos muy largos con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, físicas, químicas y biológicas.

Figura 5. Liofilizador



1.7 PANIFICACIÓN

La harina de trigo es única entre las harinas de cereales. Cuando se mezcla con agua, la proteína forma gluten, formando una masa elástica capaz de retener gas, si se mezcla debidamente el gluten produce una hogaza con un volumen y estructura de miga deseada.

Una harina de buena calidad y uniforme es determinante en la calidad del producto terminado, aunque el pan se elabora con muchos procesos de panificación, el objetivo común es desarrollar el gluten. Todos los métodos son una combinación de 5 etapas básicas de procesamiento.

- **Mezclado.** Se mezclan harina, agua, levadura y otros ingredientes para formar la masa. El mezclado desarrolla el gluten para optimizar la retención de gas en las etapas posteriores de fermentación y horneado. Durante el mezclado se incorpora aire a la masa. En algunos procesos, los aditivos que se le agregan en la fase de mezclado reducen o eliminan el tiempo de mezclado.
- **División.** Se conoce como división el proceso que consiste en separar la masa en piezas de un peso determinado. Al redondear las piezas, la superficie deja de ser pegajosa y recobra su lisura. La masa se deja reposar en un proceso que se conoce como fermentación inmediata, que facilita el trabajo mecánico. Luego se extiende en hojas, se moldea y se pasa al proceso de fermentación final.
- **Fermentación.** Los organismos de la levadura se alimentan de los azúcares y producen bióxido de carbono que expande el volumen de la masa. A medida que ocurre la fermentación el gluten se acondiciona y se ablanda volviéndose elástico. Por lo general, la masa se coloca en una cámara de fermentación a una temperatura y humedad constantes.
- **Horneado.** El horneado transforma la masa en pan. En el horno, la masa se expande, adquiere una forma estable, se produce el sabor deseado y se forma la corteza. Una vez horneado el pan, se deja enfriar y luego se rebana o se envasa.

1.8 NUMERO DE CAIDA (*FALLING NUMBER*)

El número de caída es una herramienta que permite conocer que tan apta es una harina para ser aplicada en la industria de panificación, así, un número de caída menor a 170 tendría un riesgo de una miga de pan pegajosa, mientras que un número de caída muy alto superior a 330 tiene un riesgo de miga seca y poco volumen.

2. METODOLOGIA DE LA EXPERIMENTACION

Para el desarrollo del presente trabajo de grado se realizaron diferentes procedimientos experimentales teniendo en cuenta que la mayoría de estos provienen de la investigación titulada “ **BIOTECNOLOGICA DE LAS ENZIMAS MICROBIANAS PECTINASA Y AMILASA** ” (*Segunda etapa*) de la Línea de Investigación de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de Alimentos. A continuación se explican cada uno de estos procedimientos.

2.1 PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación del medio de cultivo LB (Luria Bertrani), Se preparó según indicaciones de la casa comercial MERKC. Se pesan 3.7 g de medio LB correspondiente a 100 mL. Se colocan en el frasco correspondiente y se adicionan 100 mL de agua destilada. Se lleva a autoclave durante 15 minutos, 15 psi (103421Pa) y a 121 °C (394 K).

Al terminar el tiempo de autoclave se sacan los medios, y se deja enfriar para poder servir en las cajas Petrí, se adicionan en cada caja aproximadamente 25 mL del medio, se tapan las cajas y se espera hasta que el medio se solidifique para su uso.

Como prueba de esterilidad se colocaron algunos medios a 37 °C (310 K) por 48 horas y así comprobar al no obtener crecimiento de colonias, que este está libre de microorganismos.¹⁵

2.2 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

En esta etapa se trabaja con la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* ATCC 21556. Las cepas se mantienen en el medio sólido Luria Bertrani (LB), el tiempo de incubación es de 48 horas a 37 °C (310 K) +/- 1y de esta forma se garantiza que los microorganismos que se usan se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento.

Siembra y resiembra. Después de haber sido preparado el medio de cultivo LB se procede a sembrar en este. La técnica adoptada fue la de sembrado zigzag, a no más de 10 cm del mechero, el cual proporciona condiciones de esterilidad e

¹⁵ Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería de Alimentos Biotecnología de las enzimas microbianas pectinasa y amilasa (Segunda etapa). Bogotá (Colombia) 2004

inocuidad en el momento de la siembra. Para resembrar siempre se mantuvieron cepas frescas, esto se garantiza con el resembrado del *Bacillus subtilis* ATCC 21556 cada 2 días. Así se asegura el uso de cepas frescas y mejor adaptadas a los medios para cada prueba que se desea realizar.

2.3 ZONA DE HIDRÓLISIS

Se pesan 3.7 g de agar granulado LB para preparar 100 mL de agar. Se calientan a 50°C (323 K) 80 mL de agua destilada y se disuelve el agar en esta; aparte se prepara el almidón pesando 1 g de este y disolviéndolo en 20 mL de agua destilada. Se mezcla el agar y el almidón en un frasco tapa rosca y se esteriliza a una temperatura de 121°C (394 K) y una presión de 15 psi (103421 Pa) por 15 minutos.

Se esterilizan 4 cajas petri en el horno a una temperatura de 177°C (450 K) por 2 horas. Posteriormente se vierte 25 mL de agar estéril en cada caja petri, se deja enfriar hasta gelificación para luego sembrar el microorganismo. Se incuban por 4 días a una temperatura de 37°C (310 K) para luego adicionar lugol (3 mL) y así observar la zona de hidrólisis del microorganismo.

2.4 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS LÍQUIDOS PARA LA FERMENTACION

Según los resultados obtenidos por la investigación mencionada anteriormente los medios donde la actividad amilolítica del *Bacillus subtilis* ATCC 21556 se favoreció fueron en el medio López que tenía como inductor de biosíntesis fécula de plátano y el medio experimental E1 con lactosa como inductor y el tiempo óptimo fue de 72 horas. La composición de estos medios se puede observar en el cuadro 2. Además se hicieron modificaciones para enriquecer el medio líquido E1 con almidón como inductor.

Cuadro 2. Composición de los medios líquidos.

Medio de cultivo	Composición	%	Fuente bibliográfica
López modificado MEDIO 4	Fécula de plátano Harina de maíz (NH ₄) ₂ HPO ₄ KCL MgSO ₄ 7H ₂ O CaCL ₂ 6H ₂ O Extracto de levadura	9.0 9.0 1.2 0.15 0.05 0.05 2.0	BIOTECNOLOGICA DE LAS ENZIMAS MICROBIANAS PECTINASA Y AMILASA .. (Segunda etapa) 2004
Medio experimental E 1	Lactosa KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄ KCL MgSO ₄ CaCL ₂ Extracto de levadura Extracto de maní Tween 80	6.0 0.2 1.0 0.05 0.001 0.001 1.0 1.0 0.01	BIOTECNOLOGICA DE LAS ENZIMAS MICROBIANAS PECTINASA Y AMILASA .. (Segunda etapa) 2004

Se preparan 0.5 L de los medios líquidos seleccionados para técnica sumergida, según las indicaciones dadas (en la investigación anteriormente mencionada) y se colocan en los frascos tapa rosca y se llevan a autoclave. Los frascos tapa rosca se enfrían hasta 37 °C (310 K) y se vierte el contenido en erlenmeyers previamente esterilizados y se inoculan con 10 mL de las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 21556. Por último se hace el montaje en el agitador orbital (ver figura 6) que se mantiene a 180 rpm, el cual se encuentra en una cámara que permite mantener la temperatura estable. Cada vez finalizado el tiempo de fermentación se realizaron los análisis del pH, biomasa y actividad amilolítica a partir de una muestra de 25 mL.

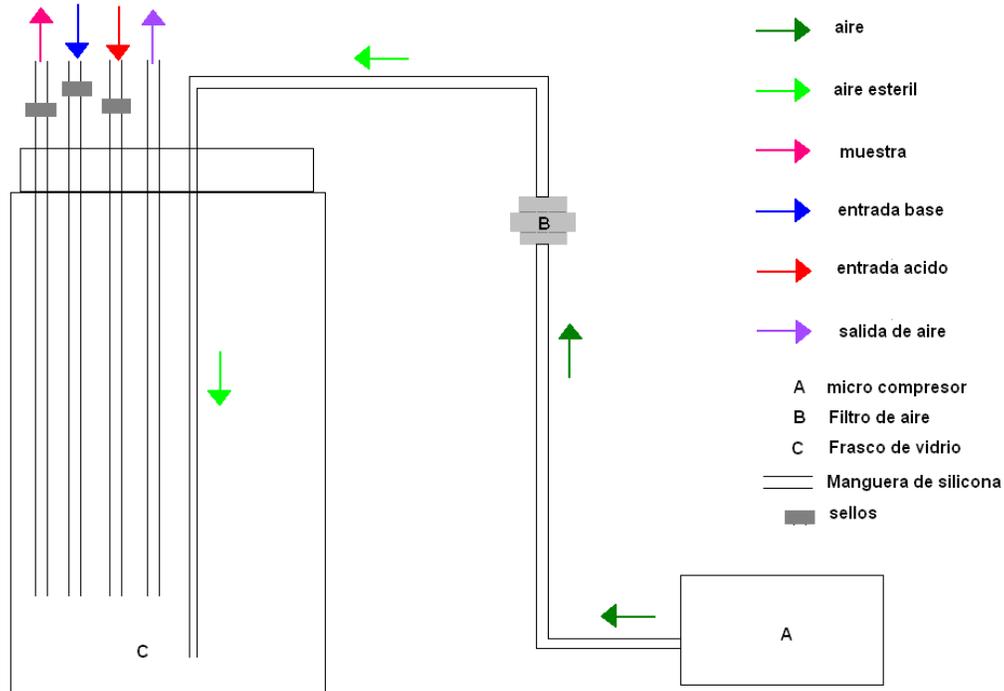
Figura 6. Agitador Orbital



2.5 BIOFERMENTADOR

El biofermentador fue hecho por los autores y constaba de un frasco de vidrio con tapa, con una capacidad de 4 litros, la tapa es perforada y tiene cuatro agujeros por donde entran y salen cuatro mangueras de silicona las cuales transportan ácido, base y oxígeno, la cuarta manguera se utiliza para la toma de muestras (ver figura 7). La agitación y la oxigenación del medio de cultivo en el biofermentador se hacen por medio de un micro compresor cuyas especificaciones son: 110V, 60 Hz, 2.5 W, 0.012 Mpa de presión y flujo de aire de 1.6 L/minuto, el cual tiene un filtro de aire que se utiliza para purificar este y agitar constantemente el medio presente. Para garantizar los parámetros de fermentación el biofermentador se encuentra en una incubadora la cual mantiene la temperatura deseada y cada vez que se toma una muestra se mide el pH y según la lectura se toman las medidas correctivas necesarias.

Figura 7. Esquema biofermentador



Todos los materiales que componen el biofermentador deben resistir temperaturas de esterilización.

2.6 PARÁMETROS DE CONTROL EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Las fermentaciones se realizaron en un biofermentador hecho por los autores de este trabajo de grado, con los siguientes parámetros de proceso.¹⁶

- Los rangos de pH que se trabajaron fueron del orden de 5.5 a 6.1
- La temperatura de evaluación fue de 37 °C (310 K) +/- 1.
- El tiempo de fermentación es de 120 horas (5 días)
- Estas variables fueron estables en cada una de las fermentaciones de los diferentes medios ya que estas variables fueron estandarizadas en la investigación de la Universidad de la Salle mencionada anteriormente.

¹⁶ Scriban R. Producción de Enzimas. México. Editorial El Manual Moderno S.A. 1985

2.6.1 Tiempo optimo de fermentación. Para la determinación del tiempo óptimo de fermentación se realizaron pruebas con los medios líquidos **E1** y **López modificado** se tomaron 3 muestras diarias durante 6 días y se analizó la actividad amilolítica, el pH y la formación de biomasa en cada una de las muestras.

2.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La determinación de biomasa se realizó por diferencia de pesos. Primero se toman los pesos de los papeles filtro que iban a ser utilizados en una balanza analítica. Posteriormente se centrifugan las muestras obtenidas (cada muestra contiene 50 mL) a 4000 rpm por 20 minutos, para luego dejarlas filtrando en un erlenmeyer con un embudo y su respectivo papel filtro ya pesado, luego se procede a la eliminación de sustancias diferentes a la biomasa mediante un lavado con agua a 40°C (313 K), y se procede a retirar la humedad de los papeles filtro introduciéndolos en una estufa a 100°C (373 K) durante 1 hora, pasado este tiempo se introducen las muestras en una cámara desecamiento por 1 hora. Posteriormente se toma los pesos de cada papel filtro y por diferencias de peso se obtiene la biomasa en gramos de cada muestra.

2.8 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA α – AMILASA BACTERIANA.

Una vez realizada la fermentación el extracto enzimático, el cual posee proteínas, azúcares y otros subproductos metabólicos, debe ser sometido a una serie de procedimientos para obtener una enzima purificada.

Después de la separación de la biomasa se obtienen una cantidad de extracto enzimático líquido, con este volumen se hacen los cálculos correspondientes para agregarle los floculantes requeridos en la extracción de la enzima. Primero CaCl_2 5% con agitación por 15 minutos y luego $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 4.5% con agitación por 20 minutos, para luego dejar reposar el extracto enzimático con los floculantes por 1 hora. Pasado este tiempo se separan el sobrenadante del precipitado y se hacen los cálculos para la precipitación con las sales solventes. Se le agrega etanol 3.5 veces el volumen del sobrenadante, a una temperatura de 4°C (277 K) con baño de hielo. El etanol se agrega poco a poco mientras se hace una agitación suave y constante, se deja reposar por 6 horas en refrigeración. Pasado este tiempo se realiza una centrifugación por 20 minutos y 4000 rpm para separar el sobrenadante del precipitado; en este caso el precipitado es la enzima

semiconcentrada. Posteriormente después de haber retirado el etanol residual del precipitado mediante evaporación se procede a congelar este precipitado por 24 horas a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (255 K), para luego ser Liofilizado a una temperatura de $-44\text{ }^{\circ}\text{C}$ (229 K) y una presión de vacío de 0.2×10^{-3} mBar (20 Pa). Por un tiempo de 72 horas. Así se obtiene una enzima concentrada en forma de polvo y libre de residuos orgánicos presentes en la fermentación. La enzima aislada se denominó con el nombre de **MIX 2**

2.9 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD AMILOLITICA

La técnica que se describe a continuación para la actividad amilolitica es característica de enzimas que pueden catalizar procesos de hidrólisis de almidón hasta la formación de dextrinas las cuales son incoloras en presencia de yodo. La unidad de actividad amilolitica se define como la "cantidad" de enzima que hidroliza 1g de almidón hasta dextrinas, durante 1 hora a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (303 K). Esta técnica se utiliza para la caracterización del producto final. Para el desarrollo de esta técnica se emplea una solución de sustrato de almidón soluble MERCK al 1%, *Buffer* fosfato pH 6 y solución de yodo.

Procedimiento. Se toman dos erlenmeyer y se agregan 10mL del sustrato a cada uno, se ponen en baño maría a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (303 K), a un erlenmeyer se le agregan 5mL de agua destilada (control), al otro se le adicionan 5mL de enzima, agitar rápidamente y dejar en incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (303 K) durante 10 minutos. Luego se sacan 0.5 mL de cada erlenmeyer y se disponen en otros dos erlenmeyers debidamente marcados como control y muestra, a estos se le adicionan 50mL de solución de yodo, se agita rápidamente. Finalmente se mide en un espectrofotómetro la absorbancia con una longitud de onda de 656 nm y en una cubeta con cambio óptico de 1cm.

Para expresar los resultados utilizar las siguientes convenciones:

D_1 : Absorbancia de control.

D_2 : Absorbancia de la enzima.

La diferencia entre las dos absorbancias corresponde a la cantidad de almidón hidrolizado.

$$C = \frac{0.1g * (D_1 - D_2)}{D_2}$$

0.1 gramos corresponden a la cantidad de almidón utilizado para determinar D_1 y D_2

La actividad amilolítica (A.A) se calcula según:

$$A.A = \frac{(5.885 * C * 0.0016) * 1000}{N}$$

En donde:

- 5.885 y 0.0016. son constantes matemáticas según la definición de A .A.
- 1000. número de mg de sustrato (se pueden pasar a gramos).
- N. mL o mg de enzima utilizados en el ensayo.¹⁷

2.10 DETERMINACION DE ALMIDÓN HIDROLIZADO POR LA ENZIMA

La determinación de esta prueba esta basada en la técnica colorimétrica Gracheva, pero en este caso no se calcula la actividad amilolítica sino que se compara la absorbancia obtenida después de la hidrólisis frente a una curva de calibración que indica el porcentaje de almidón presente en la muestra.

2.10.1 Curva de calibración. Para la determinación de la cantidad de almidón hidrolizado es necesario realizar una curva que relacione la cantidad de almidón presente en una muestra con la absorbancia.

Para esto se elaboraron muestras con el 1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2% de almidón, se tomaron 0.5 mL de cada una de las muestras y se agregan a 50mL de la solución de yodo, se agita para luego verterse en una celda. Se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 656 nm. Se grafica absorbancia en función del

¹⁷ Gracheva. I. Crivova A. Tecnología de Enzimas Microbianas, Editorial Elbar, Moscú. 2000.

porcentaje de almidón y el resultado debe ser una línea recta la cual será utilizada para la determinación del porcentaje de almidón hidrolizado por la enzima.

2.10.2 Determinación del porcentaje de almidón presente en la muestra. Se toman 10mL de solución de almidón soluble al 1% (la cantidad de almidón presente en 10mL es de 0.1g), se introduce en un baño María a 30°C (303K) por 2 minutos, luego se añaden 5mL de enzima y se agita constantemente, se extraen 0.5mL de esta mezcla y se añaden a 50mL de solución de yodo, este procedimiento se repite cada 2 minutos hasta que no se presente cambio de color en la solución de yodo o hasta el tiempo determinado. Se realizaron pruebas variando la cantidad de enzima y la cantidad de almidón.

2.10.3 Determinación de la velocidad de hidrólisis. Para el cálculo de la velocidad de hidrólisis se toma los miligramos de almidón hidrolizado y se divide en 10 minutos que corresponde al tiempo de hidrólisis en la prueba.

2.11 MÉTODOS DE PANIFICACIÓN

Se pesa la harina y se agrega el azúcar, la sal y la levadura, se mezclan los ingredientes con ayuda de la mojadora HOBART a baja velocidad, se agrega la enzima α -amilasa el agua hasta formar una masa seca y fibrosa, en este punto se adiciona la margarina, se deja que se mezcle, se aumenta la velocidad de mezclado de la mojadora y se mezcla por 2 minutos, luego se aumenta nuevamente la velocidad hasta su máximo valor y se continúa mezclando hasta obtener el punto óptimo de la masa conocido como “guante de cirujía”. Después de esto se pesa la masa y se toma la temperatura de esta, el rango óptimo es de 25 a 28°C (301 K) a continuación se divide esta masa en tres porciones de 163 g cada una, se moldean y se ubican en los moldes previamente engrasados. Posteriormente se llevan al cuarto de crecimiento y se mantienen aproximadamente 45 minutos para las muestras sin mejorantes y de 60 a 80 minutos para las muestras que los contienen. La temperatura del cuarto de crecimiento es de 30°C (303 K) y la humedad relativa de aproximadamente 85%. Pasado este periodo de fermentación se introducen las masas fermentadas en el horno previamente calentado a 180°C (453 K), el tiempo de horneado es de 23

minutos. Se deja enfriar aproximadamente por 1 hora antes de realizar las pruebas cuantitativas y cualitativas.

2.12 PRUEBAS DE APLICACIÓN DE LA ENZIMA OBTENIDA

La enzima α -amilasa bacteriana aislada se aplicó en procesos de panificación, donde se utilizó para el desarrollo de este trabajo de grado. Se basa en una metodología estandarizada por la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. como pruebas de laboratorio de control de calidad, la cual consiste en:

Formulación. La formulación para la elaboración de los panes de prueba tiene como base 100% harina de trigo sin mejorantes, 60% de agua, 5% de azúcar, margarina 5%, levadura 4% y sal 2%. Para las pruebas que contienen mejorantes las dosificaciones son las siguientes: ácido ascórbico 100 ppm, peróxido de calcio 50 ppm y xilanasas 80 ppm y se representan con un signo positivo (+).

Las dosificaciones de enzima fueron de 30, 60 y 90 ppm para el uso de enzima α amilasa bacteriana obtenida en laboratorio, α amilasa bacteriana de tipo comercial y α amilasa fúngica GRYNDAMIL; para el desarrollo de las pruebas que requirieron el uso de las mezclas entre α amilasa bacteriana y α amilasa fúngica se utilizaron mezclas de 45 y 60 ppm de cada una y la dosificación de enzima para las pruebas con mejorantes se determina dependiendo de el resultado obtenido de las pruebas sin mejorantes.

2.13 NUMERO DE CAÍDA (*FALLING NUMBER*)

El número de caída se define como el tiempo total en segundos desde la inmersión del tubo viscosímetro dentro del baño de María hasta que el agitador viscosímetro ha caído en la suspensión gelatinizada.

Para la determinación del número de caída se utilizó un *Falling Number* tipo 1400 el cual se muestra en la figura 8

Figura 8. *Falling Number* Tipo 1400.



Determinación Número de caída. El número de caída debe determinarse a partir de una muestra de 7 g harina con un contenido de humedad del 15%, si la humedad de la muestra difiere de este valor el peso de esta varía según lo indicado en el cuadro Contenido de humedad de la muestra de análisis (ver anexo 1), además la prueba se hace por sextuplicado y se analiza la tendencia de los resultados.

Los pasos para la determinación del número de caída son:

- Tomar 7.0 +/- 0.05 g de muestra e introducirlos en el tubo viscosímetro.
- Agregar 25 mL de agua destilada en el tubo viscosímetro. Colocar un tapón de caucho en la boca del tubo viscosímetro y agitar vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea.
- Retirar el tapón y ubicar el agitador viscosímetro dentro del tubo, raspando dentro de la suspensión cualquier partícula de harina o producto molido que se haya adherido a las paredes del tubo.
- Coloque el tubo viscosímetro con el agitador dentro del baño María en ebullición a través del orificio en la tapa o cubierta; 5 segundos después de esto comienza la agitación automática.

- El tiempo de caída del embolo es medido automáticamente y el resultado es mostrado en la pantalla.

2.14 ANÁLISIS DE PANIFICACIÓN.

Para el desarrollo de estos análisis se adoptaron los parámetros utilizados en la elaboración de las muestras por la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. los cuales son realizados por el Ingeniero y el panadero industrial los cuales están certificados por la misma empresa. Las pruebas que se realizaron fueron la medición de volumen por desplazamiento de semillas, altura, color de la corteza, uniformidad de la miga, color de la miga, humedad y gomosidad de esta.

- **Medición del volumen.** Cuando el pan se encuentre a temperatura ambiente se procede a determinar el volumen mediante el desplazamiento de semillas (alpiste), este consiste en llenar completamente un recipiente de semillas y tomar el peso de estas, a continuación se introduce el pan en el recipiente vacío y se llena nuevamente el recipiente con las semillas, después de esto las semillas contenidas en el recipiente con el pan son pesadas, y se determinan las semillas desplazadas por diferencia de pesos. El volumen se haya al dividir el peso de las semillas por su densidad (0.7 g/cm^3)
- **Altura.** Para la determinación de la altura se toma la muestra de pan frío, se corta longitudinal y se mide la altura desde el piso hasta el punto mas alto de la corteza.
- **Uniformidad de la miga.** La determinación de este atributo se hace de forma visual y se confronta con la muestra patrón.
- **Color de la miga.** La determinación de este atributo se hace de forma visual y se confronta con la muestra patrón.
- **Gomosidad de la miga.** La determinación de este atributo se hace de forma sensorial y se confronta con la muestra patrón.
- **Humedad.** Se toma una cápsula, se tara y se pesa en una balanza analítica, se registra el peso. Posteriormente en esta misma cápsula se pesa una muestra que provenga del centro del pan, esto garantiza una lectura confiable de la humedad de la miga, la cápsula con la muestra se introduce en una estufa a 100°C por 2 horas. Pasado este tiempo se saca la cápsula y se introduce a un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente, cuando llega a este punto

se retira del desecador con pinzas para cápsula y se pesa, este peso se registra para luego hacer el cálculo de humedad por diferencia de pesos.

3. RESULTADOS Y ANALISIS DE LA EXPERIMENTACION

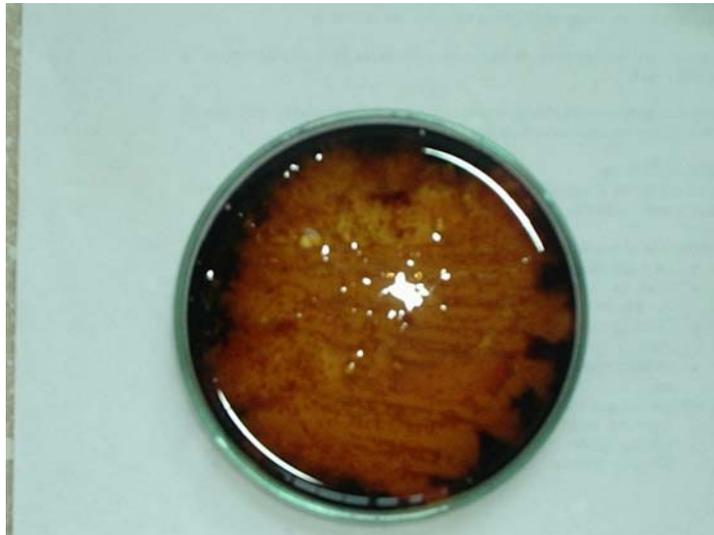
Los resultados obtenidos de las fermentaciones, y las pruebas realizadas a la enzima aislada se presentan a continuación.

3.1 DETERMINACION DE LA ZONA DE HIDROLISIS

La zona de hidrólisis se determinó adicionando lugol liquido a el agar LB con 2% en el cual se había sembrado la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 21556 120 horas antes.

La α -amilasa presente rompe la cadena de almidón obteniendo dextrinas que no reaccionan con el lugol. El color original del reactivo, al contacto con el almidón cambia a morado oscuro. (ver figura 9)

Figura 9. Zona de hidrólisis del *Bacillus subtilis* ATCC 21556 en agar LB con 2% de almidón



3.2 MEDIOS LIQUIDOS DE LAS FERMENTACIONES

Los medios líquidos y las fermentaciones fueron realizados según la metodología, numeral 2.4, además de esto se modifico el medio **E1** con un 4% de almidón en su formulación, manteniendo en igual proporción los demás componentes. El nuevo

medio obtenido fue denominado **E1 modificado** y su composición se puede ver en el cuadro 3

Cuadro 3. Composición medio líquido **E1 modificado**.

MEDIO	Composición	%
Medio experimental E1 Modificado	Lactosa	6.0
	Almidón	4.0
	KH ₂ PO ₄	0.2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0
	KCL	0.05
	MgSO ₄	0.001
	CaCL ₂	0.001
	Extracto de levadura	1.0
	Extracto de maní	1.0
Tw een 80	0.01	

Cuadro 4. Actividad amilolítica, pH y biomasa de los medios líquidos después de 70 horas de fermentación.

MEDIO E1	Tiempo (h)	AA	pH	Biomasa (g)
	70	2,35	5,9	0,182
	70	2,01	6	0,145
	70	1,98	6	0,167
MEDIO E1 MODIFICADO	Tiempo (h)	AA	pH	Biomasa (g)
	70	2,14	6	0,154
	70	2,03	5,8	0,165
	70	2,12	5,8	0,164
MEDIO LOPEZ MODIFICADO	Tiempo (h)	AA	pH	Biomasa (g)
	70	1,98	6	0,178
	70	2,13	5,8	0,154
	70	2,45	5,9	0,164

Los resultados de las fermentaciones con los medios líquidos seleccionados (ver cuadro 4) mostraron que la actividad, pH y biomasa no varía uno del otro significativamente, por lo que se decidió hacer las pruebas de tiempo óptimo con los tres medios.

3.3 TIEMPO ÓPTIMO DE FERMENTACIÓN.

La metodología para determinar el tiempo óptimo de fermentación con el fin de obtener una mejor actividad amilolítica de la enzima se presenta en el numeral 2.6.1 En los cuadros 5, 6 y 7 se observan los resultados de los parámetros de fermentación como el pH y la biomasa, además se graficaron contra el tiempo,

Cuadro 5. Fermentación realizada con el medio liquido **E1**

Tiempo (horas)	AA/g	pH	Biomasa (g)
18	0,855	5,9	0,047
21	1,265	5,8	0,061
35	2,264	5,8	0,064
43	2,847	5,7	0,068
45	3,104	5,7	0,074
74	3,907	5,8	0,083
120	4,657	5,7	0,09
144	3,987	5,7	0,136

Cuadro 6. Fermentación realizada con el medio liquido **E1 modificado**

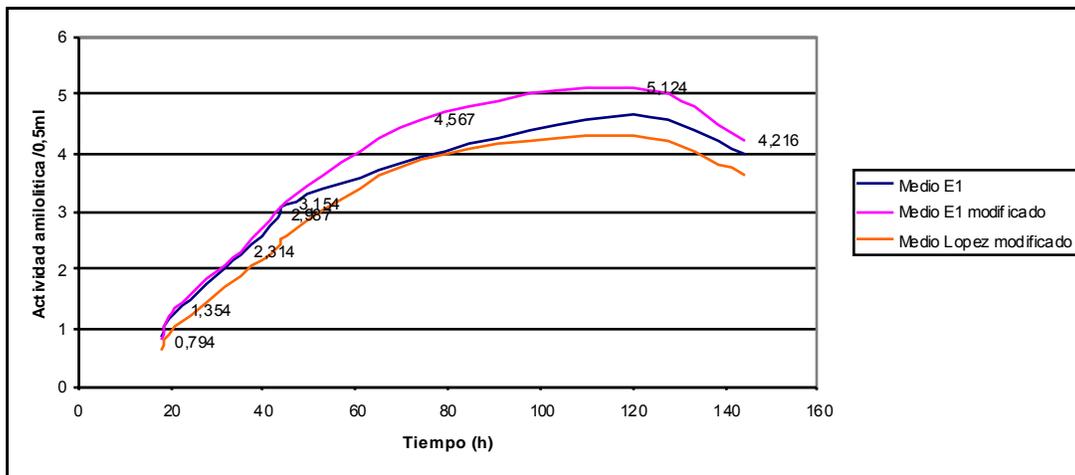
Tiempo (horas)	AA/g	pH	Biomasa (g)
18	0,794	5,9	0,034
21	1,354	5,9	0,042
35	2,314	5,7	0,058
43	2,987	5,7	0,078
45	3,154	5,7	0,083
74	4,567	5,6	0,099
120	5,124	5,6	0,101
144	4,216	5,5	0,115

Cuadro 7. Fermentación realizada con el medio liquido **López modificado**

Tiempo (horas)	AA/g	pH	Biomasa(g)
18	0,647	6	0,021
21	1,025	6	0,038
35	1,897	6	0,049
43	2,345	5,9	0,064
45	2,579	5,8	0,079
74	3,897	5,8	0,089
120	4,298	5,7	0,106
144	3,647	5,5	0,112

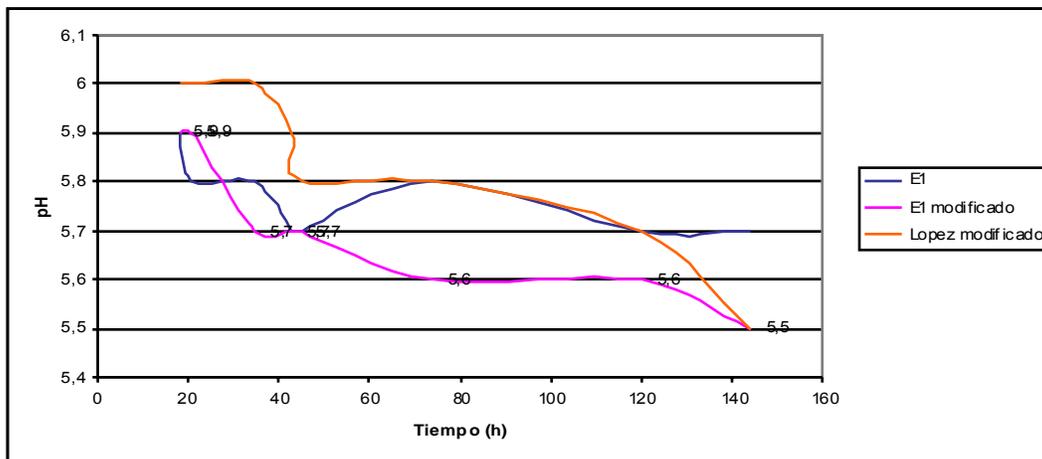
Se puede observar en la figura 10 que los picos mas altos de actividad amilolitica los encontramos entre la hora 100 y la 120, este último fue el tiempo escogido como parámetro de fermentación para las pruebas realizadas.

Figura 10. Actividad amilolitica en el tiempo de la fermentación con los medio líquidos seleccionados



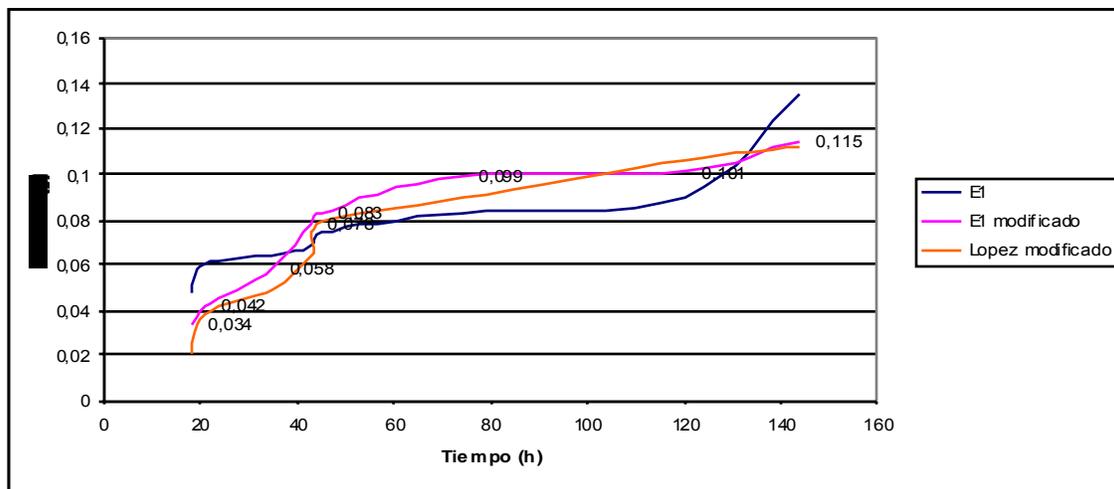
Los valores de pH van disminuyendo pero se encuentran entre un rango entre 5.5 y 6.0 como se muestra en la figura 11, esto se presenta por acción del metabolismo del microorganismo presente en el medio.

Figura 11. Variación de pH en el tiempo de la fermentación con los medios líquidos seleccionados.



Como se observa en la figura 12 la biomasa aumenta gradualmente a lo largo del tiempo de fermentación y tiende a estabilizar su crecimiento desde la hora 70.

Figura 12. Formación de biomasa en el tiempo de fermentación con los medios líquidos seleccionados.



Debido a la actividad amilolítica obtenida en la hora 120 en el medio **E1 modificado** la cual se observa en la figura 10 se opto por tomar este medio para el desarrollo de las siguientes fermentaciones, (los valores de actividad amilolítica, pH y formación de biomasa para este medio se encuentran sobre su serie de datos en las figuras 10, 11 y 12).

Las fermentaciones descritas en el cuadro 8 fueron realizadas bajo las condiciones descritas en la metodología numeral 2.4 aumentando la cantidad de medio a 2 L, y fue realizada en el biofermentador descrito en el numeral 2.5, el tiempo de fermentación fue seleccionado a partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores.

Cuadro 8. Fermentaciones realizadas con el medio líquido E1 modificado con el tiempo señalado de 120 horas.

Tiempo	AA/g	pH	Biomasa (g)
120	5,56	5,9	0,182
120	6.12	6,1	0,164

3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA ENZIMA

Se obtuvieron 1.4 L de extracto enzimático los cuales fueron sometidos a los procedimientos descritos en la metodología, numeral 2.8. Como producto final se obtuvieron 65 g de enzima purificada, la cual presentó las siguientes características % humedad: 6.1%; % sólidos: 93.9%. Dicha enzima fue denominada por los autores como **MIX 2**

Figura 13. Agitación del extracto enzimático con los flocculantes



3.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMIOLITICA DE LA ENZIMA OBTENIDA

En el cuadro 9 se observa que la absorbancia, el porcentaje de almidón presente en el sustrato después de la hidrólisis y la actividad amilolítica de la muestra con la enzima TENASE es mayor a los resultados obtenidos con la enzima **MIX 2**.

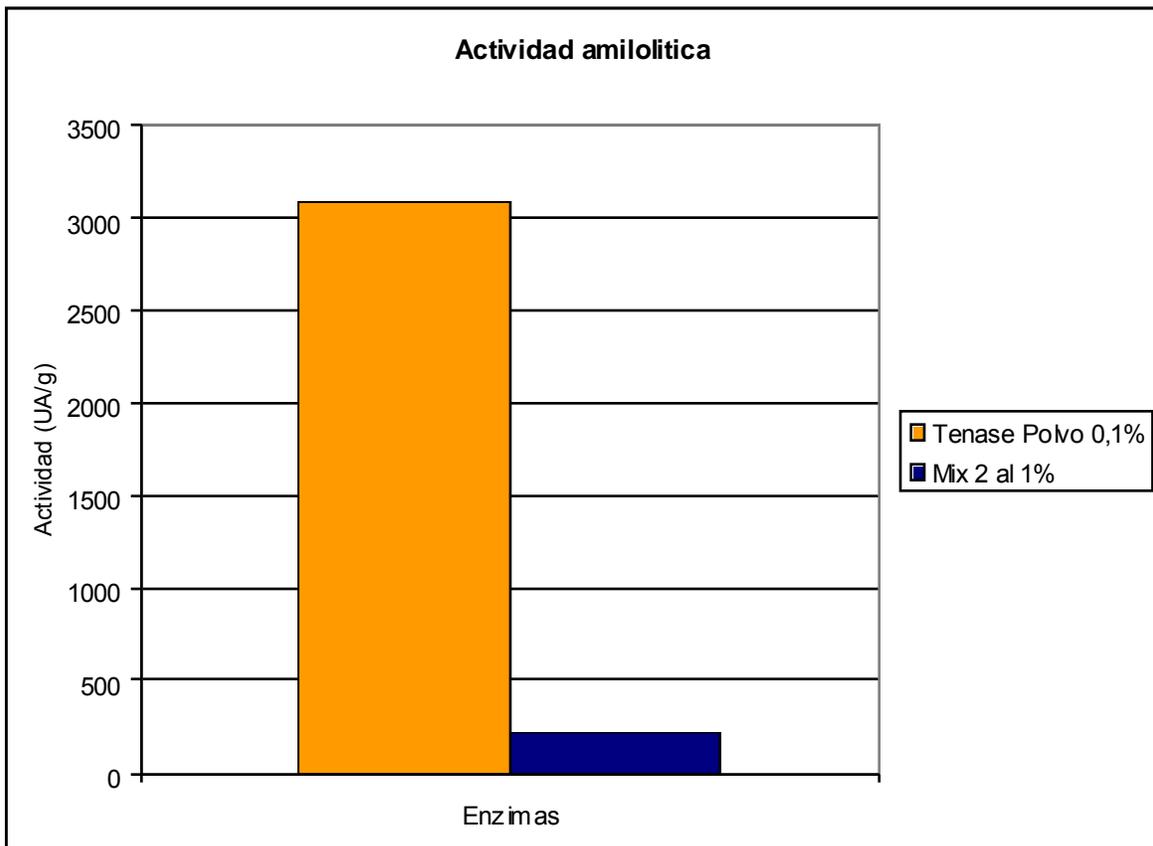
Cuadro 9. Actividad amilolítica. TENASE y **MIX 2**

ACTIVIDAD AMIOLITICA 10 MINUTOS

Enzima	Absorbancia	% almidon	C	AA	AA/g
Tenase polvo al 0,1%	0,278	0,0036	0,012852665	15,44758621	3089,51724
Mix 2 al 1%	0,024	0,0036	0,092476489	10,91648276	218,329655

En la figura 14 se puede observar que la actividad de la enzima comercial es 10 veces mayor a la actividad de la enzima **MIX2**.

Figura 14. Actividad amilolítica de las enzimas TENASE y **MIX 2** en UA/g



3.6 DETERMINACION DE ALMIDÓN HIDROLIZADO

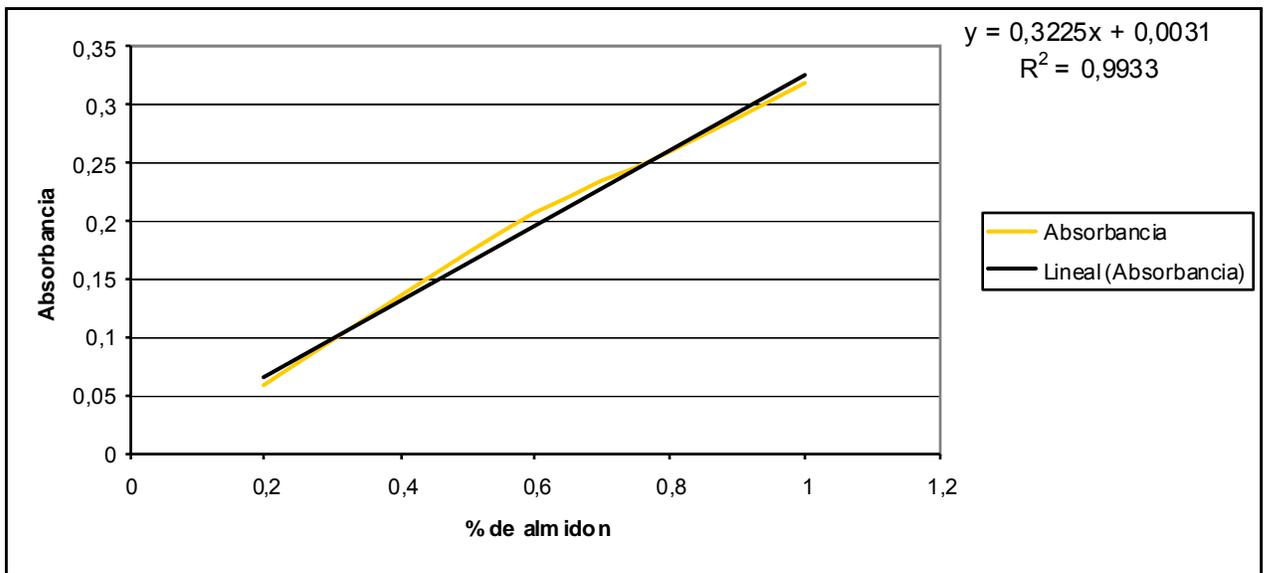
Para la determinación del almidón hidrolizado por la enzima, es necesario tener una herramienta que permita relacionar la absorbancia con el porcentaje de almidón presente en la muestra (almidón residual). El cuadro 10, muestra las lecturas obtenidas en el espectrofotometro de las muestras con diferentes porcentajes de almidón a 656 nm, de esta manera se deduce una relación lineal bajo la ecuación $Y=0.3225X+0.0031$ donde **X** corresponde al porcentaje de almidón y **Y** la lectura de la absorbancia. De esta manera para cada lectura de absorbancia se halla un porcentaje de almidón útil para la determinación de la

velocidad de hidrólisis. En la figura 15 se puede observar dicha relación entre concentración de almidón y absorbancia.

Cuadro 10. Curva de concentración almidón vs. Absorbancia

% de almidón	g de almidón	Absorbancia
1	0,1	0,319
0,8	0,08	0,261
0,6	0,06	0,207
0,4	0,04	0,138
0,2	0,02	0,058

Figura 15. Curva para la determinación del porcentaje de almidón presente en una solución.



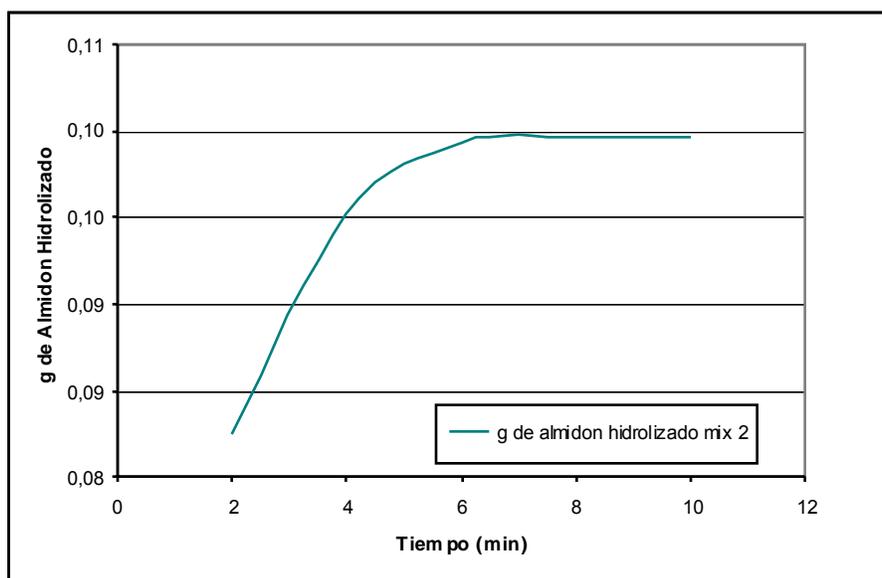
3.6.1 Almidón hidrolizado usando enzima MIX 2. Para el desarrollo de esta prueba se peso 1g de enzima liofilizada y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 100 mL, el procedimiento continua según lo descrito para medición de actividad amilolitica.

Cuadro11. Almidón hidrolizado en mg utilizando las enzimas **MIX2**

Tiempo (minutos)	Absorbancia	almidón Hidrolizado g	% de almidón hidrolizado
2	0,059	0.08240	82.4
4	0,015	0.09527	95.2
6	0,003	0.09940	99.4
8	0,002	0.09964	99.6
10	0,002	0.09964	99.6

El cuadro 11 y la figura 16 muestran la cantidad de almidón hidrolizado por la enzima **MIX 2** durante 10 minutos, se observa que a los 6 minutos hidrolizó el 99.4% del almidón presente en sustrato.

Figura 16. Cantidad total de almidón hidrolizado en 10 minutos usando 5mL de enzima **MIX 2**



3.6.2 Variación de la cantidad total de almidón hidrolizado para diferentes concentraciones de enzima MIX 2. Para el desarrollo de esta prueba se utilizó la metodología descrita en el numeral 2.10.2 variando la concentración de enzima. En el cuadro 12 se observa que la hidrólisis del almidón es muy alta hasta el minuto 4, pero desde este punto hasta los 20 minutos la hidrólisis se hace muy lenta aumentado en menos de 10mg de almidón hidrolizado.

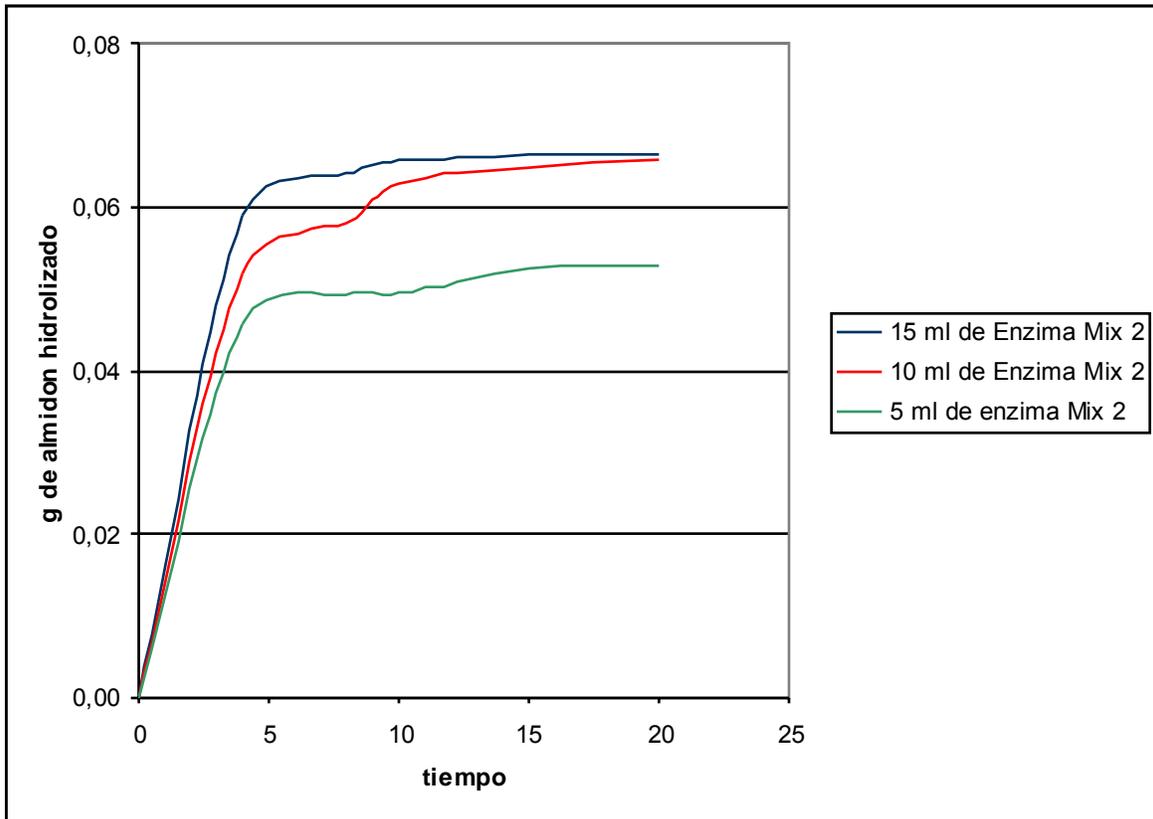
Cuadro 12 Variación en la cantidad de enzima **MIX 2** y su efecto en la cantidad de almidón hidrolizado

mL de Enzima	Tiempo	Absorbancia	g de almidón hidrolizado	% de almidón hidrolizado
15 mL	0	0,548	0	0
	4	0,209	0,0589	58
	8	0,204	0,0641	64
	10	0,189	0,0657	65
	15	0,181	0,0664	66
	20	0,18	0,0665	66
10 mL	0	0,548	0	0
	4	0,264	0,052	52
	8	0,256	0,058	58
	10	0,204	0,0629	62
	15	0,193	0,0649	64
	20	0,19	0,0656	65.6
5 mL	0	0,548	0	0
	4	2,89	0,0456	45
	8	0,28	0,0491	49
	10	0,278	0,0495	49
	15	0,262	0,0524	52
	20	0,259	0,0529	52

La figura 17 muestra que la velocidad se ve afectada por la cantidad de enzima adicionada pero tanto la prueba realizada con 10 mL como la realizada con 15 mL de enzima presentan una hidrólisis de almidón muy semejante, se puede decir que la mayor hidrólisis se presenta dentro de los 6 primeros minutos y que la velocidad de hidrólisis permanece constante hasta el final de la hidrólisis.

La cantidad de almidón hidrolizado con 15, 10 y 5 mL de enzima fue de 66, 62 y 49mg respectivamente.

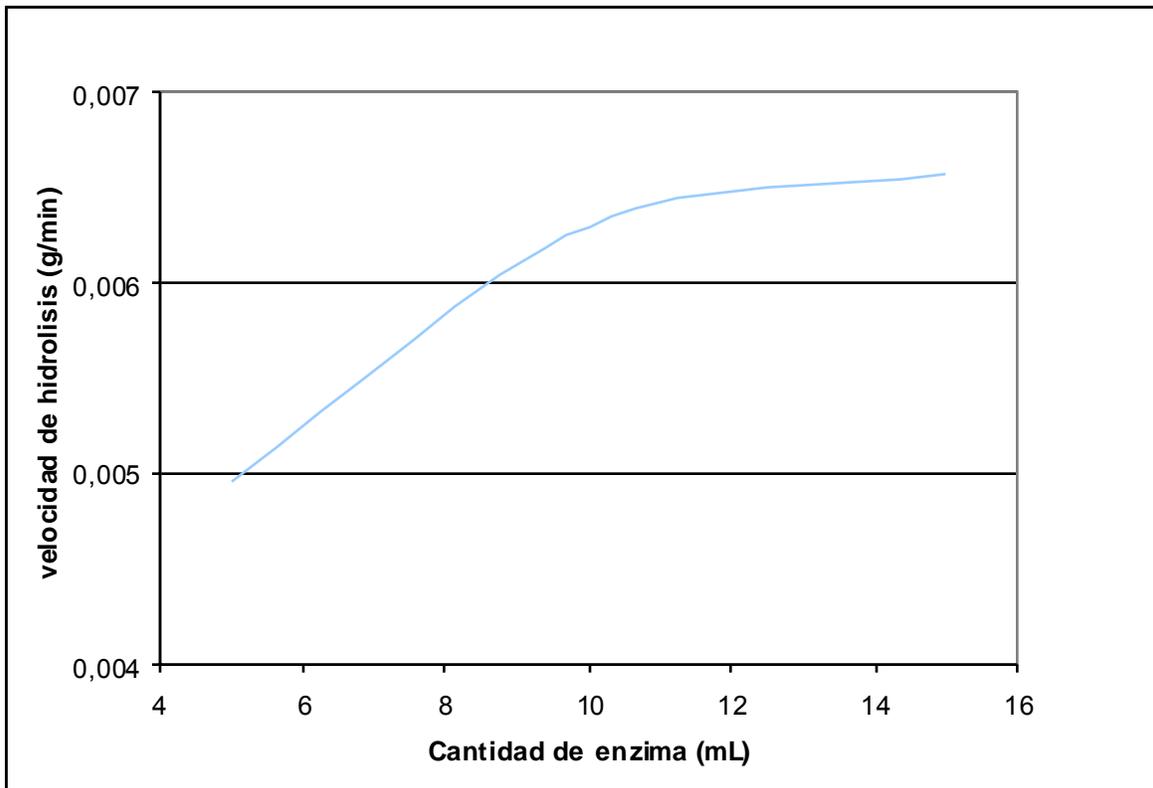
Figura 17. Hidrólisis de almidón con 15, 10 y 5 mL de enzima **MIX 2**



3.6.3 Velocidad de hidrólisis del almidón para la acción de la enzima MIX 2.

Para la determinación de la velocidad de hidrólisis se tomaron los valores señalados en color amarillo de la cuadro 12 (g de almidón hidrolizado) y se dividieron entre el tiempo, en este caso fue de 10 minutos, La figura 18 indica de forma mas clara la relación existente entre la velocidad y la concentración de enzima.

Figura 18. Velocidad de hidrólisis del almidón variando la concentración de enzima.



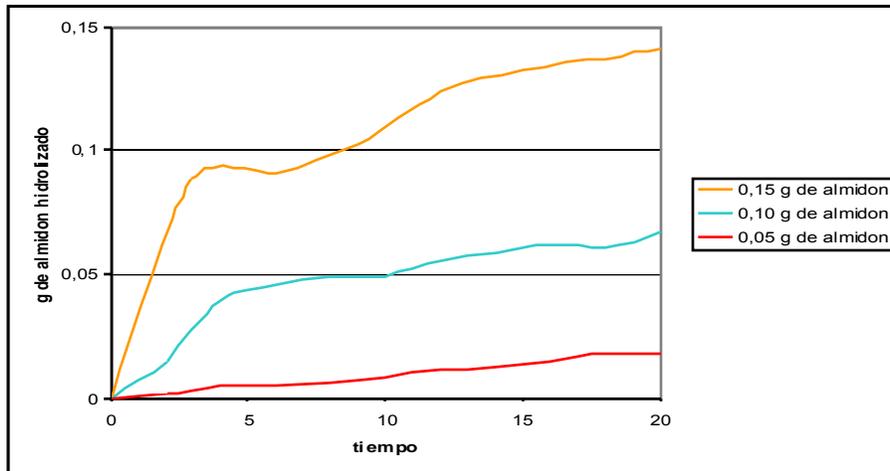
3.6.4 Variación de la cantidad total de almidón hidrolizado para diferentes concentraciones de almidón en el sustrato. Para el desarrollo de esta prueba se utilizó la metodología descrita en el numeral 2.10.2 variando la cantidad de almidón, así para 50mg de almidón se agregan 5mL de solución de almidón al 1%, para 150mg se agregan 15ml de solución. En el cuadro 13 se observa que la hidrólisis del almidón está alrededor del 96% para la muestra que tenía 150 mg de almidón, mientras que la muestra que tenía 50 mg de almidón lo hidrolizó en un 36%.

Cuadro 13. Cantidad de almidón hidrolizado variando la concentración de este en el sustrato.

mg de almidón	Tiempo	Absorbancia	g de almidón hidrolizado	% de almidón hidrolizado
15 mg	0	0.821	0	0
	3	0,339	0.088	0.088
	6	0,325	0.090	0.090
	9	0,262	0.10	0.10
	12	0,146	0.12	0.12
	15	0,097	0.13	0.13
	18	0,072	0.137	0.137
	20	0,047	0.141	0.141
10 mg	0	0.548	0	0
	2	0,465	0.015	0.015
	4	0,333	0.039	0.039
	6	0,298	0.045	0.045
	8	0,284	0.048	0.048
	10	0,279	0.049	0.049
	12	0,243	0.055	0.055
	14	0,226	0.058	0.058
	16	0,208	0.062	0.062
	18	0,187	0.066	0.066
	20	0,18	0.067	0.067
5 mg	0	0.274	0	0
	2	0,268	0,0012	0,0012
	4	0,251	0,0043	0,0043
	6	0,243	0,0058	0,0058
	8	0,239	0,0065	0,0065
	10	0,226	0,0089	0,0089
	12	0,216	0.0107	0.0107
	14	0,208	0.0122	0.0122
	16	0,194	0.0148	0.0148
	18	0,178	0.0177	0.0177
	20	0,175	0.0182	0.0182

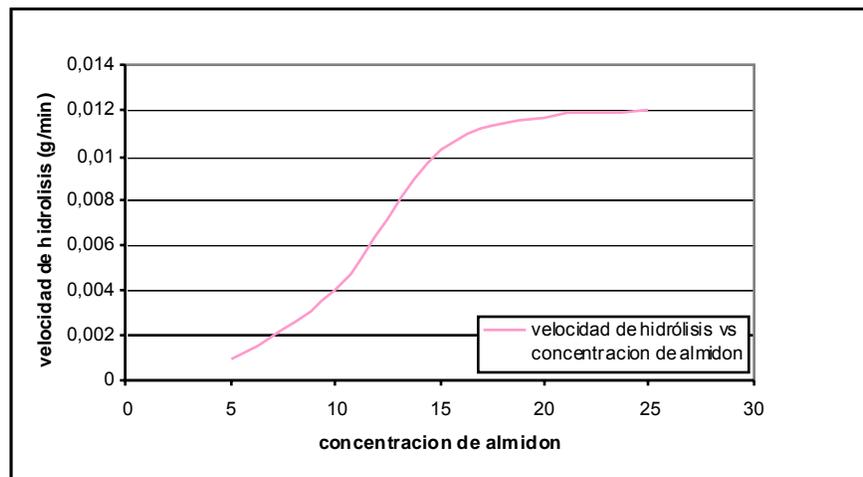
La figura 19 ilustra las variaciones en la cantidad de gramos de almidón hidrolizados en función de la cantidad de almidón disponible en el sustrato, es decir si en el sustrato hay gran cantidad de almidón la enzima es capaz de hidrolizarlo, no obstante un sustrato con alta concentración de almidón provoca una reducción de la velocidad de hidrólisis como se muestra en el numeral 3.6.5.

Figura 19. Cantidad de almidón hidrolizado variando la concentración de este en el sustrato..



3.6.5 Velocidad de hidrólisis del almidón para diferentes concentraciones de almidón en el sustrato. Para la determinación de la velocidad de hidrólisis se tomaron los valores señalados en color amarillo del cuadro 13 (mg de almidón hidrolizado) y se dividieron entre el tiempo, en este caso fue de 12 minutos. En la Figura 20 se observa que la velocidad de hidrólisis es muy alta con 15 mg de almidón, y esta se estabiliza hasta el punto de hidrolizar la misma cantidad de almidón por minuto, esto indica que una cantidad excesiva de almidón en el sustrato afecta la velocidad de hidrólisis.

Figura 20. Velocidad de hidrólisis VS concentración de almidón (mg)



4. APLICACIÓN DE LA α -AMILASA BACTERIANA Y FUNGICA EN PRUEBAS DE PANIFICACION

Una vez aislada y purificada la enzima, se procede a su aplicación en una harina de trigo Canadiense duro blanco suministrada por la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. para panificación la cual tiene las siguientes características: ceniza 0.52%, humedad 14.8%, gluten húmedo 29.43%, gluten seco 10.67%, proteína en base húmeda 2% y número de caída de 705 segundos.

4.1 DENOMINACION DE LAS PRUEBAS REALIZADAS

Para la evaluación de la actividad amilolítica y sus efectos sobre el pan se realizaron pruebas que corresponden a diferentes dosificaciones de cada una de las siguientes enzimas:

- **MIX 2:** α -amilasa bacteriana obtenida por los autores
- **TENASE:** α -amilasa bacteriana perteneciente a la casa comercial MERQUIAND.
- **GRYNDAMIL:** α -amilasa fúngica de la casa comercial DANISCO utilizada por la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A.

En el cuadro 14 muestra las diferentes dosificaciones de cada una de las enzimas mencionadas anteriormente así:

Cuadro 14. Denominación de las enzimas usadas en las pruebas de panificación

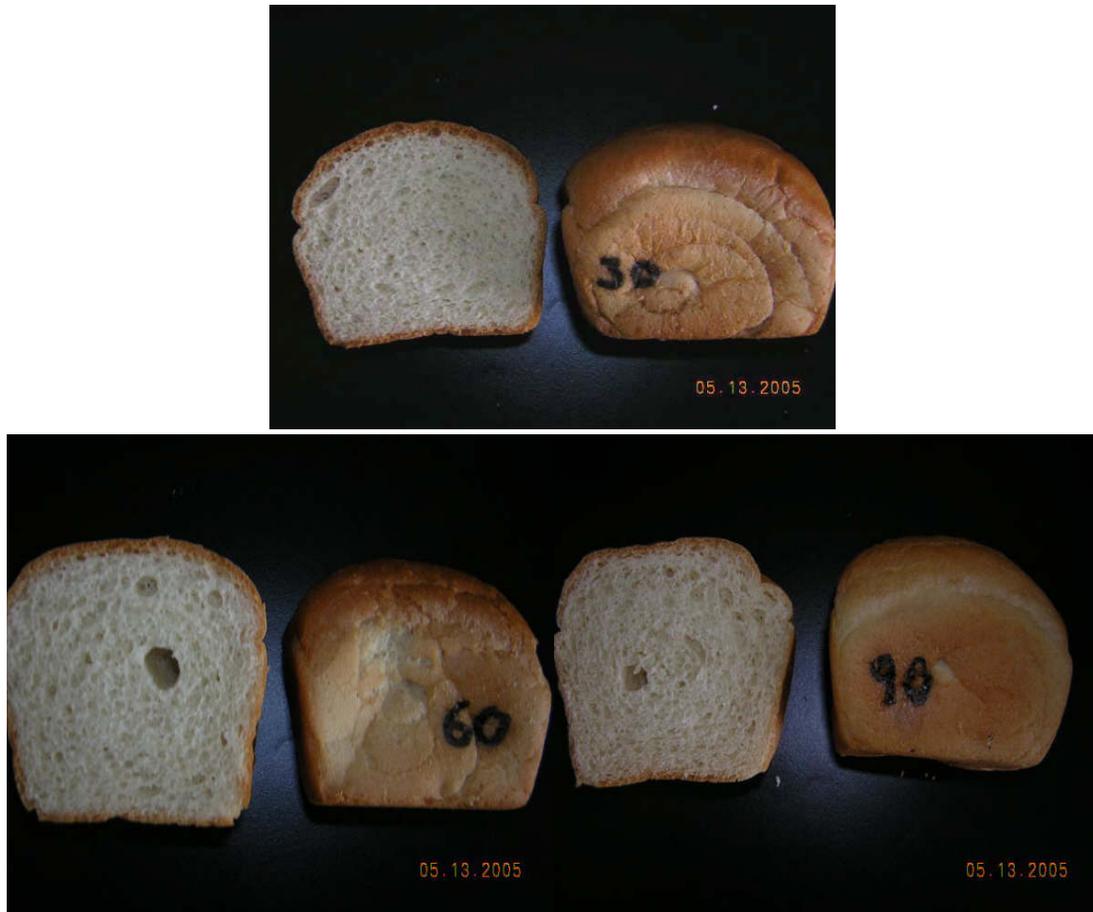
Enzima	Denominación
30 ppm de enzima MIX 2	30
60 ppm de enzima MIX 2	60
90 ppm de enzima MIX 2	90
30 ppm de enzima comercial TENASE	30T
60 ppm de enzima comercial TENASE	60T
90 ppm de enzima comercial TENASE	90T
30 ppm de enzima comercial GRYNDAMIL	30F
60 ppm de enzima comercial GRYNDAMIL	60F
90 ppm de enzima comercial GRYNDAMIL	90F
45 ppm MIX 2 + 45 ppm GRYNDAMIL	45FM
60 ppm MIX 2 + 60 ppm GRYNDAMIL	60FM
45 ppm TENASE + 45 ppm GRYNDAMIL	45FT
60 ppm TENASE + 60 ppm GRYNDAMIL	60FT
30ppm TENASE con mejorantes	T+
90ppm MIX 2 con mejorantes	M+
Patrón sin enzimas ni mejorantes	P
Patrón GRYNDAMIL PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. con mejorantes	MM

4.2 EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE PANIFICACION SIN MEJORANTES

El desarrollo de las muestras evaluadas se hace según el numeral 2.12 para muestras que contengan enzima ya sea α -amilasa fúngica o bacteriana sin mejorantes.

En la figura 21 se observa el pan que fué elaborado con harina adicionada con 30 y 60 ppm de enzima **MIX 2** presenta una miga cerrada, uniforme, no gomosa, además se puede decir que estas características fueron superiores en las muestras elaboradas con 90ppm de enzima **MIX 2**.

Figura 21. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de α -amilasa bacteriana **MIX 2**. Sin mejorantes.



De la figura 22 se puede decir que el pan que fue elaborado con harina adicionada con TENASE presenta una miga abierta, no uniforme, gomosa y de color crema haciéndose más notorio en las muestras que contenían 60 y 90 ppm de TENASE.

Figuras 22. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones con α -amilasa bacteriana TENASE de la casa comercial MERQUIAND. Sin mejorantes.



En la figura 23 se observa que las muestras en las que se utilizó la enzima GRYNDAMIL presenta una miga cerrada, uniforme, no gomosa y blanca. La muestra que presenta las mejores características es la denominada como 60F

Figuras 23. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones con α -amilasa fúngica GRYNDAMIL perteneciente al molino de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. Sin mejorantes.



La figura 24 hace referencia a las pruebas realizadas con mezclas de α -amilasas GRYNDAMIL y **MIX 2**, donde se observa que la mezcla de 45ppm de cada una de estas enzimas genera una miga muy abierta y poco uniforme, mientras que la mezcla de 60ppm da como resultado una miga cerrada, homogénea y de buen color.

Figura 24. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de la mezcla con α -amilasa Fúngica GRYNDAMIL de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. y α -amilasa bacteriana **MIX 2**



En la figura 25 muestra claramente que la mezcla de enzimas TENASE y GRYNDAMIL dio como resultado una miga abierta no uniforme y ligeramente gomosa para las dos dosificaciones de enzimas utilizadas.

Figura 25. Pruebas de panificación utilizando diferentes concentraciones de la mezcla con α -amilasa GRYNDAMIL de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. y α -amilasa bacteriana TENASE



La figura 26 ilustra la prueba realizada sin mejorantes ni enzimas, dicha prueba tuvo una miga muy abierta de color crema, gracias a esta prueba se puede decir que las enzimas aplicadas en el desarrollo de este trabajo de grado tuvieron un efecto notable en las características de la miga.

Figura 26. Muestra patrón sin adición de enzimas ni mejorantes.



El uso de la enzima **MIX 2** da como resultado una miga de mejor color en comparación con la α -amilasa fúngica y proporciona una mejor textura y miga que con el uso de la TENASE. Las muestras que fueron realizadas adicionando 30, 60 y 90 ppm de TENASE presentaron una textura gomosa localizada especialmente en el centro del pan, además el endurecimiento de la miga fue similar al obtenido con las otras enzimas. El color de la miga no varió en ninguna de las muestras a lo largo del periodo de almacenamiento.

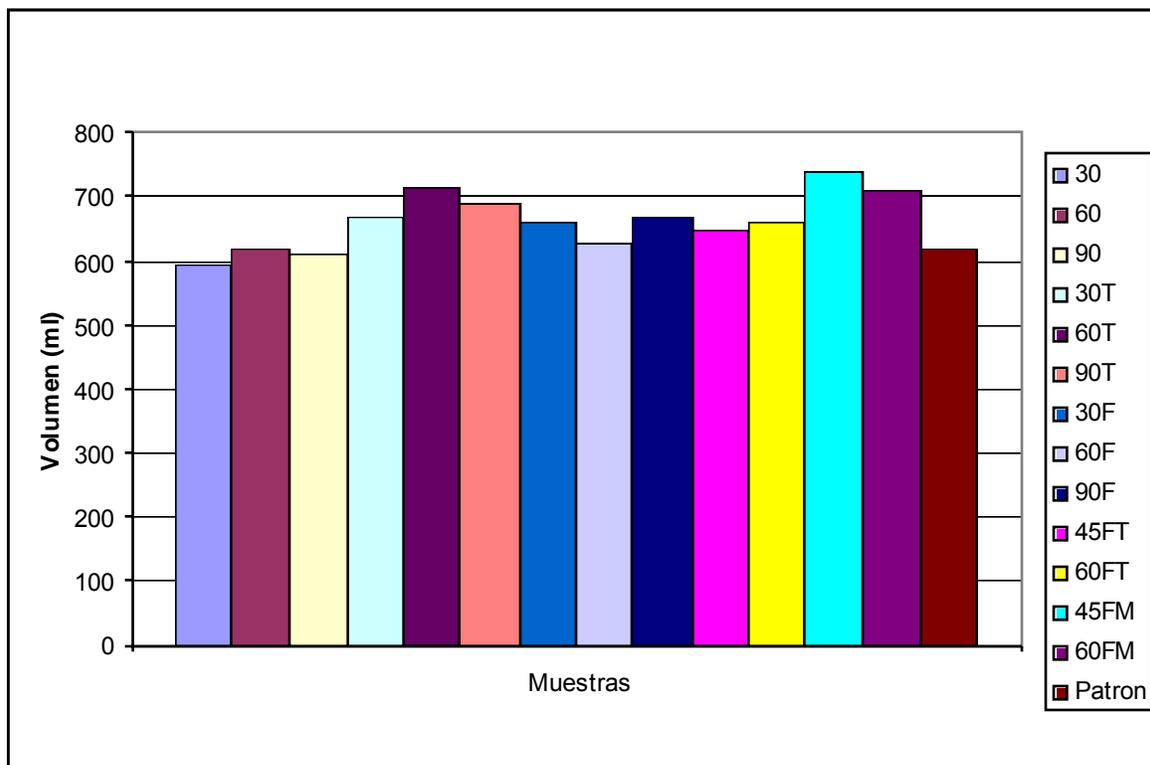
Los resultados obtenidos en las pruebas indican que el uso de α -amilasa bacteriana comercial TENASE no cumple con los estándares de calidad para panificación adoptados por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. por presentar en algunas muestras una gomosidad excesiva en la miga y una mala sinergia de enzimas cuando se utilizaron mezclas de estas. No hay una diferencia considerable en los resultados de las mezclas de las tres enzimas por lo que no se hizo indispensable la elaboración de una muestra con mezcla de enzimas y mejorantes.

Volumen Podemos observar en el cuadro 15 que los volúmenes de las muestras varían entre 592.1 y 737.4 cm³ pero no hay una diferencia notable entre los volúmenes obtenidos con α -amilasa bacteriana, fúngica y mezclas de estas. La figura 27 muestra la variación de volumen entre las muestra que no contenían mejorantes, se observa que las pruebas realizadas con enzima **MIX 2** tuvieron volúmenes menores a los demás, siendo el mas alto el de la prueba denominada 45FM.

Cuadro 15. Volumen (cm³) y altura (cm) de las pruebas sin mejorantes.

Muestra	Volumen (cm³)	Altura (cm)
30	592,1	6.7
60	616,3	7.2
90	610,4	6.8
30T	670,6	7.2
60T	713,0	7.7
90T	691,0	7.5
30F	657,6	6.8
60F	626,6	6.6
90F	668,6	6.6
45FT	649,7	6.6
60FT	658,6	7.1
45FM	737,4	7.1
60FM	709,1	7.2
Patrón	619,7	7.1

Figura 27. Volumen de las muestras sin mejorantes.



4.3 EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE PANIFICACION CON MEJORANTES

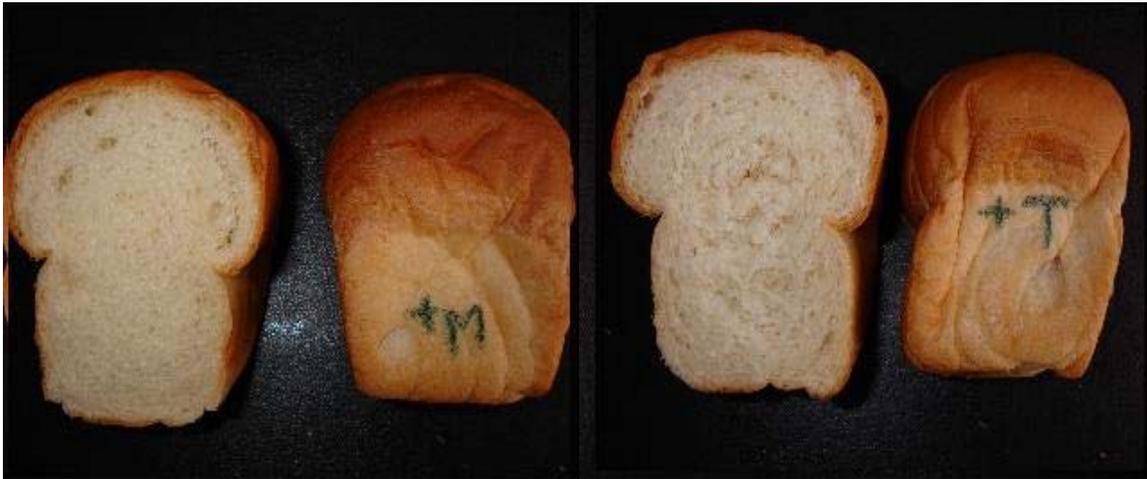
El desarrollo de las muestras evaluadas se hace usando 100 ppm de ácido ascórbico, 50 ppm de peróxido de calcio y 80 ppm de xilanas, para las muestras que contengan enzima ya sea α -amilasa fúngica o bacteriana con mejorantes.

La evaluación se desarrolló según lo enunciado en el numeral 2.14, que señala los parámetros como el color de la miga, volumen, altura, uniformidad de la miga y gomosis de esta. Dicha evaluación se desarrolló con la colaboración de panelistas entrenados de la empresa PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A.

En la figura 28 se observa que la muestra elaborada con **MIX 2** da como resultado una miga mucho más uniforme y cerrada que la muestra elaborada con TENASE, la cual presenta una ligera gomosis en la miga, esto se debe a la baja concentración de enzima utilizada (30ppm) ya que en pruebas anteriores no

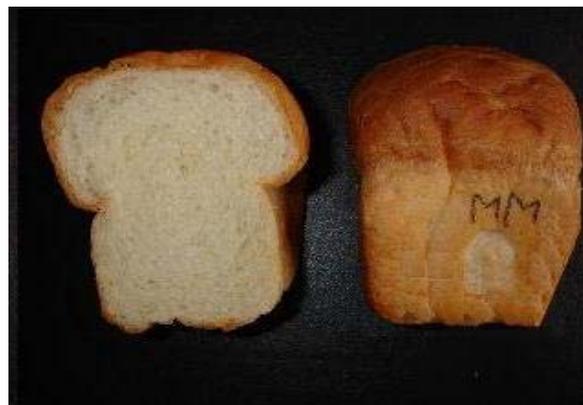
presentaba una gomosis crítica como si se evidenciaba con la utilización de las otras concentraciones de enzima (60 y 90 ppm) en las primeras pruebas.

Figura 28. Prueba de panificación **MIX 2 Y TENASE** elaboradas con mejorantes.



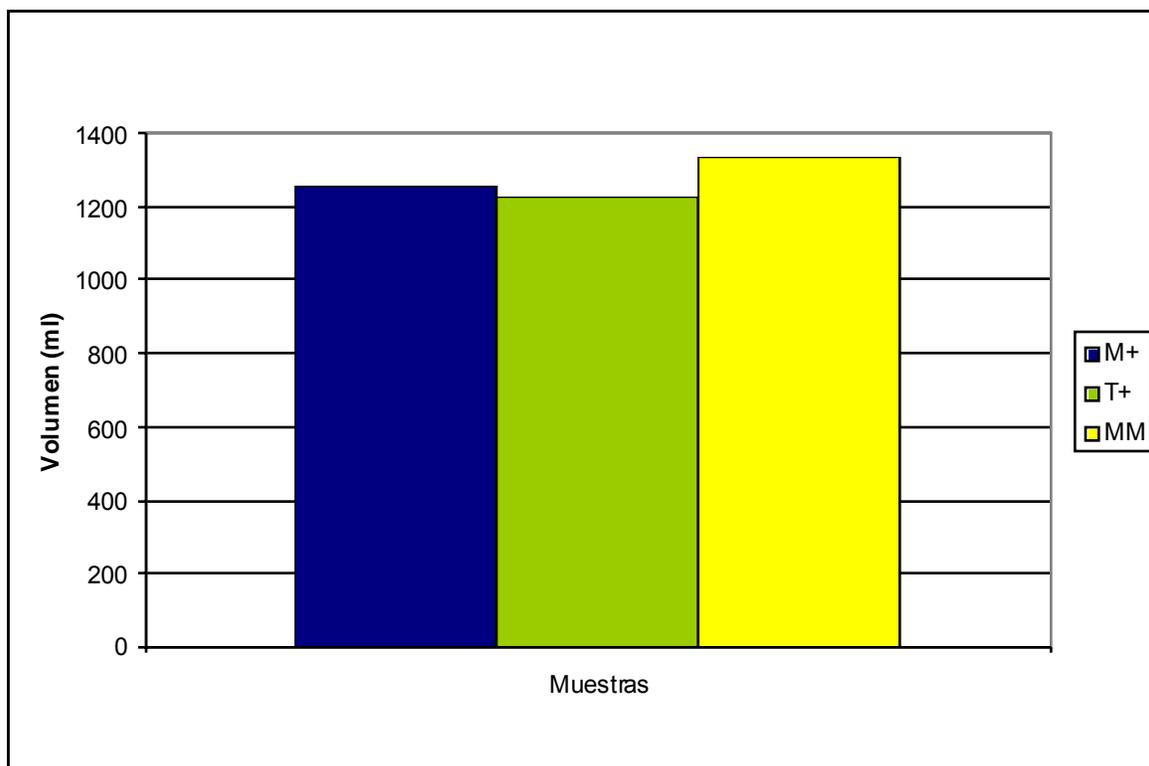
En la figura 29 se observa una miga muy uniforme, cerrada, de color blanco, que satisface los parámetros establecidos por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A., sin embargo no se persive una gran diferencia entre dicha muestra y la muestra elaborada con **MIX 2** y todos los mejorantes. Su diferencia mas notable fue la del volumen, del cual se hablara mas adelante en el numeral 4.4.

Figura 29. Prueba de panificación elaborada con GRYNDAMIL y todos los mejorantes en las proporciones sugeridas por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A.



Volumen Las pruebas realizadas con mejorantes fueron superiores en casi un 100% a los volúmenes de las muestras sin ellos, evidenciando así que la relación entre el volumen y el uso de la enzima no es tan influyente como si lo es el uso de los mejorantes.

Figura 30. Volumen de las muestras elaboradas con mejorantes.



Cuadro 16. Volumen (cm³) y altura (cm) de todas las pruebas de panificación con mejorantes

Muestra	Volumen (cm ³)	Altura (cm)
M+	1256,6	12
T+	1224,4	11.2
MM	1338,3	11.9

4.4 NUMERO DE CAÍDA USANDO AMILASA MIX 2 Y TENASE

Según la tendencia el número de caída para la harina con **MIX 2** fue de 265 y para la harina con TENASE fue de 142, lo anterior indica (según el anexo 2 Calculo de suplementacion de malta) que la harina adicionada con TENASE esta dentro del rango que indica un alto riesgo de pan con miga pegajosa, mientras que la harina adicionada con **MIX 2** esta en nivel óptimo para harinas de trigo para panificación, es de aclarar que el número de caída de la harina sin adición de enzima fue de 705.

4.5 CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.

Para la evaluación de textura de la miga en las muestras, se tuvieron en cuenta los parámetros sugeridos por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. Los análisis fueron realizados los días 1, 4, 5, 6, 7, 8, y 11, después de la elaboración de los panes. Los autores fueron previamente capacitados por el panadero industrial de PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A. para la evaluación de las muestras.

Cuadro 17. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con **MIX 2**

día	30 ppm	60 ppm	90 ppm
1	Suave	Suave	Suave
4	Suave	Suave	Suave
5	Semi-duro	Suave	Suave
6	Semi-duro	Semi-duro	Suave
7	Semi-duro	Semi-duro	Semi-duro
8	Duro	Duro	Semi-duro
11	Duro	Duro	Duro

Cuadro 18. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con TENASE

día	30ppm	60ppm	90ppm
1	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave
4	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave
5	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave
6	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro
7	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro
8	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro
11	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro

Cuadro 19. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con GRYNDAMIL

día	30ppm	60ppm	90ppm
1	Suave	Suave	Suave
4	Suave	Suave	Suave
5	Semi-duro	Semi-duro	Suave
6	Semi-duro	Semi-duro	Semi-duro
7	Semi-duro	Duro	Semi-duro
8	Duro	Duro	Duro
11	Duro	Duro	Duro

Cuadro 20. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con la mezcla de GRYNDAMIL y TENASE

día	45FT	60FT
1	Gomoso/Suave	Gomoso/Suave
4	Gomoso/Suave	Gomoso/semi duro
5	Gomoso/Suave	Gomoso/semi duro
6	Gomoso/semi duro	Gomoso/semi duro
7	Gomoso/semi duro	Gomoso/duro
8	Gomoso/semi duro	Gomoso/duro
11	Gomoso/semi duro	Gomoso/duro

Cuadro 21. Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con la mezcla de GRYNDAMIL Y MIX 2.

día	45FM	60FM
1	Suave	Suave
4	Suave	Semi-duro
5	Semi-duro	Semi-duro
6	Semi-duro	Semi-duro
7	Semi-duro	Semi-duro
8	Duro	Duro
11	Duro	Duro

Cuadro 22 Textura de la miga durante el almacenamiento en las muestras elaboradas con todos los mejorantes

día	MM	M+	T+
1	Suave	Suave	Gomoso/Suave
4	Suave	Suave	Gomoso/Suave
5	Suave	Suave	Gomoso/Suave
6	Suave	Suave	Gomoso/Suave
7	Suave	Semi-duro	Gomoso/Suave
8	Semi-duro	Semi-duro	Gomoso/Suave
11	Semi-duro	Semi-duro	Gomoso/Suave

Cuadro23. Textura de la miga durante el almacenamiento en la muestra patrón sin enzimas ni mejorantes.

día	Patrón
1	Suave
4	Semi-duro
5	Semi-duro
6	Duro
7	Duro
8	Duro
11	Duro

Las muestras que fueron tratadas con TENASE no presentaron un endurecimiento progresivo en la miga durante el periodo de almacenamiento, como si lo presentaron las muestras tratadas con α – amilasa fúngica y mezcla de estas (TENASE-GRYNDAMIL y GRYNDAMIL-MIX2). Esto se debe a la gomosidad

característica que da el uso de α -amilasa bacteriana en panadería y a una de sus ventajas la cual consiste en prolongar la vida útil del producto en condiciones normales de almacenamiento.

4.6 PERDIDA DE PESO EN LAS MUESTRAS ALMACENADAS

Se puede observar que en todos los ensayos de panificación después del día 8 de almacenamiento se produce un decrecimiento brusco en el peso de todas las muestras.

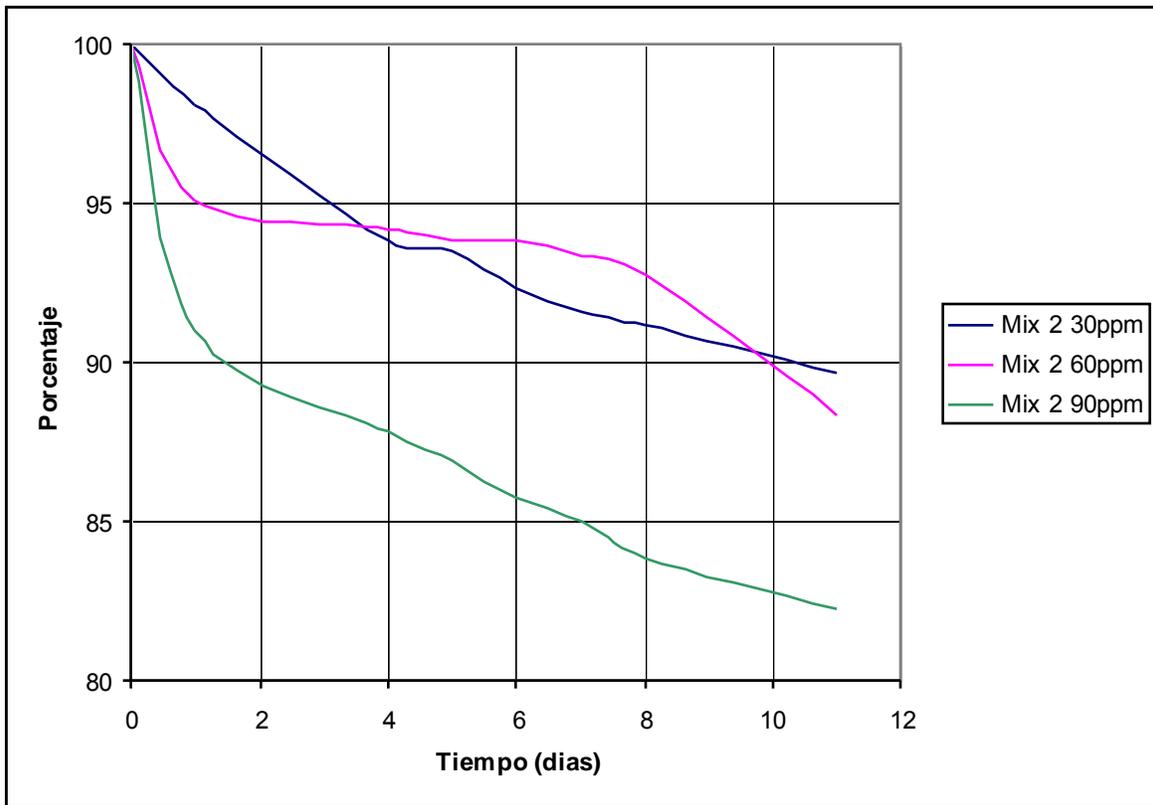
El cuadro 24 muestra la diferencia de pérdida de peso que hubo en cada una de las muestras denominadas como 30, 60 y 90 a lo largo del tiempo de almacenamiento, la pérdida de peso fue de 0.1848 gramos, 0.1347 gramos y 0.1924 gramos respectivamente.

Cuadro 24. Pérdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de MIX2

MIX 2	30	60	90
Día	%	%	%
0	0	0	0
1	1.9	4.8	8
4	6.1	5.7	12.1
5	6.4	6.1	13.1
6	7.6	6.2	14.2
7	8.3	6.6	14.9
8	8.8	7.2	16.1
11	10.3	11.6	17.7

La figura 31 toma como base el 100% como peso inicial de la muestra y su pérdida porcentual a lo largo del tiempo de almacenamiento, donde se observa que la pérdida porcentual fue mayor para la muestra que contenía 90ppm de enzima; se observa que el % de peso final de las muestras fue de 90% para la prueba 30, de 88 para la prueba 60 y de 82% para la prueba de 90, la pérdida de peso fue de 10%, 12% y 18% respectivamente.

Figura 31. Porcentaje de pérdida de peso usando diferentes concentraciones de MIX2



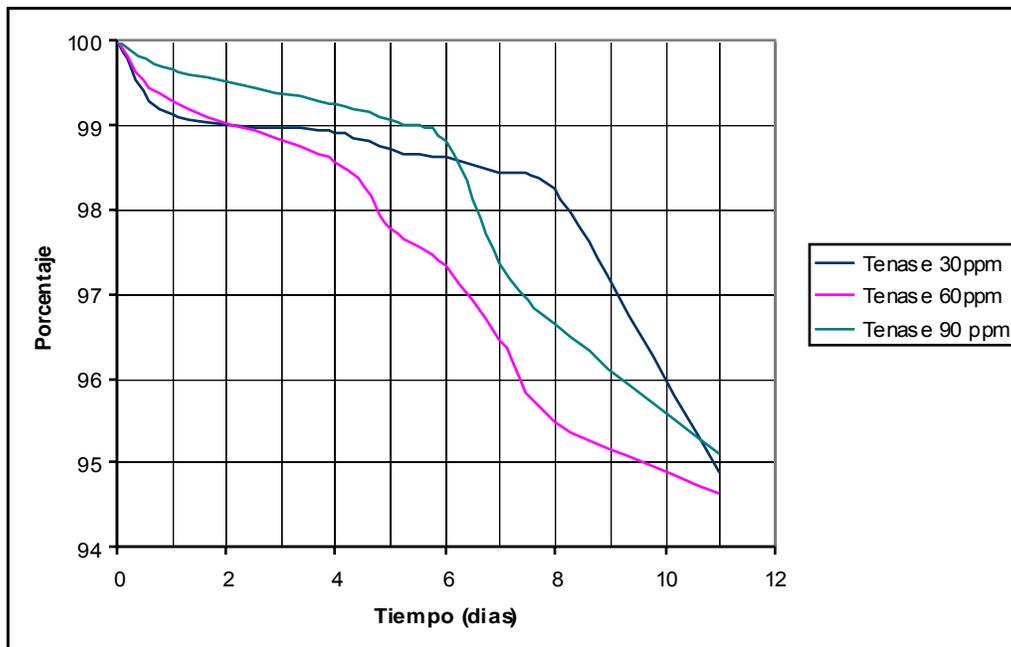
El cuadro 25 muestra la diferencia de la pérdida de peso porcentual que hubo en cada una de las muestras denominadas como 30T, 60T y 90T a lo largo del tiempo de almacenamiento, la pérdida de peso fue de 0.1182 gramos, 0.1306 gramos y 0.1743 gramos respectivamente

Cuadro 25. Perdida porcentual de peso con diferentes concentraciones de TENASE

TENASE	30T	60T	90T
Día	%	%	%
0	0	0	0
1	0.8	0.7	0.3
4	1.1	1.4	0.7
5	1.2	2.2	0.9
6	1.3	2.6	1.2
7	1.5	3.5	2.6
8	1.7	4.5	3.3
11	5.1	5.3	4.9

La figura 32 toma como base el 100% como peso inicial de la muestra y su perdida porcentual a lo largo del tiempo de almacenamiento, donde se observa que la perdida porcentual fue mayor para la muestra que contenía 60ppm de enzima, pero en estas la perdida de peso para las tres pruebas es muy similar en el día 11. El % de peso final respecto al inicial fue muy cercano al 95% para las tres pruebas señalando así que la perdida de peso fue inferior a lo ocurrido con la enzima **MIX 2**.

Figura 32. Perdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de TENASE



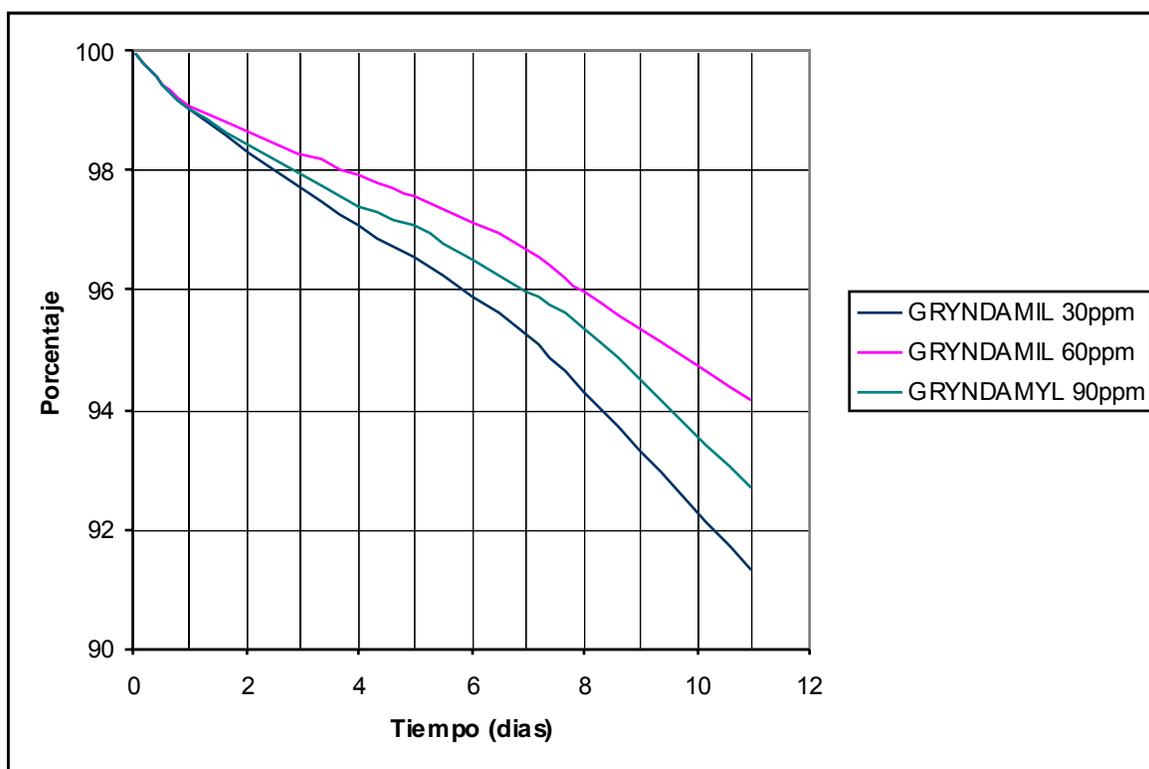
El cuadro 26 muestra la diferencia en perdida porcentual de peso que hubo en cada una de las muestras denominadas como 30F, 60F y 90F a lo largo del tiempo de almacenamiento, la perdida de peso fue de 0.1735 gramos, 0.1837 gramos y 0.174 gramos respectivamente.

Cuadro 26. Perdida porcentual de peso usando diferentes concentraciones de GRYNDAMIL

GRYNDAMIL	30F	60F	90F
Día	%	%	%
0	0	0	0
1	0.9	0.9	0.9
4	2.9	2.0	2.6
5	3.4	2.4	2.9
6	4.1	2.9	3.5
7	4.7	3.3	4.1
8	5.6	4.1	4.7
11	8.6	5.8	7.3

La figura 33 toma como base el 100% como peso inicial de la muestra y su perdida porcentual a lo largo del tiempo de almacenamiento, donde se observa que la perdida porcentual fue mayor para la muestra que contenía 30ppm de enzima, pero en estas la perdida de peso para las tres pruebas es muy similares en el día 11. El porcentaje de peso final varía entre el 94 y el 91% con respecto al peso inicial de cada una de las muestras.

Figura 33. Perdida de peso usando diferentes concentraciones de GRYNDAMIL



Las figuras 31, 32 y 33 muestran la perdida porcentual de peso desde el día 0 hasta el 11 para las muestras de enzima **MIX 2**, TENASE y GRYNDAMIL, donde observamos que la mayor perdida porcentual ocurre con la enzima **MIX 2** y la menor con la enzima TENASE.

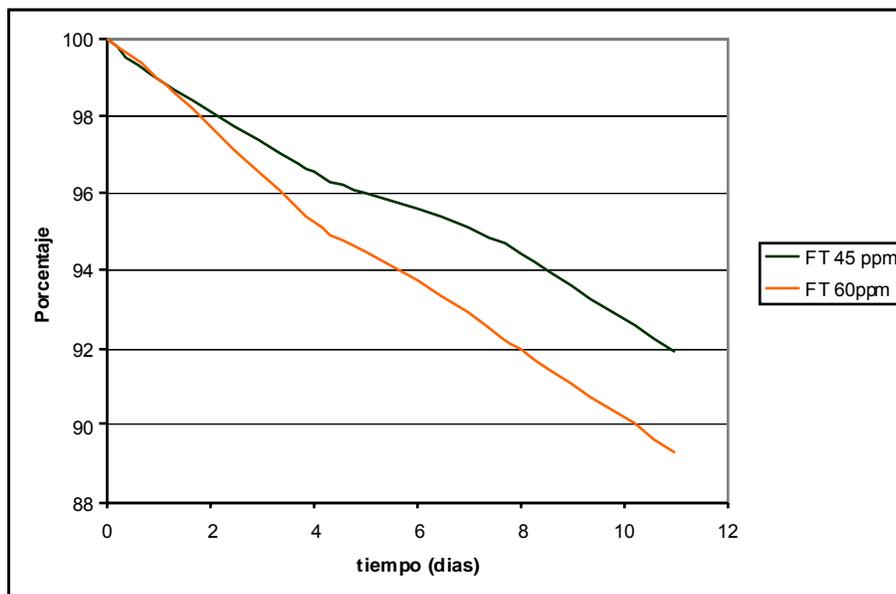
Cuadro 27. Pérdida porcentual de peso utilizando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y TENASE

Mezcla FT	45 ppm de mezcla	60ppm de mezcla
Día	%	%
0	0	0
1	1.9	1.5
4	4.5	2.4
5	5.2	3.0
6	6.0	3.2
7	6.9	3.5
8	7.9	4.1
11	12.1	8.1

El cuadro 27 muestra la diferencia en la pérdida porcentual de peso de la muestra 45FT y 60FT durante el periodo de almacenamiento donde la pérdida de peso fue de 0.1739 y 0.236 para cada una de las muestras.

La figura 34 muestra que el porcentaje de peso final con respecto al inicial para las muestras 45FM y 60FM fue de el 92 y 89% respectivamente

Figura 34. Pérdida de peso utilizando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y TENASE

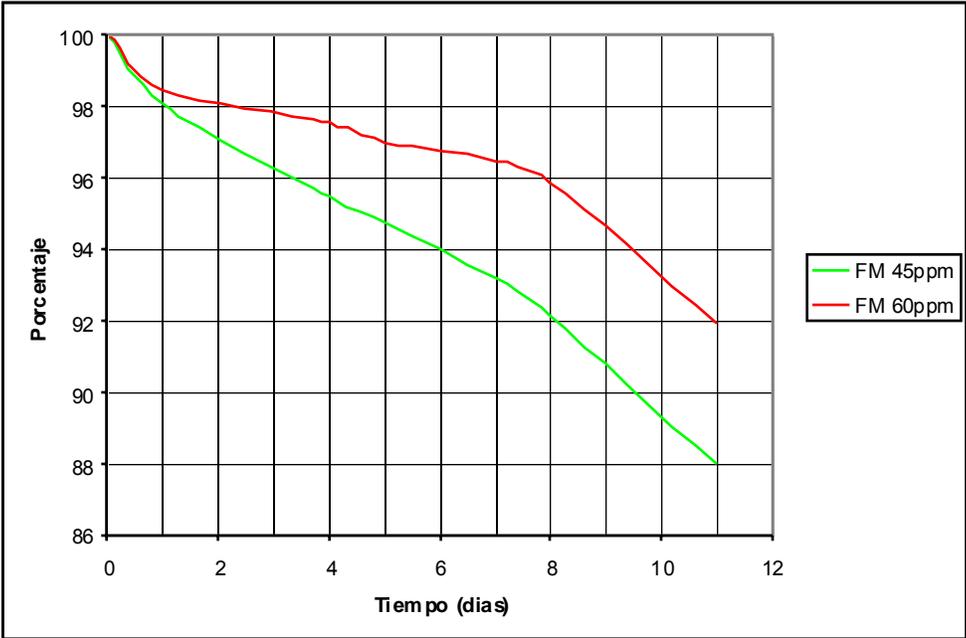


El cuadro 28 muestra la diferencia de peso de la muestra 45FM y 60FM durante el período de almacenamiento donde la pérdida de peso fue de 0.2562 y 0.1696 para cada una de las muestras.

Cuadro 28. Pérdida porcentual de peso utilizando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y **MIX 2**

Día	% 45ppm	% 60ppm
0	0	0
1	1.1	1.1
4	3.4	4.7
5	3.9	5.4
6	4.4	6.2
7	4.9	6.0
8	5.5	8.1
11	9.1	10.7

Figura 35. Perdida porcentual de peso utilizando diferentes concentraciones de la mezcla GRYNDAMIL y **MIX 2**



La figura 35 muestra que el porcentaje de peso final con respecto al peso inicial de las muestras 45FM y 60FM fue de 88 y 92% respectivamente.

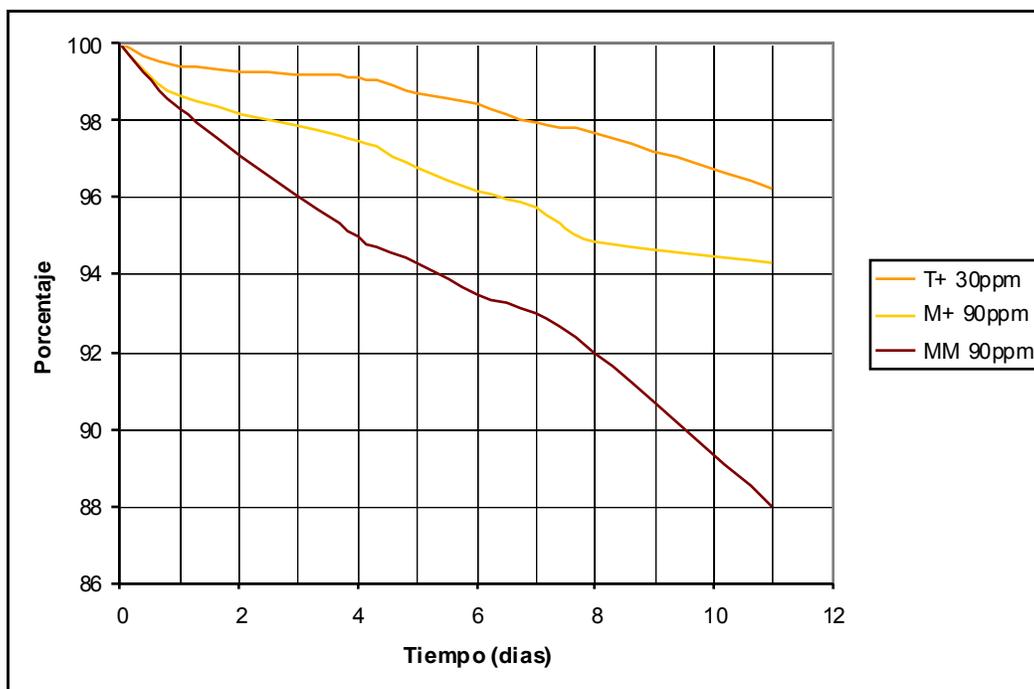
El cuadro 29 muestra la diferencia en la pérdida de porcentual de peso que hubo en cada una de las muestras denominadas como T+, M+ y MM a lo largo del tiempo de almacenamiento, la pérdida de peso fue de 0.1123 gramos, 0.1419 gramos y 0.2137 gramos respectivamente.

Cuadro 29. Pérdida porcentual de peso utilizando **MIX 2**, TENASE y GRYNDAMIL con mejorantes

Día	% T+	% M+	% MM
0	0	0	0
1	0.5	1.3	1.6
4	0.8	2.5	5.0
5	1.3	3.2	5.7
6	1.6	3.8	6.5
7	2.1	4.2	7.0
8	2.3	5.1	8.0
11	3.7	5.7	12

La figura 36 toma como base el 100% como peso inicial de las muestras y su pérdida porcentual a lo largo del tiempo de almacenamiento, donde se observa que la pérdida porcentual fue mayor para la muestra MM, en tanto que la muestra T+ presenta un peso final cercano al 96% del porcentaje original.

Figura 36. Perdida de peso utilizando **MIX 2**, TENASE y GRYNDAMIL con mejorantes



Cuadro 30. Perdida porcentual de peso de la muestra Patrón (sin enzimas ni mejorantes)

Día	%
0	0
1	0.5
4	1.4
5	1.6
6	2.1
7	2.2
8	2.7
11	5.8

En la figura 37 se observa que el porcentaje de peso final con respecto al inicial de la muestra patrón estuvo cercano al 93%.

Figura 37. Pérdida de peso de la muestra patrón (sin enzimas ni mejorantes)



4.7 PERDIDA DE HUMEDAD EN LAS MUESTRAS ALMACENADAS.

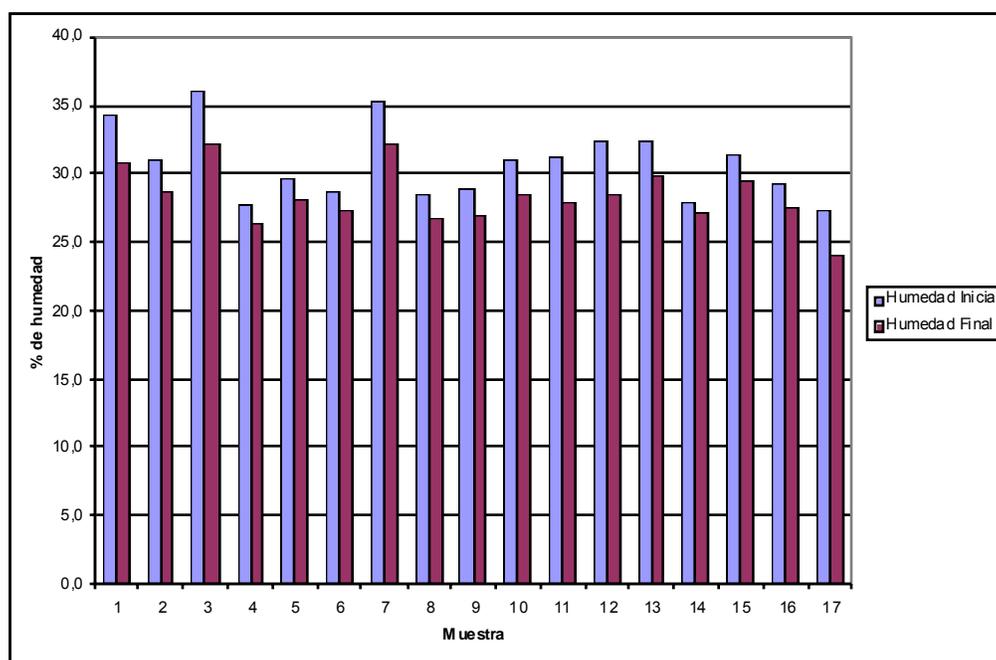
Se observa en el cuadro 31 la pérdida de humedad día a día de cada una de las muestras, algunas de ellas muestran un rango de pérdida de peso entre 0.0015g hasta 0.03g. Esto depende tanto de la enzima o de la sinergia de la mezclas de enzimas y mejorantes que se utilizaron en la elaboración de la muestra como de las condiciones de almacenamiento en las cuales se encontraba el producto final.

De este modo en la figura 38 se muestra la variación de cada muestra entre su humedad inicial y su humedad final.

Cuadro 31. Variación del peso de la muestra durante el almacenamiento.

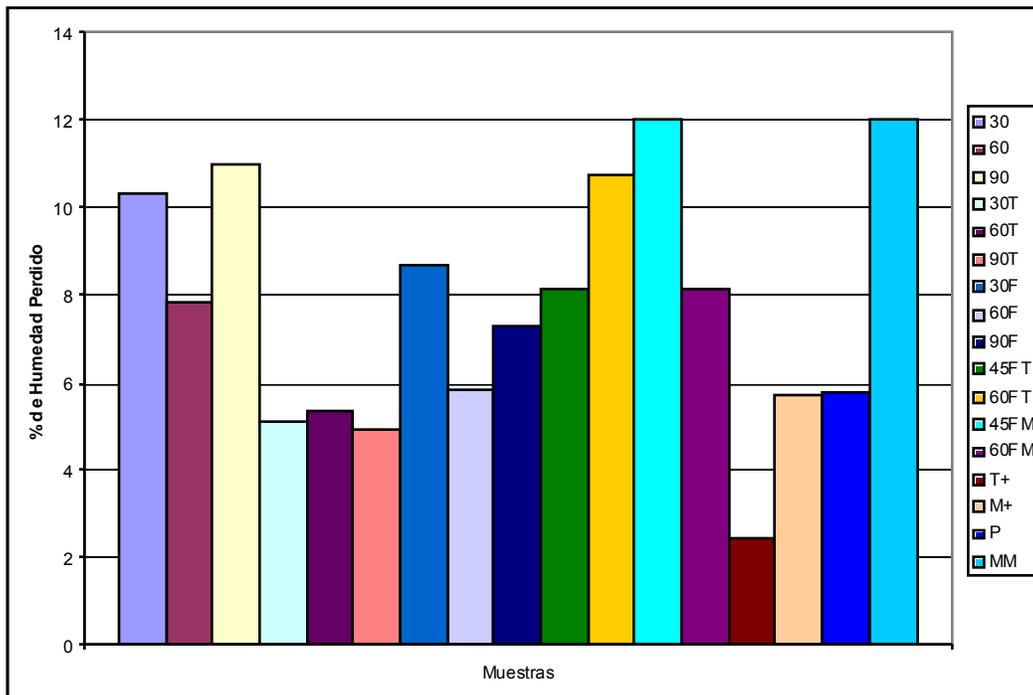
Muestra	Peso Muestra	Humedad Inicial	Día 1	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 11
30	1,7904	34,2120	1,7562	1,681	1,6742	1,6542	1,6402	1,6326	1,60565
60	1,7171	31,0808	1,7029	1,6866	1,681	1,6807	1,6721	1,6613	1,5824
90	1,6557	36,1028	1,6296	1,5725	1,556	1,5354	1,5234	1,5012	1,4733
30T	2,3184	27,7573	2,2981	2,2934	2,2884	2,2864	2,2821	2,2774	2,20015
60T	2,4378	29,7015	2,4203	2,4033	2,3836	2,3726	2,3519	2,3277	2,3072
90T	3,556	28,6671	3,5437	3,529	3,5222	3,5133	3,463	3,4367	3,38165
30F	2,0026	35,3424	1,9832	1,9439	1,9336	1,9204	1,9078	1,8887	1,82905
60F	3,1343	28,4391	3,1062	3,0688	3,0581	3,0448	3,0303	3,0079	2,95095
90F	2,3842	28,9342	2,3607	2,3221	2,314	2,3003	2,2887	2,2734	2,2102
45FT	2,136	31,0592	2,1142	2,0618	2,0511	2,0429	2,0312	2,0175	1,9621
60FT	2,2002	31,3058	2,1775	2,0955	2,0798	2,0632	2,0451	2,0234	1,96415
45FM	2,129	32,4048	2,0873	2,0326	2,0173	2,0004	1,9834	1,9612	1,8728
60FM	2,0892	32,4737	2,0565	2,0372	2,026	2,0212	2,015	2,0035	1,9196
T+	2,9723	27,9300	2,9553	2,9462	2,9337	2,925	2,9109	2,9028	2,89995
M+	2,4733	31,3950	2,4409	2,4107	2,3934	2,3789	2,3676	2,3461	2,33135
P	2,0273	29,2202	2,0163	2	1,9951	1,988	1,9833	1,9734	1,9098
MM	1,7746	27,3418	1,7446	1,6854	1,6734	1,6589	1,6501	1,6325	1,56145

Figura 38. Humedad inicial y final de cada muestra.



Se observa en la figura 39 que las muestras que mas perdieron humedad fueron 30, 90 y 45 FM, las 2 primeras pertenecientes a los ensayos hechos con α -amilasa bacteriana **MIX 2** y la última pertenece a los ensayos hechos con la mezcla entre α -amilasa fúngica GRYNDAMIL y α -amilasa bacteriana TENASE. También se puede decir que las muestras que menos perdieron humedad fueron 30T, 60T, 90T y T+, las 3 primeras pertenecientes a los ensayos hechos con α -amilasa bacteriana TENASE y la ultima con un porcentaje muy bajo de perdida de humedad también perteneciente a los ensayos realizados con TENASE, pero con la adición de mejorantes en su elaboración.

Figura 39. Porcentaje de la pérdida de humedad de cada muestra.



CONCLUSIONES

La enzima aislada a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 21556 fue obtenida utilizando el medio experimental **E1** modificado de la investigación que tenía como inductores lactosa y almidón, el tiempo de fermentación óptimo fue de 120 horas donde se encontró la mayor producción de α -amilasa, el pH de trabajo, osciló entre 5.5 y 6.0.

De 2 L de medio de fermentación se logró obtener 65 g de enzima concentrada con las siguientes características: 6.1 % de humedad final, 93.9% de sólidos y una actividad amilolítica de 230 UA/g.

La variación en la cantidad de enzima usada en las pruebas de actividad amilolítica da como resultado un mayor porcentaje de almidón hidrolizado para la prueba con mayor concentración de enzima; en cuanto a la velocidad de hidrólisis contra la concentración de enzima se puede decir que esta se estabiliza después de los 10 ml de enzima.

La variación en la concentración de almidón en el sustrato da como resultado que la muestra que tenía 1.5% de almidón tuvo una mayor hidrólisis mientras que la muestra que tenía 0.5% de almidón resultó ser la que menos hidrólisis sufrió; de lo anterior se puede decir que la actividad enzimática depende en gran medida de la concentración de sustrato presente en la muestra.

De las pruebas de panificación se puede concluir que la miga, el color y la textura obtenidos del uso de la enzima denominada **MIX 2** fueron mejores a los obtenidos con la enzima comercial TENASE, debido a la alta actividad amilolítica de la enzima comercial. Esto se ratifica en los resultados del número de caída, los cuales indican que la harina adicionada con TENASE está por debajo de los rangos óptimos de panificación, dando como resultado una miga gomosa.

Las dextrinas no transformadas en maltosa juegan un papel relevante en la retención de agua y en la esponjosidad de la miga. Conforme se va degradando el almidón dañado, parte del agua absorbida por estos gránulos pasa de nuevo a la masa, reduciéndose la consistencia de la misma. Un exceso de dextrinas contribuye a hacer pegajosa la masa

A pesar que la enzima obtenida es de origen bacteriano, no se presentó el problema característico de este tipo de enzimas, dando como resultado un número de caída óptimo para harinas destinadas para la industria de la panificación. Esto se debe a la baja concentración de enzima obtenida en laboratorio comparada con la enzima de tipo comercial. La cual si presentó estos defectos de gomosis en la miga.

Los resultados obtenidos con la enzima GRYNDAMIL fueron adecuados en cuanto miga, color, textura y volumen.

El volumen de cada una de las pruebas sin mejorantes fue similar al volumen de la muestra **P**, es decir que no se observa una variación dramática del volumen con el uso de enzimas α -amilasas bacterianas, fúngicas ni mezclas de estas, mientras que la adición de los mejorantes incrementa el volumen en casi un 100%.

Las características de miga, color y textura se ven afectadas por el uso de enzimas α -amilasas; mientras que la muestra **T+** presenta unas características de gomosis al igual que las muestras con TENASE que no contenían mejorantes.

La pérdida de humedad de las muestras respecto a la humedad inicial fue de entre el 2 al 12%, a lo largo del periodo de almacenamiento de 11 días. Tiempo durante el cual se mantuvo a temperatura ambiente en bolsas de plástico calibre 2. Las muestras que más perdieron humedad fueron las realizadas con la mezcla GRYNDAMIL-TENASE y las muestras con 30ppm. 60ppm elaboradas con MIX2.

A pesar de la alta pérdida porcentual registrada por las muestras **T** tuvieron una miga gomosa y húmeda a lo largo de los 11 días de almacenamiento, mientras que las otras muestras presentaron un endurecimiento progresivo de la miga.

La caracterización de las muestras se desarrolló bajo los parámetros señalados por PRODUCTORA COLOMBIANA DE HARINAS PROCOHARINAS S.A., sin embargo esta tiende a ser muy subjetiva y propia de cada molino según sus requerimientos.

RECOMENDACIONES

Para garantizar una buena adaptación del microorganismo al medio fermentativo, en este caso el *Bacillus subtilis* ATCC 21556 es aconsejable que se hagan resiembras de este, en agar **LB** con 1% de almidón, por lo menos cada dos días con el fin de utilizar cepas frescas y mejor adaptadas al sustrato e inductores que se están utilizando.

Almacenar la enzima en refrigeración +/- 4°C si es líquida ya que se ha comprobado que esta pierde entre un 10% de su actividad amilolítica por año bajo estas condiciones; si su almacenamiento es superior a esta temperatura la pérdida de actividad podría ser mayor. Si la enzima fue liofilizada y su presentación es en polvo, como lo fue la enzima obtenida en el laboratorio, es recomendable almacenarla a temperatura ambiente y sellada ya que es susceptible a ganar humedad y volverse pegajosa.

Para los análisis sensoriales de las muestras es indispensable determinar la metodología de alguno de los molinos para la evaluación de estas, ya que estos análisis tienden a ser propios de cada molino y es necesario sustentar estos resultados con personas calificadas y certificadas en el campo de la panificación.

Es necesario que la industria adopte unos parámetros estándar para evaluar de forma objetiva los atributos más importantes que se manejan en la industria de panificación, especialmente la miga. (En el momento en el que se estaba realizando este trabajo de grado estaba en estudio una normativa para pruebas de panificación a nivel nacional).

Realizar pruebas con la enzima obtenida en otra clase de panes o en otra clase de producto como almidones modificados, para poder observar su comportamiento con otras variables y condiciones de proceso.

Es necesario realizar el análisis farinográfico para determinar propiedades como empuje y estructura las cuales son de vital importancia en el momento de evaluar el producto final.

BIBLIOGRAFIA

Aunstrup, K. Ctal. Applied bioengineering. New York – San Francisco- London.
En: Enzyme technology Academic Press. Vol 2 1979.

Bárzana García, E. y López Munguía, C. A. La tecnología enzimática, Mexico:
Limusa S.A. de C.V. 1993

Coolbear. T. Enzymes and products from bacteria, fungi and plant cell. Berlin,
Springer. P 144. 1992

Fersht, A. Enzyme structure and mechanism. Freeman, San Francisco. 1997

Fogarty, William M. Microbial enzymes and biotechnology. London, New York,
Elsevier. P 472. 1990

Grevechova R. Utilización de las enzimas a base de microorganismos en la Unión
Soviética, revision. En: ONTITEI. Microbioprom. Moscú 1982, p 42.

Gracheva. I. Crivova A. Tecnología de Enzimas Microbianas, Editorial Elbar,
Moscú. 2000.

Grevechova. R, Prieto. L. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería de
Alimentos Biotecnología de las enzimas microbianas pectinasa y amilasa
(Segunda etapa). Bogota Colombia 2004

Izquierdo M. Biología. Disponible en Internet www.paleontologia.co.uk. 2003

Lopez – Munguía C. A y Quintero R. R. Tecnología enzimática. UNAM, México,
1987.

Lucas, E. Biotecnología de alimentos. Monografías. Disponible en Internet en
www.bioenlace.com/alimentos/enzimatica.asp. 2003

Mathewson P. Enzymes, Eagan Press. Enzimas Poderosas. Disponible en www.barkingbussines.com St Paul. Minnesota USA, 2003

Murray R. Mayes P. Bioquímica de Harper tercera edición. Editorial El Manual Moderno. México 2001.

Parra S, Tibaduiza A. Enzimas: Aplicaciones en Biotecnología, Procesos Industriales y Terapia. Tesis. Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Universidad de La Salle. Bogotá. D.C.1996

Sanchez, S y Farres, A. Regulación de enzimas microbianas. En: tecnología enzimática, Lopez – Munguia C. A y Quintero R. R. UNAM, México, 1987.

Segel, J H. Enzyme Kinetics, Jhon Wiley and Sons. New York- 1975.

Scriban R. Producción de Enzimas. Editorial El Manual Moderno S.A. México 1985

Stauffer C. Enzymes used in Bakery Products I. Fundamentals of Enzymes. AIB research department Volumen XVI Abril de 1994

Stauffer C. *Enzymes used in Bakery Products II. Applications of Enzymes. AIB research department* Volumen XVI mayo de 1994

Tortora Gerard, Funke Berdell. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1999

Trevan M. D., Boffey S., Goulding K.H. Y Stanbury P. Biotecnología: principios biológicos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España 1990.

CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA MUESTRA DE ANALISIS

Determine el contenido de humedad de la muestra molida de harina antes de pesar la cantidad para la prueba.

El Falling Number deberá ser determinado con una muestra de 15% de humedad. La cantidad que usa cuando el contenido de humedad difiere del 15% se indica en la siguiente tabla:

Contenido de humedad%	Peso	Contenido de humedad %	Peso
9.0	6.40	14.0	6.90
9.2	6.45	14.2	6.90
9.4	6.45	14.4	6.95
9.6	6.45	14.6	6.95
9.8	6.50	14.8	7.00
10.0	6.50	15.0	7.00
10.2	6.55	15.2	7.00
10.4	6.55	15.4	7.05
10.6	6.55	15.6	7.05
10.8	6.60	15.8	7.10
11.0	6.60	16.0	7.10
11.2	6.60	16.2	7.15
11.4	6.65	16.4	7.15
11.6	6.65	16.6	7.15
11.8	6.70	16.8	7.20
12.0	6.70	17.0	7.20
12.2	6.70	17.2	7.25
12.4	6.75	17.4	7.25
12.6	6.75	17.6	7.30
12.8	6.80	17.8	7.30
13.0	6.80	18.0	7.30
13.2	6.80		
13.4	6.85		
13.6	6.85		
13.8	6.90		



Cálculo de suplementación de malta

Fecha
Harina
Malta

Número de caída
Harina sin malta
100

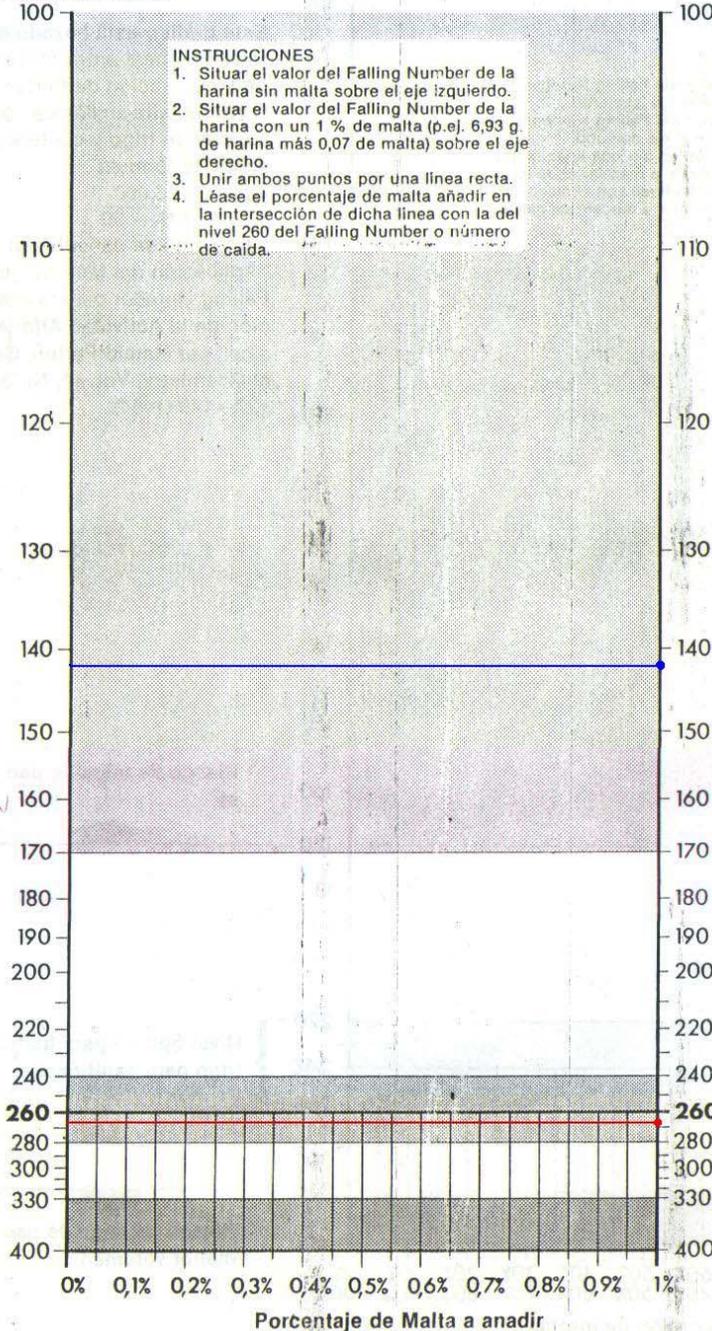
Número de caída
Harina con 1 % de malta
100

INSTRUCCIONES

1. Situar el valor del Falling Number de la harina sin malta sobre el eje izquierdo.
2. Situar el valor del Falling Number de la harina con un 1 % de malta (p.ej. 6,93 g. de harina más 0,07 de malta) sobre el eje derecho.
3. Unir ambos puntos por una línea recta.
4. Léase el porcentaje de malta añadir en la intersección de dicha línea con la del nivel 260 del Falling Number o número de caída.

● Tenase

● MIX 2



Riesgo de miga de pan pegajosa

Nivel óptimo para harinas de trigo para panificación

Riesgo de miga de pan seca y menor volumen

Trabajando a partir de harinas industriales, consideramos 260 seg. como óptimo

TENASE® 1,200

Genencor® Bacterial Alpha-Amylase

Product Information

■ DESCRIPTION

TENASE® 1,200 enzyme is a bacterial α -amylase derived from a selected strain of *Bacillus subtilis*. Typical application areas for TENASE® 1,200 enzyme include baking and waste treatment.

■ TYPICAL CHARACTERISTICS

Activity:	1,200,000 MWU/g (minimum)
Appearance:	White powder
Grade:	Food grade, Kosher

Unit Definition

The activity of TENASE® 1,200 enzyme is expressed in MWU/g. One Modified Wohlgemuth unit is that activity which dextrinizes one milligram of soluble starch to a defined blue value in 30 minutes, under assay conditions. The assay method is available upon request.

pH Dependency

The pH range for the enzyme activity of TENASE® 1,200 enzyme is approximately from 6.0 to 7.0, with an optimum performance at pH 6.0. The exact pH optimum will depend on process variables, including temperature, time, substrate nature and concentration.

Temperature Dependency

The activity of TENASE® 1,200 enzyme is effective in the temperature range of 65° C (150° F) to 75° C (165° F), with an optimum performance at 70° C (160° F). The exact temperature optimum will depend on many process variables, such as pH, time, substrate nature and concentration.

Inactivation

The enzyme can be inactivated by holding for 15 minutes at a temperature of 95° C (205° F), pH 6 or holding for 10 minutes at 80° C (175° F), pH 4.

■ BIOCHEMICAL PARAMETERS

Enzyme type:	1,4 α -D-glucan-glucanohydrolase
IUB#:	3.2.1.1
Activators/cofactors:	200 - 400 ppm Ca ²⁺

■ APPLICATION RECOMMENDATIONS

TENASE® 1,200 enzyme is used to liquefy and dextrinize gelatinized starch prior to hydrolysis by saccharifying enzymes in application areas, such as brewing, cereal modification and baby food processing.

Calcium has a stabilizing effect on the enzyme, especially if hydrolysis is carried out at high temperatures.

■ DOSAGE

A typical TENASE® 1,200 α -amylase dosage rate of 0.5 - 0.8% (based on starch dry solids) is recommended as a starting point for the optimization of enzyme dosage.

■ REGULATORY STATUS

TENASE® 1,200 bacterial α -amylase complies with the current FAO/WHO and Food Chemical Codex recommended specifications for food-grade enzymes and is GRAS (Generally Recognized As Safe) in the United States.

■ STORAGE

TENASE® 1,200 enzyme will meet the declared activity of 1,200,000 MWU/g upon arrival at the customer's plant.

Genencor enzymes can be safely stored in unopened and sealed original containers. Enzyme containers should be stored below 20° C (70° F), preferentially refrigerated and sheltered against direct sunlight.

During storage, TENASE® 1,200 enzyme will have an activity loss of less than 10% per year at a temperature of 4° C (40° F). For more information on the storage of this product, please contact your Genencor International representative.

■ PACKAGING

TENASE® 1,200 enzyme is available in 20 kg containers.

Please note that some Genencor products are sold in full pallet loads only.



Genencor International, Inc.
Innovative by Nature™

■ SAFETY & ENZYME HANDLING

Repeated inhalation of enzyme dust may cause respiratory allergies in susceptible individuals. Special precautions are needed in the handling of powder enzymes to prevent the release of airborne dust and employee exposure. Powder enzymes should be handled in closed systems. When there is a potential for employee exposure to airborne enzyme dust, appropriate respiratory protection should be worn. Inhalation of enzyme dust and mists should be avoided. In case of contact with the skin or eyes, promptly rinse with water for at least 15 minutes.

For detailed handling information, please refer to the appropriate Material Safety Data Sheet, the Enzyme Technical Association (ETA) handbook *Working Safely with Enzymes*, and the Association of Manufacturers of Fermentation Enzyme Products (Amfep) handbook *Guide to the Safe Handling of Microbial Enzyme Preparations*. All are available from Genencor International.

■ TECHNICAL SERVICE

Genencor International will work with customers to enhance processes and solve problems. Let us know what you need and we will assist you.

For more information:

USA and Canada

Genencor International, Inc.

200 Meridian Centre Blvd., Rochester, NY 14618 USA

Telephone: 1-800-847-5311 (USA)

Telephone: +1-716-256-5200

Telefax: +1-716-244-4544

Europe and Africa

Genencor International B.V.

P.O. Box 218, 2300 AE Leiden, The Netherlands

Telephone: +31-71-5686-168

Telefax: +31-71-5686-169

Latin America

Genencor International Argentina S.R.L.

Carlos Pellegrini 1149, Piso 13

1009 Buenos Aires, Argentina

Telephone: +54-11-4129-2300

Telefax: +54-11-4326-4411

Asia/Pacific

Genencor International Asia Pacific PTE, LTD.

3 Killiney Road

#05-02 Winsland House, Singapore 239519

Telephone: +65-838-7410

Telefax: +65-737-1218

Web Address

www.genencor.com

© Genencor International, Inc., 2001. TENASE, GENENCOR, GENENCOR INTERNATIONAL, and INNOVATIVE BY NATURE are registered trademarks of Genencor International, Inc. or its affiliated companies.

The information contained in this product literature is, to the best of our knowledge, true and accurate and the product as sold is in conformance with the specifications set forth herein as determined by the assay methods described. Due to conditions of use, technical errors or omissions, improper handling or storage beyond our control, Genencor International hereby DISCLAIMS ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. Genencor International shall not be liable for any incidental, consequential, or special damages resulting in any way from the furnishing, performance, or use of this product literature or the product described herein.

Nothing contained herein shall be construed as a representation by Genencor International that the use or resale of the product or processes described herein will not violate any rules or regulations or infringe upon patents or other intellectual property rights of third parties or that the recommendations and usage suggestions described constitute any authorization or inducement to infringe any such rights.

REV0301

1654

TEN48AX

02

Printed on recycled paper

NOMBRE DEL EQUIPO	Centrifuga
Serie	SG96/07/157
Modelo	Centaur 2

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	-

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	4 tubos de 50 mL
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	Ambiente
Voltaje de trabajo	110-120 V
Amperaje de trabajo	5A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115 V
Amperaje	5A
cos	-

DATOS BASICOS

Capacidad	200 mL
Temperatura mínima	-
Presión	-
Potencia	500W
R.P.M.	4300
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Separación de sólidos y líquidos	
Fabricante / Distribuidor / proveedor	LOFAR LTDA.
Localización	Planta piloto de Frutas y verduras

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,42
Material:	Acero, acrílico y pasta.

OBSERVACIONES ESPECIALES

Operar cerrada, revisar que los frascos se encuentren bien cerrados, tener en cuenta el desnivel.

DATOS ADICIONALES

Marca Sanyo. Tiene temporizador y tablero de velocidad. Capacidad para 4 tubos de 50 mL, energía máxima 3,40 kJ, indicador de desnivel y es monofásico.

NOMBRE DEL EQUIPO	Batidora
Serie	14032136
Modelo	N-50

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	50°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	700g
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	-
Voltaje de trabajo	115 V
Amperaje de trabajo	2,85A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115 V
Amperaje	2,85A
cos	-

DATOS BASICOS

Capacidad	700g
Temperatura mínima	-
Presión	-
Potencia	1/6HP
R.P.M.	1725
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Mezclar y homogeneizar	
Fabricante / Distribuidor / proveedor	Hobart Corporation
Localización	Laboratorio Calidad Procoharinas S.A.

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,015
Material:	Aluminio y acero

OBSERVACIONES ESPECIALES

<p>Cuando se va a cambiar de velocidad apagarla primero.</p>
--

DATOS ADICIONALES

<p>Hz 60. pH 1, 3 velocidades y tiene 3 implementos para mezcla de gancho, paleta y globo.</p>
--

NOMBRE DEL EQUIPO	Autoclave
Serie	-
Modelo	25X
Fecha de Compra	-
Puesta en marcha	-
Precio	-

OBJETIVO: Esterilizar material	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: ALLAMERICAN	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	30 psi - 2kg/cm ²
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	274°F

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,1056
Material:	Aluminio, acero y pasta

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	-
Presión de trabajo	15 psi - 1kg/cm ²
Temperatura de trabajo	250°F
Voltaje de trabajo	115 V
Amperaje de trabajo	-

OBSERVACIONES ESPECIALES

<p>No sobrepasar presiones de 20 psi a 259°F Leer muy bien el manual de trabajo antes de ser empleada.</p>

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	110-120V
Amperaje	-
cosφ	-

DATOS ADICIONALES

<p>Cuenta con manómetro que a su vez indica temperatura Posee válvula de escape de vapor y cierres herméticos.</p>

DATOS BASICOS

Capacidad	-
Temperatura mínima	0°F
Presión	-
Potencia	1100W
R.P.M.	-
Presión de Vapor	0-30 psi y 0-20 kg/cm ²

NOMBRE DEL EQUIPO	Espectrofotómetro
Serie	3SGC075077
Modelo	4001/4

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	40°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	Una celda de 2mL
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	15-40°C
Voltaje de trabajo	100-240V+/-10%
Amperaje de trabajo	1A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115V
Amperaje	1A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	2mL
Temperatura mínima	15°C
Presión	-
Potencia	-
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Ejecutar mediciones de absorbancia y % de transmitancia	
Fabricante / Distribuidor / proveedor	KASAI LTDA.
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,099
Material:	Plástico, acrílico, aluminio y vidrio

OBSERVACIONES ESPECIALES

Para su almacenamiento la temperatura debe oscilar entre -40 a 60°C, la humedad relativa no debe exceder el 60%.
 Hay que permitir al instrumento que se ajuste a la temperatura ambiente. No almacenar en ambientes corrosivos
 Limpiar inmediatamente líquidos o salpicaduras que caigan sobre el instrumento.

DATOS ADICIONALES

Marca: Spectronic Unicam
 Pantalla digital de cristal líquido
 Teclado e impresora interna opcional.
 La longitud de onda es de 325-1100nm.
 La exactitud de la longitud de onda es de +/-2nm.
 Rango fotométrico es del 0-125% de Transmitancia, 0,1-2,5% en absorbancia

NOMBRE DEL EQUIPO	Balanza Analítica
Serie	1122383841
Modelo	AB204-S
Fecha de Compra	-
Puesta en marcha	-
Precio	-

OBJETIVO: Pesar sustancias de m Fabricante / Distribuidor / proveedor
Localización

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	30°C

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)
Material:

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	220g
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	5-40°C
Voltaje de trabajo	8-14,5V
Amperaje de trabajo	6A

OBSERVACIONES ESPECIALES

Mantener limpia, cuando se trabaja y limpiar. Debe realizarse un mante
--

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	9,5-20V
Amperaje	6A
cosf	-

DATOS ADICIONALES

Precisión de indicación de 0,1mg. Tiempo de estabilización: 3,5 s Humedad relativa del aire: 15-80%

DATOS BASICOS

Capacidad Máxima	220g
Temperatura mínima	10°C
Presión	-
Potencia	6W
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

Manera exacta

Marca: Mettler Toledo

Laboratorio de Química

0,083545

Carcasa: Aluminio fundido a presión, lacada

Platillo: Acero al cromo níquel, Plástico y acrílico

Al usar productos químicos se recomienda lavar
con agua y jabón de manera regular

NOMBRE DEL EQUIPO	Agitador orbital
Serie	80102331
Modelo	Unimax 2010
Fecha de Compra	-
Puesta en marcha	-
Precio	-

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	50°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	10kg
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	(-)20 a 50°C
Voltaje de trabajo	125V
Amperaje de trabajo	2A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115V
Amperaje	2A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	10kg
Temperatura mínima	(-)20°C
Presión	-
Potencia	180W
R.P.M.	200-400
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Agitar para mantener aireación en experimentaciones	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: Heidolph Instruments	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,17845
Material:	Plástico, acero inoxidable aluminio

OBSERVACIONES ESPECIALES

<p>Limpia con jabón suave, debe estar en una base estable Revizar que el material este bien sujeto, Comenzar con baja frecuencia de agitacón. Atornillar bien las plataformas.</p>

DATOS ADICIONALES

<p>Timer de 0-120 minutos Plataforma para matraz de 250mL con capacidad para 12 Plataforma para matraz de 500mL con capacidad para 6</p>
--

NOMBRE DEL EQUIPO	Nevera
Serie	E*031044579
Modelo	NF-12T

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	-

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	300L
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	(-)10°C-10°C
Voltaje de trabajo	115V
Amperaje de trabajo	2,40A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115V
Amperaje	15A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	300L
Temperatura mínima	(-)10°C
Presión	-
Potencia	2,6kW/24h
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Conservación, Producción de hielo, Cadena de frío	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: Icasa	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,52. Espacio adicional 65cm
Material:	Vidrio, plástico, metal acrilico

OBSERVACIONES ESPECIALES

<p>Verificar el manual antes de llamar el técnico para reparaciones</p> <p>Tener en cuenta las precauciones</p> <p>Debe mantenerse limpias según recomendaciones del manual</p>

DATOS ADICIONALES

<p>Volumen fresco: 227L</p> <p>Frío: 73L</p> <p>Espumante 141b</p> <p>Refrigerante HFC 134a 130g</p> <p>Color: Almendra</p>

NOMBRE DEL EQUIPO	Baño María
Serie	12.960.978
Modelo	WB/OB7-45

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	100°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	-
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	10-110°C
Voltaje de trabajo	115V
Amperaje de trabajo	5,2A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115V
Amperaje	10,4A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	7L
Temperatura mínima	10°C
Presión	-
Potencia	1200W
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Calentamiento de forma indirecta	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: Sanitas LTDA.	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,1656
Material:	Acero inoxidable y plástico

OBSERVACIONES ESPECIALES

Llamar al técnico para cualquier reparación
 Para limpiar, asegurarse que este desconectada.
 Verificar que el agua cubra todas las resistencias.

DATOS ADICIONALES

Peso 11kg
 Marca: Memmert
 Temperatura de fluctuación +/- 0,1°C
 Cuenta con alarma y timer

NOMBRE DEL EQUIPO	Horno
Serie	KWIK-CO
Modelo	90

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	300°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	4 Bandejas de 60 x 40cm
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	Depende del producto
Voltaje de trabajo	230V
Amperaje de trabajo	1A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	230V
Amperaje	1A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	4 Bandejas de 60 x 40cm
Temperatura mínima	Ambiente
Presión	-
Potencia	0,23kW
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Hornear	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: Industria SALVA S.A.	
Localización	Laboratorio de calidad Procoharinas

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,96
Material:	Acilico, acero, vidrio, plástico

OBSERVACIONES ESPECIALES

<p>La puersta debe abrirse con precaución para evitar posibles quemaduras por contacto directo con los vapores producidos durante la cocción.</p> <p>Los trabajos de reparación y mantenimiento deberan realizarse por el servicio técnico oficial del proveedor.</p>

DATOS ADICIONALES

<p>El nivel de potencia acustica emitido es de 70db</p> <p>Posee chimenea</p> <p>Presión del gas natural: 18mbar</p> <p>Potencia quemada (kcal/h):7750</p>
--

NOMBRE DEL EQUIPO	Incubadora
Serie	
Modelo	BD 53

Presión max. De operación	2000 m sobre el nivel del mar
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	100°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	43kg
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	5-100°C
Voltaje de trabajo	230V
Amperaje de trabajo	10A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	230V
Amperaje	10A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	53L
Temperatura mínima	5°C
Presión	-
Potencia	400W
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Proporcionar condiciones deseadas de temperatura	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: BINDER	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,3645
Material:	Acero inoxidable, plástico acrílico, acero, aluminio

OBSERVACIONES ESPECIALES

Limpiar y desinfectar constantemente. Tener precaución para no desconfigurarla. Leer el manual antes de operar.

DATOS ADICIONALES

Posee timer, operar y almacenamiento a 78% de humedad relativa.
Posee dos soportes.

NOMBRE DEL EQUIPO	
Serie	
Modelo	
Fecha de Compra	
Puesta en marcha	
Precio	

OBJETIVO:	
Fabricante / Distribuidor / proveedor	
Localización	

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	
Presión de prueba	
Temperatura máxima	

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	
Material:	

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	
Presión de trabajo	
Temperatura de trabajo	
Voltaje de trabajo	
Amperaje de trabajo	

OBSERVACIONES ESPECIALES

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	
Amperaje	
cosf	

DATOS ADICIONALES

--

DATOS BASICOS

Capacidad	
Temperatura mínima	
Presión	
Potencia	
R.P.M.	
Presión de Vapor	

NOMBRE DEL EQUIPO	Liofilizador
Serie	-
Modelo	7752000

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	2000 x 10 ⁻³ mBar
Presión de prueba	
Temperatura máxima	15°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	6L
Presión de trabajo	113L/min y 0,2x10 ⁻³ mBar
Temperatura de trabajo	(-)50°C
Voltaje de trabajo	115V
Amperaje de trabajo	9A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	115V
Amperaje	20A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	6L
Temperatura mínima	(-)50°C
Presión	133 x 10 ⁻³
Potencia	
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Retirar el agua del producto	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: Labconco	
Localización	Laboratorio de Biotecnología

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,6958
Material:	Aluminio, acero inoxidable, acrilico plástico, vidrio

OBSERVACIONES ESPECIALES

Leer las indicaciones del manual y el protocolo de trabajo.
Se prende y espera hasta que llegue a una temperatura de -40°C y luego se prende el vacío, cuando llegue a 133mBar x 10⁻³ se coloca en automatico. Leer el tiempo aproximado según las indicaciones de la tabla del manual. Antes de sacarlo es necesario incrementar la temperatura con vacío para que el producto no gane humedad se retira a una temperatura ambiente.

DATOS ADICIONALES

60 Hertz
Posee un condensador, un colector de hielo y una bomba para el vacío, una plataforma con tres niveles.

NOMBRE DEL EQUIPO	Falling number
Serie	AB 1400
Modelo	1402

DATOS MECANICOS

Presión max. De operación	-
Presión de prueba	-
Temperatura máxima	550°C

DATOS DE OPERACIÓN

Capacidad de trabajo	1 tubo de muestra
Presión de trabajo	-
Temperatura de trabajo	92°C
Voltaje de trabajo	115V
Amperaje de trabajo	6A

CAPACIDAD ELECTRICA

Voltaje	110-115V
Amperaje	6A
cosφ	-

DATOS BASICOS

Capacidad	1 Tubo
Temperatura mínima	150
Presión	-
Potencia	70W
R.P.M.	-
Presión de Vapor	-

OBJETIVO: Determinar contenido de α-amilasa en la harina	
Fabricante / Distribuidor / proveedor: C-O Dotylaboratorios Inc.	
Localización	Laboratorio de calidad PROCOHARINAS S.A.

SERVICIOS INDUSTRIALES

Area (m ²)	0,024
Material:	Aluminio, acero y plástico

OBSERVACIONES ESPECIALES

Recircular agua fria cuando el agua del dispositivo de calentamiento ebulla.
--

DATOS ADICIONALES

60 Hz.
