



ESTUDIO DE LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN Y SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEO PARA OBTENER UN JARABE DE GLUCOSA A PARTIR DE HARINA DE PAN

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2020/2021

**Alumna: Inés Martín Sáez
Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales
Cotutor: Manuel Gómez Pallarés**

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

ÍNDICE

ÍNDICE	1
I. Resumen	2
II. Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Materiales.....	7
3.2. Métodos.....	7
3.2.1. Licuefacción y sacarificación secuencial.....	7
3.2.1.1. Licuefacción	7
3.2.1.2. Sacarificación.....	8
3.2.2. Licuefacción y sacarificación simultánea	8
3.2.3. Determinaciones analíticas.....	8
3.2.3.1. Azúcares reductores	8
3.2.3.2. Glucosa.....	9
3.2.3.3. Viscosidad.....	9
3.3. Tratamiento estadístico de los datos.....	9
3.3.1. Modelización de las curvas.....	9
3.3.2. Diseño de superficie de respuesta.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Sacarificación secuencial.....	11
4.2. Licuefacción y sacarificación simultánea	15
4.3. Comparación entre el proceso de sacarificación secuencial y el proceso de hidrólisis simultánea.....	22
5. CONCLUSIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25

I. Resumen

Cada año, se estima que un tercio de toda la comida producida acaba pudriéndose en los cubos de basura de los consumidores y minoristas, o estropeándose debido a un transporte y unas prácticas de recolección deficientes. Este problema mundial tiene consecuencias económicas, ambientales y sociales negativas.

Los objetivos de la presente investigación fueron, por una parte, optimizar el proceso de hidrólisis enzimática para producir un jarabe de glucosa a partir de residuos de pan, estudiando las condiciones de pH y temperatura, y por otra parte realizar las etapas del proceso de hidrólisis enzimática de manera simultánea en vez de secuencial.

En el proceso de licuefacción y sacarificación secuenciales el mayor rendimiento de glucosa se obtuvo a pH 4,38 y 65,3°C de temperatura. En el caso de la hidrólisis simultánea, las mayores cantidades de azúcares reductores y glucosa se formaron a pH 4,51 y temperatura 64,7°C. Además, las cantidades de glucosa obtenidas en el proceso de hidrólisis simultánea fueron similares a las obtenidas en la hidrólisis enzimática secuencial.

II. Abstract

Each year, an estimated one third of all food produced ends up rotting in consumer and retailer bins or spoiling due to poor transport and collection practices. This global problem has negative economic, environmental, and social consequences.

The objectives of the present research were, on the one hand, to optimise the enzymatic hydrolysis process to produce a glucose syrup from bread waste by studying the pH and temperature conditions, and on the other hand to perform the steps of the enzymatic hydrolysis process simultaneously rather than sequentially.

In the sequential liquefaction and saccharification process, the highest glucose yield was obtained at pH 4,38 and 65,3°C temperature. In the case of simultaneous hydrolysis, the highest amounts of reducing sugars and glucose were formed at pH 4,51 and 64,7°C temperature. Moreover, the amounts of glucose obtained in the simultaneous hydrolysis process were higher than those obtained in the sequential enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Una gran cantidad de alimentos se pierden o desperdician a lo largo de la cadena de suministro, desde la producción agrícola inicial hasta el consumo doméstico final. Y a falta de posibles usos alternativos, estos desechos terminan siendo eliminados como residuos. Esto supone uno de los problemas más candentes a nivel mundial que tiene consecuencias negativas tanto económicas (eficiencia de recursos, volatilidad de precios, aumento de costes y gestión de residuos), como sociales (sanidad e igualdad) y ambientales (disponibilidad de recursos y cambio climático) (Aka & Buyukdag, 2021; Stenmarck et al., 2016).

En 2011 la FAO estimó que a nivel mundial un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se pierden o desperdician (Tonini et al., 2018). El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, estima que en 2019 se generaron alrededor de unos 931 millones de toneladas de desperdicio de alimentos, lo que representa el 17% del total de la producción mundial de alimentos disponibles para el consumo (Forbes et al., 2021), siendo los residuos de alimentos en el hogar los que ocupan la mayor parte del desperdicio total de alimentos en los países desarrollados (Ananda et al., 2021).

A nivel europeo el desperdicio alimentario se estimó, en 2011, en un 20% del total de la comida disponible, llegando a alcanzar las 129,2 millones de toneladas (Caldeira et al., 2019; Corrado & Sala, 2018). Los alimentos que más se desperdiciaron fueron verduras y frutas, seguidas por productos a base de cereales y carne. Al igual que a nivel mundial el mayor desperdicio alimentario se produce en los hogares (Caldeira et al., 2019). Un estudio realizado en Suecia comprobó que los residuos alimentarios que presentan una mayor huella medioambiental son los desperdicios de carne y de pan de los supermercados (Brancoli et al., 2017).

El capítulo 12.3 de 'la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible' creado por las Naciones Unidas en 2015 pretende, en 15 años, reducir a la mitad el desperdicio de alimentos en la venta al por menor y a nivel de los consumidores y reducir las pérdidas de alimentos en las cadenas de producción y suministro. Se pretende alcanzar dicho objetivo mediante actividades de prevención, reducción, reciclado y reutilización, además de ayudar a los países en desarrollo a fortalecer su capacidad científica y tecnológica para avanzar hacia modalidades de consumo y producción más sostenibles (Naciones Unidas., 2015).

El pan es uno de los productos más consumidos en todo el mundo y es una parte esencial en nuestra dieta diaria. Se estima que su producción mundial fue de 125

millones de toneladas en 2011 y que entre el 7-10% de su producción se desecha lo que supuso unos residuos de pan de 12,5 millones de toneladas (Samray et al., 2019).

Una gran parte de estos desperdicios de pan son el resultado de productos con defectos como deformaciones, cocción insuficiente o excesiva, y otra los panes no vendidos en panaderías industriales y de pequeña escala cuya vida útil ha terminado (Samray et al., 2019). También es muy importante la cantidad de pan que se desperdicia en los hogares (Caldeira et al., 2019). El tratamiento de estos desperdicios constituye un problema importante para la mayoría de las panaderías industriales ya que no está permitido el vertido de estos residuos en muchas normativas debido a su alto contenido orgánico, principalmente constituido por almidón (Oda et al., 1997; Samray et al., 2019).

De manera habitual la investigación sobre la gestión de este tipo de residuos se ha centrado en su uso como alimento para animales (Afzalzadeh et al., 2007; Kwak & Kang, 2006). Pero la Unión Europea (UE) aconseja que, cuando no sea posible minimizar estos desperdicios, estos deben destinarse preferentemente al consumo humano, ya sea directamente o tras su transformación en nuevos productos (Fernández-Peláez et al., 2021).

Por ello, cada vez son más frecuentes las investigaciones para que estos desechos de pan se conviertan en productos de valor añadido como el ácido láctico (Oda et al., 1997), el etanol (Ebrahimi et al., 2008; Torabi et al., 2020), el biohidrógeno (Han et al., 2017) y el ácido succínico (Leung et al., 2012), entre otros. Su transformación en bioetanol requiere una etapa de hidrólisis enzimática para obtener azúcares simples fermentables y otra etapa de fermentación (Ebrahimi et al., 2008; Mihajlovski et al., 2020). En el caso de su transformación en ácido succínico también se requiere una etapa de hidrólisis enzimática con complejos ricos en enzimas amilolíticas y proteasas para liberar glucosa y aminoácidos, respectivamente antes de la fermentación con microorganismos productores de ácido succínico (Brancoli et al., 2017; Leung et al., 2012). También se pueden destinar para obtener energía tras una digestión anaerobia (Melikoglu & Webb, 2013), o para el crecimiento de distintos microorganismos o producción de enzimas (Demirci et al., 2019).

Siguiendo las recomendaciones de la UE, se han realizado varios estudios para poder utilizar los desperdicios de pan para elaborar productos de consumo humano. Durante mucho tiempo se empleó para elaborar pan rallado, sin embargo, la legislación española vigente prohíbe fabricar pan rallado con restos de pan procedentes de establecimientos de consumo (BOE, 2019). Recientemente, se ha investigado la

elaboración de productos extruidos a partir de migas de pan (Samray et al., 2019). Los desperdicios de pan también pueden emplearse como adjunto o fuente de hidratos de carbono fermentables en la elaboración de cerveza (Brancoli et al., 2020). También, se ha estudiado como son harinas de pan o las harinas que han sido sometidas a un tratamiento térmico, las cuales podrían emplearse en la elaboración de bizcochos, mezclas de rebozado y salsas en frío (Fernández-Peláez et al., 2021; Martínez et al., 2015).

Siguiendo esta línea de búsqueda de alternativas para el consumo humano, a partir de la hidrólisis enzimática del almidón contenido en la harina de pan es posible la producción de un jarabe rico en glucosa (Riaukaite et al., 2019).

Un proceso de elaboración del jarabe de glucosa a partir de almidón consiste en su conversión en glucosa mediante un proceso secuencial de hidrólisis enzimática, el cual consta de dos etapas (licuefacción y sacarificación) (Demirci et al., 2017; Ebrahimi et al., 2008; Kawa-Rygielska et al., 2012; Leung et al., 2012; Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014; Riaukaite et al., 2019; Sirohi et al., 2021).

Durante la licuefacción del almidón, se emplea la enzima termoestable α -amilasa del género *Bacillus*, con una T^a óptima de 60-90°C y un pH óptimo de 5,0-7,0, para hidrolizar los enlaces (1,4)- α -D-glucosídicos de los polisacáridos del almidón y obtener dextrinas, oligosacáridos y pequeñas cantidades de glucosa (Maldonado-Guzmán et al., 1995), observándose además una importante reducción en la viscosidad de la mezcla de almidón. Previamente, el almidón tiene que ser gelatinizado para obtener un sustrato más susceptible a la hidrólisis enzimática debido a que su estructura amorfa da lugar a una mayor disponibilidad de sitios de unión de las enzimas amilásicas (Immonen et al., 2020; Kawa-Rygielska et al., 2012; Martínez et al., 2018; Riaukaite et al., 2019).

En la fase de sacarificación se emplea la enzima amiloglucosidasa que hidroliza los enlaces (1,4) y (1,6)- α -D-glucosídicos en los extremos no reductores de las dextrinas y los oligosacáridos para liberar glucosa y producir un jarabe rico en glucosa. La enzima amiloglucosidasa producida por *Aspergillus niger* también es termoestable y tiene una actividad óptima en rangos de 4,0-5,0 de pH y 60-65°C (Maldonado-Guzmán et al., 1995). En caso de querer obtener un jarabe de fructosa, existe una tercera etapa en la cual la enzima glucosa isomerasa transforma las moléculas de glucosa en fructosa (Amaral-Fonseca et al., 2021; Riaukaite et al., 2019).

En la harina de pan, el almidón se encuentra parcial o completamente gelatinizado, ya que, durante el proceso de horneado, el almidón hidratado se gelatiniza y la proteína se coagula, lo que lleva a la formación de la estructura del pan. Esta matriz amorfa, formada principalmente por almidón gelatinizado, se modificará aún más durante el enfriamiento a medida que el almidón se retrograda (Martínez & Gómez, 2017). Además, las enzimas amilásicas propias de las levaduras y la harina, o las enzimas añadidas intencionadamente en la formulación del pan, hidrolizan parcialmente el almidón gelatinizado (Ray & Rosell, 2017).

A pesar de que existen numerosos estudios sobre la utilización de la harina de pan para obtener alcohol, para lo que es necesaria una hidrólisis previa, existen pocos estudios que aborden el uso de harina de pan para la obtención de jarabe de glucosa. Recientemente, Riaukaite et al. (2019) optimizó la concentración de harina de pan y de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa para obtener un jarabe rico en glucosa. También se estudió la concentración de la enzima glucosa isomerasa y el pH del medio para producir un jarabe rico en fructosa. Demirci et al. (2017) realizaron un proceso secuencial de licuefacción y sacarificación de la harina de pan, en la que estudiaron las dosis de enzima (α -amilasa y amiloglucosidasa) y pan más adecuadas para producir la mayor cantidad de azúcares, que posteriormente fueron fermentados para obtener etanol.

A diferencia de los trabajos precedentes, en este estudio se compara una hidrólisis enzimática en dos etapas secuenciales (licuefacción y sacarificación) con un proceso simultáneo de licuefacción y sacarificación de la harina de pan para obtener un jarabe rico en glucosa. Para ello se midió glucosa en la hidrólisis enzimática secuencial, y azúcares reductores, glucosa y viscosidad en la hidrólisis enzimática simultánea. Para optimizar las condiciones de los procesos se han modelizado las curvas y se ha utilizado un tratamiento estadístico de diseño de superficie de respuesta.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue optimizar un proceso simultáneo de licuefacción y sacarificación para producir un jarabe rico en glucosa a partir de harina de pan.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las condiciones óptimas de pH y T^a del proceso simultáneo de licuefacción y sacarificación, y del proceso de sacarificación secuencial.

- Comparar los procesos de hidrólisis enzimática simultánea y secuencial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para la elaboración de la harina de pan, la Tahona de Sahagún (Palencia, España), una panadería local, donó los excedentes de sus barras de pan duro. Cada barra de pan pesó 250 g y la formulación es la siguiente: 1,8% de sal, 4% de levadura fresca, 55% de agua y 2% de mejorante por cada 100 g de harina. Estos panes se molturaron con un molino de martillos LM 3100 (Pertin Instruments, Huddinge, Suecia) hasta obtener una harina inferior a 1.000 μm . La humedad de esta harina fue 8,24%.

Para el proceso de licuefacción se utilizó la enzima α -amilasa (Liquoflow® Yield) producida por una cepa modificada genéticamente de *Bacillus*, cuya actividad enzimática es de 278 KNU-AH/g, KNU-AH es la cantidad de α -amilasa que descompone 5,26 g de almidón por hora según el método estándar de Novozymes (Demirci et al., 2017). La dosis de α -amilasa empleada fue de 0,179 $\mu\text{l/g}$ de harina de pan. La sacarificación se realizó con la ayuda de la enzima amiloglucosidasa (Saczyme® Go 2X) producida por cepas seleccionadas de *Aspergillus niger*, con una actividad enzimática de 1725 AGU/g, AGU es la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de maltosa por minuto (Riukaite et al., 2019). La dosis de amiloglucosidasa usada fue de 0,292 $\mu\text{l/g}$ de harina de pan.

3.2. Métodos

3.2.1. Licuefacción y sacarificación secuencial

3.2.1.1. Licuefacción

El proceso de licuefacción secuencial se realizó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con una mezcla de harina de pan y agua destilada (20 g de harina de pan en 80 ml de agua destilada). Esta mezcla se homogeneizó en una placa agitadora Velp Scientifica AM4 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italia) durante 5 minutos a 1.500 rpm. Posteriormente se midió el pH de la mezcla, el cual era de $5,7 \pm 0,2$. Se añadió la enzima Liquoflow® Yield (3,6 μl), se agitó el matraz manualmente y se introdujo en el baño termostático agitador Ovan BS127 E (Ovan, Barcelona, España) a 86,2°C y 70 rpm durante 2 horas. Estas condiciones fueron las optimizadas previamente a este estudio. Finalmente, los matraces se congelaron a -20°C hasta su empleo.

3.2.1.2. Sacarificación

Esta etapa se realizó tras el proceso de licuefacción. Los matraces se descongelaron a 35°C en un baño calefactor Nahita 601/3 (Laboquimia®, Logroño, España). Después, se ajustó el pH de la mezcla con NaOH 1 M o con HCl 1 M al valor deseado para cada ensayo, los cuales pueden observarse en la Tabla 1. Se añadió la enzima Saczyme® Go 2X (5,8 µl), se agitó el matraz manualmente y se introdujo en el baño termostático agitador (BS127 E, Ovan, Barcelona, España) a la temperatura deseada en función del ensayo (Tabla 1) y a 70 rpm durante 2 horas. Se analizó el contenido de glucosa antes de la adición de la enzima y a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de su adición.

3.2.2. Licuefacción y sacarificación simultánea

El proceso de licuefacción y sacarificación también se realizó simultáneamente añadiendo las dos enzimas al mismo tiempo. Se estudió el efecto de pH y de la T^a del proceso siguiendo los mismos rangos que los empleados en el proceso de sacarificación (Tabla 1).

En este proceso se midieron tanto azúcares reductores, como concentración de glucosa, antes de la adición de las enzimas y a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de su adición. También se determinó la viscosidad durante 2 horas después de la adición de las enzimas.

3.2.3. Determinaciones analíticas

3.2.3.1. Azúcares reductores

Para determinar la concentración de azúcares reductores se empleó el método DNS (Miller, 1959). Alícuotas de 1 ml de la mezcla de la hidrólisis enzimática se tomaron en microtubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 21°C en la centrifugadora (Centrifuge 5418R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Posteriormente se añadieron 10 µl de sobrenadante de cada muestra a 1,99 ml de NaOH 1M y 2,0 ml de reactivo DNS (1% de NaOH, 1% de ácido dinitrosalicílico, 0,2% de fenol y 0,05% de sulfito de sodio). Los tubos se calentaron a ebullición en un baño calefactor durante 15 minutos, se enfriaron con agua fría y se añadió 1,0 ml de Sal de Rochelle (solución de tartrato sódico-potásico 40%) a cada tubo para estabilizar el color. Finalmente, se leyó la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro 4001/4 (Spectronic Unicam, Nueva York, Estados Unidos).

Al mismo tiempo, se preparó una recta de calibrado con patrones de concentraciones conocidas de glucosa (0, 2, 5, 7, 10, 15 y 20 g/l).

La determinación de azúcares reductores se determinó por triplicado para cada muestra.

3.2.3.2. Glucosa

Para determinar la concentración de glucosa se empleó un kit enzimático K-FRUGL (Megazyme, Bray, Irlanda). Alícuotas de 1 ml de la mezcla de la hidrólisis enzimática se tomaron en microtubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 21°C en la centrifugadora (Centrifuge 5418R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Finalmente se diluyó el sobrenadante con agua destilada a 1/500 y se guardó la muestra a 4°C hasta su análisis. Las muestras se midieron en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) a 340 nm.

Se realizó una recta de calibrado con patrones de concentraciones conocidas de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6 g/l de glucosa.

La determinación de glucosa se determinó por triplicado para cada muestra.

3.2.3.3. Viscosidad

La viscosidad de las muestras se midió con el equipo Newport Scientific model 4-SA (Warriewood, Australia). Se empleó una mezcla de harina de pan y agua de 6,25 g y 25 ml, lo que equivale a 20 g de harina de pan y 80 ml de agua. Se ajustó el pH de la mezcla con NaOH 1 M o con HCl 1 M al valor deseado para cada ensayo (Tabla 1). Se adicionaron 1,1 μ l de la enzima α -amilasa y 1,8 μ l de la enzima amiloglucosidasa. Los análisis se realizaron a 160 rpm durante 2 horas a la T^a de cada ensayo (Tabla 1).

3.3. Tratamiento estadístico de los datos

3.3.1. Modelización de las curvas

Las cinéticas de producción de glucosa obtenidas del proceso de sacarificación secuencial y de glucosa y azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática simultánea se modelizaron usando una regresión no lineal estimándose los parámetros del modelo por el método de Marquardt (Hecke, 2017). Esta modelización se empleó para calcular la concentración teórica de azúcares reductores y glucosa a los 120 minutos (f_{120}) y la velocidad máxima (m_i) de producción de azúcares reductores y glucosa.

El modelo matemático que se usó para calcular la concentración teórica de azúcares reductores ($AR_{f_{120}}$) y glucosa ($G_{f_{120}}$) a los 120 minutos fue la siguiente:

$$f(t) = \frac{a}{1 + be^{-ct}} \text{ con } a > 0, b > 0 \text{ y } c > 0.$$

Donde $f(t)$ es el cambio de la respuesta analizada (azúcares reductores o glucosa) en el tiempo, a , b y c son los coeficientes del modelo y t es el tiempo.

También se calculó la velocidad máxima (m_i) a la que se forman los azúcares reductores (AR_{m_i}) o la glucosa (G_{m_i}) en el tiempo en el cual la pendiente es máxima (t_i). Este parámetro se obtiene de la derivada de la función anterior con respecto al tiempo.

$$m_i = f'(t_i) = \frac{ac}{4}$$

Para ajustar la curva de viscosidad se empleó el siguiente modelo matemático:

$$f(t) = \frac{a}{1 + bt^c} \text{ con } a > 0, b > 0 \text{ y } c > 0.$$

Donde $f(t)$ es el cambio de la viscosidad con el tiempo, a , b y c son los coeficientes del modelo y t es el tiempo.

La velocidad máxima (m_i) a la que se reduce la viscosidad de la muestra (VT_{m_i}) se obtuvo al calcular, la derivada del anterior modelo en el punto de inflexión donde es máxima la pendiente.

$$m_i = f'(t_i) = \left(\frac{-ab(c+1)^2}{2c} \right) \left(\frac{c-1}{b(c+1)} \right)^{(c-1)/c}$$

Para todos estos cálculos se empleó el paquete estadístico SAS 9.4 (SASInstitute Inc, 2011).

3.3.2. Diseño de superficie de respuesta

Para obtener los valores de pH y temperatura óptimos del proceso de sacarificación secuencial y licuefacción y sacarificación simultánea se seleccionó un diseño central compuesto (2^2 + estrella) ya que permite estudiar los efectos lineales, cuadráticos y cruzados de dos factores (pH y T^a). Cada factor se hizo variar en 5 niveles y se

incluyeron 8 puntos centrales de replicación para evaluar el error experimental. El experimento diseñado consistió en 16 ensayos (Tabla 1).

Las respuestas que usamos para analizar los resultados de azúcares reductores y glucosa tanto en sacarificación como en licuefacción y sacarificación simultánea son ART_{120} y GT_{120} (la concentración de azúcares reductores o glucosa obtenida de manera experimental a los 120 minutos), ARf_{120} y Gf_{120} , y ARm_i y Gm_i . En el caso de la viscosidad, analizada en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea, la respuesta empleada fue VTm_i .

Este diseño de superficie de respuesta se realizó con el software estadístico Statgraphics Centurion 18_X64 (Manugistics, Rockland MD).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Sacarificación secuencial

Los datos de la concentración de glucosa experimental (GT_{120}) y teórica (Gf_{120}) a los 120 minutos y la velocidad máxima (Gm_i) de producción de glucosa de los 16 ensayos del proceso de sacarificación secuencial se recogen en la Tabla 1. Los valores de GT_{120} variaron entre 35,8 y 141,2 g/l. Kawa-Rygielska et al. (2012) obtuvieron unas cantidades de glucosa entre 122,4 y 132,8 g/l, realizando una sacarificación de restos de pan de trigo y centeno de 90 minutos a 55°C y pH 5,80. Estas cantidades son algo inferiores a la máxima obtenida en nuestro ensayo nº5 (141,2 g/l). Sin embargo, Pietrzak & Kawa-Rygielska. (2014) realizaron el mismo proceso de sacarificación que Kawa-Rygielska et al. (2012) en residuos de pan de trigo y centeno y la cantidad de glucosa que obtuvieron fue de aproximadamente 55 g/l, lo cual se aleja mucho de nuestro valor máximo obtenido.

A modo de ilustración en la Figura 1 se muestran tres cinéticas de glucosa experimental a 65°C (experimentos 5, 6 y 12) en los cuales se ha variado el pH (4,09, 6,91 y 5,50, respectivamente), observándose un incremento notable en la concentración de glucosa al disminuir el pH de la sacarificación.

Tabla 1. Resultados de la etapa de sacarificación secuencial. GT_{120} : concentración de glucosa experimental a los 120 minutos. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica a los 120 minutos. Gm_i : velocidad máxima de producción de glucosa. R^2 : coeficiente de regresión de ajuste del modelo.

Ensayo	pH	T ^a (°C)	GT ₁₂₀ (g/l)	Gf ₁₂₀ (g/l)	Gm _i (g/l·min)	R ² (%)
1	4,50	50,0	81,80	83,06	0,81	99,57
2	6,50	50,0	57,02	56,72	0,48	96,32
3	4,50	80,0	89,72	88,34	2,69	99,63
4	6,50	80,0	35,76	37,47	0,58	97,09
5	4,09	65,0	141,20	137,30	1,57	99,10
6	6,91	65,0	41,99	38,59	0,56	95,03
7	5,50	43,8	63,16	63,00	0,53	99,76
8	5,50	86,2	29,37	30,26	0,47	99,10
9	5,50	65,0	108,95	104,94	1,08	98,42
10	5,50	65,0	124,75	121,64	1,10	98,45
11	5,50	65,0	114,62	113,37	1,32	98,64
12	5,50	65,0	109,72	105,55	1,26	98,82
13	5,50	65,0	104,76	101,15	1,11	98,87
14	5,50	65,0	126,72	123,03	1,05	97,07
15	5,50	65,0	114,35	112,26	1,38	99,66
16	5,50	65,0	116,24	112,50	1,25	98,83

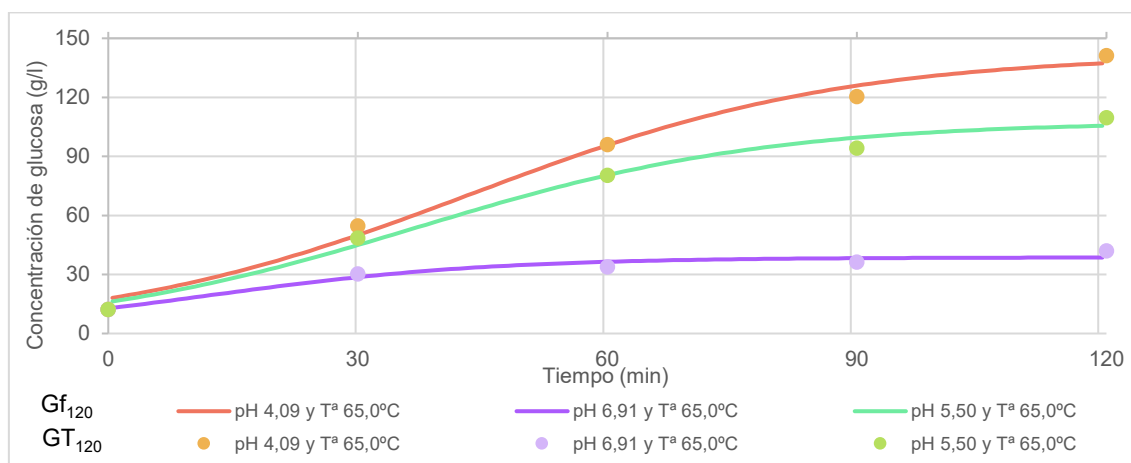


Figura 1. Comparación de las concentraciones de glucosa obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de sacarificación de los ensayos a misma T^a y distinto pH. GT_{120} : concentración de glucosa experimental. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica.

En el ensayo n°5 a pH 4,09 se obtuvo la máxima cantidad de glucosa de los 16 ensayos, ya que se realizó en las condiciones de pH y temperatura próximas a las óptimas de la enzima (Maldonado-Guzmán et al., 1995). A los 120 min se alcanzaron 141,2 g/l de glucosa, siendo mayor la actividad enzimática en la primera hora de ensayo, en la cual se alcanzó más de la mitad de la concentración total. Esta concentración es más del triple de lo que se obtuvo en el ensayo que se realizó a pH 6,91, en el cual solo se alcanzó una concentración de glucosa de 41,99 g/l. En estas condiciones la enzima cesa su actividad a los 60 minutos, a partir del cual la

concentración de glucosa se mantiene constante. Amaral-Fonseca et al. (2021) también experimentaron que un pH superior a 6,0 provoca una disminución en la actividad de la enzima amiloglucosidasa. A pH 5,50, la concentración de glucosa que se obtuvo fue de 109,7 g/l. En este caso la enzima también tuvo una mayor actividad en la primera mitad del ensayo, y se aprecia como a las 2 h de ensayo la cantidad de glucosa comienza a estabilizarse.

En la Figura 2 se representan tres cinéticas de producción de glucosa variando la temperatura con un pH constante de 5,50 (experimentos 7, 8 y 12). Se aprecia como a dicho pH, tanto una T^a muy elevada ($86,2^{\circ}\text{C}$), como una T^a muy baja ($43,8^{\circ}\text{C}$), resultan negativas para obtener una mayor concentración de glucosa. A pH 5,50, la mayor concentración de glucosa ($109,72\text{ g/l}$) se obtiene a 65°C , que se ha descrito como la T^a óptima para la enzima amiloglucosidasa (Maldonado-Guzmán et al., 1995). En este ensayo la actividad enzimática es mayor en los primeros 60 min, y se aprecia como a las 2 h de sacarificación se comienza a estabilizar la concentración de glucosa. A $86,2^{\circ}\text{C}$, se obtuvo una concentración de glucosa de $29,25\text{ g/l}$, lo que supone aproximadamente un 75% menos que en el ensayo a 65°C . Se aprecia como la enzima cesa su actividad aproximadamente a los 30 min de ensayo, lo cual puede deberse a las altas temperaturas que pueden provocar una desnaturalización de la enzima (Roca et al., 2003). A $43,8^{\circ}\text{C}$ se obtuvo una cantidad de $63,16\text{ g/l}$ de glucosa, un valor que se encuentra entre medias de los otros dos ensayos, en estas condiciones, la formación de glucosa es progresiva y la actividad de la enzima se mantiene constante.

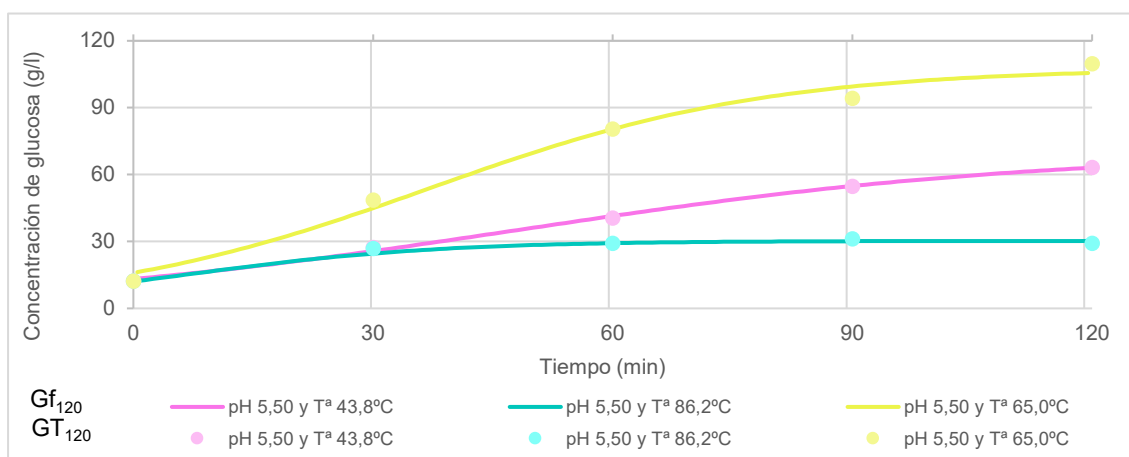


Figura 2. Comparación de las concentraciones de glucosa obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de sacarificación de los ensayos a distinta T^a y mismo pH. GT_{120} : concentración de glucosa experimental. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica.

Como se aprecia en la Figura 1 y 2, el modelo de regresión no lineal empleado se adecúa a las curvas de glucosa obtenidas de forma experimental en el proceso de sacarificación.

El coeficiente de regresión R^2 que indica la bondad del ajuste del modelo fue elevado, entre el 95,0-99,7%, para los 16 ensayos (Tabla 1).

Finalmente, los gráficos de superficie de respuesta ilustran el efecto del pH y la T^a sobre las respuestas GT_{120} y Gm_i (Figura 3a y 3b, respectivamente). Además, derivando la ecuación del modelo matemático obtenido para cada respuesta respecto al pH o la T^a , se obtuvieron sus valores óptimos para maximizar las respuestas. Al sustituir estos valores de pH y T^a óptimos en dicha ecuación se calculó el valor máximo teórico de cada respuesta (Tabla 2).

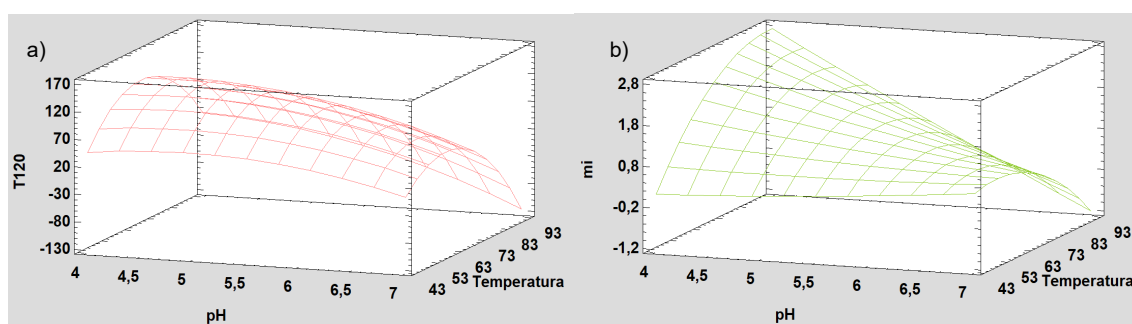


Figura 3. Gráficos de superficie de respuesta 3D del proceso de sacarificación. a) concentración de glucosa experimental. b) velocidad de formación. T_{120} : concentración de glucosa experimental (g/l). m_i : velocidad máxima de formación de glucosa: (g/l·min). Temperatura ($^{\circ}C$)

Tabla 2. Valores óptimos de pH y T^a y valor teórico máximo obtenido para cada para el proceso de sacarificación secuencial.

Respuesta	pH óptimo	T^a óptima ($^{\circ}C$)	R^2 (%)	Valor de la respuesta en condiciones óptimas
GT_{120}	4,38	65,3	96,65	130,82 g/l
Gf_{120}	4,39	64,8	93,97	126,92 g/l
Gm_i	4,09	86,2	78,09	2,63 g/l·min

En el proceso de sacarificación, la máxima cantidad de glucosa teórica (130,82 g/l) se alcanzaría a un pH de 4,38 y 65,3 $^{\circ}C$ de temperatura (Tabla 2 y Figura 3a). Estas condiciones óptimas similares a las que Riaukaite et al., (2019) emplearon en el proceso de sacarificación que realizaron para obtener un jarabe de glucosa-fructosa a partir de residuos de pan, y muy parecidas a las empleadas por Sirohi et al. (2021) que realizaron una sacarificación a pH 4,0 y 60 $^{\circ}C$ para obtener azúcares reductores a partir de almidón de trigo dañado. En la Figura 3a se aprecia como, en las condiciones de ensayo, la T^a tiene una influencia mayor que el pH sobre la concentración de

glucosa, reduciéndose notablemente la actividad de la enzima amiloglucosidasa a T^a bajas o altas, es decir entre 43 y 83°C. Valores de pH superiores a 6,0 también afectan de manera negativa a la formación de glucosa, pero en menor extensión.

El valor óptimo de la velocidad máxima a la que se forma la glucosa fue de 2,63 g/l·min y se obtiene en las condiciones óptimas de pH 4,09 y 86,2°C (Tabla 2 y Figura 3b) que corresponden con el pH más bajo y la T^a más alta ensayados. A baja temperatura (43,8°C) la velocidad es pequeña y su valor se mantiene bajo para cualquier pH ensayado. Sin embargo, a altas temperaturas (86,2°C), se observa un incremento notable en la velocidad a medida que desciende el pH del medio y su valor se acerca al pH óptimo descrito para la enzima (Figura 3b), lo cual demuestra que G_{mi} está muy condicionada por el ensayo n°3.

4.2. Licuefacción y sacarificación simultánea

Se realizaron 16 ensayos de licuefacción y sacarificación simultánea, bajo las mismas condiciones de pH y T^a que en la etapa de sacarificación secuencial (Tabla 1). En la Tabla 3 se recogen los datos de azúcares reductores experimentales (AR_{T120}) y teóricos (AR_{f120}), glucosa experimental (G_{T120}) y teórica (G_{f120}) a 120 minutos, la velocidad de formación de los azúcares reductores (AR_{mi}), y glucosa (G_{mi}), y la velocidad teórica a la que se reduce la viscosidad (VT_{mi}). En el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea se obtuvieron unas concentraciones de azúcares reductores de entre 86,6 y 228,7 g/l, unas concentraciones de glucosa de entre 16,2 y 116,0 g/l, y la velocidad teórica a la que se reduce la viscosidad varió entre los 53,19 y 1,60E+13 g/l·min.

Al igual que ocurrió con la etapa de sacarificación secuencial, tanto el pH como la T^a influyen en la formación de azúcares reductores (Figura 4 y Figura 5) y glucosa (Figura 6 y Figura 7) durante el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea. Los ensayos que se muestran en las Figuras 4 y 6 son el n°5, el n°6 y el n°12, realizados a 65°C y a valores de pH 4,09, 6,91 y 5,50, respectivamente. En el caso de las Figuras 5 y 7 se muestran los ensayos n°7, n°8 y n°12, realizados a pH 5,50 y a 43,8, 86,2 y 65,0°C, respectivamente.

Tabla 3. Resultados del proceso de licuefacción y sacarificación simultánea. ART_{120} : concentración de azúcares reductores experimentales a los 120 minutos. ARf_{120} : concentración de azúcares reductores teóricos a los 120 minutos. ARm_i : velocidad máxima de producción de azúcares reductores. GT_{120} : concentración de glucosa experimental a los 120 minutos. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica a los 120 minutos. Gm_i : velocidad máxima de producción de glucosa. VTm_i : velocidad teórica a la que se reduce la viscosidad.

Ensayo	ART_{120} (g/l)	ARf_{120} (g/l)	ARm_i (g/l·min)	GT_{120} (g/l)	Gf_{120} (g/l)	Gm_i (g/l·min)	VTm_i (cp/min)
1	127,85	125,46	1,33	80,66	80,74	1,13	140,77
2	106,37	105,97	1,16	40,77	39,80	0,46	157,54
3	143,49	135,89	3,01	78,28	79,11	1,61	827,42
4	86,59	85,30	1,17	16,19	15,94	0,22	634,58
5	204,58	197,17	2,00	115,46	113,18	1,40	621,11
6	113,87	113,78	1,46	30,93	30,22	0,30	6.173,47
7	110,20	108,77	1,30	47,69	49,32	0,62	53,15
8	122,89	118,45	2,05	27,43	28,02	0,42	597,52
9	219,88	213,48	2,64	96,06	93,30	1,31	1,60E+13
10	226,33	220,43	2,50	115,97	108,44	1,31	2.246,65
11	225,44	227,54	2,46	101,51	97,73	1,17	391,60
12	206,92	204,93	2,82	100,92	96,12	1,33	862,77
13	206,11	205,13	2,58	96,74	92,04	1,46	489,84
14	200,12	203,61	2,32	108,73	105,86	1,54	370,87
15	201,16	198,65	2,30	97,10	93,28	1,18	146.197,85
16	228,73	227,13	2,44	99,54	95,10	1,53	724,20

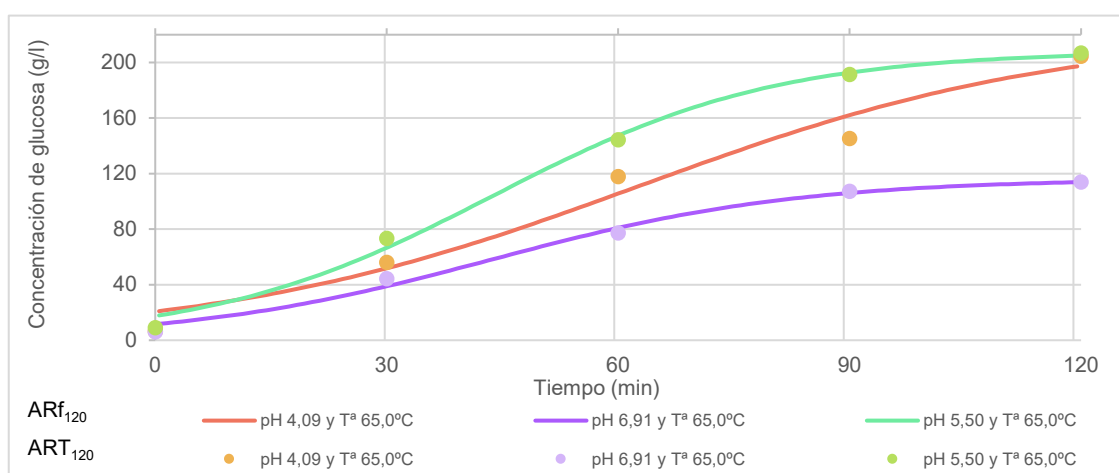


Figura 4. Comparación de las concentraciones de azúcares reductores obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea de los ensayos a misma T^a y distinto pH. ART_{120} : concentración de azúcares reductores experimentales. ARf_{120} : concentración de azúcares reductores teórica.

A 65°C (Figura 4), ambas enzimas trabajaron sinérgicamente a pH 4,09 y 5,50, obteniéndose unas cantidades de azúcares reductores de 204,6 y 206,9 g/l respectivamente. Estas cantidades de azúcares reductores son superiores a las

obtenidas por Sirohi et al. (2021), que alcanzaron unas cantidades de azúcares reductores de 100,12 a 150,97 g/l tras un proceso de licuefacción y sacarificación secuencial de almidón de trigo dañado a pH 5,0 y 90°C y pH 4,0 y 60°C respectivamente. A pH 6,91 se consiguió aproximadamente un 45% menos de azúcares reductores (113,87 g/l), lo cual puede deberse a que la enzima amiloglucosidasa, que es la encargada de la formación de glucosa, es menos eficaz a este pH.

Al pH de 5,50 (Figura 5), a la temperatura de 65,0°C se alcanzó la mayor cantidad de azúcares reductores (206,9 g/l). A 86,2°C y 43,8°C se obtuvieron unas cantidades de azúcares reductores de 122,9 g/l y 110,2 g/l, respectivamente, lo cual supuso una reducción aproximada del 40-45% respecto al ensayo de 65°C.

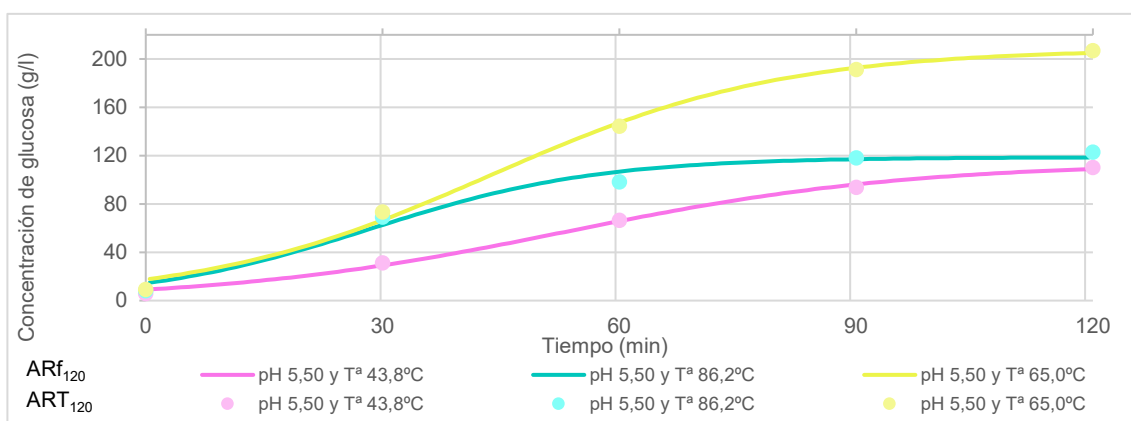


Figura 5. Comparación de las concentraciones de azúcares reductores obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea de los ensayos a distinta Tª y mismo pH. ART₁₂₀: concentración de azúcares reductores experimental. ARf₁₂₀: concentración de azúcares reductores teórica.

Además de los azúcares reductores se analizó la concentración de glucosa a las 2 horas de hidrólisis enzimática simultánea. En la Figura 6 se aprecia como a 65,0°C las mayores concentraciones de glucosa se obtuvieron a pH 4,09 y a pH 5,50 (115,5 y 100,9 g/l, respectivamente) al igual que ocurrió con los azúcares reductores. Fujii et al. (1988) experimentaron que las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa trabajan sinérgicamente a 30°C y pH 5,25, valor de pH que se encuentra entre los dos valores anteriores. Estas cantidades son muy superiores a los 30,93 g/l de glucosa que se obtuvieron a pH 6,91.

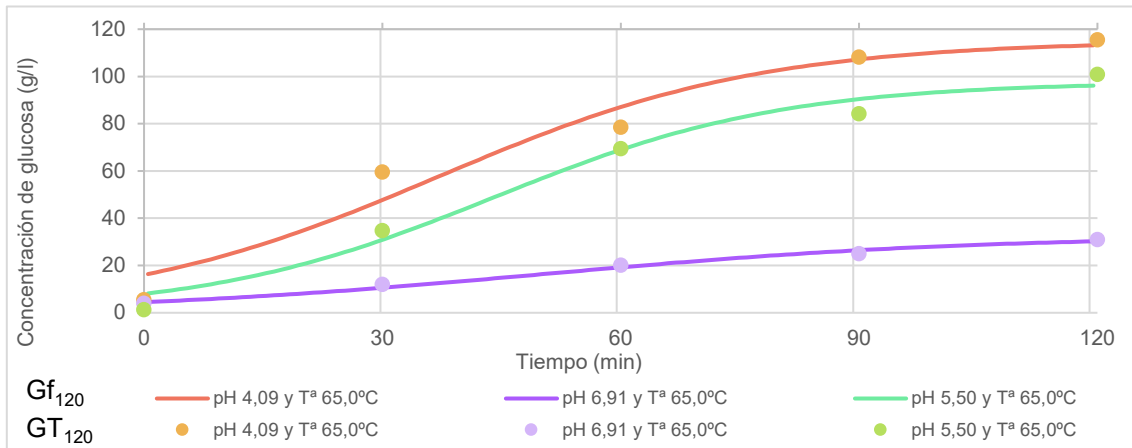


Figura 6. Concentración de glucosa de 3 ensayos de hidrólisis simultánea realizados a misma T^a y distinto pH. Comparación de las concentraciones de glucosa obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de hidrólisis simultánea de los ensayos a misma T^a y distinto pH. GT_{120} : concentración de glucosa experimental. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica.

Cuando se mantuvo el pH constante, a 5,50 (Figura 7), la mayor concentración de glucosa se obtuvo a 65,0°C (100,92 g/l), la cual es adecuada para las dos enzimas (Maldonado-Guzmán et al., 1995). A 43,8°C se consiguió un 50% menos de glucosa (47,69 g/l). Pero el menor rendimiento se logró a 86,2°C con tan solo 27,43 g/l de glucosa, y como se aprecia en la Figura 7, en los últimos 30 minutos de ensayo no se produjo glucosa, lo cual puede deberse a que, a elevadas temperaturas mantenidas en el tiempo, la enzima amiloglicosidasa pierde su actividad enzimática al desnaturalizarse (Roca, 2003).

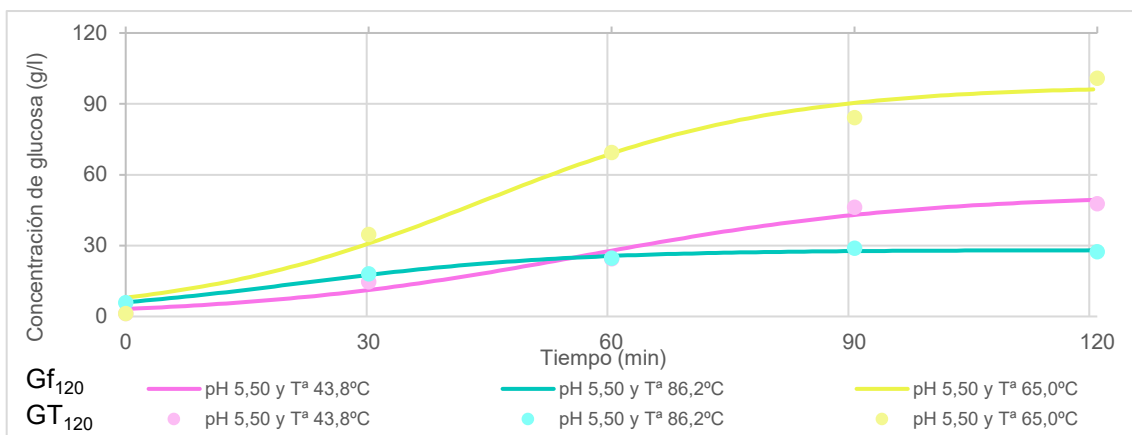


Figura 7. Concentración de glucosa de 3 ensayos de hidrólisis simultánea realizados a distinta T^a y mismo pH. Comparación de las concentraciones de glucosa obtenidas de manera experimental y de manera teórica en el proceso de hidrólisis simultánea de los ensayos a distinta T^a y mismo pH. GT_{120} : concentración de glucosa experimental. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica.

El coeficiente de regresión R^2 que indica la bondad del ajuste del modelo fue elevado, superiores al 90%, para los 16 ensayos (Tabla 4).

En la Figura 8a se observan los ensayos 5, 6, 7, 8 y 12 de viscosidad del proceso de licuefacción y sacarificación simultánea realizado con el RVA. Se aprecia como independientemente del pH y la Tª a la que se realicen los ensayos, la viscosidad se reduce drásticamente durante los primeros minutos del ensayo. Demirci et al., (2017) también observaron una rápida caída de la viscosidad al principio del proceso de licuefacción de los residuos de pan. Paralelamente, en la Figura 8b se observan los ensayos de viscosidad ajustados al modelo de regresión no lineal. En la Tabla 4 se recoge el coeficiente de regresión R² para los 16 ensayos de viscosidad modelizados, el modelo se ajusta con bondad ya que los valores son superiores al 98%.

Tabla 4. Comprobación de la adecuación del modelo en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea estudiando el coeficiente de regresión R². AR: azúcares reductores. G: glucosa. V: viscosidad.

Ensayo	R ² AR (%)	R ² G (%)	R ² V (%)
1	99,29	99,38	99,87
2	99,48	98,31	99,90
3	98,45	99,96	98,99
4	97,09	90,89	99,56
5	97,07	95,76	99,77
6	99,09	99,07	99,14
7	99,68	97,49	99,22
8	98,03	99,19	99,64
9	98,63	96,91	98,42
10	97,48	95,84	99,63
11	96,86	97,90	99,93
12	99,53	98,13	99,75
13	99,55	98,67	99,86
14	97,30	99,15	99,94
15	98,60	97,54	98,34
16	98,62	98,76	99,69

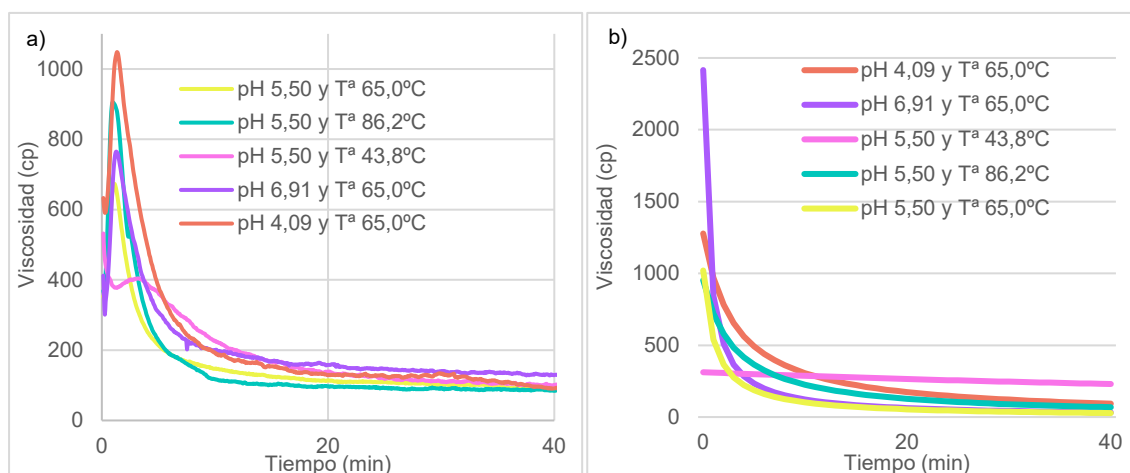


Figura 8. a) Ensayos de viscosidad realizados con el RVA. b) Curvas de viscosidad obtenidas con la modelización de las curvas.

Para terminar, para cada una de las respuestas estudiadas en el proceso de hidrólisis simultánea las superficies de respuesta permitieron observar gráficamente el efecto de los parámetros pH y T^a dentro de los rangos estudiados. Las respuestas estudiadas fueron azúcares reductores y glucosa experimental a tiempo 120 minutos (AR_{T120} , G_{T120}), la velocidad de formación (AR_{mi}) de azúcares reductores y glucosa (G_{mi}) en el tiempo en el cual la pendiente es máxima, y la velocidad a la que disminuye la viscosidad de la mezcla (VT_{mi}) (Tabla 5). Los valores óptimos de pH y temperatura, y los valores máximos teóricos de cada respuesta se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores óptimos de pH y T^a y valor teórico máximo obtenido para cada respuesta para el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea. ART_{120} : concentración de azúcares reductores experimental. ARf_{120} : concentración de azúcares reductores teórica. GT_{120} : concentración de glucosa experimental. Gf_{120} : concentración de glucosa teórica. ARM_i : velocidad de formación de los azúcares reductores. Gm_i : velocidad de formación de glucosa. VTm_i : velocidad a la que disminuye la viscosidad de la mezcla.

Respuesta	pH óptimo	T^a óptima (°C)	R^2 (%)	Valor de la respuesta en condiciones óptimas
ART_{120} (g/l de glucosa)	5,10	65,7	94,23	219,52
ARf_{120} (g/l de glucosa)	5,15	65,4	94,61	216,73
ARM_i (g/l·min)	4,63	77,5	92,30	2,80
GT_{120} (g/l de glucosa)	4,51	64,7	96,16	114,19
Gf_{120} (g/l de glucosa)	4,47	64,7	98,13	112,11
Gm_i (g/l·min)	4,29	69,3	92,51	1,63
VTm_i (cp/min)	5,50	65,0	6,67	2,00E+12

Los gráficos de superficie de respuesta 3D (Figura 9a y 9b) ilustran el efecto del pH y la T^a sobre las respuestas ART_{120} , y ARM_i .

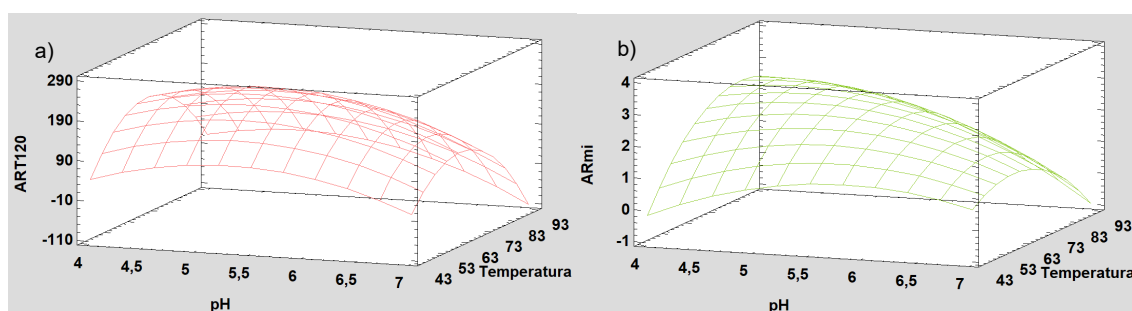


Figura 9. Gráficos de superficie de respuesta 3D del proceso de hidrólisis simultánea. a) concentración de azúcares reductores experimentales. b) velocidad de formación de azúcares reductores. ART_{120} : concentración de azúcares reductores obtenidos de manera experimental (g/l). ARM_i : velocidad máxima de formación de azúcares reductores (g/l·min). Temperatura (°C).

En el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea, teóricamente se llegarían a los 219,5 g/l de azúcares reductores si se realizara a 65,7°C y pH 5,10 (Tabla 5 y Figura 9a), pH que se acerca al pH 5,5 que emplearon Fujii et al. (1988) cuando se emplearon las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa de manera simultánea. Los pH

inferiores a 4,5 o superiores a 6,0 afectan de manera negativa al proceso simultáneo. Las T^a s bajas o altas, es decir, entre 43-53°C y superiores a 83°C fueron perjudiciales ya que influyen negativamente en la formación de azúcares reductores.

La máxima velocidad de formación de los azúcares reductores se obtendría a pH 4,63 y 77,5°C, alcanzando un valor teórico de 2,80 g/l·min (Tabla 5 y Figura 9b). A baja temperatura (43,8°C) la velocidad es pequeña y su valor se mantiene bajo para cualquier pH ensayado. Sin embargo, a una temperatura más elevada (75°C), se observa un incremento notable en la velocidad a medida que desciende el pH del medio y su valor se acerca al pH óptimo descrito para la enzima amiloglucosidasa (Figura 9b).

La Figura 10a y 10b muestra los gráficos de superficie de respuesta 3D que ilustran el efecto de los parámetros pH y T^a sobre GT_{120} , y Gm_i en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea.

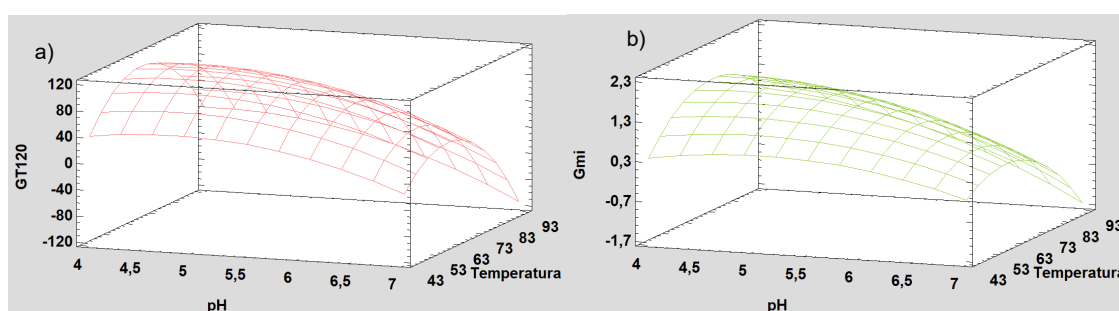


Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta 3D del proceso de hidrólisis simultánea. a) concentración de glucosa experimental. b) velocidad de formación de glucosa. GT_{120} : concentración de glucosa obtenida de manera experimental (g/l). Gm_i : velocidad máxima de formación de glucosa (g/l·min). Temperatura (°C).

Teóricamente, la cantidad máxima de glucosa (114,2 g/l) se obtendría a 64,7°C y pH 4,51 (Tabla 5 y Figura 10a), valores similares a los empleados por Ebrahimi et al. (2008) que realizaron para la sacarificación de residuos de pan a 60°C y pH 4,5. Tal y como se observó para los azúcares reductores, la temperatura tiene una mayor influencia que el pH en la formación de glucosa, alcanzando una mayor cantidad en las T^a s intermedias dentro del intervalo estudiado (53-73°C) y un pH inferior a 6,0 en ese caso. A bajas temperaturas el efecto del pH en la formación de glucosa fue mínimo (Figura 10a).

La velocidad de formación de glucosa máxima es de 1,63 g/l·min, la cual se alcanzaría a 69,3°C y pH 4,39 (Tabla 5 y Figura 10b). Al igual que con GT_{120} , las temperaturas inferiores a 60°C y las temperaturas superiores a 80°C afectan negativamente a la velocidad de formación de glucosa. Además, estas temperaturas influyen de manera

más negativa si se combinan con pH superiores a 6,0. En cuanto al pH, los pH superiores a 6 son negativos para la velocidad de formación de glucosa en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea indistintamente de la temperatura (Figura 10b).

En el caso de la viscosidad, la velocidad máxima a la que se reduce tiene lugar a pH 5,50 y 65,0°C, alcanzándose una velocidad teórica de 2,00E+12 cp/min (Tabla 5 y Figura 11). Los pH y T^as extremos de los intervalos estudiados son los que afectan más negativamente a la velocidad a la que se reduce la viscosidad, es decir, a pH 4,0 o 7,0 y T^a 43 o 93°C la viscosidad se reduce más lentamente (Figura 11).

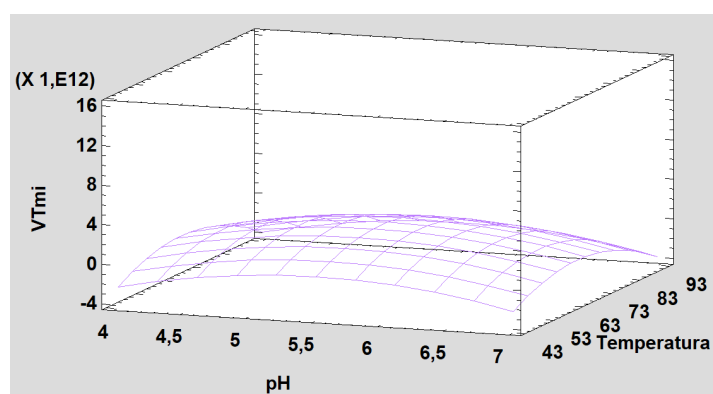


Figura 11. Gráficos de superficie de respuesta 3D de la velocidad de reducción de la viscosidad. VTmi: velocidad de reducción de la viscosidad (cp/min). Temperatura (°C)

Al igual que ocurrió en el proceso de sacarificación, estos datos demuestran que, en el proceso de licuefacción y sacarificación simultánea, los parámetros de pH y T^a, modifican directamente la concentración de azúcares reductores, glucosa, la velocidad a la que se forman, y la velocidad a la que se reduce la viscosidad.

4.3. Comparación entre el proceso de sacarificación secuencial y el proceso de hidrólisis simultánea

Tal y como se observa en la Tabla 6 para la mayoría de los ensayos la concentración de glucosa que se obtiene tras 2 horas de hidrólisis enzimática simultánea es ligeramente inferior (10-15%) a la que se obtiene en un proceso más lento de 2 horas de licuefacción y 2 horas de sacarificación. Además, a pesar de que las condiciones óptimas de pH y temperatura son distintas para las enzimas α -amilasa (86,2°C a pH 5,7) y amiloglucosidasa (65,3°C a pH 4,38), pueden trabajar conjuntamente a 64,7°C a un pH de 4,51 sin que la eficacia del proceso se reduzca significativamente.

Tabla 6. Comparación de la cantidad de glucosa obtenida en el proceso de sacarificación y en el proceso de hidrólisis simultánea.

Ensayo	pH	Temperatura (°C)	Sacarificación	Hidrólisis simultánea
			Glucosa (g/l)	Glucosa (g/l)
1	4,50	50,0	81,80	80,66
2	6,50	50,0	57,02	40,77
3	4,50	80,0	89,72	78,28
4	6,50	80,0	21,57	16,19
5	4,09	65,0	141,20	115,46
6	6,91	65,0	41,99	30,93
7	5,50	43,8	63,16	47,69
8	5,50	86,2	29,25	27,43
9	5,50	65,0	108,95	96,06
10	5,50	65,0	124,75	115,97
11	5,50	65,0	114,62	101,51
12	5,50	65,0	109,72	100,92
13	5,50	65,0	104,76	96,74
14	5,50	65,0	126,72	108,73
15	5,50	65,0	114,35	97,10
16	5,50	65,0	116,24	99,54

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Bajo nuestras condiciones de ensayo (20 g de harina de pan por 80 g de agua, 0,179 $\mu\text{l/g}$ de α -amilasa y 0,292 $\mu\text{l/g}$ de amiloglicosidasa), la óptima producción de glucosa durante el proceso de sacarificación secuencial de la harina de pan con la enzima amiloglicosidasa se alcanzó a pH 4,38 y 65,3°C.
- En el proceso de hidrólisis simultánea, la viscosidad se redujo drásticamente en los primeros minutos para todas las condiciones de pH y temperatura.
- La optimización del proceso de licuefacción y sacarificación simultáneo se alcanzó para la producción de glucosa a pH de 4,51 y 64,7°C, valores similares a los obtenidos en el proceso de sacarificación secuencial.
- Bajo las condiciones optimizadas, el proceso de licuefacción y sacarificación simultáneo de la harina de pan produjo una concentración de glucosa similar a la obtenida en un proceso secuencial, reduciéndose la duración del proceso a la mitad.

En futuras investigaciones se deberían estudiar las cantidades de sustrato y enzimas óptimas para producir la máxima cantidad de glucosa posible. Así como estudiar el proceso de licuefacción y sacarificación simultáneo durante 24 h, tal y como se realiza en la etapa de sacarificación secuencial con almidón.

Actualmente se está estudiando como eliminar el alto contenido de sal que tiene el jarabe rico en glucosa que se obtiene tras la hidrólisis enzimática. Además, una posible vía de investigación posterior podría ser la concentración del jarabe de glucosa obtenido para su uso en el desarrollo de nuevos productos tales como bizcochos, galletas, gominolas o bebidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzalzadeh A., Boorboor A., Fazaeli H., & Kashan N., G. D. . (2007). Effect of feeding bakery waste on sheep performance and the carcass fat quality. In *Journal of Animal and Veterinary Advances* (Vol. 6, Issue 4, pp. 559–562).
- Aka, S., & Buyukdag, N. (2021). How to prevent food waste behaviour? A deep empirical research. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 61(January), 102560. <https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2021.102560>
- Amaral-Fonseca, M., Morellon-Sterling, R., Fernández-Lafuente, R., & Waldir, P. (2021). Optimization of simultaneous saccharification and isomerization of dextrin to high fructose syrup using a mixture of immobilized amyloglucosidase and glucose isomerase. *Catalysis Today*, 362(November 2019), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.021>
- Ananda, J., Gayana, G., Mitsis, A., Kansal, M., & Pearson, D. (2021). Analysing behavioural and socio-demographic factors and practices influencing Australian household food waste. *Journal of Cleaner Production*, 306(September 2020), 127280. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127280>
- Brancoli, P., Bolton, K., & Eriksson, M. (2020). Environmental impacts of waste management and valorisation pathways for surplus bread in Sweden. *Waste Management*, 117, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.043>
- Brancoli, P., Rousta, K., & Bolton, K. (2017). Life cycle assessment of supermarket food waste. *“Resources, Conservation & Recycling,”* 118, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.11.024>
- Caldeira, C., Laurentiis, V. De, Corrado, S., Holsteijn, F. Van, & Sala, S. (2019). Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. *Resources, Conservation & Recycling*, 149(June), 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.06.011>
- Corrado, S., & Sala, S. (2018). Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook. *Waste Management*, 79, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.032>
- Demirci, A., Palabiyik, I., Apayd, D., Mirik, M., & Gumus, T. (2019). Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *LWT - Food Science and Technology*, 101(June 2018), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.018>

- Demirci, A. S., Palabıyık, I., Gümüş, T., & Özalp, Ş. (2017). Waste Bread as a Biomass Source: Optimization of Enzymatic Hydrolysis and Relation between Rheological Behavior and Glucose Yield. *Waste Biomass Valor*, 8(3), 775–782. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9601-6>
- Ebrahimi, F., Khanahmadi, M., Roodpeyma, S., & Taherzadeh, M. J. (2008). Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.007>
- Fernández-Peláez, J., Guerra, P., Gallego, C., & Gomez, M. (2021). Physical properties of flours obtained from wasted bread crusts and crumbs. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020282>
- Forbes, H., Quested, T., & O'Connor, C. (2021). *Food Waste Index Report 2021*.
- Fujii, M., Homma, T., & Taniguchi, M. (1988). Synergism of α -Amylase and Glucosamylase on Hydrolysis of Native Starch Granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 910–915.
- Han, W., Liu, W. X., Yu, C. M., Huang, J. G., Tang, J. H., & Li, Y. F. (2017). BioH₂ production from waste bread using a two-stage process of enzymatic hydrolysis and dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(50), 29929–29934. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.221>
- Hecke, T. Van. (2017). The Levenberg-Marquardt method to fit parameters in the Monod kinetic model. *Journal of Statistics and Management Systems*, 20(5), 953–963. <https://doi.org/10.1080/09720510.2017.1325090>
- Immonen, M., Maina, N. H., Wang, Y., Coda, R., & Katina, K. (2020). Waste bread recycling as a baking ingredient by tailored lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 327(May), 108652. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108652>
- Kawa-Rygielska, J., Pietrzak, W., & Czubaszek, A. (2012). Characterization of fermentation of waste wheat-rye bread mashes with the addition of complex enzymatic preparations. *Biomass and Bioenergy*, 44, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.016>
- Kwak, W. S., & Kang, J. S. (2006). Effect of feeding food waste-broiler litter and bakery by-product mixture to pigs. *Bioresource Technology*, 97, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.008>

- Leung, C. C. J., Cheung, A. S. Y., Zhang, A. Y. Z., Lam, K. F., & Lin, C. S. K. (2012). Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.010>
- Maldonado-Guzmán, H., López-Paredes, O., & Biliaderis, G. C. (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(5), 373–403.
- Martínez, M. M., & Gómez, M. (2017). Rheological and microstructural evolution of the most common gluten-free flours and starches during bread fermentation and baking. *Journal of Food Engineering*, 197, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.008>
- Martínez, M. M., Román, L., & Gómez, M. (2018). Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust. *Food Chemistry*, 239, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.122>
- Martínez, M. M., Sanz, T., & Gómez, M. (2015). Influence of wheat flour subjected to different extrusion conditions on the rheological behaviour and thermal properties of batter systems for coating. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1309–1314. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.037>
- Mihajlovski, K., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2020). Enzymatic hydrolysis of waste bread by newly isolated *Hymenobacter* sp. CKS3: Statistical optimization and bioethanol production. *Renewable Energy*, 152, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.101>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(III), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Naciones Unidas. (2015). *Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible*. 16301, 1–40. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/>
- Oda, Y., Park, B. S., Moon, K. H., & Tonomura, K. (1997). Recycling of bakery wastes using an amylolytic lactic acid bacterium. *Bioresource Technology*, 60(2), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00008-4)
- Pietrzak, W., & Kawa-Rygielska, J. (2014). Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. *Fuel*, 134, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.081>

- Riaukaite, J., Basinskiene, L., & Syrpas, M. (2019). Bioconversion of waste bread to glucose fructose syrup as a value-added product. *Foodbalt*, 120–124. <https://doi.org/10.22616/foodbalt.2019.015>
- Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2003). Bioquímica. Técnicas y métodos. 309-311.
- Samray, M. N., Masatcioglu, T. M., & Koksel, H. (2019). Bread crumbs extrudates: A new approach for reducing bread waste. *Journal of Cereal Science*, 85(August 2018), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.005>
- SASInstitute Inc.: 2011. *SAS/STAT@ 9.3 User's Guide*. Cary, NC: SASInstitute Inc, USA
- Sirohi, R., Pandey, J. P., Goel, R., Singh, A., Lohani, U. C., & Kumar, A. (2021). Two-Stage Enzymatic Hydrolysis for Fermentable Sugars Production from Damaged Wheat Grain Starch with Sequential Process Optimization and Reaction Kinetics. *Starch/Staerke*, 73(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1002/star.202000082>
- Stenmarck, Å., Jensen, C., Quested, T., & Moates, G. (2016). *Estimates of European food waste levels*. 1–80.
- Tonini, D., Federica, P., & Fruergaard, T. (2018). Environmental impacts of food waste : Learnings and challenges from a case study on UK. *Waste Management*, 76, 744–766. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.03.032>
- Torabi, S., Satari, B., & Hassan-Beygi, S. R. (2020). Process optimization for dilute acid and enzymatic hydrolysis of waste wheat bread and its effect on aflatoxin fate and ethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, March. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00676-3>