



FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de **INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

“OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA PARA LA
OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN
DE OCA (*Oxalis tuberosa*)”

Tesis para optar al título profesional de:
INGENIERA AGROINDUSTRIAL

Autor:

Anshela Cynthia Rafael Ayala

Asesor:

Dr. Ricardo David Vejarano Mantilla

<https://orcid.org/0000-0002-7482-1077>

Trujillo - Perú

2024

JURADO EVALUADOR

Jurado 1 Presidente(a)	Jose Manuel Cedano Romero	45070233
	Nombre y Apellidos	N.º DNI

Jurado 2	Cesia Elizabeth Boñon Silva	40222757
	Nombre y Apellidos	N.º DNI

Jurado 3	Jackeline Marilyn Leon Vargas	18216170
	Nombre y Apellidos	N.º DNI

INFORME DE SIMILITUD

2024 Tesis Anshela_R21_14_03.2024 .docx

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%	8%	1%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	dspace.uazuay.edu.ec Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
5	repositorio.ulcb.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.upn.edu.pe Fuente de Internet	1%

Excluir citas Activo Excluir coincidencias < 1%
 Excluir bibliografía Activo

DEDICATORIA

Con todo mi corazón, dedico mi tesis a mi madre, Gricelda Maribel Ayala Cabrera, porque sin ella no habría llegado hasta aquí. Eres una mujer que simplemente me llena de orgullo. Te amo y no podré encontrar la manera de devolverte todo lo que me has ofrecido desde el día en que nací. Esta tesis representa otro logro que he alcanzado, y sin lugar a duda, gran parte del mérito es tuyo. Tu bendición diaria a lo largo de mi vida me protege y me guía por el camino del bien. No sé dónde estaría sin tus consejos, tu compañía y tu amor. Me has enseñado a ser fuerte y a seguir mis sueños, y por eso, siempre te estaré agradecida. Aunque el destino tal vez nos separe físicamente, quiero que sepas que siempre

estarás en mi corazón.

Te doy mis sinceras gracias, madre.

AGRADECIMIENTO

- Agradezco a Dios, fuente de toda bendición y guía en mi vida, por haberme otorgado la fortaleza y la sabiduría necesarias para llegar a este importante momento. A mi familia, cuyo amor incondicional y apoyo constante han sido mi mayor inspiración, les dedico mi más profundo agradecimiento. Su sacrificio y aliento han sido el faro que iluminó mi camino en cada paso de esta travesía.
- Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Ing. Ricardo David Vejarano Mantilla, mi asesor, por su invaluable orientación, dedicación y sabios consejos a lo largo de la realización de esta tesis. Su experiencia y apoyo fueron fundamentales para alcanzar este logro académico.
- Agradezco también a todos aquellos que, de una forma u otra, contribuyeron a mi formación y crecimiento durante este proceso. Cada palabra de aliento, cada gesto de apoyo ha sido un motor que me impulsó hacia adelante.
- Por último, agradezco a la vida por brindarme esta oportunidad de crecimiento y aprendizaje. Que este logro sea solo el inicio de un camino lleno de éxitos y realizaciones. Con gratitud en mi corazón.
- La presente Tesis se ha desarrollado en el marco del Proyecto 20231002 "*Producción de bioetanol a partir de tubérculos andinos de bajo consumo*", de la Universidad Privada del Norte, financiado con recursos ordinarios a través de la Dirección de Investigación, Innovación y Responsabilidad Social.

TABLA DE CONTENIDO

JURADO EVALUADOR	2
INFORME DE SIMILITUD	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTO	5
TABLA DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RESUMEN	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA	13
1.2. MARCO TEÓRICO	16
1.2.1 OCA	16
1.2.2 ALMIDÓN	17
1.2.3 HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN	20
1.2.3.1 ALFA-AMILASA (A-AMILASA)	21
1.2.3.2 GLUCOAMILASA	22
1.2.4 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	23
1.2.5 ETANOL	24
1.2.5.1 ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE	24
1.2.5.2 BEBIDAS ALCOHÓLICAS DESTILADAS	26
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	28
1.4. OBJETIVO GENERAL	28
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
1.6. HIPÓTESIS	29
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	30
2.1. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS	30
2.3. EXTRACCIÓN DEL ALMIDÓN	32
2.4. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ALMIDÓN	33

2.4.1	RENDIMIENTO DE ALMIDÓN EN BASE HÚMEDA:	33
2.4.2	CONTENIDO DE SÓLIDOS EN BASE HÚMEDA:	33
2.4.3	RENDIMIENTO DE ALMIDÓN EN BASE SECA:	33
2.5.	HIDROLISIS DEL ALMIDÓN	33
2.5.1	LICUEFACCIÓN	33
2.5.2	SACARIFICACIÓN	37
2.5.3	FERMENTACIÓN:	40
CAPÍTULO III: RESULTADOS		42
3.1	RENDIMIENTO DEL ALMIDÓN EXTRAÍDO DE LA OCA	42
3.2	HIDROLISIS DE ALMIDÓN	42
3.2.1	LICUEFACCIÓN	42
3.2.2	SACARIFICACIÓN	46
3.2.3	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	50
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		52
REFERENCIAS		60

Índice de tablas

TABLA 1	16
<i>COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA OCA (OXALIS TUBEROSA)</i>	16
TABLA 2	19
<i>CONTENIDO DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN EL ALMIDÓN DE OCA REPORTADO POR DIFERENTES AUTORES</i>	19
TABLA 3	21
<i>MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS AMILASAS</i>	21
TABLA 4	25
<i>PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ETANOL (MILES DE GALONES) ENTRE LOS AÑOS 2018 Y 2022</i>	25
TABLA 5	30
<i>MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS</i>	30
TABLA 6	34
<i>PARÁMETROS EVALUADOS PARA EL SCREENING MEDIANTE UN DISEÑO PLACKETT-BURMAN, USANDO EL PROTIMIZA EXPERIMENT DESIGN SOFTWARE</i>	34
TABLA 7	34
<i>PLACKETT-BURMAN – HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN CON A-AMILASA (100 ML DE SUSPENSIÓN DE ALMIDÓN EN AGUA)</i>	34
TABLA 8	35
<i>PARÁMETROS USADOS PARA OPTIMIZAR EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN DEL ALMIDÓN DE OCA APLICANDO DCCR</i>	35
TABLA 9	36
<i>DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) – HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN CON A-AMILASA (100 ML DE SUSPENSIÓN DE ALMIDÓN EN AGUA)</i>	36
TABLA 10	37
<i>PARÁMETROS UTILIZADOS PARA EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN CON LA ENZIMA GLUCOAMILASA</i>	37

TABLA 11.	38
<i>PLACKETT-BURMAN PARA EVALUAR LA HIDRÓLISIS DE LAS DEXTRINAS CON LA ENZIMA GLUCOAMILASA (SUSPENSIÓN DE 24 % DE SÓLIDOS SOLUBLES [°BRIX]).</i>	
TABLA 12.	38
<i>VARIABLES CON MAYOR INFLUENCIA EN EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN.</i>	
TABLA 13.	39
<i>DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA EVALUAR LA HIDRÓLISIS DE DEXTRINAS EN AZÚCARES FERMENTABLES CON LA ENZIMA GLUCOAMILASA (SUSPENSIÓN DE 24 % DE SÓLIDOS SOLUBLES [°BRIX]).</i>	
TABLA 14.	41
<i>DOSIFICACIÓN DE DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS PARA EVALUAR EL RENDIMIENTO FERMENTATIVO DE LA LEVADURA S. CEREVISIAE.</i>	
TABLA 15.	42
<i>RENDIMIENTO DEL ALMIDÓN DE OCA.</i>	
TABLA 16.	43
<i>APLICACIÓN DE DISEÑO PLACKETT-BURMAN PARA EVALUAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE LA ABSORBANCIA A 635 NM (DEGRADACIÓN DE AMILOSA) TRAS LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA CON A-AMILASA.</i>	
TABLA 17.	45
<i>APLICACIÓN DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA DETERMINAR LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN DE OCA (REDUCCIÓN DE LA ABSORBANCIA A 635 NM) EN DEXTRINAS CON A-AMILASA. ALMIDÓN (30%), TEMPERATURA (85 °C), PH (7,7).</i>	
TABLA 18.	47
<i>APLICACIÓN DE DISEÑO PLACKETT-BURMAN PARA EVALUAR LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES PRODUCIDOS A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS DEXTRINAS DEL ALMIDÓN DE OCA CON GLUCOAMILASA.</i>	
TABLA 19.	49

<i>APLICACIÓN DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA DETERMINAR LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE HIDRÓLISIS DE LAS DEXTRINAS DE OCA EN AZÚCARES FERMENTABLES CON LA ENZIMA GLUCOAMILASA. DEXTRINAS (24 °BRIX), TEMPERATURA (55 °C), PH (4.5).</i>	49
TABLA 20.	51
<i>EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN CON LA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN MOSTOS A BASE DE AZÚCARES FERMENTABLES (23 °BRIX) OBTENIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE OCA USANDO DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO (N).</i>	51

Índice de figuras

FIGURA 1	17
<i>PRODUCCIÓN ANUAL DE OCA EN EL PERÚ ENTRE LOS AÑOS 2005 Y 2022.</i>	17
FIGURA 2	19
<i>ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA AMILOSA Y AMILOPECTINA CONSTITUYENTES DEL ALMIDÓN.</i>	19
FIGURA 3	24
<i>SÍNTESIS DE ETANOL A PARTIR DE GLUCOSA MEDIANTE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA REALIZADA POR LA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE.</i>	24
FIGURA 4	44
<i>DIAGRAMA DE PARETO DEL DISEÑO PLACKET–BURMAN PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LAS VARIABLES EVALUADAS DURANTE LA HIDROLISIS DE ALMIDÓN DE OCA CON LA ENZIMA A-AMILASA.</i>	44
FIGURA 5	46
<i>EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA A-AMILASA (E, %) SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA ABSORBANCIA A 635 NM (DEGRADACIÓN DE AMILOSA) TRAS LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE OCA, UTILIZANDO EL DISEÑO SUPERFICIE RESPUESTA.</i>	46
FIGURA 6	48
<i>DIAGRAMA DE PARETO DEL DISEÑO PLACKET–BURMAN PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LAS VARIABLES EVALUADAS DURANTE LA HIDROLISIS DE LAS DEXTRINAS DE OCA CON LA ENZIMA GLUCOAMILASA.</i>	48
FIGURA 7	50
<i>EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA GLUCOAMILASA [E] (X_1, %) Y TIEMPO DE HIDRÓLISIS (X_2, H) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LAS DEXTRINAS DE OCA, UTILIZANDO EL DISEÑO SUPERFICIE RESPUESTA.</i>	50

RESUMEN

Los cultivos autóctonos que aún subsisten en los territorios andinos, gracias al cuidado con que han sido guardados por las comunidades residentes, vuelven a retomar la importancia como fuente de nutrientes y sustratos para la elaboración de diversos productos derivados, siendo un grupo importante los tubérculos. Si bien los cultivos más conocidos y comercializados en los principales mercados de las grandes ciudades incluyen la papa, el camote o la yuca, existen otros cultivos menos comercializados a gran escala como la oca, mashua, arracacha, achira, entre otros, consumidos principalmente por las poblaciones de las zonas aledañas donde se producen, sin ser aprovechados a gran escala en aplicaciones que permitirían darles un mayor valor agregado. Estos cultivos se caracterizan por su contenido de sustancias que pueden ser aprovechadas con fines industriales, por ejemplo, su contenido de almidón. En ese sentido el objetivo de la investigación fue evaluar el potencial aprovechamiento del almidón de oca (*Oxalis tuberosa*), para la producción de etanol, estudiando las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática del almidón para la obtención de azúcares fermentables y posterior fermentación alcohólica, logrando, entre los principales resultados, una conversión de hasta 93% en la hidrólisis del almidón a dextrinas (licuefacción) a una concentración óptima de enzima α -amilasa del 0.41%, así como la posterior hidrólisis de esas dextrinas en azúcares fermentables (sacarificación) a tasas superiores al 93% a una concentración óptima de enzima glucoamilasa del 0.75%. En la etapa de fermentación alcohólica se obtuvo una Eficiencia de conversión de los azúcares fermentables en etanol del 89% utilizando extracto de levadura como fuente N para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En base a los resultados obtenidos, por cada 1000 kg de oca se podría producir hasta 30 L de etanol, el cual puede ser utilizado posteriormente con diferentes fines, por ejemplo, para la elaboración de bebidas alcohólicas, biocombustible, uso medicinal, entre otras aplicaciones.

PALABRAS CLAVES: Oca, almidón, hidrólisis enzimática, fermentación alcohólica, etanol.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática

El almidón es históricamente utilizado como una fuente alimenticia, siendo las fuentes más comunes el maíz, trigo, papa, o yuca. Las aplicaciones principales del almidón han sido como aglutinantes, adsorbentes, floculantes, retardantes de llama y emulsionantes (Wang et al., 2023). Otras aplicaciones incluyen su uso para elaborar edulcorantes (García-Almeida et al. 2013) envases biodegradables (Cruz-Tirado et al., 2017; 2019), obtención de etanol (Zamora-Hernández et al., 2014), entre otras aplicaciones.

De las diferentes materias primas a partir de las cuales se puede obtener almidón en nuestro país, es considerable la producción de especies nativas que son consumidas principalmente por las poblaciones de las zonas aledañas donde se producen, sin ser aprovechados para otras aplicaciones industriales que permitirían darles un mayor valor agregado. El almidón de estas especies nativas puede ser aprovechado para diversas aplicaciones debido a su accesibilidad, renovabilidad, biodegradabilidad y abundancia.

Por ejemplo, la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), un tubérculo de alta producción en Perú (Cruz-Tirado et al., 2019), cuyo contenido promedio de carbohidratos es de 25 g por 100 g de raíz. De los carbohidratos totales, la parte principal (alrededor del 80%) pertenece al almidón (Rocha et al., 2008). Otra especie es la mashua (*Tropaeolum tuberosum*), producto mayoritariamente consumido por las poblaciones altoandinas desde la época precolombina, y que en años recientes ha empezado a generar interés debido a sus aplicaciones en diversos productos alimentarios, o incluso como fuente de compuestos bioactivos con beneficios sobre la salud (Aguilar-Galvez et al., 2023; Paucar-Menacho et al., 2020).

Otra importante especie nativa es la oca (*Oxalis tuberosa*), planta perenne de la familia de las Oxalidáceas cuyo tubérculo es rico en almidón. Es cultivada en los Andes centrales y meridionales, entre los 2300 y 4100 metros sobre el nivel del mar, donde el clima es frío (Zhu & Cui 2020). Es una planta herbácea, dicotiledónea de entre 30 y 80 cm de alto, cuya cosecha es anual, y se la puede encontrar en los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, aunque también se cultiva en México y Nueva Zelanda (Suquilanda, 2009).

1.2. Antecedentes

En un estudio realizado por García (2017), se investigó la influencia del tiempo de licuefacción y la concentración de α -amilasa y glucoamilasa en el porcentaje de glucosa obtenido a partir del maíz amarillo malteado de la variedad Alazán. El objetivo principal fue obtener un jarabe de maíz rico en glucosa mediante hidrólisis enzimática. Se utilizaron amilasas comerciales Liquozyme SC 4X (α -amilasa) y Spirizyme Ultra (glucoamilasa) de Novozymes (Copenhague, Dinamarca). Se probaron diferentes tiempos de licuefacción (20, 50 y 80 minutos) y concentraciones de α -amilasa (0.06, 0.075 y 0.09 gramos por kilogramo de maíz) y glucoamilasa (0.35, 0.40 y 0.50 gramos). La combinación óptima de variables fue de 80 minutos de licuefacción, 0.06 gramos de α -amilasa por kilogramo de maíz y 0.4238 gramos de glucoamilasa. Se logró un rendimiento máximo teórico del 92%. Este estudio proporciona una base para comparar los resultados obtenidos en futuras investigaciones sobre hidrólisis enzimática con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa.

Benavides y Pozo (2018) llevaron a cabo un estudio donde elaboraron vodka a partir de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum*), utilizando dos tipos de enzimas. Durante un período de 12 días, evaluaron varios parámetros como el rendimiento de almidón, el pH

y los grados Brix. Observaron cambios en el pH y los grados Brix, con rangos de 4 a 5 para el pH y de 12 a 22 para los grados Brix, lo que indica condiciones óptimas para la fermentación.

En su estudio de investigación titulado "Obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de banano, *Musa Cavendish*", Quitiguiña y Santacruz (2012) exploraron la posibilidad de aprovechar el banano como recurso para convertir su almidón en jarabe de glucosa mediante procesos enzimáticos. Prepararon el sustrato mediante lavado y secado, luego realizaron la hidrólisis en dos etapas. En la primera etapa, utilizaron α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* para degradar el almidón hasta dextrinas, determinando un tiempo óptimo de hidrólisis de 2 horas. En la segunda etapa, emplearon amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* y realizaron un diseño experimental para estudiar la combinación de tiempo y cantidad de enzima, obteniendo un tratamiento recomendado de 1.5 ml de enzima y 14 horas de hidrólisis, que resultó en un rendimiento de glucosa del 90.14%.

En su estudio titulado "Desarrollo de una bebida alcohólica destilada tipo vodka a partir de dos variedades de tubérculos, papa china (*Colacasia esculenta*) y oca (*Oxalis tuberosa*)", llevado a cabo por Ordóñez (2022), se incluyó como factores el tiempo de fermentación y la cantidad de enzima (α -amilasa y glucoamilasa). Este estudio centró en evaluar la cantidad de enzima α -amilasa y glucoamilasa, así como abordar el tiempo de fermentación mediante el uso de diferentes fuentes de nitrógeno como variables de interés.

Según Apaza y Ramírez (2021), en un estudio titulado "Optimización de la hidrólisis enzimática en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) para la obtención de bioetanol", se evaluaron

los procesos para obtener etanol a partir de la cascarilla de arroz. En esta investigación experimental, se secuenciaron los procesos de pretratamiento oxidativo, hidrólisis enzimática y fermentación, evaluando variables significativas como el tiempo (24 h, 48 h, 72 h) y la concentración enzimática, manteniendo la temperatura a 50 °C, agitación a 200 rpm y pH 5.0. Las condiciones óptimas del proceso (72 h, 50% p/p) permitieron la obtención de 24.03 g de azúcares reductores por litro de solución hidrolizada, lo que equivale al 85.08% de sacarificación. Los azúcares hidrolizados resultantes se sometieron a fermentación (48 h, 30 °C y pH 5.0) para la producción de bioetanol.

1.3. Marco teórico

1.2.1 Oca

La oca se caracteriza por su textura harinosa y ligero sabor dulce. Puede ser consumida de diversas formas, ya sea hervida, cocida al horno, frita o encurtida. Además, su versatilidad permite su uso en panificación, confituras y producción de etanol gracias a su contenido de almidón (Suquilanda, 2009). En la Tabla 1 se presenta la composición química de la oca.

Tabla 1.

*Composición química de la oca (*Oxalis tuberosa*).*

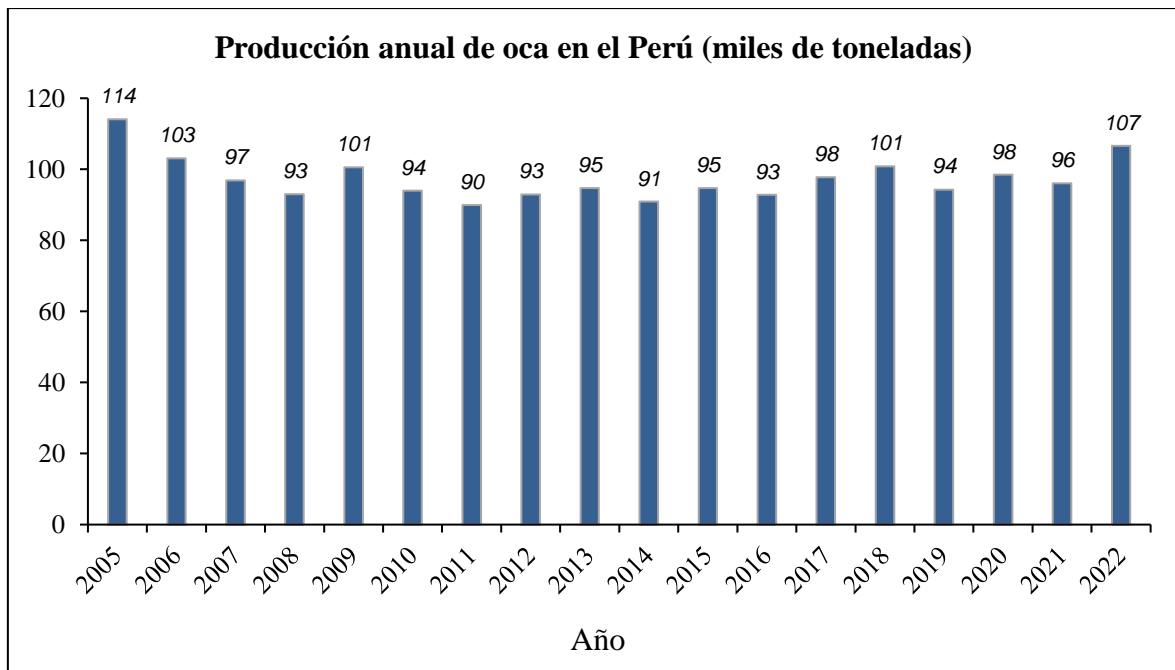
Componentes	Unidad	Cantidad
Humedad	%	77.73
Proteína	g	4.6
Energía	kcal	61
Cenizas	g	2.3
Grasa	g	0.7
Carbohidratos	g	88.19
Fibra	g	3.6
Acido ascórbico	mg	30.4
Fósforo	mg	36

Calcio	mg	22
Hierro	mg	1.6
Tiamina	Mg	0.05
Riboflavina	Mg	0.13
Niacina	Mg	0.43

Fuente: (Carrión, 2018; Jativa, 2012; Suquilanda, 2009).

La producción de oca en el Perú ha experimentado una tendencia positiva y continuada. Durante el año 2021, se registró una producción de 96 mil toneladas, y en el año 2022, esta cifra aumentó a 107 mil toneladas (Figura 1).

Producción anual de oca en el Perú entre los años 2005 y 2022.



Fuente: BCRP (2022):

<https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/anuales/resultados/PM05078AA/html/2005/2022/>

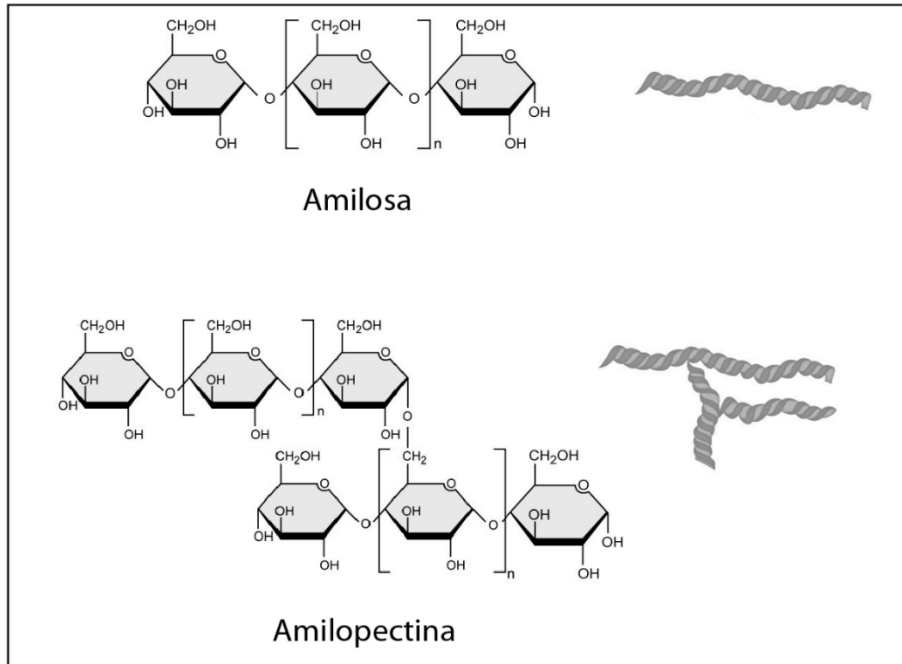
1.2.2 Almidón

El almidón es un polímero de glucosa presente en abundancia en los tejidos vegetales, en los cuales constituye el principal carbohidrato de reserva. Tiene como fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde el factor **n** tiene al menos un valor de 4 y puede llegar a fórmulas con más de 100 átomos de carbono (Berg et al. 2002). Se encuentra en grandes cantidades en tubérculos, semillas de cereales y leguminosas y otras estructuras vegetales, conformando una parte significativa de la biomasa terrestre con diferentes aplicaciones industriales.

Químicamente, el almidón tiene la misma composición que la celulosa, es decir, ambos polímeros están formados por largas cadenas de glucosa como unidad estructural. No obstante, la distinción clave entre ambos radica en que en el almidón los restos de glucosa están unidos por uniones glucosídicas 1-4 con orientación α , mientras que la celulosa presenta uniones glucosídicas 1-4 con orientación β . Adicionalmente, alrededor del 20% del almidón consiste en una fracción soluble en agua llamada amilosa, mientras que el 80% restante forma una solución insoluble conocida como amilopectina (Alarcón y Arroyo 2016). Ambas fracciones están compuestas por unidades de α -D-glucosa (Figura 2), diferenciándose estructuralmente en que la amilosa está formada por cadenas lineales de glucosa con enlaces $\alpha(1-4)$, mientras que la amilopectina presenta cadenas lineales $\alpha(1-4)$ y ramificadas $\alpha(1-6)$ de glucosa (Hernández-Medina et al, 2008).

Figura 1.

Estructura química de la amilosa y amilopectina constituyentes del almidón.



Fuente: Adaptado de Alarcón y Arroyo (2016).

El contenido de amilosa y amilopectina es variable en función de la materia prima. En el caso del almidón de oca, diferentes autores han reportado contenidos variables de amilosa y amilopectina (Tabla 2).

Tabla 2.

Contenido de amilosa y amilopectina en el almidón de oca reportado por diferentes autores.

Amilosa (%)	Amilopectina (%)	Fuente
30	70	Espín et al. (2004)
29	71	Surco (2004)
23.01	76.99	Velásquez-Barreto & Velezmoro (2018)

1.2.3 Hidrolisis enzimática del almidón

De manera general, la hidrólisis enzimática es el proceso de descomposición o desdoblamiento de polisacáridos mediante el uso de catalizadores biológicos o enzimas. La hidrólisis enzimática ocurre a temperaturas variables, en función de cada enzima, y puede emplear enzimas específicas como amilasas, celulasas, amilogucosidasas, proteasas, entre otras, en función del sustrato a hidrolizar y del producto a obtener. La ventaja clave de la hidrólisis enzimática es su capacidad para catalizar de manera específica, logrando altos rendimientos y evitando la formación de otros productos. En comparación con la hidrólisis ácida y alcalina, la hidrólisis enzimática es más eficiente y menos corrosiva para los materiales y equipos (Reyna et al. 2004).

Respecto a la hidrólisis del almidón, el proceso está influenciada por diversos factores, como la proporción de amilosa y amilopectina, el tamaño de partícula, la estructura cristalina y la presencia de inhibidores de enzimas (Sauer et al., 2000). Las estructuras constituyentes del almidón (amilosa y amilopectina) requieren de diferentes tipos de enzimas amilolíticas para su hidrólisis completa, siendo los mono- y disacáridos en la mayoría de las aplicaciones los productos finales deseados. Estas enzimas amilolíticas incluyen la α -amilasa, β -amilasa y glucoamilasa (o amilogucosidasa), las cuales tienen una relevancia comercial significativa en la degradación y/o modificación del almidón (Witasari et al., 2024), la fabricación de jarabes de glucosa y fructosa (García-Almeida et al 2013), así como en la producción de etanol (Zamora-Hernández et al., 2014).

La α -amilasa descompone los enlaces α -1,4-D-glucosídicos entre las unidades de glucosa adyacentes en la cadena lineal de amilosa, mientras que la β -amilasa corta los

extremos no reductores de amilosa, amilopectina y moléculas de glucógeno. Por su parte, la glucoamilasa (o amiloglucosidasa) hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 en los extremos no reductores del almidón y los enlaces α -1,6 en los puntos de ramificación de la amilopectina, aunque a una tasa inferior a los enlaces α -1,4, generando glucosa (Pandey & Teixeira, 2016).

1.2.3.1 Alfa-amilasa (α -amilasa)

El origen de esta enzima es diverso (Tabla 3), ya que puede proceder de fuentes fúngicas como *Aspergillus oryzae*, bacterianas como la bacteria termófila *Geobacillus stearothermophilus* y de *Bacillus subtilis*, así como de cereales y de páncreas. En el caso de cereales, la presencia de la enzima α -amilasa es limitada, siendo más abundante en aquellos cereales que han experimentado una germinación parcial (Cruz Ruiz, 2012), por ejemplo, durante la elaboración de malta.

Tabla 3.

Microorganismos productores de enzimas amilasas.

Microorganismo	Especie	Enzima
Hongo	<i>Aspergillus niger</i>	α -amilasa, celulasa, glucoamilasa, lactasa, pectinasa, catalasa, glucosa oxidasa, proteasa, lipasa
	<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, lactasa, lipasa
	<i>Rhizopus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, pectinasa
	<i>Rhizopus niveus</i>	Glucoamilasa
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilasa, proteasa
	<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilasa

Fuente: Castillo (2005).

La función principal de la α -amilasa es proporcionar fragmentos más pequeños que pueden ser aprovechados por las demás enzimas amilasas. Su actividad óptima se encuentra en un rango de pH de 5-7. Además, destaca por su resistencia al calor, conservando un 70% de su actividad a 70 °C. Esta enzima actúa tanto en almidones crudos como en gelatinizados. Cataliza la hidrólisis de enlaces internos α -1,4-O-glucosídicos en polisacáridos, manteniendo la configuración anomérica en los productos resultantes.

La enzima α -amilasa pertenece a la familia 13 (GH-13) del grupo de enzimas glucósido hidrolasa y son metaloenzimas que requieren iones de Ca^{2+} para su actividad, integridad estructural y estabilidad (Pandey & Teixeira, 2016). La actividad de la α -amilasa se mide en unidades de amilasa, liberando 1 mg de maltosa en presencia de almidón bajo condiciones de ensayo estándar, y se informa en unidades internacionales (UI/ml).

1.2.3.2 Glucoamilasa

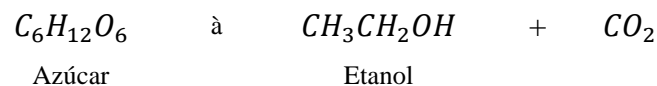
La enzima glucoamilasa, conocida también como amiloglucosidasa, actúa como una amilasa de acción *exo* que puede hidrolizar los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ desde el extremo no reductor de la cadena. Su papel es crucial en procesos industriales donde se requiere un alto grado de hidrólisis del almidón. La velocidad de hidrólisis de la glucoamilasa está influenciada por el tamaño del sustrato, su estructura, la naturaleza y posición del enlace presente.

Aunque se encuentra de manera ubicua en diversas formas de vida (plantas, animales, bacterias, arqueas y eucariotas), se produce principalmente en hongos filamentosos, siendo *Aspergillus niger* uno de los productores más destacados (Tabla 3). La actividad catalítica de la glucoamilasa disminuye significativamente a altas temperaturas debido a cambios en

la conformación, pero su velocidad de reacción se incrementa, lo que resulta en un procesamiento más rápido. En términos de su actividad, se establece que una unidad de glucoamilasa libera 1 mg de glucosa en presencia de almidón bajo condiciones estándar (Pandey & Teixeira, 2016).

1.2.4 Fermentación alcohólica

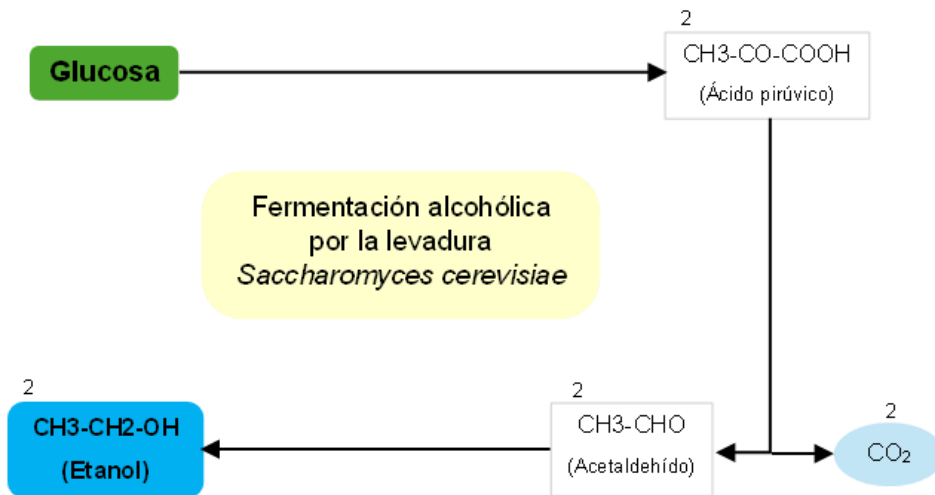
La fermentación alcohólica es un proceso biológico que tiene como objetivo proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares, específicamente las levaduras, en condiciones de ausencia de oxígeno. En este proceso, las levaduras descomponen las moléculas de glucosa para obtener la energía necesaria para su supervivencia, generando alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como productos de la fermentación. (Corrales, et al. 2015). Desde una perspectiva química, esta transformación se expresa mediante la siguiente ecuación:



La fermentación alcohólica inicia después de que la glucosa se degrada a ácido pirúvico, el cual se transforma posteriormente en CO₂ y etanol (Figura 3). En la industria alimentaria, este proceso se aprovecha para la elaboración de diversos productos fermentados como pan, cerveza, vino, bebidas destiladas, entre otros (Vázquez & Dacosta 2007).

Figura 2.

*Síntesis de etanol a partir de glucosa mediante fermentación alcohólica realizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.*



1.2.5 Etanol

El etanol tiene diferentes aplicaciones, y las materias primas a partir de las cuales se obtiene juegan un rol importante al momento de diseñar los procesos productivos.

1.2.5.1 Etanol como biocombustible

Los biocombustibles surgen como una opción para sustituir a los combustibles fósiles, ya que se generan a partir de fuentes biológicas como plantas y residuos orgánicos, cuya producción demanda una cantidad inferior de energía en comparación con la producción de combustibles fósiles (Villadiego-del Villar, et al 2021).

En la actualidad, aproximadamente el 85% de la producción de biocombustibles líquidos se atribuye al etanol, producción que lideran Estados Unidos y Brasil. El resto de la producción se distribuye entre la Unión Europea, China, Canadá, Tailandia, Argentina,

India, y entre otros países (Tabla 4). En el contexto peruano, el bioetanol también está ganando importancia en la transición a fuentes energéticas más sostenibles (Torres, 2017).

Tabla 4.

Producción mundial de etanol (miles de galones) entre los años 2018 y 2022.

Región	2018	2019	2020	2021	2022	Producción mundial (%)
Estados Unidos	16 091	15 778	13 941	15 016	15 400	55%
Brasil	8 060	8 860	8 100	7 320	7 420	27%
Unión Europea	1 300	1 350	1 280	1 350	1 330	5%
China	810	1 010	930	870	1 090	3%
India	430	460	540	850	920	3%
Canadá	460	497	429	434	460	2%
Tailandia	390	430	390	360	380	1%
Argentina	290	290	210	270	290	1%
Resto del mundo	709	655	650	820	870	3%
Total	28 540	29 330	26 470	27 290	28 160	

Fuente: Asociación de combustibles renovables (RFA, 2023): <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>.

La combinación de bioetanol con gasolina produce biocombustibles de alta energía, *gasohol*, una mezcla de gasolina con diferentes proporciones de etanol con propiedades similares a la gasolina pura, pero con significativa reducción de emisiones contaminantes en motores de combustión interna convencionales (Tejeda et al., 2011). Esta mezcla, ampliamente utilizada como combustible o aditivo de gasolina, es completamente renovable, ya que las emisiones de CO₂ se reciclan durante la fotosíntesis en las plantas. El uso de bioetanol como combustible fósil enriquecido presenta diversas ventajas, incluyendo una mejor oxidación de hidrocarburos en la gasolina, reduciendo así las emisiones de gases de efecto invernadero en aproximadamente un 12% (Castro-Martínez et al., 2012).

Para emplear el etanol como combustible mezclado con gasolina, es necesario eliminar el agua hasta alcanzar una pureza de 99.5 a 99.9%, dependiendo de la temperatura y la fase hidrocarbonada (Arosemena et al., 2015).

A nivel industrial el etanol, o bioetanol, utilizado como biocombustible, puede ser producido a partir de procesos productivos como los de **primera generación**, a partir de almidones y azúcares presentes en diversos vegetales (Cobos, 2019), utilizando tecnologías convencionales como la hidrólisis del almidón (en fuentes amiláceas) y fermentación alcohólica, teniendo entre sus ventajas su relativa facilidad de manipulación y bajas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Álvarez, 2009). También se puede obtener etanol a partir de procesos de **segunda generación** a partir de residuos agrícolas y forestales ricos en lignocelulosa no destinados al consumo humano (Cobos, 2019). Este procedimiento es más complejo debido a la dificultad de aislar e hidrolizar la celulosa, polímero compuesto por unidades de glucosa, que es la molécula que se convierte en el etanol mediante fermentación alcohólica. La principal ventaja de esta producción es que no afecta la seguridad alimentaria (disponibilidad de alimentos) (Salazar & Muñoz, 2019).

1.2.5.2 Bebidas alcohólicas destiladas

Otra de las aplicaciones importantes del etanol es su uso como principal componente de bebidas alcohólicas destiladas como el vodka, whisky, baijiu, sake, tequila, pisco, cachaza, entre otros, que se obtienen a partir de bebidas alcohólicas fermentadas (Arteaga, 2016), variando la materia prima de la cual se obtienen y de la composición química que caracteriza a cada bebida (Vasquez, 2007).

En algunos casos es más importante la pureza de la fracción etanólica, como en el caso del vodka (Prentice & Handsjuk, 2016), mientras que, en otros casos como en el pisco, baijiu, etc., además del grado alcohólico, es muy deseable la presencia de compuestos que contribuyen al perfil aromático característico (Cacho et al., 2013; Sakandar et al., 2020).

En el caso del primer grupo, el destilado más importante es el vodka, originario de Rusia, y también producido en Polonia y Finlandia. Es un destilado muy popular en diversos países (Vásquez & Vásquez, 2009), y a diferencia de otros destilados no es sometido a procesos de añejamiento ni tampoco se caracteriza por una importante presencia de compuestos aromáticos, es decir que se considera como una bebida destilada neutra, donde la pureza alcohólica (contenido de etanol) es más importante (Prentice & Handsjuk, 2016), alcanzando un grado alcohólico de hasta 45 % v/v.

El vodka puede ser obtenido a partir de cualquier planta rica en almidón, tradicionalmente utilizando granos como centeno o trigo, aunque también se emplean papa y melaza (Bhattacharyya, et al 2019). De modo la producción de vodka a partir de materias primas amiláceas, por ejemplo, tubérculos nativos como la oca, mashua, arracacha, entre otros, es una interesante alternativa de estudio y desarrollo a nivel industrial, con el fin de darle un mayor valor agregado a estas materias primas, considerando que la mayoría de estas especies amiláceas nativas son consumidas principalmente por las poblaciones de las zonas aledañas donde se producen, sin ser aprovechados para otras aplicaciones a mayor escala, a diferencia de otros tubérculos como la papa, el camote o la yuca, que son consumidos masivamente en el mercado nacional y usados para diferentes aplicaciones industriales.

1.4. Formulación del problema

¿De qué manera influye la optimización de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica en la obtención de etanol a partir de almidón de oca (*Oxalis tuberosa*)?

1.5. Justificación

La justificación práctica de este estudio radica en la consideración de emplear la oca (*Oxalis tuberosa*) para la producción de etanol. Este tubérculo se selecciona debido a su alto contenido de almidón y ocupar el quinto lugar en producción entre los tubérculos en el Perú de acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Agricultura y Riego (MIDAGRI, 2024), no obstante, la oca se encuentra entre los tubérculos menos consumidos en el mercado nacional, y es consumida principalmente por las poblaciones de las zonas aledañas donde se producen, sin ser aprovechado para otras aplicaciones que permitirían darle un mayor valor agregado. Con ello se podría diversificar el sector y proporcionar oportunidades de crecimiento a los productores.

La justificación teórica se fundamenta en la generación de conocimiento relacionado con el conocimiento del proceso químico de hidrólisis enzimática utilizando las enzimas amilasas comerciales disponibles para el estudio, con el fin de conocer en qué condiciones se logra una mejor hidrólisis del almidón en azúcares fermentables, y a su vez que permita obtener el mayor rendimiento en la producción de etanol a partir de estos azúcares fermentables.

1.6. Objetivo general

Determinar de qué manera influye la optimización de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica en la obtención de etanol a partir de almidón de oca (*Oxalis tuberosa*).

1.7. Objetivos específicos

- Determinar las variables con mayor efecto sobre la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática de almidón de oca con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa.
- Optimizar las condiciones de producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática de almidón de oca con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa.
- Determinar la mejor fuente de nitrógeno sobre el rendimiento de etanol producido por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante fermentación alcohólica de los azúcares fermentables obtenidos del almidón de oca.

1.8. Hipótesis

La optimización de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica permite obtener un rendimiento mayor al 80% en la producción de etanol a partir de almidón de oca (*Oxalis tuberosa*).

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1. Población y muestra

La población es la oca (*Oxalis tuberosa*) producida en el distrito de Carabamba, provincia de Julcán, región La Libertad. La muestra fueron los 25 kg utilizados para la extracción del almidón a utilizar en la parte experimental.

Para la selección de la muestra, se optó por el muestreo de tipo no probabilístico, dado que la elección de oca disponible se basó en la disponibilidad y accesibilidad al producto en los mercados locales.

2.2. Técnicas y materiales

2.2.1. Materiales, equipos e insumos

Para el desarrollo experimental se emplearon los materiales ilustrados en la Tabla 5.

Tabla 5.

Materiales, equipos e insumos.

Materiales	Equipos	Insumos
Vasos de precipitación	Licadora industrial	Oca
Probetas	Balanza analítica	Almidón
Fiolas	Balanza determinadora de humedad	Glucosa
Tubos de ensayo	Refrigeradora	Enzima α -amilasa (Song Yuan Feng, China)
Gradillas	Estufa	Enzima glucoamilasa (Song Yuan Feng, China)
Morteros	Baño maría	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepa 7VA
Papel Aluminio	pH -metro	Urea
Tela para filtrar	Micropipetas	Dimetilsulfóxido (DMS)
Termómetro	Agitador Magnético	Yodo
Alcoholímetro	Espectrofotómetro UV-vis	Yoduro de potasio

Tubos falcon	Equipo de destilación	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
		Tartrato de sodio-potasio
		Hidróxido de sodio
		Bisulfito de sodio

2.2.2. Técnicas:

Para evaluar la evolución de la hidrólisis del almidón con la α -amilasa, se determinó de manera indirecta la presencia de amilosa mediante la medida de la absorbancia a 635 nm en un espectrofotómetro UV-visible, con una adaptación del método propuesto por Morrison & Laignelet (1983) utilizando reactivo de yodo-yoduro de potasio (I₂-KI) para generar un complejo de color azul. Se mezcló 200 μ l de muestra de suspensión de almidón con 2,5 ml de urea 6M y dimetilsulfóxido (U-DMSO) y se calentó durante 5 a 15 minutos a 100 °C con agitación continua. La muestra mezclada se incubó a 100 °C durante 60 minutos y luego se enfrió. A temperatura ambiente. Se tomó 200 μ l de la suspensión incubada con la posterior adición de 6 ml de agua destilada y 200 μ l de solución de I₂-KI y se mezcló inmediatamente. También se preparó una muestra en blanco con agua destilada. La absorbancia se tomó a 635 nm después de 15 min.

Para evaluar la evolución de la hidrólisis de las dextrinas en azúcares fermentables se aplicó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Este método se fundamenta en la reducción del DNS (color amarillo) en presencia de glucosa u otro azúcar reductor, hacia un complejo de color rojo ladrillo, con una coloración más o menos intensa en función a la concentración de azúcares (Krivorotova & Sereikaite, 2019). El reactivo de DNS se preparó añadiendo 1 g de DNS y 30 g de tartrato ácido de Na-K a 80 ml de NaOH 0.5 N. La solución se mantuvo a

45 °C para la disolución completa de los reactivos y luego se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua destilada hasta 100 ml. La solución se puede almacenar durante 2 semanas a 4 °C. Para la medición se agregaron 1.5 ml de reactivo de DNS a 1.5 ml de la muestra a analizar, calentando y manteniendo a 95 °C durante 5 minutos con posterior enfriado a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 540 nm.

2.2.3. Métodos

- *Sscreening* (o barrido) mediante un diseño Plackett-Burman, usando el software Protimiza Experiment Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br>).
- Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) usando el Protimiza Experiment Design Software (<http://experimental-design.protimiza.com.br>),

2.3. Extracción del almidón de oca

La oca (*Oxalis tuberosa*), utilizada como materia prima, tuvo procedencia de Carabamba (provincia de Julcán, región La Libertad). Para la extracción del almidón se siguió la metodología propuesta por Novelo-Cen & Betancur-Ancona (2005). Los tubérculos fueron pelados y cortados en cubos de 3 cm, para luego ser triturados durante 5 minutos. La masa resultante se suspendió en una solución de bisulfito de sodio de 1500 ppm obteniendo una lechada, la cual se filtró para separar la fibra, después fue sometida tres veces a licuado para extraer la máxima cantidad posible de almidón. El filtrado se dejó sedimentar a 4 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, el líquido sobrenadante se eliminó y el sedimento de almidón se lavó con agua destilada y se dejó sedimentar nuevamente a 4 °C por 24 horas, repitiendo estos pasos tres veces. El almidón obtenido se secó en una estufa a 40 °C durante

48 horas, pasadas las 48 horas el almidón paso a molienda, y finalmente se almacenó en frascos con cierre de tapa hermética para su posterior uso.

2.4. Determinación del rendimiento del almidón

El rendimiento de almidón en base seca se calcula teniendo en cuenta el contenido de humedad inicial y la cantidad de almidón obtenida.

2.4.1 Rendimiento de almidón en base húmeda:

$$\text{Rendimiento de almidón en base húmeda (\% b.h.)} = \frac{\text{cantidad de almidón obtenida}}{\text{cantidad de materia prima}} \times 100$$

2.4.2 Contenido de sólidos en base húmeda:

$$\text{Contenido de sólidos en base húmeda (\%)} = 100 \% - \text{contenido de humedad (\%)}$$

2.4.3 Rendimiento de almidón en base seca:

$$\text{Rendimiento de almidón en base seca (\% b.s.)} = \frac{\text{Almidón en base húmeda (\%)}}{\text{Sólidos en base húmeda (\%)}} \times 10$$

2.5. Hidrolisis del almidón

La conversión de almidón en azúcares fermentables se realizó en dos fases:

2.5.1 Licuefacción

Este proceso se realizó mediante la adaptación de metodologías reportadas en trabajos previos (Cripwell et al., 2020; Nuriana & Wuryantoro, 2015; Quitiguiña & Santacruz, 2012) mediante el uso de una enzima α -amilasa comercial (Song Yuan Feng, China), para hidrolizar el almidón en dextrinas. Primero se aplicó un *screening* (o barrido) mediante un diseño Plackett-Burman, usando el software Protimiza Experiment Design

(<http://experimental-design.protimiza.com.br>), para identificar las variables (factores) con mayor impacto en el proceso de hidrólisis del almidón a dextrinas, trabajando con 5 variables independientes (Tabla 6): concentración de almidón (% m/v), concentración de enzima α -amilasa (% m/m respecto al almidón), tiempo de hidrólisis (horas), pH, temperatura (°C).

Tabla 6.

Parámetros evaluados para el screening mediante un diseño Plackett-Burman, usando el Protimiza Experiment Design Software.

Parámetro	Licuefacción		
	Mínimo	Medio	Máximo
	-1	0	1
Temperatura (°C)	75	85	95
Enzima (%)	0.1	0.2	0.3
Almidón (%)	20	25	30
pH	6.5	7.1	7.7
Tiempo (h)	0.5	1	1.5

Se obtuvo el siguiente diseño experimental (Tabla 7) a aplicar para el *screening* de variables mediante el diseño Plackett-Burman (Protimiza Experiment Design Software (<http://experimental-design.protimiza.com.br>)).

Tabla 7.

Plackett-Burman – hidrólisis de almidón con α -amilasa (100 mL de suspensión de almidón en agua).

Tratamiento	Variables independientes						Variable dependiente
	Temperatura (°C)	Almidón (g/100)	Enzima (%)	Enzima (g)	pH	Tiempo (horas)	Hidrólisis del almidón a dextrinas
T1	95.0	30.0	0.1	0.030	6.5	0.5	

T2	95.0	20.0	0.3	0.060	7.7	0.5
T3	75.0	30.0	0.3	0.090	6.5	1.5
T4	95.0	30.0	0.1	0.030	7.7	0.5
T5	95.0	20.0	0.3	0.060	7.7	1.5
T6	95.0	30.0	0.3	0.090	6.5	1.5
T7	75.0	30.0	0.3	0.090	7.7	0.5
T8	75.0	30.0	0.1	0.030	7.7	1.5
T9	75.0	20.0	0.1	0.020	7.7	1.5
T10	95.0	20.0	0.1	0.020	6.5	1.5
T11	75.0	20.0	0.3	0.060	6.5	0.5
T12	75.0	20.0	0.1	0.020	6.5	0.5
T13	85.0	25.0	0.2	0.050	7.1	1.0
T14	85.0	25.0	0.2	0.050	7.1	1.0
T15	85.0	25.0	0.2	0.050	7.1	1.0

Una vez identificadas las variables con mayor impacto sobre la licuefacción del almidón de oca, se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) usando el Protimiza Experiment Design Software (<http://experimental-design.protimiza.com.br>), a fin de determinar los parámetros óptimos de hidrólisis del almidón en dextrinas (licuefacción) mediante la enzima α -amilasa (Tabla 8), manteniendo constantes el pH (7.7), concentración de almidón (30 %), y temperatura (85 °C).

Tabla 8.

Parámetros usados para optimizar el proceso de licuefacción del almidón de oca aplicando DCCR.

Parámetro	Mínimo -1	Medio 0	Máximo 1
Enzima (%)	0.2	0.3	0.4
Tiempo (h)	0.5	1	1.5

Tabla 9.

Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) – hidrólisis de almidón con α -amilasa (100 mL de suspensión de almidón en agua).

Tratamiento	Variables independientes						Variable dependiente
	Temperatura (°C)	pH	Almidón (g/100)	Enzima (%)	Enzima (g)	Tiempo (min)	Hidrólisis del almidón a dextrinas
T1	85	7.7	30	0.20	0.060	30.00	
T2	85	7.7	30	0.40	0.120	30.00	
T3	85	7.7	30	0.20	0.060	90.00	
T4	85	7.7	30	0.40	0.120	90.00	
T5	85	7.7	30	0.16	0.048	60.00	
T6	85	7.7	30	0.44	0.132	60.00	
T7	85	7.7	30	0.30	0.090	17.57	
T8	85	7.7	30	0.30	0.090	102.43	
T9	85	7.7	30	0.30	0.090	60.00	
T10	85	7.7	30	0.30	0.090	60.00	
T11	85	7.7	30	0.30	0.090	60.00	

Para evaluar la evolución de la hidrólisis del almidón con la α -amilasa, se determinó de manera indirecta la presencia de amilosa mediante la medida de la absorbancia a 635 nm en un espectrofotómetro UV-visible, con una adaptación del método propuesto por Morrison & Laignelet (1983) utilizando reactivo de yodo-yoduro de potasio (I_2 -KI) para generar un complejo de color azul.

Se mezcló 200 μ l de muestra de suspensión de almidón con 2,5 ml de urea 6M y dimetilsulfóxido (U-DMSO) y se calentó durante 5 a 15 minutos a 100 °C con agitación continua. La muestra mezclada se incubó a 100 °C durante 60 minutos y luego se enfrió. A temperatura ambiente. Se tomó 200 μ l de la suspensión incubada con la posterior adición de 6 ml de agua destilada y 200 μ l de solución de I_2 -KI y se mezcló inmediatamente. También

se preparó una muestra en blanco con agua destilada. La absorbancia se tomó a 635 nm después de 15 min.

2.5.2 Sacarificación

Este proceso implica la inclusión de la enzima glucoamilasa, cuya función es hidrolizar las dextrinas (producidas en la licuefacción previa) en azúcares reductores, para lo cual se trabajó mediante la adaptación de metodologías reportadas en trabajos previos (Cripwell et al., 2020; Nuriana & Wuryantoro, 2015; Quitiguiña & Santacruz, 2012).

Se realizó un proceso de *screening* (o cribado) mediante un diseño Plackett-Burman (utilizando el software Protimiza Experiment Design) con el fin de identificar las variables que tienen un mayor impacto en la hidrólisis de las dextrinas a azúcares fermentables. Esto se llevó a cabo considerando 4 variables independientes (Tabla 10): concentración de enzima glucoamilasa (% respecto a sustrato), tiempo de hidrólisis (horas), pH y temperatura (°C). La suspensión en todos los casos tuvo un contenido de 24 % de dextrinas.

Tabla 10.

Parámetros utilizados para el proceso de sacarificación con la enzima glucoamilasa.

Parámetro	Mínimo	Medio	Máximo
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	50	55	60
Enzima (%)	0.4	0.5	0.6
pH	4	4.5	5
Tiempo (h)	4	6	8

Con base en lo anterior, se derivaron los tratamientos (Tabla 11) que se emplearían en el proceso de selección de variables utilizando el diseño Plackett-Burman.

Tabla 11.

Plackett-Burman para evaluar la hidrólisis de las dextrinas con la enzima glucoamilasa (suspensión de 24 % de sólidos solubles [°Brix]).

Tratamiento	Variables independientes				Variable dependiente
	Temperatura (°C)	Enzima (%)	pH	Tiempo (horas)	Azúcares fermentables
T1	60	0.4	4.0	8.0	
T2	60	0.6	4.0	4.0	
T3	60	0.6	5.0	4.0	
T4	50	0.6	5.0	8.0	
T5	60	0.4	5.0	8.0	
T6	50	0.6	4.0	8.0	
T7	50	0.4	5.0	4.0	
T8	50	0.4	4.0	4.0	
T9	55	0.5	4.5	6.0	
T10	55	0.5	4.5	6.0	
T11	55	0.5	4.5	6.0	

Después de haber identificado las variables con mayor impacto, se implementó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) a través del software Protimiza Experiment Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br>) con el objetivo de establecer los valores óptimos de las variables para la sacarificación de las dextrinas en azúcares reductores. La suspensión en todos los casos tuvo un contenido de 24 % de dextrinas.

Tabla 12.

Variables con mayor influencia en el proceso de sacarificación.

Parámetro	Mínimo	Medio	Máximo
	-1	0	+1
Enzima (%)	0.5	0.6	0.7
Tiempo (h)	4	6	8

Tabla 13.

Diseño compuesto central rotacional (DCCR) para evaluar la hidrólisis de dextrinas en azúcares fermentables con la enzima glucoamilasa (24 % de sólidos solubles [°Brix]).

Tratamiento	Variables independientes				Variable dependiente	
	Enzima (%)	Enzima (g)	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	pH	Azúcares fermentables
T1	0.50	0.12	4	55	4.5	
T2	0.70	0.17	4	55	4.5	
T3	0.50	0.12	8	55	4.5	
T4	0.70	0.17	8	55	4.5	
T5	0.46	0.11	6	55	4.5	
T6	0.74	0.18	6	55	4.5	
T7	0.60	0.14	3.2	55	4.5	
T8	0.60	0.14	8.8	55	4.5	
T9	0.60	0.14	6	55	4.5	
T10	0.60	0.14	6	55	4.5	
T11	0.60	0.14	6	55	4.5	

Para evaluar la evolución de la hidrólisis de las dextrinas en azúcares fermentables se aplicó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Este método se fundamenta en la reducción del DNS (color amarillo) en presencia de glucosa u otro azúcar reductor, hacia un complejo de color rojo ladrillo, con una coloración más o menos intensa en función a la concentración de azúcares (Krivorotova & Sereikaite, 2019).

El reactivo de DNS se preparó añadiendo 1 g de DNS y 30 g de tartrato ácido de Na-K a 80 ml de NaOH 0.5 N. La solución se mantuvo a 45 °C para la disolución completa de los reactivos y luego se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua destilada hasta 100 ml. La solución se puede almacenar durante 2 semanas a 4 °C. Para la medición se agregaron 1.5 ml de reactivo de DNS a 1.5 ml de la muestra a analizar, calentando y

manteniendo a 95 °C durante 5 minutos con posterior enfriado a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 540 nm.

2.5.3 Fermentación alcohólica:

El proceso fermentativo se realizó con la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* 7VA, procedente de la Denominación de Origen Ribera del Duero (Valladolid, España), aislada y proveída por el Grupo de Investigación EnotecUPM de la Universidad Politécnica de Madrid, España (Morata, 2004).

Se utilizó un 10% de inóculo preparado en medio líquido YEPD (glucosa: 2%, peptona: 2%, y extracto de levadura: 1%, ajustando el pH a 3.5). Se utilizaron fermentadores que aseguren la anaerobiosis total y no permitan contaminaciones, llenados hasta un 70% de su volumen de operación, siguiendo el proceso fermentativo hasta el cese de burbujeo (producción de CO₂) en los fermentadores. Procediendo posteriormente a determinar el grado alcohólico mediante destilación y densimetría, de acuerdo con el Método Oficial MA-AS312-01A (OIV, 2023), así como de los azúcares residuales mediante el método DNS (Krivorotova & Sereikaite, 2014) para comprobar que han sido convertidos en etanol.

En esta etapa se evaluó el efecto de dos fuentes de nitrógeno (N), una inorgánica (fosfato diamónico) y otra orgánica (extracto de levadura) sobre el rendimiento fermentativo de la levadura *S. cerevisiae*, como se muestra en la Tabla 14, de tal manera que ambas fuentes se pueda obtener un equivalente al 20 % como N.

Tabla 14.

Dosificación de diferentes fuentes nitrogenadas para evaluar el rendimiento fermentativo de la levadura S. cerevisiae.

Tratamiento	Extracto de levadura	Fosfato diamónico (NH₄)₂HPO₄
Control (C)	-	-
N-inorgánico (i)	-	1 g/L
N-orgánico (O)	2 g/L	-
N-mixto (Mx)	1 g/L	0.5 g/L

2.6. Aspectos éticos

La ejecución experimental, recolección y análisis de datos, y discusión de resultados en la presente tesis se ha realizado en base a los lineamientos de trabajos de investigación de la Universidad Privada del Norte, cumpliendo los aspectos éticos relacionados con el uso de fuentes confiables de información, las cuales han sido citadas y referenciadas adecuadamente, garantizando el respecto a la propiedad intelectual de los autores cuyas investigaciones han sido el soporte teórico de la tesis.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Rendimiento del almidón extraído de la oca

Se determinó la cantidad de almidón a partir de la diferencia entre el peso total de la materia prima recibida y la cantidad de almidón obtenida al finalizar el proceso de extracción. Se utilizaron 25 kg de materia prima, y se logró extraer un total de 1.7 kg de almidón de oca (Tabla 15), obteniendo un rendimiento de 42.5 % b.s., en concordancia con valores reportados previamente, entre 28 y 45 % b.s. (Espín et al., 2004).

Tabla 15.

Rendimiento del almidón de oca.

Materia prima	Humedad de la oca	Rendimiento de almidón en base seca
25 kg	84%	42.5%

3.2 Hidrolisis de almidón

3.2.1 Licuefacción

Al tener un alto número de variables (factores) con efecto sobre la degradación del almidón en dextrinas por la enzima α -amilasa, se ejecutó un estudio discriminante (*screening*) para determinar las variables con impacto significativo sobre el proceso hidrolítico. Se aplicó un diseño Plackett–Burman con 5 variables y 3 puntos centrales, teniendo como variables independientes: concentración de almidón ([S], %), concentración de enzima α -amilasa ([E], %), temperatura (T, °C), pH y tiempo (t, h).

Como variable dependiente (variable respuesta) se evaluó la degradación del almidón, representado por el porcentaje de reducción de la absorbancia como indicador de la degradación de la amilosa, midiendo la intensidad del complejo azulado de amilosa en presencia de I₂-KI, a una longitud de onda de 635 nm (Morrison y Laignelet, 1983).

Tabla 16.

Aplicación de diseño Plackett-Burman para evaluar el porcentaje de reducción de la absorbancia a 635 nm (degradación de amilosa) tras la hidrólisis enzimática con α -amilasa.

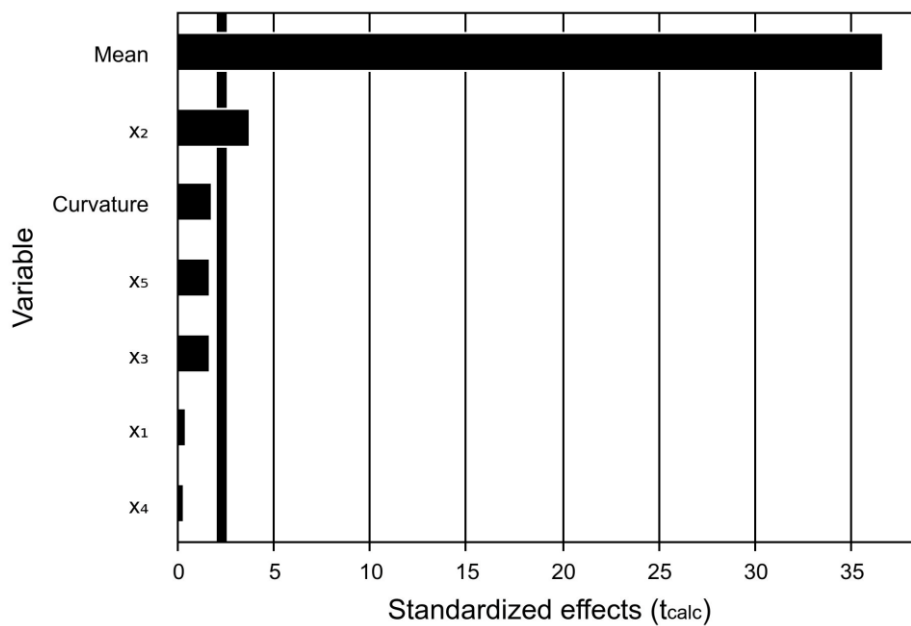
Tratamiento	Variables independientes					Variable dependiente
	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Almidón (g/100)	pH	Tiempo (h)	Reducción de la absorbancia (635 nm)
T1	95.0	0.1	30.0	6.5	0.5	77.1%
T2	95.0	0.3	20.0	7.7	0.5	91.8%
T3	75.0	0.3	30.0	6.5	1.5	89.5%
T4	95.0	0.1	30.0	7.7	0.5	61.3%
T5	95.0	0.3	20.0	7.7	1.5	94.3%
T6	95.0	0.3	30.0	6.5	1.5	90.7%
T7	75.0	0.3	30.0	7.7	0.5	91.6%
T8	75.0	0.1	30.0	7.7	1.5	68.7%
T9	75.0	0.1	20.0	7.7	1.5	88.6%
T10	95.0	0.1	20.0	6.5	1.5	91.6%
T11	75.0	0.3	20.0	6.5	0.5	93.4%
T12	75.0	0.1	20.0	6.5	0.5	63.3%
T13	85.0	0.2	25.0	7.1	1.0	93.1%
T14	85.0	0.2	25.0	7.1	1.0	93.2%
T15	85.0	0.2	25.0	7.1	1.0	91.7%

Al analizar los resultados del diseño Plackett-Burman, el factor (variable) con impacto significativo sobre la disminución de la absorbancia (degradación de amilosa) fue la concentración de la enzima α -amilasa (variable X₂: [E] %), mientras que las demás variables

no mostraron un impacto significativo sobre la degradación del almidón de oca en dextrinas (Figura 4).

Figura 3.

Diagrama de Pareto del diseño Plackett–Burman para determinar el efecto de las variables evaluadas durante la hidrolisis de almidón de oca con la enzima α -amilasa.



En base al resultado obtenido, para optimizar las condiciones de licuefacción del almidón en dextrinas con la enzima α -amilasa se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) considerando concentraciones variables de la enzima α -amilasa ([E], %) como variable independiente (Tabla 17). Adicionalmente, se incluyó el tiempo como otra variable independiente, manteniendo constantes la temperatura (85 °C), pH (7.7) y concentración de sustrato (almidón 30 %). El DCCR es un diseño estadístico que permite obtener un rango de

valores de las variables independientes, en donde la hidrólisis (licuefacción) del almidón en dextrinas sea óptima.

Tabla 17.

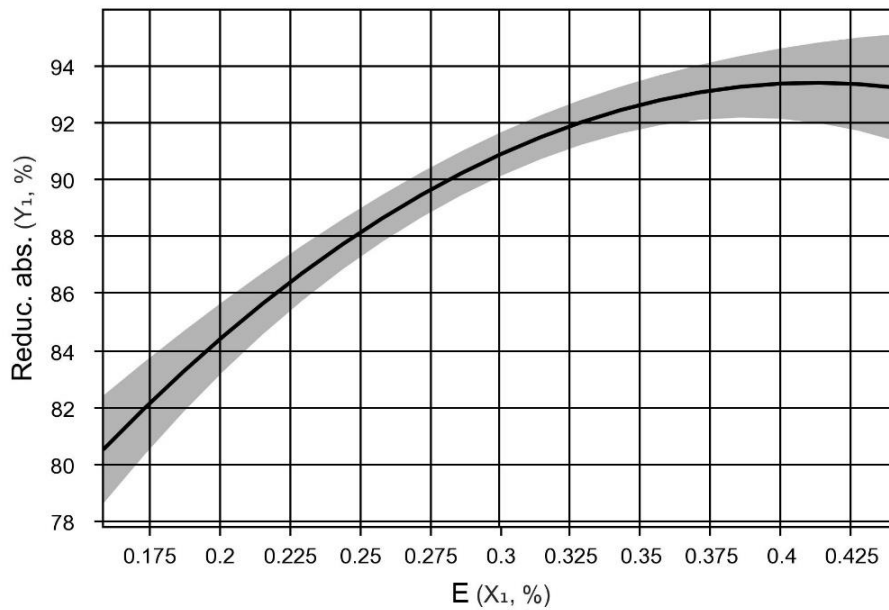
Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar las condiciones óptimas de hidrólisis del almidón de oca (reducción de la absorbancia a 635 nm) en dextrinas con α -amilasa. Almidón (30 %), temperatura (85 °C), pH (7,7).

Tratamiento	Variables independientes			Variable dependiente
	Enzima (%)	Enzima (g)	Tiempo (min)	Reducción de la absorbancia (635 nm)
T1	0.20	0.060	30.00	85.4%
T2	0.40	0.120	30.00	91.5%
T3	0.20	0.060	90.00	85.0%
T4	0.40	0.120	90.00	94.2%
T5	0.16	0.048	60.00	79.4%
T6	0.44	0.132	60.00	94.0%
T7	0.30	0.090	17.57	87.7%
T8	0.30	0.090	102.43	92.1%
T9	0.30	0.090	60.00	89.3%
T10	0.30	0.090	60.00	92.5%
T11	0.30	0.090	60.00	92.5%

Al analizar los resultados del DCCR, la concentración óptima de enzima α -amilasa [E] (X1, %) para la degradación del almidón de oca a dextrinas fue de 0.41 %, con una capacidad de degradación del almidón de hasta 93.39 % (Figura 5).

Figura 4.

Efecto de la concentración de enzima α -amilasa (E , %) sobre la reducción de la absorbancia a 635 nm (degradación de amilosa) tras la hidrólisis enzimática del almidón de oca, utilizando el diseño superficie respuesta.



3.2.2 Sacarificación

Al tener un alto número de variables (factores) con efecto sobre la degradación de las dextrinas en azúcares fermentables por la enzima glucoamilasa, se ejecutó un estudio discriminante (*screening*) para determinar los factores con impacto significativo sobre el proceso de sacarificación. Se aplicó un diseño Plackett–Burman con 4 variables y 3 puntos centrales, teniendo como variables independientes: concentración de enzima glucoamilasa [E] (X_2 , %), temperatura T (X_1 , °C), pH (X_3) y tiempo t (X_4 , h). La concentración de sustrato (dextrinas) se ajustó a un valor de 24 % de sólidos solubles (°Brix).

Como variable independiente (variable respuesta) se evaluó la producción de azúcares fermentables, como indicador de la degradación de las dextrinas por la enzima glucoamilasa, aplicando el método DNS (Krivorotova & Sereikaite, 2019).

Tabla 18.

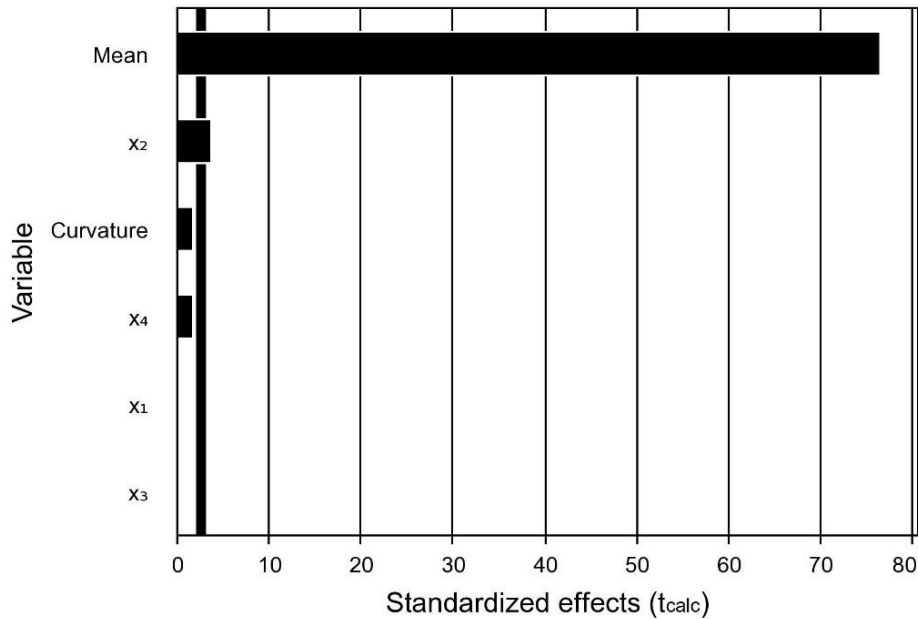
Aplicación de diseño Plackett-Burman para evaluar la producción de azúcares fermentables producidos a partir de la hidrólisis enzimática de las dextrinas del almidón de oca con glucoamilasa.

Tratamiento	Variables independientes				Variable dependiente
	T (X ₁ , °C)	[E] (X ₂ , %)	pH (X ₃)	t (X ₄ , h)	Azúcares fermentables
T1	60	0.4	4.0	8.0	17.6%
T2	60	0.6	4.0	4.0	19.2%
T3	60	0.6	5.0	4.0	18.6%
T4	50	0.6	5.0	8.0	19.1%
T5	60	0.4	5.0	8.0	18.4%
T6	50	0.6	4.0	8.0	20.7%
T7	50	0.4	5.0	4.0	17.8%
T8	50	0.4	4.0	4.0	16.8%
T9	55	0.5	4.5	6.0	17.7%
T10	55	0.5	4.5	6.0	17.9%
T11	55	0.5	4.5	6.0	17.5%

Al analizar los resultados del diseño Plackett-Burman, el factor (variable) con impacto significativo sobre la producción de azúcares fermentables fue la concentración de la enzima glucoamilasa (variable X₂), mientras que las demás variables no mostraron un impacto significativo sobre la degradación de las dextrinas (Figura 6).

Figura 5.

Diagrama de Pareto del diseño Plackett–Burman para determinar el efecto de las variables evaluadas durante la hidrólisis de las dextrinas de oca con la enzima glucoamilasa.



En base al resultado obtenido, para optimizar las condiciones de sacarificación de las dextrinas en azúcares fermentables con enzima glucoamilasa se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) considerando la concentración de enzima [E] (X_1 , %) como variable independiente (Tabla 20). También se incluyó el tiempo como variable independiente, manteniendo constantes la temperatura (55 °C), pH (4.5) y concentración de sustrato (dextrinas: 24 °Brix). El DCCR es un diseño estadístico que permite obtener un rango de valores de las variables independientes para la sacarificación óptima de las dextrinas.

Tabla 19.

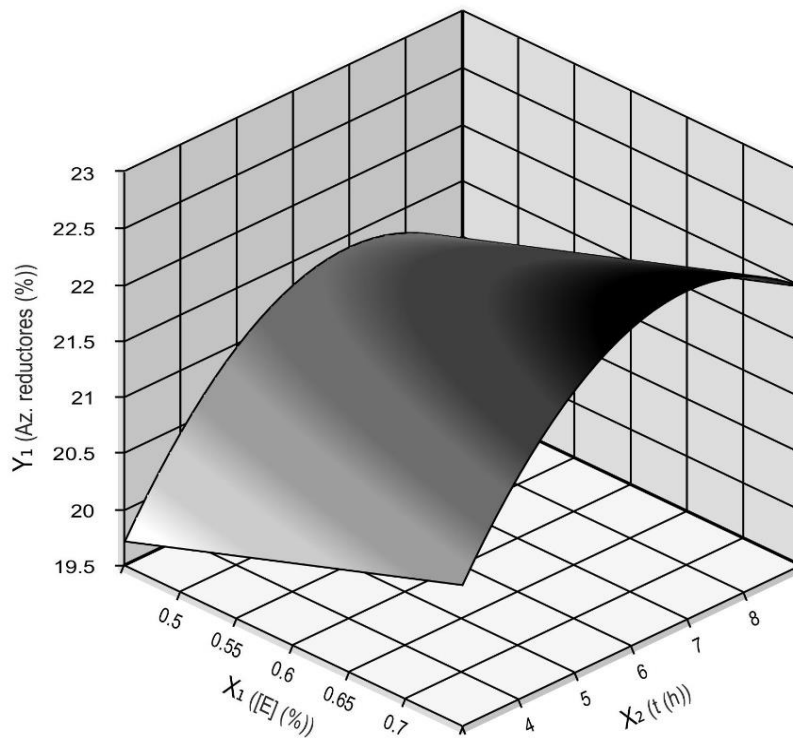
Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar las condiciones óptimas de hidrólisis de las dextrinas de oca en azúcares fermentables con la enzima glucoamilasa. Dextrinas (24 °Brix), temperatura (55 °C), pH (4.5).

Tratamiento	Variables independientes		Variable dependiente
	Enzima (%)	Tiempo (horas)	Azúcares fermentables
T1	0.50	4.0	20.4%
T2	0.70	4.0	21.6%
T3	0.50	8.0	21.5%
T4	0.70	8.0	21.8%
T5	0.46	6.0	21.1%
T6	0.74	6.0	22.0%
T7	0.60	3.2	20.3%
T8	0.60	8.8	21.7%
T9	0.60	6.0	22.1%
T10	0.60	6.0	22.2%
T11	0.60	6.0	21.7%

La concentración de enzima glucoamilasa [E] (X_1 , %) y tiempo (X_2 , h) tuvieron un impacto significativo sobre la hidrólisis de las dextrinas en azúcares fermentables, con valores óptimos de 0.75 % de enzima glucoamilasa (respecto al sustrato) y un tiempo de hidrólisis de 6.96 horas, logrando producir hasta un 22.4 % de azúcares fermentables (Figura 7).

Figura 6.

Efecto de la concentración de enzima glucoamilasa [E] (X_1 , %) y tiempo de hidrólisis (X_2 , h) sobre la producción de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática de las dextrinas de oca, utilizando el diseño superficie respuesta.



3.2.3 Fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se utilizaron diferentes fuentes de nitrógeno para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una fuente de N orgánico (O: extracto de levadura), N inorgánico (i: fosfato diamónico $[(NH_4)_2HPO_4]$) y una mezcla de ambas fuentes (Mx: mixta), además de un control (C) sin N, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 20.

Tabla 20.

*Evaluación del rendimiento de la fermentación usando diferentes fuentes de nitrógeno (N) para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en mostos a base de azúcares fermentables (23 °Brix) obtenidos mediante hidrólisis enzimática de almidón de oca.*

Tratamiento	Etanol (% v/v)	Etanol (g/L)	Días de fermentación	Horas de fermentación	Azúcar residual (g/L)	Conversión de sustrato ($Y_{p/s}$: g/g)	Eficiencia de conversión (%)	Productividad volumétrica de etanol (Q_p : g/L-h)
Control (C)	10.70 ± 0.35 ^c	83.89 ± 2.72 ^c	24	576	19.15 ± 0.86 ^a	0.41 ± 0.01 ^c	80.83 ± 2.46 ^c	0.15 ± 0.00 ^d
N-inorgánico (i)	12.23 ± 0.29 ^a	95.91 ± 2.26 ^a	14	336	8.87 ± 0.14 ^b	0.45 ± 0.01 ^{ab}	87.97 ± 2.10 ^a	0.29 ± 0.01 ^c
N-orgánico (O)	12.40 ± 0.00 ^a	97.22 ± 0.00 ^a	7	168	8.87 ± 0.12 ^b	0.45 ± 0.00 ^a	89.17 ± 0.05 ^a	0.58 ± 0.00 ^a
N-mixto (Mx)	11.90 ± 0.00 ^b	93.30 ± 0.00 ^b	7	168	8.59 ± 0.32 ^b	0.44 ± 0.00 ^b	85.46 ± 0.13 ^b	0.56 ± 0.00 ^b

- ✓ Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).
- ✓ Parámetros de rendimiento de fermentación (Duarte et al., 2013):
 - Conversión de sustrato ($Y_{p/s}$: g/g) = etanol producido/azúcar consumido (valor ideal 51%).
 - Eficiencia de conversión (Ef: %) = Conversión de sustrato respecto al 51% ideal.
 - Productividad volumétrica de etanol (Q_p : g/L h) = etanol producido/tiempo.

Los tratamientos conteniendo N orgánico en forma de extracto de levadura (O y Mx) mostraron mayores valores en los parámetros de rendimiento de producción de etanol en comparación con los tratamientos control (C) y con N inorgánico (i).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Discusiones

4.1.1 Hidrolisis del almidón

a. Licuefacción del almidón a dextrinas

Respecto a la etapa de licuefacción del almidón en dextrinas, en un estudio realizado para producir alcohol a partir de almidón de papa mediante hidrólisis enzimática y posterior fermentación alcohólica, se obtuvo un efecto estadísticamente significativo de la concentración de enzima α -amilasa y de la concentración de sustrato, siendo favorecida la conversión de sustrato a azúcares reductores a valores de 0.8 mL/kg y 20%, respectivamente (Gonzales y Molina, 2003). En el presente estudio, al aplicar el *screening* mediante el diseño Plackett-Burman para determinar el impacto de las variables intervinientes en la hidrólisis del almidón a dextrinas, la variable que más impacto mostró fue la concentración de enzima α -amilasa (Figura 4). Las demás variables independientes, al parecer, no tuvieron un impacto estadísticamente significativo en el proceso llevado a cabo con la enzima α -amilasa comercial utilizada (Song Yuan Feng, China).

Identificada la variable con mayor impacto sobre la licuefacción del almidón, se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar el rango óptimo de valores de las variables independientes para la licuefacción del almidón en dextrinas, obteniendo una concentración enzimática (E) óptima de α -amilasa del 0.41%, que permitiría alcanzar una conversión máxima de almidón en dextrinas del 93.4% (Figura 5).

b. Sacarificación de las dextrinas a azúcares fermentables

En la siguiente etapa, de sacarificación, es decir de la conversión de las dextrinas en azúcares fermentables, al aplicar el *screening* mediante Plackett-Burman para determinar el impacto de las variables independientes, la variable que más impacto mostró fue la concentración de la enzima glucoamilasa (Figura 6). Las demás variables, al parecer, no tuvieron un impacto estadísticamente significativo en el proceso llevado a cabo con la enzima glucoamilasa comercial utilizada (Song Yuan Feng, China), a diferencia de otros estudios, donde se destaca la importancia del tiempo en el proceso de sacarificación, cuyo incremento mejora el rendimiento de azúcares reductores (Miranda y Molina, 2015). En tal sentido, para la optimización del proceso de sacarificación en el presente estudio, se incluyó adicionalmente como variable independiente el tiempo, considerando además la implicancia práctica que puede tener el tiempo, por ejemplo, sobre los costos en un proceso de hidrólisis.

Al aplicar el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) para determinar el rango de valores de las variables independientes en donde la sacarificación de las dextrinas en azúcares fermentables sea óptima, se obtuvo una concentración enzimática (E) óptima de glucoamilasa de 0.75 %, a un tiempo óptimo de hidrólisis de 6.96 horas, valores óptimos que permitirían producir hasta un 22.4 % de azúcares fermentables (Figura 7), a partir de un medio con 24 % de dextrinas, es decir una conversión de dextrinas en azúcares fermentables de 93.3 %.

En un estudio previo (Rojas et al., 2008), se encontró que la licuefacción y sacarificación alcanzaron rendimientos del 51.86% y 24.89%, respectivamente. Nuestros resultados, en cambio, revelaron rendimientos más altos, de 93.4% en el proceso de licuefacción y de 93.3% en el proceso de sacarificación. Lo que sugiere que las enzimas

comerciales utilizadas en la presente investigación son altamente eficientes en términos de rendimiento, tanto para la licuefacción como para la sacarificación. Estos resultados sugieren que para optimizar la conversión del almidón de oca a azúcares fermentables con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa comerciales utilizadas en el presente estudio (Song Yuan Feng, China), se debe prestar especial atención a la concentración de las mismas, en concordancia con un estudio reciente, en el cual la concentración de las enzimas α -amilasa y glucoamilasa ha mostrado ser una variable relevante para lograr una mayor hidrólisis en preparados de almidón de achira (*Canna edulis* Kerr.), al obtener una mayor degradación de los gránulos de almidón y del contenido de amilosa (Witasari et al., 2024).

En ese sentido, los resultados obtenidos en la presente investigación pueden tener importantes implicancias prácticas para mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis y guiar futuras investigaciones para obtención de azúcares fermentables a partir de otras fuentes de almidón, sobre todo a partir de fuentes amiláceas de bajo consumo, por ejemplo, a partir de arracacha o de mashua (Espín et al., 2004; Cruz-Tirado et al., 2019).

4.1.2 Fermentación alcohólica

De acuerdo con la Tabla 20, las fermentaciones que presentan los mejores parámetros de rendimiento fermentativo para la producción de etanol son las que contienen extracto de levadura como fuente de N, alcanzando valores de Productividad volumétrica de etanol (Q_p) de 0.58 g/L-h en N-orgánico (O) y 0.56 g/L-h en N-mixto (Mx), es decir una mayor producción de etanol para el tratamiento O en el mismo tiempo de fermentación que el tratamiento Mx. Mientras que la mayor Eficiencia de conversión de sustrato en etanol se logró con el tratamiento N-orgánico (O), con un valor de 89.17%, determinado a partir de la

relación entre la Conversión de sustrato $Y_{p/s}$ (0.45 g etanol / g azúcar) respecto al valor teórico ideal de 0.51 g etanol / g azúcar (Duarte et al. 2013). En base a los resultados obtenidos (Tabla 20), por cada 1000 kg de oca se podría producir aproximadamente 30 L de etanol.

Se ha reportado una mayor preferencia por parte de las levaduras hacia fuentes de N orgánico. *Saccharomyces cerevisiae* ha mostrado preferencia por NH_4^+ y aminoácidos (Gutiérrez et al., 2012; Martínez-Moreno et al., 2012). La urea como fuente orgánica de N, sería una buena alternativa, como se ha observado en la producción de etanol a partir de residuos industriales de algarroba (Raposo et al., 2017), dado que en mostos fermentativos se hidroliza en NH_4^+ y otros compuestos. Por su parte, el extracto de levadura, utilizado como fuente de N-orgánico en el presente estudio (Tabla 14), está formado por los aminoácidos constituyentes de la levadura de la que se ha obtenido. Estos aminoácidos al ser descompuestos durante el proceso fermentativo liberan NH_4^+ , que es utilizado como fuente primaria de N por las levaduras. Lo cual explica que en el tratamiento con N-orgánico (extracto de levadura), se haya obtenido la mejor productividad volumétrica de etanol (Q_p : 0.58 g etanol/L-h) (Tabla 20), con un tiempo de fermentación de 7 días, respecto a los 14 días que demoró en presencia de la fuente de N-inorgánico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

Entre las diversas funciones del N destacan la reproducción y crecimiento celular, la síntesis de enzimas y de proteínas de transporte de azúcares, además de las funciones que cumplen los aminoácidos como precursores de compuestos aromáticos, principalmente alcoholes superiores, producidos mediante desaminación y descarboxilación (Gobert et al., 2017). Deficiencias en los niveles de N pueden conllevar el riesgo de fermentaciones lentas

o estancadas (Prior et al., 2019), además de un menor contenido de compuestos aromáticos, debido a la deficiente formación de ésteres, ácidos grasos volátiles y alcoholes superiores (De Koker, 2015). Esta deficiencia en N se puede corregir mediante el uso de fuentes adicionales de N como $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Por otro lado, se ha reportado que la excesiva utilización de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ puede generar problemas en el proceso fermentativo, como una alta acidificación del medio, altos niveles de fosfato residual, incrementar los niveles de sulfuro de hidrógeno (H_2S), favorecer la producción de compuestos dañinos como carbamato de etilo y aminas biógenas, entre otros efectos indeseables (Burin et al., 2015; Mendes-Ferreira et al., 2011; Ribereau-Gayon et al., 2006; Sturgeon et al., 2013). Lo cual podría explicar el menor valor de productividad volumétrica de etanol (Q_p : 0.29 g etanol/L-h) y el mayor tiempo para finalizar el proceso fermentativo, de 14 días (Tabla 20), obtenidos en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fuente de N-inorgánico (i).

De modo que la determinación de una adecuada proporción entre fuentes de N orgánico (extracto de levadura) e inorgánico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) podría tener implicancias prácticas respecto a mejoras en el rendimiento fermentativo de las levaduras, considerando la diferencia en la accesibilidad y costos de ambas fuentes de nitrógeno. Al respecto, una proporción 1/1 entre ambas fuentes (tratamiento N-mixto: Mx), como la utilizada en la presente investigación (Tabla 14), podría ser de utilidad para lograr un rendimiento fermentativo favorable, con valores de productividad volumétrica de etanol (Q_p : 0.56 g etanol/L-h) y un tiempo de fermentación de 7 días, similares a los obtenidos con la fuente de N-orgánico (0.58 g etanol/L-h y 7 días, respectivamente) (Tabla 20).

4.2. Conclusiones

En el proceso de licuefacción y sacarificación, se ha identificado como variable significativa la concentración de la respectiva enzima, la cual ha mostrado mayor impacto en el proceso de hidrólisis a dextrinas (enzima α -amilasa) y azúcares fermentables (enzima glucoamilasa), respectivamente. Las demás variables: temperatura, tiempo, pH o concentración de sustrato, al parecer no tuvieron un impacto significativo en el proceso hidrolítico llevado a cabo con las enzimas α -amilasa y glucoamilasa comerciales utilizadas (Song Yuan Feng, China).

Es esencial destacar que, además de la cantidad de enzima, el tiempo desempeña un papel relevante en la optimización de los costos asociados a un proceso industrial. Por consiguiente, se recomienda considerar tanto la concentración de enzima como el tiempo en el diseño y la ejecución de los procesos de licuefacción y sacarificación utilizando estas enzimas α -amilasa y glucoamilasa comerciales (Song Yuan Feng, China), dado que ambos aspectos resultan fundamentales para maximizar la hidrólisis del almidón en azúcares fermentables y optimizar la eficiencia económica de la operación.

Por otro lado, se han determinado las condiciones óptimas para la producción de azúcares fermentables mediante la hidrólisis enzimática del almidón de oca. Durante el proceso de licuefacción, se ha obtenido un porcentaje de enzima α -amilasa de 0.41 %, que permitiría alcanzar una conversión máxima de almidón en dextrinas del 93.4 %. Para la etapa de sacarificación, se ha obtenido un porcentaje de enzima glucoamilasa de 0.75 % con un tiempo de hidrólisis de 6.96 horas a partir de un medio con 24 % de dextrinas, con una conversión de dextrinas en azúcares fermentables del 93.3 %. Estas condiciones han

demostrado maximizar la eficiencia del proceso y la producción de azúcares fermentables a partir del almidón de oca.

Asimismo, la investigación revela que el extracto de levadura (N-orgánico), como fuente orgánica de nitrógeno, permite obtener el mayor rendimiento de etanol producido por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica de los azúcares fermentables del almidón de oca, alcanzando una Productividad volumétrica de etanol (Q_p) de 0.58 g/L-h, así como una Eficiencia de conversión de azúcares en etanol de 89.17 %.

En general, en base a los resultados obtenidos, y mediante la metodología aplicada en el presente estudio, por cada 1000 kg de oca se podría producir aproximadamente 30 L de etanol.

Finalmente, como perspectiva de futuras investigaciones, en base al rendimiento fermentativo con diferentes fuentes de N, se ha observado que la fuente mixta de nitrógeno (Mx), es decir la combinación de N-orgánico y N-inorgánico (extracto de levadura + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, respectivamente) ofrece un rendimiento levemente inferior al de la fuente de N-orgánico (extracto de levadura), pero con una diferencia no significativa en términos de rendimiento fermentativo, aunque a un costo potencialmente más bajo, dada la disponibilidad comercial del $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Por ende, al considerar la rentabilidad y la eficiencia en la producción de etanol a partir del almidón de oca, la fuente mixta de nitrógeno emerge como una opción más equilibrada y rentable en comparación con la fuente orgánica de nitrógeno, sin comprometer significativamente el rendimiento final de etanol.

4.3. Limitaciones

A lo largo del desarrollo de la investigación, se identificaron diversas limitaciones. Una de ellas se relacionó con la falta de una fuente constante de calor para la licuefacción del almidón en dextrinas, dado que la enzima α -amilasa requiere de temperaturas superiores al 75 °C para llevar a cabo el proceso hidrolítico de manera adecuada. Así mismo, otra limitación estuvo relacionada con la temperatura de gelificación del almidón (a partir de 58 °C), lo que fue solventado con pruebas previas para determinar el momento adecuado para dosificar la enzima, de modo que su acción hidrolítica reduzca el proceso de gelificación y así permitir una adecuada agitación de la suspensión de almidón.

4.4. Implicancias

Desde el punto de vista teórico, los resultados del estudio han permitido determinar las variables que tienen impacto en el proceso hidrolítico llevado a cabo con las enzimas amilasas comerciales utilizadas (Song Yuan Feng, China), así como las condiciones óptimas en las cuales se puede desarrollar el proceso hidrolítico correspondiente a cada enzima, siendo la concentración de enzima el factor con mayor impacto.

Desde el punto de vista práctico, se ha podido evidenciar que a partir de fuentes de almidón como la oca se abren posibilidades para la obtención de nuevos productos como el etanol, lo que sugiere un potencial significativo para la diversificación de la industria y la generación de nuevas fuentes de energía renovable.

Desde el punto de vista metodológico, se ha identificado los parámetros óptimos que pueden ser aplicados en un proceso de hidrólisis a mayor escala, facilitando así la obtención de etanol de manera más eficiente.

Referencias

- Aguilar-Galvez, A., García-Ríos, D., Ramírez-Guzmán, D., Lindo, J., Chirinos, R., Pedreschi, R., & Campos, D. (2023). In vitro and in vivo biotransformation of glucosinolates from mashua (*Tropaeolum tuberosum*) by lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 404(A), 134631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134631>
- Alarcón, H., Arroyo, E. (2016). Evaluación de las propiedades químicas y mecánicas de biopolímeros a partir del almidón modificado de la papa. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(3), 315-323. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n3/a07v82n3.pdf>
- Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63-89. <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlosalvarez.pdf>
- Apaza, Y., Ramirez, G. (2021) Optimización de la hidrólisis enzimática en cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) para la obtención de bioetanol. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú]. <http://hdl.handle.net/20.500.12773/12235>
- Arosemena, R., Castillo, A., Castillo, M., Castillo, V., Chen, R., Fuentes, A., & Jaramillo, B. (2015). Obtención de etanol a base de la savia de la palma de corozo *Attalea butyracea*. *Journal of Undergraduate Research*, 1(2), 66-72. <https://revistas.utp.ac.pa/index.php/ric/article/download/451/447>
- Arteaga, P. (2016). Aplicaciones del alcohol etílico. *Con-Ciencia*, 3(5), 7. <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa3/n5/m7.html>
- Bhattacharyya, N., Goodell, A., Rogers, S., & Demond, A. (2019). Environmental impacts of wheat-based vodka production using life cycle assessment. *Journal of cleaner production*, 231, 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.226>
- Benavides, I., Pozo, M. (2018). *Elaboración de una bebida alcohólica destilada (vodka) a partir de tres variedades de papa (Solanum tuberosum) utilizando dos tipos de enzimas*. [Tesis de Grado, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/327>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Gatto Jr, G. J. (2002). Glycogen Metabolism. *Biochemistry*, 5th Edition. WH Freeman, New York.
- Burin, V. M., Gomes, T. M., Caliar, V., Rosier, J. P., & Bordignon Luiz, M. T. (2015). Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchemical Journal*, 122, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.03.011>

- Cacho, J., Moncayo, L., Palma, J. C., Ferreira, V., & Culleré, L. (2013). The influence of different production processes on the aromatic composition of Peruvian piscos. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 3(6), 1000245. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000245>
- Castro-Martínez, C., Beltrán-Arredondo, L., & Ortiz-Ojeda, J. (2012). Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética? *Ra Ximhai*, 8(3b), 93-100. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177010>
- Castaño, H., Cardona, M., Mejía C., Acosta A. (2011). Producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. *Dyna*, 78(169), 158-166. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0012-73532011000500018&script=sci_arttext
- Carrión, L. (2018). *Obtención de almidón y glucosa a partir de la oca (Oxalis tuberosa) por hidrólisis ácida y su cinética de extracción*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional del Altiplano, Puno]. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3276900>
- Castillo, F. (2005). *Biología Ambiental: Tecnología Enzimática*. Primera edición, Editorial Tébar Flores. Madrid, España. <https://www.tebarflores.com/ciencias-ambientales/1-biologia-ambiental-9788473603959.html>
- Cobos, Y. (2019). *Estudio comparativo para la producción de bioetanol a través de la fermentación en batch usando Saccharomyces cerevisiae entre (Mangifera indica) y (Vitis vinifera)*. [Proyecto de Investigación, Fundación Universitaria Los Libertadores, Colombia]. https://repository.libertadores.edu.co/bitstream/handle/11371/1786/cobos_yennifer_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Corrales, L., Antolinez, D., Bohorquez, J., & Corredor, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(23), 55-81. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702015000200007&script=sci_abstract&tlng=es
- Cripwell, R. A., Favaro, L., Viljoen-Bloom, M., & van Zyl, W. H. (2020). Consolidated bioprocessing of raw starch to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*: Achievements and challenges. *Biotechnology Advances*, 42, 107579. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107579>
- Cruz, K. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10313>
- Cruz-Tirado, J. P., Vejarano, R., Tapia-Blácido, D. R., Barraza-Jáuregui, G., & Siche, R. (2019). Biodegradable foam tray based on starches isolated from different Peruvian species.

International Journal of Biological Macromolecules, 125, 800–807.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.111>

- De Koker, S. (2015). *Nitrogen utilisation of selected non-Saccharomyces yeasts and the impact on volatile compound production* [Master Thesis, Stellenbosch University, Cape Town, South Africa]. <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/98050>
- Duarte, W., Amorim, J., & Schwan, R. (2013). The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(1), 175–194. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9798-8>
- Espín, S., Villacrés, E., & Brito, B. (2004). Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-Ecuador) & Centro Internacional de la Papa (CIP-Perú). <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3264/1/iniapscCD55p91.pdf>
- García-Almeida, J.M., Casado Fdez, G.M., & García Alemán, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición hospitalaria*, 28, 17-31. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000003
- García, M. (2017). Influencia del tiempo de licuefacción y concentración de alfa amilasa y glucoamilasa sobre el porcentaje de glucosa obtenido del maíz amarillo malteado variedad alazán. *Ciencia Tecnología y Humanidades*, 8(2), 87-102. <http://revistas.unprg.edu.pe/openjournal/index.php/revistacientifica/article/view/203>
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., & Alexandre, H. (2017). Non-*Saccharomyces* yeasts nitrogen source preferences: Impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- González, J., & Molina, M.E. (2006). Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*). *Ingeniería: Revista de la Universidad de Costa Rica*, 16(1), 27-37. <https://doi.org/10.15517/ring.v16i1.642>
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 31(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012>
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology*, 28(3), 718-726. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031>

- Jativa, H. (2012). *Caracterización física, química y nutricional de la oca (Oxalis tuberosa) cultivada en diferentes suelos edafológicos del Ecuador*. [Tesis de Grado, Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador]. <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/4958>
- Krivorotova, T., & Sereikaite, J. (2014). Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(6), 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.005>
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 477-485. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x>
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., & Mendes-Faia, A. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 26(1), 17-32. <https://scielo.pt/pdf/ctv/v26n1/v26n1a03.pdf>
- MIDAGRI. (2024). Producción Agrícola. Boletines Anuales Del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú. <https://siea.midagri.gob.pe/portal/publicacion/boletines-anuales/4-agricola>
- Miranda, B., & Molina, M. (2015). Evaluación de factores que pueden influir en el proceso de sacarificación-fermentación simultáneas para la producción de etanol a partir de materiales amiláceos. *Ingeniería*, 25(1), 47-61. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/14665>
- Morata, A. (2004). *Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de los vinos tintos*. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, España]. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.28>
- Morrison, W. R., & Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, 1(1), 9-20. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80004-6)
- Novelo-Cen, L., & Betancur-Ancona, D. (2005). Chemical and functional properties of *Phaseolus lunatus* and *Manihot esculenta* starch blends. *Starch - Stärke*, 57(9), 431-441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/star.200500398>
- Nuriana, W., & Wuryantoro. (2015). Ethanol synthesis from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) stone waste as renewable energy source. *Energy Procedia*, 65, 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.01.066>
- OIV. (2023). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2023-05/Compendium%20MA%20complet_EN.pdf

- Ordóñez Girón, L. D. (2022). *Desarrollo de una bebida alcohólica destilada tipo (vodka) a partir de dos variedades de tubérculos, papa china (Colacasia esculenta) y oca (Oxalis tuberosa)*. [Tesis de Grado, Universidad del Azuay, Ecuador].
<https://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/11671>
- Pandey, A., & Teixeira, J. A. C. (2016). Current developments in biotechnology and bioengineering: Foundations of biotechnology and bioengineering. Elsevier, Amsterdam.
<https://www.sciencedirect.com/book/9780444636683/current-developments-in-biotechnology-and-bioengineering#book-info>
- Paucar-Menacho, L. M., Peñas, E., Hernandez-Ledesma, B., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2020). A comparative study on the phenolic bioaccessibility, antioxidant and inhibitory effects on carbohydrate-digesting enzymes of maca and mashua powders. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 109798. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109798>
- Prentice, C., & Handsjuk, N. (2016). Insights into Vodka consumer attitude and purchasing behaviors. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 32, 7-14.
<https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2016.05.009>
- Prior, K. J., Bauer, F. F., & Divol, B. (2019). The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiology*, 79, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Quitiguiña, C., & Santacruz, S. (2012). Obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de banano, *Musa cavendish*. *Revista Boliviana de Química*, 29(1).
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602012000100005
- Raposo, S., Constantino, A., Rodrigues, F., Rodrigues, B., & Lima-Costa, M. E. (2017). Nitrogen sources screening for ethanol production using carob industrial wastes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181, 827-843. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2252-z>
- Reyna, L., Robles, R., Reyes, M., Mendoza, Y., & Romero, J. (2004). Hidrólisis enzimática del almidón. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 7(1), 40-44.
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/download/4685/3758/15769>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Nitrogen compounds. In *Handbook of Enology the Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (2nd ed., pp. 109–140). JohnWiley and Sons Ltd.
- Rocha, T. S., Demiate, I. M., & Franco, C. M. L. (2008). Structural and physicochemical characteristics of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch. *Food Science and Technology*, 28(3), 620-628. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300018>
- Rojas, L., Caicedo L., Aguilar, J. & Martínez L. (2008). Evaluación de la sacarificación de yuca mediante el proceso convencional y el proceso low-energy, para su posterior determinación

- de la cinética de reacción. *Revista Tecnológicas*, 21, 81-98.
<https://revistas.itm.edu.co/index.php/tecnologicas/article/view/253/259>
- Salazar, L., & Muñoz, G. (2019). Seguridad alimentaria en América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo. <http://dx.doi.org/10.18235/0001784>
- Sakandar, H. A., Hussain, R., Farid Khan, Q., & Zhang, H. (2020). Functional microbiota in Chinese traditional Baijiu and Mijiu Qu (starters): A review. *Food Research International*, 138(B), 109830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109830>
- Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P., Svensson, B. (2000). Glucoamylase: Structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 275-293. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00232-6)
- Sturgeon, J. Q., Bohlscheid, J. C., & Edwards, C. G. (2013). The effect of nitrogen source on yeast metabolism and H₂S formation. *Journal of Wine Research*, 24(3), 182–194.
<https://doi.org/10.1080/09571264.2013.793175>
- Surco, F. (2004). *Caracterización de almidones aislados de tubérculos andinos: mashua (Tropaeolum tuberosum), oca (Oxalis tuberosa), olluco (Ullucus tuberosus) para su aplicación tecnológica*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2588>
- Suquilanda, M. (2009). Producción orgánica de cultivos andinos. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca de Ecuador & Unión de Organizaciones Campesinas del Norte de Cotopaxi (Unocanc).
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
- Tejeda, L. (2011). *Bases conceptuales para la estimación de las propiedades de los biocombustibles y sus mezclas*. [Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica de Bolívar, Colombia]. <https://biblioteca.utb.edu.co/notas/tesis/0062301.pdf>
- Torres, A. (2017). Cultivos generadores de bioetanol: Alternativa para el Perú. 6ta Jornada Científica de estudiantes-FIA, Universidad Peruana Unión, Perú.
http://eventoscientificos.upeu.edu.pe/index.php/6jornada/6jornada_fia/paper/view/174
- Vázquez, H. & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 8(4), 249-259. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004
- Velásquez-Barreto, F., & Velezmoro, C. (2018). Propiedades reológicas y viscoelásticas de almidones de tubérculos andinos. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 189-197.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.02.03>

- Villadiego-del Villar, A., Sarmiento-Zea, N., León-Pulido, J., & Rojas-Pérez, L. (2021). Producción de bioetanol a partir de ñame (*Dioscorea rotundata*) empleando un proceso de sacarificación y fermentación simultánea. *TecnoLógicas*, 24(50), e1724. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-77992021000100116&lang=es
- Wang, S., Zhang, P., Li, Y., Li, J., Li, X., Yang, J., Ji, M., Li, F., & Zhang, C. (2023). Recent advances and future challenges of the starch-based bio-composites for engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 307, 120627. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120627>
- Witasari, L., Heryadi, A., Yani, A., Nisrina, S., Purwitasari, L., & Pranoto, Y. (2024). Characterization of porous starch produced from edible canna (*Canna edulis* Kerr.) via enzymatic hydrolysis using thermostable α -amylase and glucoamylase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 55, 102990. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102990>
- Zamora-Hernández, T., Prado-Fuentes, A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, E., & Peña-Castro, J. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educacion Quimica*, 25(2), 122-127. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(14\)70534-8](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(14)70534-8)
- Zhu, F., & Cui, R. (2020). Comparison of physicochemical properties of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.028>