

Artículo Original

**DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA ALFA
AMILASA PARA SU USO EN LA INDUSTRIA AZUCARERA**

**DETERMINATION OF THE PROPERTIES OF THE ALPHA AMYLASE
ENZYME FOR ITS USE IN THE SUGAR INDUSTRY**

Saul Dueñas Casas ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8878-5484>
Jesús Luis Orozco ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6484-0672>
Héctor Luis Ramírez ² <https://orcid.org/0000-0003-1383-5149>
Leissy Gómez Brizuela ² <https://orcid.org/0000-0003-4832-7160>

¹ Departamento de Química, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

² Centro de Biotecnología, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

Recibido: Noviembre 16, 2024; Revisado: Noviembre 23, 2024; Aceptado: Diciembre 2, 2024

RESUMEN

Introducción:

La presencia de almidón en el proceso de producción de azúcar crudo cubano ha provocado en los últimos años serios impedimentos para su comercialización, de ahí la necesidad de emprender estudios que conduzcan a su reducción.

Objetivo:

Estudiar las condiciones que garantizan un mejor efecto de la enzima α -amilasa en el desdoblamiento de almidones, para su futura aplicación en la industria azucarera cubana.

Materiales y Métodos:

Se determina la actividad específica de la enzima por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico, así como sus propiedades estructurales y funcionales, los parámetros cinéticos de la reacción se determinan mediante el método de Lineweaver y Burk.

Resultados y Discusión:

La enzima presenta una actividad específica de 86 U/ μ g, los óptimos de las propiedades estructurales que se determinan son: pH 5,0, temperatura 60 °C, una afinidad al sustrato de 6,4 g/L y una velocidad máxima de reacción de 28 571 μ mol/mL \times min. Se determina que la α -amilasa es estable de 35 a 50 °C y en un intervalo de pH de 5,0 a 8,5, con una actividad superior al 80 %.



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

* Autor para la correspondencia: Saul Dueñas, Email: saul33dc@gmail.com



Conclusiones:

La α -amilasa estudiada se mantiene estable en un intervalo de pH de 5,0 a 8,5 y en un rango de temperatura de 35 a 50 °C, donde retiene más de un 80 y 90 % de actividad respectivamente; estas características la hacen adecuada para su aplicación industrial, específicamente en el proceso de producción de azúcar crudo.

Palabras clave: α -amilasa; almidón; hidrólisis enzimática; industria azucarera.

ABSTRACT**Introduction:**

The presence of starch in the production process of raw sugar in Cuba has caused serious obstacles to its commercialization in recent years, hence the need to undertake studies that lead to its reduction.

Objective:

To study the conditions that guarantee a better effect of the enzyme α -amylase in the breakdown of starches, for its future application in the Cuban sugar industry..

Materials and Methods:

The specific activity of the enzyme is determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid method, as well as its structural and functional properties, the kinetic parameters of the reaction are determined by the Lineweaver and Burk method.

Results and Discussion:

The enzyme has a specific activity of 86 U/ μ g, the optimum structural properties determined are: pH 5.0, temperature 60 °C, an affinity to the substrate of 6.4 g/L and a maximum reaction rate of 28 571 μ mol/mL \times min. α -amylase is determined to be stable from 35 to 50 °C and in a pH range of 5.0 to 8.5, with an activity greater than 80%.

Conclusions:

The studied α -amylase remains stable in a pH range of 5.0 to 8.5 and in a temperature range of 35 to 50 °C, where it retains more than 80 and 90% of activity respectively; these characteristics make it suitable for industrial application, specifically in the raw sugar production process.

Keywords: α -amylase; starch; enzymatic hydrolysis; sugar industry.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del sector industrial, la producción de azúcar crudo se considera uno de los procesos más importantes en el área de la industria alimentaria y el comercio. Uno de los parámetros que más afecta la calidad de este proceso y de su producto final es el contenido de polisacáridos. El almidón es un polisacárido que se incorpora al proceso por medio de la caña de azúcar que es la principal materia prima (Caballero, 2022; Castro, 2015). Su presencia en la industria afecta la filtración y la afinación del azúcar crudo (Eggleston y col., 2007), aumenta la viscosidad de los jugos, causa pérdidas de sacarosa en la miel final y por modificaciones en el crecimiento del cristal (Castro, 2015; Penados, 2004), y constituye un impedimento para el proceso de decoloración en la refinación (Eggleston y col., 2007). Por estos motivos el azúcar crudo cubano ha

mostrado serios impedimentos para su comercialización en los últimos años, de ahí la necesidad de emprender estudios que conduzcan a su reducción durante este proceso.

En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos químicos y físicos para su eliminación. Zhou y col., (2008) proponen para su eliminación la selección de variedades de caña sobre la base del contenido de almidón. La separación mediante ultrafiltración u ósmosis inversa es un método físico que se emplea a pequeña escala (laboratorio y piloto), pero está lejos de ser desarrollado a escala industrial, debido al alto costo que implica su aplicación en procesos reales (Popper y col., 2006). La adición de enzimas, principalmente la α -amilasa, es recomendado como el método más efectivo para la eliminación de este polisacárido por Chiu y Solarek, (2009) y Jiménez y col., (2016).

Las enzimas son proteínas, que tienen la capacidad de incrementar la velocidad de las reacciones químicas. Son altamente específicas y muy activas bajo condiciones ambientales extremadamente suaves. Poseen características en cuya magnitud superan a cualquier otro catalizador preparado por el hombre (Gómez, 2016). Las amilasas se encuentran entre las enzimas industriales más importantes que tienen impacto en los estudios biotecnológicos y representan alrededor del 25 al 33 % del mercado mundial de enzimas (Ashwini y col., 2011; Kumar y col., 2016). El término amilasa abarca una clase de enzimas que se producen en una amplia variedad de organismos, y se refiere a α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas (GA) (Young y deMan, 2018). Aunque estas enzimas pueden derivarse de varias fuentes, que incluyen plantas, animales y microorganismos, las amilasas microbianas generalmente satisfacen la demanda industrial.

Sin embargo, su uso en el proceso de producción de azúcar crudo sin el conocimiento de sus propiedades estructurales y funcionales sería un grave error desde el punto de vista técnico y económico, pues no se lograría una aplicación efectiva y se estaría derrochando un producto de elevado costo en el mercado internacional (Dueñas, 2020).

El conocimiento de las características y propiedades de la enzima α -amilasa, constituye la base para su futura aplicación en la Industria Azucarera Cubana, pues permite definir las condiciones más factibles para su operación en la misma; por este motivo este trabajo es novedoso para este proceso, pues no se cuentan con evidencias del empleo de este tratamiento en el proceso de producción de azúcar crudo en Cuba. En función de lo anterior, el objetivo de la presente investigación es estudiar las condiciones que garantizan un mejor efecto de la enzima α -amilasa en el desdoblamiento de almidones, para su futura aplicación en la industria azucarera cubana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolla en los laboratorios del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas. Entre los materiales que se emplean en los experimentos se encuentran: α -amilasa suministrada por el Laboratorio Biológico Farmacéutico (LaBiofam) de Cienfuegos, almidón, ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNSA), dihidrogenofosfato de sodio y hidrogenofosfato de sodio.

2.1. Caracterización de la enzima

Se determinan la concentración de proteínas y la actividad enzimática de la enzima α -amilasa (Singh y col., 2015).

2.1.1. Concentración de proteínas por método de Lowry (Lowry y col., 1951)

Se adiciona 0,4 mL de reactivo de Folin 1 a 0,4 mL de una dilución de α -amilasa en una disolución tampón de fosfato de sodio 20 mmol/L, pH 6,9 a 6 mmol/L de cloruro de sodio, se incuba durante 10 min, se adicionan 0,2 mL de reactivo de Folin 2 transcurrido 30 min se determina la absorbancia a 750 nm. La determinación final de la concentración se realiza mediante el uso de la curva de calibración que utiliza como patrón albumina de suero bovino (BSA) (SIGMA).

2.1.2. Actividad de la enzima por método del DNSA (Benfeld, 1955)

Se adiciona 0,5 mL de disolución enzimática sobre 0,5 mL de almidón al 1 % (m/v) (10 mg/mL) en una disolución tampón de fosfato de sodio 20 mmol/L, pH 6,9 a 6,0 mmol/L de cloruro de sodio. Se mantiene con agitación a 30 °C durante 10 min, se adiciona 1 mL de DNSA, y se introduce en baño maría por 10 min a 100 °C. Una vez que finaliza esta etapa del experimento, se mide la absorbancia a 546 nm. Con el uso de la ecuación (1) se evalúa la actividad enzimática.

$$AE = \frac{A_{546}}{t} * \frac{1}{m} * \frac{D_{enz}}{V_{enz}} \quad (1)$$

Donde:

AE: actividad enzimática (número de unidades de enzima por mg o mL de proteína),

A_{546} : valor de absorbancia,

t: tiempo que se encuentra en baño maría (10 min),

m: pendiente de la curva del DNSA,

Denz: dilución de la enzima; V_{enz} : volumen de la enzima (0,5 mL).

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1,0 μ mol de maltosa por minuto a 30 °C.

2.2. Determinación de las propiedades estructurales

Se estudia el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la enzima (actividad final de la enzima 0,5 U/mL, correspondientes al 100 % en los gráficos), y se determinan los parámetros cinéticos de la reacción.

Los parámetros óptimos informados se definen según Nelson y Cox, (2021), pH óptimo: pH al cual la enzima alcanza su máxima actividad catalítica; temperatura óptima: temperatura a la cual la enzima alcanza su máxima velocidad de reacción. Los rangos de las variables se seleccionan en función de las corrientes del proceso de producción de azúcar crudo donde se va a aplicar el tratamiento enzimático.

2.2.1. pH óptimo

Se determina la actividad de la enzima, a través de las reacciones de hidrólisis con almidón a 10 mg/mL, en un intervalo de pH de 3,0 a 8,5, a 30 °C para evitar el efecto degradante de la temperatura, con un tiempo de incubación de 10 min, en las soluciones

tampón de acetato de sodio 50 mmol/L (pH = 3,0- 5,5) y fosfato de sodio 50 mmol/L (pH = 6,0- 8,5).

2.2.2. Temperatura óptima

Se determina la actividad de la enzima, mediante la incubación del almidón a 10 mg/mL en una disolución tampón de fosfato de sodio 20 mmol/L, pH 6,9 a 6,0 mmol/L de cloruro de sodio y su hidrólisis durante 10 min a diferentes temperaturas en un intervalo de 35 a 90 °C.

2.2.3. Parámetros cinéticos de la reacción

Para definir los parámetros cinéticos de la reacción se determinan las constantes cinéticas K_m (afinidad al sustrato) en g/L y V_{max} (velocidad máxima) en $\mu\text{mol/mL}\times\text{min}$ de la enzima α -amilasa, mediante el método de la doble recíproca de Lineweaver y Burk (Rathod y Pathak, 2014). Para ello, se preparan siete disoluciones de tampón de fosfato de sodio 20 mmol/L, pH 6,9 a 6,0 mmol/L de cloruro de sodio con diferentes concentraciones de almidón (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 y 4 mg/mL) a una temperatura de 30 °C. A 0,5 mL de estas disoluciones se le adiciona 0,5 mL de enzima. Estas reacciones se mantienen con agitación y a diferentes tiempos (2; 4; 6; 8 y 10 min) se le adiciona 1 mL de DNSA, se incuba por 10 min a 100 °C y se mide absorbancia a 546 nm.

2.3. Determinación de las propiedades funcionales

Para la determinación de las propiedades funcionales de la enzima, se estudia la estabilidad de la misma a la temperatura y el pH.

2.3.1. Termoestabilidad

Se determina mediante la medición de la actividad, después de incubar la preparación enzimática durante 10 min a diferentes temperaturas entre 35 y 90 °C en una solución tampón de fosfato de sodio (dihidrogenofostato de sodio/hidrogenofostato de sodio) 0,05 mol/L, pH 6,5. Al culminar el periodo de incubación se enfrían en un baño de hielo.

2.3.2. Estabilidad al pH

Se determina después de incubar la solución enzimática en soluciones tampón de acetato de sodio (50 mmol/L, pH 3,0- 5,0) y fosfato de sodio (50 mmol/L, pH 6,0- 8,5), rango que satisface cualquiera de los posibles pH que se puedan presentar en el proceso de producción de azúcar crudo, durante 30 min a 30 °C. Transcurrido este tiempo se determina la actividad de la misma.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La enzima estudiada presenta una actividad específica de 86 U/ μg .

En la Figura 1(a) se muestra la correlación entre el pH y la actividad de la enzima en el intervalo de 3,0 a 8,5. En la figura se aprecia que, con el incremento del pH, aumenta la actividad de la enzima hasta el pH 5,0, donde la enzima alcanza el 100 % de actividad, valor definido como pH óptimo. Por encima o por debajo de este valor, la actividad de

la enzima o la velocidad de la reacción catalizada por ella, disminuye (Kuddus, 2019). Este incremento inicial es indicativo de la existencia de cambios en el entorno de la enzima, los que trae como consecuencia cambios en el grado de ionización de los residuos aminoacídicos en el sitio activo de la enzima (Nelson y Cox, 2021). En el intervalo de pH de 5,0 a 6,0 la enzima presentó un porcentaje de actividad superior al 95 %, para luego decrecer, sin embargo, a pH 8,5 mantiene un 65 % de actividad. Resultados similares alcanzan Amid y Yazid, (2014), con una amilasa proveniente de la corteza de *Hilocerius polyrhizus* que retuvo más de un 84 % de actividad en el rango de pH de 4,5 a 6,0 con un pH óptimo de 5; mientras que Singh y Kayastha, (2014), determinan este mismo valor de pH óptimo para la amilasa de *Triticum aestivum*.

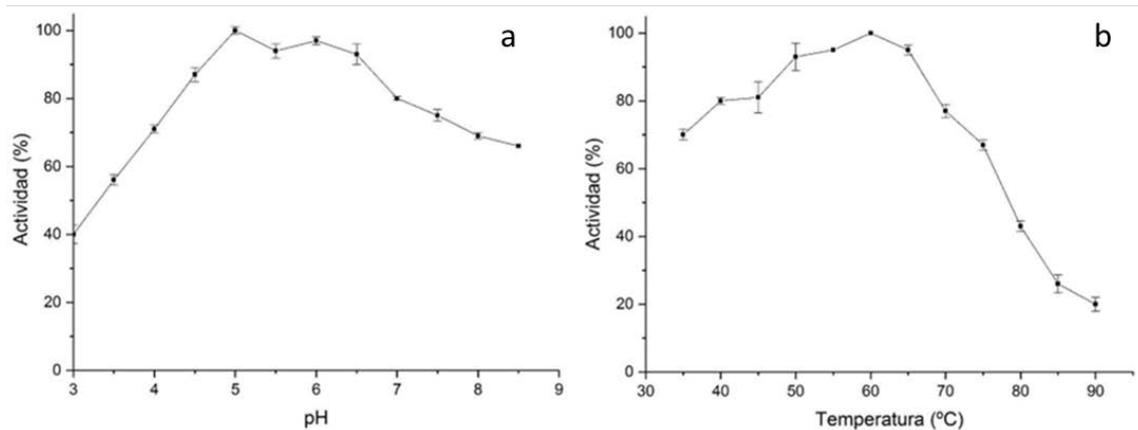


Figura 1. Valores óptimos de pH (a) y temperatura (b) para la α -amilasa

En la Figura 1(b) se observa el efecto que ejerce la temperatura sobre la actividad de la enzima caso de estudio. Inicialmente hay un aumento de la actividad de la enzima, que se debe al incremento de la temperatura, el cual ocasiona el aumento de la velocidad de la reacción al existir más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar (Aldabe y col., 1998). Esto ocurre hasta alcanzar su máxima actividad catalítica a una temperatura de 60 °C (temperatura óptima), para luego decrecer rápidamente debido al proceso de inactivación térmica que sufren las enzimas (Shukla y Singh, 2016). La enzima en el intervalo de temperatura de 35- 70 °C muestra un porcentaje de actividad superior al 70 %. Se observa además que a partir de 70 °C pequeños cambios de temperatura producen grandes variaciones en el porcentaje de actividad. Gashtasbi y col., (2014), coinciden con este resultado, pero en este caso para la α -amilasa de *Bacillus subtilis*; mientras que Fincan (2008), determina para esta misma cepa una temperatura óptima de 65 °C.

La mejor forma de describir la cinética enzimática es mediante la ecuación de Michaelis-Menten, lo que presupone la formación de un complejo enzima-sustrato, es decir una cinética enzimática en fase homogénea (Gonzales, 2004). La constante de Michaelis - Menten se determina a partir de los datos de las velocidades iniciales de la reacción catalizada a diferentes concentraciones de almidón [0,5 g/L– 4,0 g/L], los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de las constantes Km y Vmax para la α -amilasa

<i>Constantes cinéticas</i>	<i>Valores</i>
Km (g/L)	6,4
Vmax ($\mu\text{mol/mL}\times\text{min}$)	28 571

Autores como Amid y Yazid, (2014), Bhanja y Banerjee, (2015), Fincan y col., (2014) y Xie y col., (2014) informan valores de Km tanto superiores como inferiores al que presenta la enzima objeto de estudio. Mientras mayor es su valor, menor afinidad al sustrato presenta la enzima. Sin embargo, estos parámetros cinéticos son característicos para cada enzima (Bhanja y Banerjee, 2015).

Las enzimas que se utilizan como catalizadores en diferentes procesos industriales, se someten a la acción de agentes químicos y físicos externos que provocan su desnaturalización. Esta razón motiva el estudio del efecto que ejerce el pH y la temperatura sobre la estabilidad de las mismas (Figura 2).

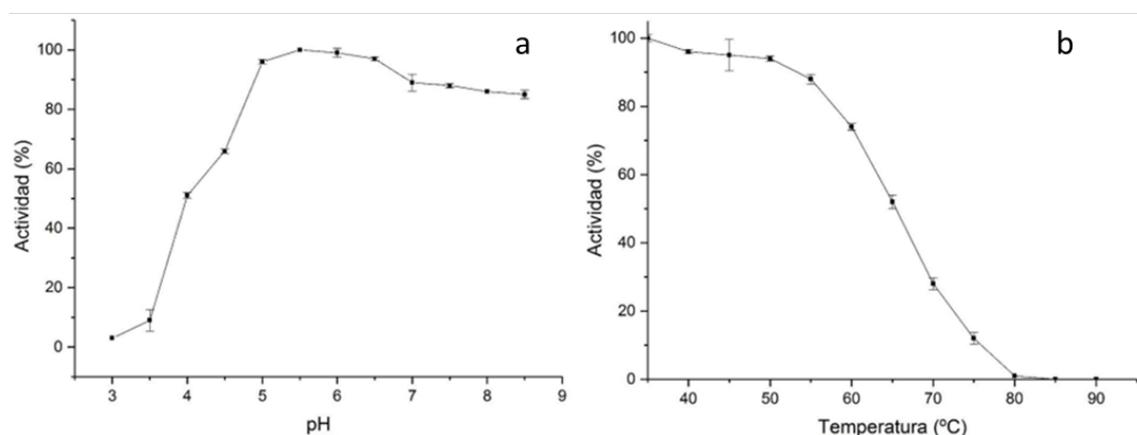


Figura 2. Estabilidad al pH (a) y termoestabilidad (b) de la enzima α -amilasa

La estabilidad al pH de la enzima se estudió en un intervalo de 3,0 a 8,5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2(a), en la misma se puede apreciar que la actividad de la enzima aumenta considerablemente a partir del pH 3,5, manteniéndose estable en el intervalo de 5,0 a 8,5 donde retiene más del 80 % de su actividad inicial. La α -amilasa de la presente investigación presenta una mayor estabilidad al pH que las α -amilasas obtenidas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* (Demirkan y col., 2005), y una mayor aplicación industrial con respecto a las α -amilasas provenientes de las bacterias *Chryseobacterium toeanense TK001* (Wang y col., 2011) y *Streptomyces strain A3* (Chakraborty y col., 2014).

Las enzimas que presentan su máxima actividad a bajos valores de pH y buena estabilidad a pH 5,0 son consideradas muy importantes desde el punto de vista de su aplicación industrial (Liu y Xu, 2008; Sajedi y col., 2005).

El efecto de la temperatura sobre la α -amilasa fue estudiado después de la incubación de la misma durante un periodo de 10 minutos a diferentes valores de temperatura (Figura 2b). El análisis de la termoestabilidad de la α -amilasa indica que la enzima se mantiene estable en un rango de temperatura entre 35-50 °C, donde retiene más de un 90 % de su actividad. El valor de T₅₀, temperatura a la cual la enzima retiene el 50 % de su actividad inicial, es de 65 °C. A temperaturas mayores de 60 °C la actividad decrece

significativamente, a 70 y 75 °C los valores de actividad fueron de 30 y 15 % respectivamente. Se aprecia que a 80 °C la enzima pierde totalmente su actividad. Este fenómeno puede atribuirse a la desnaturalización térmica que sufren las enzimas por la exposición a elevadas temperaturas (Ramirez y col., 2016).

Kapfo y col., (2013) y Veesar y col., (2015) obtuvieron resultados similares, pero en estos casos a 60 °C la enzima perdió totalmente su actividad. Las α -amilasas provenientes de plantas retienen un 90 % de su actividad en un intervalo de temperatura de 20 a 80 °C, a valores superiores hay una pérdida total de su actividad (Kolawole y col., 2011; Kumari y col., 2010; Xie y col., 2014).

4. CONCLUSIONES

1. La α -amilasa estudiada presenta una actividad específica de 86 U/ μ g (número de unidades de enzima por mg o mL de proteína).
2. La enzima alcanza su máxima actividad catalítica a 60 °C y pH 5, manteniendo un porcentaje de actividad superior al 70 % de 35- 70 °C y de pH 4 a 7,5.
3. La α -amilasa se mantiene estable en un intervalo de pH de 5 a 8,5 y en un rango de temperatura de 35 a 50 °C, donde retiene más de un 80 y 90 % de actividad respectivamente.
4. Las características de la enzima la hacen adecuada para su aplicación industrial, específicamente en el proceso de producción de azúcar crudo.

REFERENCIAS

- Aldabe, J., Hueto, A., Juni, J., y López, P., Biología., Editorial Erein, 1998, pp. 125-128. <https://www.calameo.com/read/004553748c05af003730d>
- Amid, M., & Yazid, M.A., Purification and characterization of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel., Food Chemistry, Vol. 165, 2014, pp. 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.133>
- Ashwini, K., Kumar, G., & Karthik, L., Optimization, production and partial purification of extracellular α - amylase from *Bacillus sp. Marini 3.*, Scholars Research Library, Archives of Applied Science Research, Vol. 3, 2011, pp. 32-42. <https://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/optimization-production-and-partial-purification-of-extracellular-amylase-from-bacillus-sp-marini-11727.html>
- Benfeld, P., Amylases alpha and beta. Methods Enzymology., Chapter 1, 1955, pp. 149-158. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)
- Bhanja, D.T., & Banerjee, R., Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103., Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Vol. 4, 2015, pp. 483-90. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.10.002>
- Caballero, D., Determinación del efecto de la hidrólisis enzimática del almidón en Jugo Mezclado., Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad de Matanzas, Cuba, 2022. <https://rein.umcc.cu/handle/123456789/1947>
- Castro, N., Determinación de la concentración de almidón por caracterización espectrofotométrica en el jugo de caña de azúcar de las variedades: cp72-2086, cp88-
-

- 1165 y cp73-1547 utilizadas en el ingenio Trinidad Guatemala., Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2015.
<http://www.repositorio.usac.edu.gt/2924/>
- Chakraborty, S., Sougata, J., Arijit, G., Kalyan, K.S., Wang, Z., & Chandrakant, K., Gellan gum microspheres containing a novel α -amylase from marine *Nocardiosis sp strain B2* from immobilization., International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 70, 2014, pp. 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.046>
- Chiu, C., & Solarek, D. Starch: Chemistry and Technology., Chapter 8, Third Edition, 2009, pp. 293-373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00017-3>
- Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., & Utsumi, S., Process Biochem, Vol. 40, 2005, pp. 2629-2636. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.015>
- Dueñas, S., Valoración de alternativas para el desdoblamiento enzimático de almidón en la industria azucarera., Tesis presentada en opción al Grado Científico de Master en Ciencias, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad de Matanzas, Cuba, 2020.
<https://rein.umcc.cu/bitstream/handle/123456789/700/MSc20%20Saul.pdf?sequence=1>
- Eggleston, G., Viator, R., & Grisham, M., Glyphosphate ripener effects on the processing quality of different sugarcane tissues., Proc. ISSCT Congress, South Africa, Vol. 26, 2007, pp. 1460-1467.
<https://www.semanticscholar.org/paper/RIPENER-EFFECTS-ON-THE-PROCESSING-QUALITY-OF-By-Eggleston/f3aaea55703285e183b287918691a1e079bc7e2e>
- Fincan, S., Insolation and characterization of *Bacillus subtilis* α -amylase isolated from termic hot water springs., In 11th-33rd. FEBS Congress JUBMB. Conference Athens, Grece, 2008, pp. 270- 275. <https://www.mdpi.com/2227-9717/12/8/1621>
- Fincan, A.S., Enez, B., Özdimir, S., & Matpan, M., Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavither mus.*, Carbohydrate Polymers, Vol. 102, 2014, pp. 144-150.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.048>
- Gashtasbi, F., Gholamreza, A.K., & Akbani, N., New insights in to the effectiveness of α -amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization., Enzyme and microbial Technology, Vol. 64, No. 65, 2014, pp. 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.006>
- Gómez, L., Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial., Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias, Especialidad Licenciatura en Química en la Universidad de Matanzas, Cuba, 2016.
<https://rein.umcc.cu/handle/123456789/23>
- Gonzales, C., Evaluación de la actividad amilásica como indicador del grado de biotransformación de residuos orgánicos procedentes de la industrialización de papa congelada., Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad de la Sabana, Colombia, 2004.
<https://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/4971?show=full>
- Jiménez, A., Orozco, L., Lugo, R., Ramírez, H.L., y Gómez, L., Influencia del almidón
-

- y tecnologías de control en el proceso de producción de azúcar crudo y refino., Monografías, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba, 2016. <http://monografias.umcc.cu/monos/2016/FCT/mo16152.pdf>
- Kapfo, S.R., Smitha, G., Jyoti, C., & Jay, Y., Effect of non-aqueous solvent on structural stability of α -amylase A cost-effective prospective for protein stabilization., *Process Biochemistry*, Vol. 48, 2013, pp. 1025-1030. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.006>
- Kolawole, A.O., Ajele, J.O., & Sirdeshmukh, R., Purification and characterization of alkaline-stable β -amylase in malted African finger millet (*Eleusine coracana*) seed., *Journal of Process Biochemistry*, Vol. 46, 2011, pp. 2178-2186. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.021>
- Kuddus, M., *Enzymes in Food Biotechnology.*, Chapter 1: Introduction to Food Enzymes., Academic Press, 2019, pp. 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00001-3>
- Kumar, A.P., Rani, R.S., & Pandey, A., Novel enzymatic processes applied to the industry., *Current Opinion in Food Science*, Vol. 7, 2016, pp. 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.002>
- Kumari, A., Singh, V.K., Fitter, J., Polen, T., & Kayastha, A.M., α -amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds. Purifications, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues., *Journal of Phitochemistry*, Vol. 71, 2010, pp. 1657-1666. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.012>
- Liu, X.D., & Xu, Y., A novel raw starch digesting alpha-amylase from a newly isolate *Bacillus sp. YX-1*: Purification and characterization., *Bioresource Techonology*, Vol. 99, 2008, pp. 4315-4320. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.040>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L., & Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent., *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, 1951, pp. 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Nelson, D.L., & Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry.*, Chapter 6, Eight edition, W.H., Freeman and Company, 2021, pp. 189-213. <https://www.macmillanlearning.com/college/us/product/Lehninger-Principles-of-Biochemistry/p/1319228003>
- Penados, M.F., Evaluación del impacto de adicionar la enzima alfa amilasa durante el proceso de evaporación en los niveles de almidón de azúcar crudo producido en un ingenio azucarero., Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Químico, Especialidad Ingeniería Química en la Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2004. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0921_Q.pdf.
- Popper, L., Schafer, W., & Freund, W., *Sugazym- dextranase and amylase in the sugar industry.*, Published by Agrimedia GmbH, 2006, pp. 45-67. <https://1library.co/document/qo5n1gd7-sugazym-dextranase-amylase-industry-sugazym-dextranasa-industria-azucarera.html>
- Ramirez, H.L., Gomez, B.L., Ubeda, I.J., Arevalo, V.M., & Briones, P.A., Pectinase immobilization on a chitosan-coated chitin support., *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 39, 2016, pp. 97-104. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.12203>
-

- Rathod, M.G., & Pathak, A.P., Wealth from waste: Optimized alkaline., Journal of Taibah University for Science, Vol. 8, No. 4, 2014, pp. 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.002>
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B.A., Asodeh, A., & Moradian, F., A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104., Enzyme and Microbial Technology., Vol. 36, 2005, pp. 666-671. [doi:10.1016/j.enzmictec.2004.11.003 \(um.ac.ir\)](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.11.003)
- Singh, K., & Kayastha, A.M., Optimal immobilization of α -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 104, 2014, pp. 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.014>
- Singh, K., Srivastava, G., Talat, M., Nath Srivastava, O., & Mohan Kayastha, A., α -Amylase immobilization onto functionalized graphene nanosheets as scaffolds: Its characterization, kinetics and potential applications in starch based industries., Biochemistry and Biophysics Reports, Vol. 3, 2015, pp. 18-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.07.002>
- Shukla, R.J., & Singh, S.P., Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2., International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 85, 2016, pp. 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.079>
- Veesar, I.A., Imam, B.S., & Shahabuddin, M., Immobilization of α -amylase onto a calex (4) arene derivative: Evaluation of its enzymatic activity., Bioorganic Chemistry, Vol. 60, 2015, pp. 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.04.007>
- Wang, S.L., Liang, Y.C., & Liang, T.W., Purification, characterization, and antioxidant activity of a novel chitosanase from *Bacillus cereus* isolated from the squid liver., Process Biochem, Vol. 46, 2011, pp. 745-750. <https://www.scrip.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=2250177>
- Xie, F., Shujing, Q., Dehai, L., Huan, M., Feng, L., Fuzhong, Z., & Guocan, C., Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2., Process Biochemistry, Vol. 49, 2014, pp. 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.025>
- Young, L.C., & deMan, J.M., Enzymes. Principles of Food Chemistry., Food Science Text Series, Chapter 10, 2018, pp. 397-433. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-63607-8>
- Zhou, M.M., Kimbeng, C.A., Eggleston, G., Viator R.P., Hale, A.L., & Gravois K.A., Issues of starch in sugarcane processing and prospects of breeding for low starch content in sugarcane., Sugar Cane International, Vol. 26, No. 3, 2008, pp. 3-17. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=224205>

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- M.Sc. Saul Dueñas Casas. Análisis formal, redacción - primera redacción, redacción - revisión y edición, investigación, software, visualización.
 - Dr.C. Jesús Luis Orozco. Gestión de proyectos, supervisión, redacción - revisión y edición.
 - Dr.C. Héctor Luis Ramírez. Conceptualización, metodología, recursos, supervisión.
 - Dr.C. Leissy Gómez Brizuela. Gestión de proyectos, supervisión, metodología, obtención de financiación, recursos, supervisión.
-