



# EVALUACIÓN DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE SEMILLA DE MANGO UTILIZANDO MEZCLAS DE ENZIMAS COMERCIALES ESTUDIO DE SINERGIAS ENTRE GAMALPHA, GAMMADEX, BAN 480L Y AMG 300L

S. CURIOSO<sup>2</sup>, V. CARRANZA<sup>2</sup>, B. RAMOS<sup>1</sup>, B. PRATTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitario FEI, Departamento de Ingeniería Química, Laboratorio de Bioprocursos

<sup>2</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Departamento de Postgrado

E-mail para contacto: brunapratto@fei.edu.br

*RESUMO – El presente trabajo muestra los avances en el estudio de hidrólisis enzimática de una muestra de almidón de semilla de mango (*Mangifera indica*), utilizando 4 enzimas que actuaron en combinación: Gamalpha Spezial, Gammadex Cal, AMG 300L y BAN 480 L. El objetivo fue evaluar la eficiencia de la hidrólisis enzimática por combinación de enzima a amilasa y glucoamilasa para maximizar la liberación de azúcares reductores. Se empleó como materia prima el almidón de semilla de mango obtenido por extracción húmeda, este fue secado y caracterizado. Las reacciones de hidrólisis se realizaron con un volumen fijo de 100 mL, con pH, temperatura y tiempo de reacción controlados. Se analizaron las muestras por el método DNS para cuantificar azúcares reductores y por HPLC para cuantificar glucosa. Los resultados obtenidos muestran que la combinación de enzimas más eficientes para la conversión de almidón de semilla de mango en azúcares fermentables fueron Gamalpha Spezial (41,95 g/L azúcares reductores) y AMG 300L (91,6 g/L glucosa – correspondiente a una conversión del 82,5%) pertenecientes a la combinación D, en 180 minutos de reacción.*

## 1 INTRODUCCIÓN

La revalorización de residuos agroindustriales cuenta con creciente interés relacionado a la economía circular y al desarrollo sostenible. Entre los residuos que son producto de la industrialización de productos agroindustriales podemos encontrar a la semilla de mango (*Mangifera indica L.*), solo en el año 2023 se reporta que se produjo 61.107 millones de toneladas a nivel mundial (FAO, 2025) lo que indica un aumento en la cantidad de subproductos disponibles a partir de esta materia prima como la semilla y al cascara. La semilla de mango puede contener hasta un 60% de almidón dependiendo de grado de madurez, la variedad, entre otros; el cual se posiciona como una alternativa que mejorara la viabilidad económica de las industrias (Punia Bangar et al., 2021).

La hidrólisis enzimática del almidón constituye una estrategia eficiente ambientalmente amigable para su conversión en azúcares fermentables en comparación a los métodos químicos como lo es la hidrólisis ácida que puede generar productos secundarios no deseados, además



que requieren condiciones severas y presentan bajo grado de especificidad (Wang & Copeland, 2015).

El uso de enzimas como alfa-amilasa, glucoamilasa y otras, permiten realizar la hidrólisis bajo condiciones suaves permitiendo obtener productos con mayor pureza y rendimiento. Se ha demostrado que la combinación de enzimas mejora el rendimiento de conversión del almidón, reduce los tiempos de proceso y aumenta la liberación de azúcares reductores (Zhao et al., 2021)

En el presente trabajo se evalúan el efecto de las combinaciones de enzimas alfa-amilasa y glucoamilasa sobre la hidrólisis del almidón de semilla de mango. El objetivo principal es identificar la combinación de enzimas que maximice el nivel de glucosa que nos permita utilizar ese hidrolizado en otros bioprocesos. Este estudio busca contribuir al desarrollo de alternativas sostenibles para el aprovechamiento de residuos agroindustriales con enfoque biotecnológico.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Obtención de almidón de semilla de mango

Las semillas de mango (*Mangifera indica* L.) fueron recolectadas, lavadas con agua potable y desinfectadas con una solución de bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ) a 1,6 g/L. A continuación, se secaron a 45°C durante 12 horas y se molieron en un molino de martillos. El polvo obtenido se licuo con agua destilada durante 10 minutos y se procedió a filtrar haciendo lavados adicionales con agua destilada. Se dejó en reposo la suspensión por un periodo de 12 horas para después el contenido sólido centrifugarlo a 4000 rpm por 1 hora. Se separaron las impurezas encontradas y el almidón fue colocado en placas Petri y secados en estufa a una temperatura de 40°C, cuando se obtuvo almidón a 10% de humedad relativa, se tamizó y se almacenó en un ambiente seco. Se obtuvo un rendimiento de almidón de 20% por peso de semilla entera.

#### 1. Preparación de almidón

**Gelatinización:** Se preparó una suspensión de almidón al 10% (p/v) en tampón citrato pH 6. Esta mezcla fue procesada en un biorreactor de 200 mL de capacidad con agitación de 300 rpm a 85°C por 30 minutos.

#### 2. Preparación de combinaciones enzimáticas

Se utilizaron dos enzimas alfa-amilasa en presentación líquida: BAN 480L (producida por *Bacillus amyloliquefaciens*, con una actividad enzimática > 250 KNU/g) y Gamalpha Spezial (producida por *Bacillus licheniformis*, con una actividad enzimática de 200,000 TAU/g.); así como dos enzimas glucoamilasa líquidas: Gammadex Cal (*Aspergillus niger*, 500 GAU/g) y AMG 300 L (*Aspergillus niger*, > 260 U/mL). Los valores de la actividad enzimática fueron obtenidos de las respectivas fichas técnicas proporcionadas por los fabricantes. Debido a que las actividades enzimáticas se expresan en unidades diferentes, y con el fin de estandarizar el proceso de licuefacción y sacarificación, se definieron volúmenes fijos para la adición de las enzimas alfa-amilasa y glucoamilasa, basándose en investigaciones previas. Estos tratamientos se organizaron en cuatro combinaciones enzimáticas, como se muestra en la Tabla 1.

**Licuefacción:** la preparación de la fase de gelatinización se llevó a la temperatura indicada en la Tabla 1 según la enzima que se utilizó y el pH fue ajustado a 6, se adicionó enzima alfa-amilasa en una concentración de 2 mL/kg de almidón (Larrea et al., 2020) y se aplicó agitación a 200 rpm por una hora. Se realizaron muestreos en los minutos 3, 6, 9, 12 y 15.



**Sacarificación:** El resultado de la licuefacción se llevó a la temperatura de acción indicada en la Tabla 1 según la enzima a utilizar, el pH fue ajustado a 4,8, se adiciono enzima glucoamilasa en una concentración de 5 mL/kg de almidón (Rojas et al., 2019) y se aplicó agitación a 200 rpm por 180 minutos. Se realizaron muestreos en los minutos 15, 40, 60, 80 y 180.

Los valores de temperatura y pH utilizados en este estudio son los recomendados por los fabricantes.

*Tabla 1: condiciones de temperatura y pH de las enzimas*

Combinación	Enzima	Temperatura °C	pH
A	BAN 480 L	70	6
	Gammadex cal	75	4,8
B	BAN 480L	70	6
	AMG 300 L	60	4,8
C	Gamalpha Spezial	85	6
	Gammadex cal	75	4,8
D	Gamalpha Spezial	85	6
	AMG 300 L	60	4,8

## 2.2 Medición de muestras:

Las muestras fueron refrigeradas y centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos para obtener la fase líquida, esta fue separada y preparada según el análisis a realizar.

**DNS:** La concentración de azúcares reductores de las muestras obtenidas del proceso de licuefacción, se determinó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), siguiendo el protocolo con modificaciones descrito por Wood et al. (2012). Se mezclaron 100 uL de la muestra con 200 uL de reactivo DNS, se calentó a 100°C durante 10 minutos y tras enfriar la mezcla se adiciono 5 mL de agua destilada, se midió la mezcla en espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm.

**HPLC glucosa:** La concentración de glucosa en las muestras obtenidas del proceso de sacarificación, se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando el sistema Shimadzu LC-10AD equipado con un detector de índice de refracción (Shimadzu RID-10A). La separación se realizó en una columna HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm). La fase móvil consistió en 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con flujo de la fase móvil de 0,6 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 45 °C. Se inyectaron 20 uL de cada muestra y se realizó la cuantificación mediante comparación con la curva estándar de glucosa.

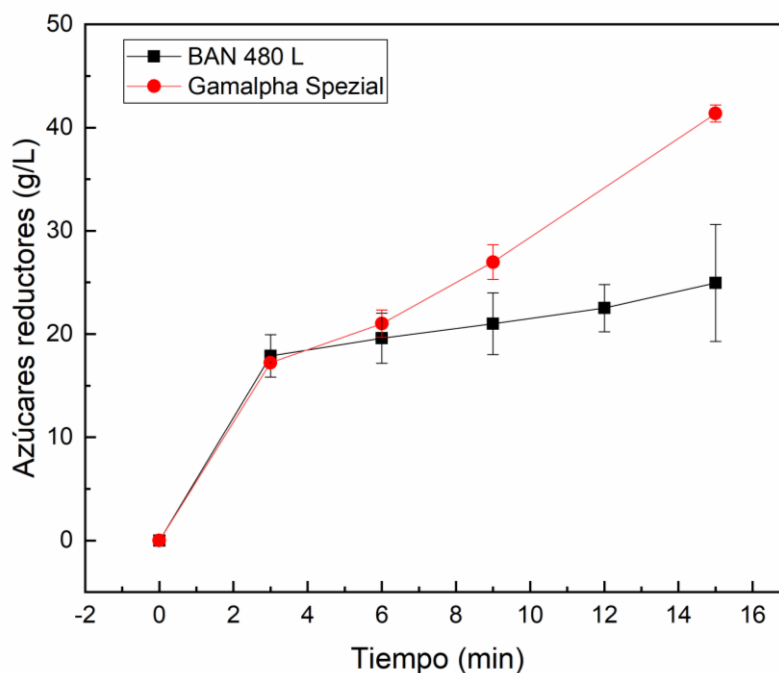
## 3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Cuantificación de azúcares reductores

Los resultados de la cuantificación de azúcares reductores por el método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de la etapa de licuefacción se presentan en la Figura 1.

La determinación de azúcares reductores mediante el método DNS permitió evaluar la eficiencia de la hidrólisis enzimática por cada enzima utilizada. La enzima que obtuvo el mayor rendimiento de hidrólisis fue Gamalpha Spezial con un valor promedio de 41,4 g/L de azúcares y la que obtuvo el menor valor fue la enzima BAN 480L con un valor promedio de 25 g/L.

Figura 1: Resultados de azúcares reductores de etapa de licuefacción



Se observa que la enzima BAN 480L libera una concentración promedio máxima de 24 g/L de azúcares reductores la cual es menor a la obtenida por la enzima Gamalpa Spezial (41,37 g/L). Al observar la cinética de liberación de azúcares reductores, se aprecia que la enzima BAN 480L presenta una curva que se estabiliza tempranamente. En cambio, la enzima Gamalpa Spezial muestra una hidrólisis progresiva con pendiente creciente a partir del minuto 3, lo que indica una acción sostenida y posiblemente más estable. Aunque las actividades enzimáticas declaradas no son directamente comparables por expresarse en unidades diferentes (KNU vs. TAU), la mayor actividad reportada de Gamalpa Spezial podría explicar su mayor rendimiento acumulado. Esta diferencia también puede deberse a una mejor adaptación de Gamalpa a la estructura del almidón de semilla de mango, lo que refuerza su potencial para procesos con esta matriz específica.

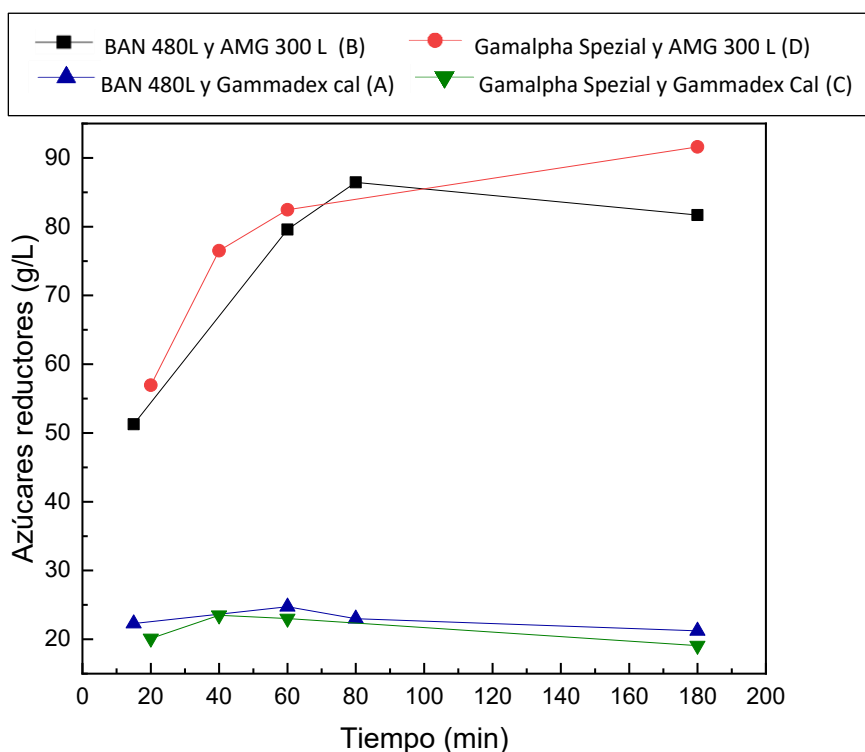
Los resultados obtenidos con BAN 480L son consistentes con los datos reportados por Larrea et al. (2020) la utilizaron para la hidrólisis de almidones extraídos de camote, yuca y papa, logrando valores entre 60 y 62 g/L de azúcares reductores en 3 horas a 80 °C, lo cual respalda su alto potencial hidrolítico, también reflejado en el presente estudio, donde alcanzó 41,4 g/L en solo 15 minutos.

Además del rendimiento técnico, se debe considerar el costo relativo de las enzimas utilizadas. En este estudio, se estimó que la enzima BAN 480L puede ser hasta 2 veces más costosa que Gamalpa Spezial por litro. Esta diferencia refuerza la elección de Gamalpa Spezial como una opción no solo eficiente en términos de liberación de azúcares reductores, sino también económicamente favorable para procesos de hidrólisis en matrices como el almidón de semilla de mango.

### 3.2 Cuantificación de glucosa

Los resultados de la cuantificación de glucosa por HPLC de la etapa de sacarificación se presentan en la Figura 2.

Figura 2. Resultados de glucosa de etapa sacarificación.



Se observa que AMG 300L obtuvo la mayor eficiencia en la conversión de almidón a glucosa, alcanzando hasta 91,60 g/L en la combinación con BAN 480L (B) y 82,45 g/L en combinación con Gamalpha Spezial (D), ambas evaluadas a los 180 minutos de reacción. En contraste, Gammadex Cal presentó un rendimiento notablemente inferior, con un valor máximo de 19,08 g/L en el mismo periodo. Esta diferencia sugiere una mayor capacidad hidrolítica de AMG 300L sobre los productos de licuefacción generados, así como una mejor estabilidad o adaptación a las condiciones operacionales empleadas.

Los valores de conversión de almidón a glucosa obtenidos tras 180 minutos de reacción reflejan diferencias claras en la eficiencia de las glucoamilasas evaluadas. La combinación D (Gamalpha Spezial + AMG 300L) logró el mayor grado de conversión (82,52 %), seguida por la combinación B (BAN 480L + AMG 300L) con 73,60 %, mientras que las combinaciones que incluyeron Gammadex Cal (A y C) mostraron valores considerablemente menores (19,13 % y 17,19 %, respectivamente). Cabe destacar que todas las enzimas fueron utilizadas bajo las mismas condiciones operativas y con la misma concentración (5 mL/kg de almidón), lo que permite atribuir las diferencias observadas a la eficiencia catalítica intrínseca de cada enzima y a su capacidad de actuar sobre los productos generados en la etapa de licuefacción. Estos resultados evidencian que AMG 300L presenta una mayor actividad efectiva bajo las condiciones empleadas, lo que la posiciona como una glucoamilasa más adecuada para maximizar la conversión de almidón de semilla de mango en glucosa fermentable.

En el estudio realizado por Hudečková et al. (2017), se evaluó la hidrólisis enzimática de pan de desecho utilizando la alfa-amilasa BAN 240L y la glucoamilasa AMG 300L, bajo condiciones de pH 4,2 y 60 °C para la glucoamilasa. Se reportó una concentración final de 71,7 g/L de glucosa tras una hora de reacción. Este valor es comparable a los obtenidos en el presente estudio, donde se emplearon condiciones similares de pH y temperatura. Estos



antecedentes coinciden con los resultados aquí obtenidos y respaldan el uso de AMG 300L como una glucoamilasa viable en procesos de conversión de almidón a azúcares fermentables.

## 4 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que la hidrólisis enzimática del almidón de semilla de mango puede realizarse mediante el uso combinado de enzimas comerciales. En la etapa de licuefacción, la enzima Gamalpha Spezial permitió obtener una concentración promedio de 41,37 g/L de azúcares reductores en 15 minutos, mientras que en la etapa de sacarificación, el uso de AMG 300L permitió alcanzar una concentración de 91,6 g/L de glucosa tras 180 minutos de reacción.

Entre las combinaciones evaluadas, la conformada por Gamalpha Spezial y AMG 300L (combinación D) mostró el mayor grado de conversión del almidón a glucosa (82,5 %) bajo las condiciones del estudio. Estos resultados permiten considerar al almidón de semilla de mango como una materia prima con potencial para ser utilizada en bioprocesos que empleen hidrólisis enzimática, contribuyendo así al estudio de alternativas de valorización de residuos agroindustriales.

## 5 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CAPES (Proceso n.º 88881.997795/2024-01) por el apoyo financiero y el otorgamiento de la beca de investigación. También agradecen al Centro Universitario FEI por el apoyo institucional y la infraestructura proporcionada para la realización de los ensayos experimentales.

## 6 REFERENCIAS

- HUDEČKOVÁ H, ŠUPINOVÁ P, BABÁK L. Optimization of enzymatic hydrolysis of waste bread before fermentation. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, v. 65, n. 1, p. 35–40, 2017.
- FAO. (2025). *Mangos, guayabas y mangostanes*. Cultivos y Producción FAO. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- LARREA FA, SALAZAR S, ANDINO C, ONA D, BENALCAZAR M, MORA J, PUNIA BANGAR S, KUMAR M, WHITESIDE WS. Mango seed starch: A sustainable and eco-friendly alternative to increasing industrial requirements. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 183, p. 1807–1817, 2021.
- ROJAS, M. J., AMARAL-FONSECA, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., DE LIMA CAMARGO GIORDANO, R., & TARDIOLI, P. W. Recovery of starch from cassava bagasse for cyclodextrin production by sequential treatment with  $\alpha$ -amylase and cyclodextrin glycosyltransferase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.22.
- WANG S, COPELAND L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 55, n. 8, p. 1081–1097, 2015.
- WOOD IP, ELLISTON A, RYDEN P, BANCROFT I, ROBERTS IN, WALDRON KW. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass Bioenergy*, v. 44, p. 117–121, 2012.
- ZHAO Y, LIU X, LI J. Synergistic effects of multiple enzymes from industrial *Aspergillus niger* on starch saccharification. *Biotechnol. Biofuels*, v. 14, p. 74, 2021.