



UNIVERSIDAD
DE PIURA

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Determinación y reducción del contenido de asparagina en
jugo de caña de azúcar con métodos enzimáticos**

Tesis para optar el Título de
Ingeniero Industrial y de Sistemas

Laura del Carmen Delgado Calderón

Asesor:
Dr. Ing. Gastón Eduardo Cruz Alcedo

Piura, julio de 2022





A Dios, mis padres y hermana.



Agradecimientos

A la Universidad de Piura y en especial al Laboratorio de Química, en cuyas instalaciones se pudo realizar los análisis y ensayos, entre enero y agosto del año 2021, a pesar de las restricciones de ingreso debido a la pandemia Covid-19.

Al Proyecto "Panela: Agroindustria Rural Innovadora y Competitiva", ejecutado por la Universidad de Piura en alianza con la Cooperativa Agraria Norandino, la ONG Progreso y el CITEagroPiura, en el marco del Programa SeCompetitivo, financiado por la Cooperación Suiza SECO. Gracias a este proyecto se pudo financiar el análisis de acrilamida en un laboratorio alemán, además de brindar apoyo para llevar a cabo los ensayos en los módulos de producción de panela en la sierra.

A la Cooperativa Agraria Norandino, en especial a sus directivos Fernando Reyes, Yeny Robledo, James Berrú, Sayby Berrú y sus técnicos de campo, por haberme acogido como practicante durante tres meses y haber facilitado las enzimas Acrylaway y los kits enzimáticos para asparagina y azúcares reductores para los análisis.

En especial a los miembros del equipo del Estudio Conjunto Norandino-UDEP-*Bioversity* para la mitigación de acrilamida en panela, quienes me abrieron las puertas en todo momento y me guiaron y motivaron para planificar los análisis y pruebas enzimáticas.

A la Dra. Rachel Atkinson, líder del equipo, así como al Ing. Fredy Yovera (*Bioversity International*), a los profesionales de Norandino antes mencionados, a mi asesor Dr. Gastón Cruz Alcedo (UDEP), al Ing. Roberto Portocarrero, ingeniero de campo del Proyecto Panela UDEP y los demás profesionales de dicho proyecto que apoyaron en la logística y difusión de los resultados parciales.

Al Programa de Desarrollo de Cooperativas - CDP (*Cooperative Development Program*) de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional – USAID, gestionada por *Equal Exchange* y administrado por Cooperativa Agraria Norandino Ltda, a su gerenta de programa Julia Baumgartner, su coordinadora Regional Paola Coronado y a José Fernando Reyes coordinador del proyecto.



Resumen

La acrilamida se forma en algunos alimentos elaborados que contienen el aminoácido asparagina, que al someterse a altas temperaturas reacciona en presencia de azúcares reductores por medio de la reacción de Maillard. Esta reacción es responsable del aroma, color, textura y sabor del producto final.

La investigación tiene como objetivo principal cuantificar la concentración de asparagina en el jugo de caña de azúcar destinado a la elaboración de panela granulada de la Cooperativa Agraria Norandino, mediante un método enzimático rápido y disponible en el mercado, y posteriormente reducir el contenido de asparagina por medio de la adición controlada de la enzima asparaginasa.

La metodología usada para el desarrollo de la investigación incluye el uso de un kit enzimático (K-ASNAM, Megazyme Ltd.) para la cuantificación de asparagina en muestras de jugo de caña proveniente de diversos módulos productivos de Norandino, para luego relacionar los resultados con el contenido de acrilamida en el producto final, la panela granulada. Además, se evalúa el uso de una enzima industrial (Acrylaway, Novozymes A/S) que contiene asparaginasa, la cual es capaz de reducir el contenido de asparagina, con el fin de encontrar los parámetros adecuados para su aplicación en el proceso de elaboración de la panela granulada.



Tabla de contenido

Introducción	15
Capítulo 1	17
Marco teórico	17
1.1. Antecedentes de la investigación	17
1.2. Producción y exportación de panela granulada	18
1.2.1. Producción de panela granulada en Perú	18
1.2.2. Exportación de panela	18
1.3. Aspectos de la materia prima: caña panelera	20
1.3.1. Composición del jugo de caña de azúcar	20
1.3.2. Factores que afectan la composición del jugo de caña	20
1.3.3. Cultivo de caña panelera en Perú	21
1.4. Proceso de elaboración de panela granulada	23
1.4.1. Molienda o extracción del jugo	23
1.4.2. Pre-limpieza	23
1.4.3. Clarificación	23
1.4.4. Concentración	23
1.4.5. Punteo	24
1.4.6. Tamizado	24
1.5. Acrilamida	24
1.5.1. Formación de acrilamida en alimentos	24
1.5.2. Dificultades en la cuantificación de acrilamida	25
1.5.3. Contenido de acrilamida en panela	25
1.6. Asparagina: agente precursor de la acrilamida en panela	26

1.6.1. Métodos de cuantificación de asparagina.....	26
1.6.2. Métodos enzimáticos de reducción de asparagina	27
1.6.4. Métodos enzimáticos para reducir el contenido de acrilamida en panela	27
Capítulo 2	29
Marco metodológico	29
2.1. Métodos de ensayo	29
2.2. Evaluación del método enzimático para cuantificar asparagina	31
2.3. Cuantificación de asparagina	31
2.4. Cuantificación de asparagina en relación con los días post cosecha	31
2.5. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en laboratorio.....	32
2.5.1. Aplicación según la dosis recomendada por el fabricante	32
2.5.2. Aplicación con variación en la dosis de Acrylaway	33
2.6. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en módulos productivos....	33
2.6.1. Aplicación según la dosis recomendada por el fabricante	33
2.6.2. Aplicación con variación en la dosis recomendada	34
Capítulo 3	35
Resultados y discusión	35
3.1. Evaluación del método enzimático para cuantificar asparagina.....	35
3.2. Cuantificación de asparagina	36
3.3. Cuantificación de asparagina según días post cosecha	43
3.4. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en laboratorio.....	46
3.5. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en módulos productivos...	55
Conclusiones.....	65
Recomendaciones	67
Referencias bibliográficas	69
Apéndices	73
Apéndice A. Evidencia fotográfica de la realización de la tesis	75
Anexo	79
Anexo A. Formato manual de procedimiento del kit K-ASNAM	81
Anexo B. Cálculo de resultados del formato manual del kit K-ASNAM	82

Lista de tablas

Tabla 1. Composición química del jugo de caña de azúcar	20
Tabla 2. Productos de la empresa Novozymes para la reducción de acrilamida	28
Tabla 3. Contenido del kit K-ASNAM	30
Tabla 4. Materiales, instrumentos y equipos requeridos para el procedimiento del kit K-ASNAM	30
Tabla 5. Resultados obtenidos en la evaluación del método enzimático	35
Tabla 6. Resultados de evaluación del método enzimático con diferentes concentraciones de asparagina	36
Tabla 7. Resultados obtenidos en los ensayos de cuantificación de asparagina	38
Tabla 8. Medianas del contenido de asparagina según módulo de procedencia	41
Tabla 9. Resultados de acrilamida en panela, y de asparagina en sus correspondientes jugos analizados por método enzimático.....	42
Tabla 10. Cantidades almacenadas de jugo de caña para primer ensayo post cosecha.....	44
Tabla 11. Resultados de primer análisis según el tiempo post cosecha.....	44
Tabla 12. Cantidades almacenadas de jugo de caña para el segundo ensayo post cosecha ..	45
Tabla 13. Resultados de segundo análisis según el tiempo post cosecha.....	45
Tabla 14. Parámetros controlados en el primer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la dosis recomendada por el fabricante.....	47
Tabla 15. Resultados obtenidos en el primer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante.....	48
Tabla 16. Parámetros controlados en el segundo ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante	51
Tabla 17. Resultados obtenidos en el segundo ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante	51
Tabla 18. Resultados obtenidos en el tercer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la dosis recomendada por el fabricante	53
Tabla 19. Parámetros controlados en el ensayo de aplicación de enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada por el fabricante.....	54
Tabla 20. Resultados obtenidos en el ensayo de aplicación de enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada por el fabricante	54

Tabla 21. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Cuñala con la dosis recomendada por el fabricante	56
Tabla 22. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Taylin con la cantidad recomendada por el fabricante	58
Tabla 23. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo La Peña con la cantidad recomendada por el fabricante	60
Tabla 24. Resultados de acrilamida a partir de jugo de caña de muestras analizadas por método enzimático con tratamiento de Acrylaway	61
Tabla 25. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Aroma Monterina con variación en la dosis recomendada por el fabricante	63



Lista de figuras

Figura 1. Correlación entre la concentración real y medida de asparagina (g/L).....	36
Figura 2. Formato de codificación de muestras provenientes de diversos módulos	37
Figura 3. Contenido de asparagina en el jugo según el módulo de procedencia (g/L)	41
Figura 4. Gráfica de dispersión entre las variables asparagina y acrilamida según módulo de procedencia.....	43
Figura 5. Contenido de asparagina según los días post- cosecha en el primer ensayo	44
Figura 6. Contenido de asparagina según los días post- cosecha en el segundo ensayo.....	46
Figura 7. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 60 °C	49
Figura 8. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 80 °C	49
Figura 9. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 30 °C	50
Figura 10. Resultado comparativo del tratamiento con Acrylaway en jugo de caña de pH 7 en términos de porcentaje	50
Figura 11. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 20 °C, 30 °C y 40 °C.....	52
Figura 12. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway L High T a 80 °C.....	53
Figura 13. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada	55
Figura 14. Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Cuñala.....	58
Figura 15 Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Taylin	59
Figura 16. Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo La Peña	61
Figura 17. Gráfica de dispersión entre las variables asparagina y acrilamida con tratamiento de Acrylaway en módulos.....	62
Figura 18. Resultados de aplicación de diferentes dosis de enzima Acrylaway en el módulo Aroma Monterina	64



Introducción

La panela granulada es un azúcar no centrifugado derivado de la caña, también llamada azúcar integral, producido por pequeños agricultores asociados de la sierra de Piura y de otros departamentos del Perú, y que actualmente se exporta a varios países con certificación orgánica y de comercio justo, a través de cooperativas, como Norandino y CAES (Cooperativas Sin Fronteras - Desarrollo, Crecimiento e Integración Agrícola, 2020), siendo Norandino el mayor exportador de panela en el 2016 con el 88 % del total exportado a Italia, Francia y Canadá como destinos principales. La demanda está creciendo, las exportaciones alcanzaron las 1600 t/año en el 2019, mientras que en el año 2016 fueron de 1400 t/año a pesar de los problemas de producción por el cambio climático según el Ing. Santiago Paz López, gerente comercial de la Cooperativa Agraria Norandino (Carrasco, 2020).

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), con fundamentos en evaluaciones del riesgo de acrilamida en alimentos realizados por el Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), menciona que hay evidencia suficiente para considerar la acrilamida como un “carcinógeno humano probable” (Higiene ambiental, 2019). Por lo que existe la posibilidad de no permitir el ingreso de alimentos con un alto contenido de acrilamida a países europeos, afectando de manera significativa a las cooperativas y productores de panela, debido a que la acrilamida está presente en el producto final.

La acrilamida es una sustancia que se forma durante el procesamiento térmico de los alimentos, y es uno de los productos de la reacción de Maillard; y en el caso de la panela, se presenta porque el jugo de caña de azúcar se somete a temperaturas de alrededor de 120 °C (Mottram, Wedzicha, & Dodson, 2002). En la reacción de formación de la acrilamida intervienen sustancias presentes naturalmente en el jugo de caña: el aminoácido asparagina, que reacciona con algunos azúcares reductores (particularmente glucosa y fructosa) a dichas temperaturas (Stadler, y otros, 2002).

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad cuantificar el contenido del aminoácido asparagina en jugo de caña de azúcar procedente de diversos módulos de procesamiento de panela granulada de la Cooperativa Agraria Norandino, mediante el uso del

kit de ensayo K-ASNAM de la marca Megazyme, basado en el uso de enzimas recombinantes avanzadas, el cual es rápido, simple y accesible.

Al conocer el contenido de asparagina en diversas muestras de jugo de caña, este podría relacionarse con el nivel de acrilamida de la panela y algunos factores de cultivo y de procesamiento, con lo cual se podrían plantear estrategias para su reducción. Por ejemplo, adicionando asparaginasa al jugo de caña, la cual descompone la asparagina en ácido aspártico y amoníaco antes de que se dé lugar a la reacción de Maillard. Además, el método rápido K-ASNAM permitirá posteriormente verificar la eficacia de un tratamiento enzimático al jugo de caña en el proceso, cuantificando nuevamente el contenido de asparagina presente.

En setiembre del 2019, inició el proyecto “Panela: agroindustria rural innovadora y competitiva”, en el marco del Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza- SECO, implementado por la Universidad de Piura asociada con la Cooperativa Agraria Norandino, la ONG Progreso, el CITEagroPiura y Helvetas Perú, como facilitador nacional, teniendo como objetivo aumentar la competitividad de la panela producida por pequeños campesinos pertenecientes a las regiones altoandinas del norte del país en el mercado internacional.

El objetivo general de este trabajo de investigación es cuantificar el contenido de asparagina en el jugo de caña de azúcar destinado a la elaboración de panela granulada de la Cooperativa Agraria Norandino, mediante un método enzimático rápido y disponible en el mercado, y posteriormente reducir su contenido por medio de la adición controlada de la enzima asparaginasa. Mientras que los objetivos específicos son los siguientes:

- Evaluar el método enzimático del kit K-ASNAM (Megazyme Ltd.) que mide tanto la asparagina como el amoníaco y la glutamina, el cual está basado en el uso de enzimas recombinantes avanzadas.
- Determinar el contenido de asparagina en diferentes muestras de jugo de caña de azúcar, procedentes de diversos módulos de procesamiento de panela granulada, y algunos ensayos de producción en el marco del estudio.
- Determinar si existe relación entre el contenido de asparagina y acrilamida presentes en la caña de azúcar y la panela granulada respectivamente.
- Determinar si existe relación entre los días post cosecha de la caña de azúcar y el contenido de asparagina.
- Evaluar la utilización de la enzima asparaginasa para reducir el contenido de asparagina en el jugo de caña panelera.
- Determinar las mejores condiciones de aplicación de la enzima asparaginasa para la reducción de asparagina en jugo de caña, procurando determinar la mínima cantidad necesaria de enzima.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Antecedentes de la investigación

En la composición del jugo de caña se tiene que el contenido de asparagina libre, uno de los precursores de la acrilamida en la reacción de Maillard, es de 0,71 %, pudiéndose expresar además como el 46 % del contenido total de aminoácidos libres presentes en la caña de azúcar según un estudio realizado por Matsui y Kitagawa (1987). Se ha reportado también una relación entre el contenido de asparagina en caña de azúcar, y el tipo y cantidad de nitrógeno como nutriente de la planta (Robinson, Vinall, Schmidt, & Lakshmanan, 2019). Al ser la panela granulada un producto con certificación orgánica, no se utilizan fertilizantes sintéticos en el cultivo de caña; ocasionalmente se ha utilizado guano de isla.

Los niveles de acrilamida en diversos productos alimenticios y recomendaciones para su reducción están plasmados en el Reglamento Europeo 2017/2158, que aún no menciona a la panela granulada. La determinación de acrilamida suele llevarse a cabo en laboratorios europeos por medio de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS o LC/MS/MS), pero se debe tener en cuenta la compatibilidad de los métodos en los diversos países, ya que, según resultados del seguimiento de nivel de acrilamida de un informe de la EFSA, se identificó que hay todavía mucha incertidumbre de medición significativa entre los resultados presentados por miembros de la Unión Europea (FoodDrink Europe, 2019).

En la tesis de la Universidad de Piura “Evaluación del contenido acrilamida durante el procesamiento de panela granulada y propuesta de reducción” de la ingeniera M. Alejandra Santín Sánchez (2018), recomienda realizar estudios que registren los niveles de azúcares reductores y asparagina presentes en el jugo de caña. Mientras que en la tesis de la Universidad Nacional de Piura “Cuantificación de acrilamida y humedad de panela granulada por los factores de almacenamiento de caña, regulador del jugo y temperatura de salida” sustentada por los ingenieros Dicther Rimaicuna Zurita y Anhy Liviapoma Correa (2019), se cuantificó la asparagina presente por el método HPLC obteniendo valores que van desde 40 a 7475 µg/kg, con muestras de jugo de caña analizadas en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El amplio rango de resultados se debe a la diferencia entre los tratamientos utilizados para la elaboración de cada muestra.

1.2. Producción y exportación de panela granulada

La panela se obtiene a partir del jugo de caña de azúcar, y esta puede venderse en forma de bloques o granulada. La principal diferencia entre la panela y el azúcar es que durante su producción no pasa por un proceso de centrifugación ni de refinado; es decir, que no se separa el azúcar de la melaza como ocurre en el azúcar industrial, otorgándole así el color marrón característico y una composición distinta de micro y oligoelementos. Sin embargo, también hay algunas opiniones como la de la Dra. Elena Aguilar, del Colegio Profesional de Dietistas-Nutricionistas de Madrid, que no encuentran diferencias nutricionales significativas entre los azúcares convencionales y la panela, por ello plantean que se trataría de un producto sustituto (ABC Bienestar, 2019).

1.2.1. Producción de panela granulada en Perú

Según datos obtenidos por la empresa Agrodato Perú, en julio del 2016 el 88 % del total de las exportaciones de panela correspondieron a la Cooperativa Agraria Norandino conformada por 600 productores asociados distribuidos en las regiones de Piura y Cajamarca, seguido por la Cooperativa Agraria Ecológica y Solidaria Piura (CAES Piura) con un 3 %, cuyos asociados se encuentran principalmente en la provincia de Ayabaca en Piura (Cooperativa Sin Fronteras, 2017).

Actualmente, la demanda de panela peruana es mayor que su oferta por la calidad del producto y por ese motivo el Ing. Santiago Paz López, gerente comercial de la Cooperativa Agraria Norandino, destacó que el Perú tendría que incrementar el volumen de producción en 10 veces para satisfacer la demanda actual, de lo contrario, se correría el riesgo de perder buenos clientes, enfatizando la necesidad de políticas de inversión agresivas por parte del estado en instalaciones de hectáreas de cultivo y plantas de producción. Adicionalmente, el Dr. Ing. Gastón Cruz, especialista de la Universidad de Piura, recalca que para muchos productores la exportación de panela granulada se ha convertido en una gran fuente de ingresos y en una oportunidad para reducir los niveles de pobreza en las zonas rurales, donde el cultivo de caña de azúcar es habitual (Agencia Agraria de Noticias Agraria.pe, 2018).

1.2.2. Exportación de panela

En 2017 se exportaron 1700 toneladas de panela, lo que representó un incremento de 21,4 % respecto a las 1400 toneladas despachadas en el 2016, a pesar de los problemas de producción por el cambio climático, llegando a tener un valor de US\$ 1500 por tonelada. Esta tendencia se ha dado gracias a la instalación de nuevos módulos y la asociación con más productores, siendo Italia el país de destino principal de exportación con un 80 %, seguido por Francia y Canadá (Agencia Agraria de Noticias Agraria.pe, 2018).

En setiembre del 2019, inició el proyecto “Panela: agroindustria rural innovadora y competitiva”, en el marco del Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza- SECO, implementado por la Universidad de Piura asociada con la Cooperativa Agraria Norandino, la

ONG Progreso, el CITEagroPiura y Helvetas Perú, como facilitador nacional, teniendo como objetivo aumentar la competitividad de la panela producida por pequeños campesinos pertenecientes a las regiones altoandinas del norte del país en el mercado internacional.

Durante los primeros meses del año 2020 el Covid-19 generó incertidumbre en el mercado internacional y, sobre todo, en la industria panelera; no obstante, el panorama se tornó positivo, esto a consecuencia de que la previsión de 1400 toneladas exportadas se incrementó en un 50 % el final del año según información publicada por la Universidad de Piura (Mercados & Regiones, 2020). El volumen exportado en el año 2020 representa el 97 % de la producción de la Cooperativa Agraria Norandino, cuyos principales mercados fueron Italia y Francia (Agencia Agraria de Noticias Agraria.pe, 2020).

Los requisitos de calidad que debe cumplir la panela granulada se encuentran establecidos en la Norma Técnica Peruana NTP 207.200.2013 Panela Granulada. Definiciones y requisitos. (Instituto Nacional de Calidad, 2013), dentro del cual se tienen como requisitos generales, y rangos de valores para el contenido de azúcares totales, azúcares reductores, humedad, entre otros:

- El color puede variar desde el amarillo claro hasta el marrón.
- Debe estar libre de olores y sabores extraños.
- Libre de materias extrañas, sin fermentar y sin presencia de hongos e insectos.
- No se permite el uso de colorantes naturales y artificiales en su elaboración.
- La humedad máxima permitida es de 4 % m/m.
- La cantidad máxima permitida de azúcares totales es de 93 % m/m.
- La cantidad mínima permitida de azúcares reductores es de 5 % m/m.

Para asegurar el cumplimiento de los requisitos mencionados anteriormente, se deberá tomar una muestra de cada lote procesado antes del envasado y rotulado, y en caso esta no cumpliera con uno o más de los requisitos, se rechazará el lote.

En Europa, se han realizado estudios sobre el nivel de acrilamida en alimentos por ser un “carcinógeno humano probable”, obteniendo como resultado una recopilación de niveles de acrilamida máximos permitidos de diversos productos alimenticios y recomendaciones para su reducción, los cuales están plasmados en el Reglamento Europeo 2017/2158 (FoodDrink Europe, 2019). La panela granulada no ha sido uno de los productos analizados en el estudio.

El nivel de acrilamida en la panela no está mencionado en la Normativa Técnica Peruana, ni en el Reglamento Europeo. Sin embargo, la Cooperativa Agraria Norandino ha planteado un límite de 800 µg/kg, empezando a analizar el contenido de acrilamida de los lotes exportados.

1.3. Aspectos de la materia prima: caña panelera

1.3.1. Composición del jugo de caña de azúcar

El jugo de caña de azúcar es la materia prima principal en la elaboración de panela granulada, y está compuesta por azúcares, sales, ácidos orgánicos y aminoácidos principalmente según lo que se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición química del jugo de caña de azúcar

Componentes	Cantidad (% en masa)
Azúcares	
Sacarosa	70-88
Glucosa	2-4
Fructosa	2-4
Sales	
Inorgánicas	3-3,4
Orgánicas	1,5-4,5
Ácidos orgánicos	1-3
Aminoácidos	1,5-5,5
Otros no azúcares	
Proteína	0,5-0,6
Almidones	0,001-0,05
Gomas	0,3-0,6
Ceras, grasas, etc.	0,15-0,5
Compuestos Fenólicos	0,1-0,8

Nota: tomado de Manual del azúcar de caña para fabricantes de azúcar de caña y químicos especializados (Chen, García, & Álvarez Medina, 1991)

1.3.2. Factores que afectan la composición del jugo de caña

La capacidad de la caña de azúcar para producir sacarosa, uno de los componentes principales del jugo de caña para la producción de panela, depende de las diversas variedades de planta, el cultivo y factores climáticos como la humedad, luminosidad y temperatura, que repercuten principalmente en el periodo de maduración de la caña de azúcar.

En este periodo de maduración se da la culminación del proceso fisiológico que conlleva a la máxima acumulación de sacarosa en la planta, por lo que, según la información recopilada por Jesús Larrahondo y Fernando Villegas (Control y características de maduración, 1995), existen algunos factores que afectan directamente al periodo mencionado anteriormente, los cuales se detallan a continuación.

1.3.2.1. Humedad. Cuando la planta está en desarrollo requiere de un suministro adecuado de agua para asimilar los nutrientes del suelo y realizar los procesos fisiológicos, pero cuando este desarrollo se retarda, disminuye la demanda de azúcares y estos terminan almacenados en los tallos. En vista de que una mayor cantidad de azúcar almacenado en los tallos favorece la calidad de los jugos, una de las prácticas es reducir el suministro de agua para favorecer esta concentración.

1.3.2.2. Temperatura. La temperatura afecta la absorción del agua y nutrientes por parte de la planta, limitando o acelerando su crecimiento y desarrollo, por lo que quizás es uno de los factores que más influyen en la maduración a pesar de que no se puede controlar. En los periodos secos, cuando la diferencia entre las temperaturas máxima y mínima oscilan entre 11 °C a 12 °C, se estimula el almacenamiento de sacarosa afectando directamente la calidad del jugo.

1.3.2.3. Luminosidad. La disminución en la intensidad de luz provoca una reducción en la elaboración y posterior almacenamiento de los azúcares en los tallos, y a su vez genera un aumento en la acumulación de almidones en las hojas. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de Costa Rica (2007), la caña requiere de 1500 a 2500 horas luz al año.

1.3.2.4. Altitud. Según el MAG de Costa Rica, el crecimiento de la caña es más lento en las zonas altas, pero el porcentaje de sacarosa contenida en la caña es mayor.

1.3.2.5. Nutrientes. Estos son aplicados al suelo por medio de los fertilizantes y es esencial la presencia de algunos en específico para el desarrollo de la caña de azúcar. Entre estos tenemos al nitrógeno, esencial durante la etapa inicial (entre 2 y 6 meses), para poder luego suspender el desarrollo vegetativo y favorecer la acumulación de sacarosa, teniendo cuidado de no caer en el exceso pues tendría un efecto negativo en la calidad del jugo.

Asimismo, otro nutriente clave es el fósforo, que repercute tanto en la maduración como en la etapa de clarificación en el procesamiento de panela, estimándose que la concentración mínima requerida en el jugo debe ser de 300 mg/L de P_2O_5 . A medida que aumenta el contenido de potasio y disminuye el de nitrógeno, la humedad y cantidad de los azúcares reductores bajan y se incrementa la sacarosa, mejorando así la calidad del jugo de caña.

Por otra parte, el suelo adecuado para la siembra de caña de azúcar es el franco arcilloso, con un buen drenado, profundo y con un pH de 5 a 6,5 (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2007).

1.3.3. Cultivo de caña panelera en Perú

En el Perú el cultivo de caña de azúcar es un sector que se ha ido desarrollando a través de los años, en el año 2019 se contaba con 160 mil hectáreas de cultivo de caña de azúcar distribuidos en los departamentos de Piura, Lambayeque, La Libertad, Ancash, Lima y Arequipa. Una de las ventajas principales del país es que se puede sembrar y cosechar durante

todos los meses del año, obteniendo cultivos que son utilizados para la producción de azúcar, alcohol y derivados como la panela (PERUCAÑA Asociación Peruana de Agroindustriales de Azúcar y Derivados, 2019).

El cultivo de caña de azúcar destinado a la producción de panela beneficia a más de 3000 familias de los valles interandinos del Perú, sin embargo, se tienen dos brechas tecnológicas: el rendimiento de caña por hectárea y las capacitaciones a los productores.

El rendimiento de caña de azúcar para la producción de panela en la selva y valles interandinos es de 50 t/ha cuando el óptimo es de 150 t/ha, mientras que el rendimiento de panela por productor es en promedio de 5 t/ha debido a que el tiempo de cosecha es de aproximadamente 2 años, cuando el potencial de rendimiento puede llegar a ser de 17 t/ha (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2017). Actualmente se brindan capacitaciones a 1000 de los 3000 productores, lo cual afecta directamente el rendimiento del cultivo, pues este mejoraría si se tuvieran capacitaciones adecuadas sobre el sistema de siembra, control, riego y fertilización; sin embargo, los rendimientos son altos en comparación con otros países por las condiciones de suelo y clima que son favorables.

Para mejorar la situación en el sector se han creado instituciones como el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) tiene el objetivo de generar y adoptar tecnologías agropecuarias para poder transferirlas a los pequeños y medianos productores del país, para lo cual tiene alianzas con instituciones públicas y privadas de manera nacional e internacional.

En Piura se encuentra la mayor cantidad de productores organizados en cooperativas como la Cooperativa Agraria Norandino o la Cooperativa Agraria Ecológica y Solidaria Piura (CAES Piura), a los cuales se les brinda asistencia técnica a través de proyectos, mejorando sus ingresos y la gestión de recursos para aumentar la producción.

El cultivo de caña panelera tiene tres problemas principales: la problemática varietal, la agronómica y las plagas y enfermedades.

La problemática varietal se refiere a que existe una falta de nuevas variedades de caña, debido principalmente a que el mejoramiento genético es un proceso muy largo y de mucha inversión, y las utilizadas actualmente presentan un bajo nivel de productividad y calidad, siendo solo tres la que ocupan el 80 % del área cultivada (H32-8560, PCG12-745 y RB72-454), es por eso que el INIA ha traído cañas híbridas desde México para realizar sus procesos de selección e investigación. La problemática agronómica es ocasionada por la carencia de tecnología en fertilización, riego y cosecha, además de diseñar el campo sin tener en cuenta el sistema de cosecha que será utilizado posteriormente. Adicionalmente, se cuenta con ausencia de métodos de diagnósticos rápidos para las diferentes plagas y enfermedades que afectan directamente al cultivo y su rendimiento (Instituto Nacional de Innovación Agraria, 2021).

1.4. Proceso de elaboración de panela granulada

1.4.1. Molienda o extracción del jugo

El jugo de caña se obtiene por extracción o molienda de la caña de azúcar con rendimientos entre el 50 % – 64 %; este amplio rango es debido a diversos factores como el deterioro de la caña, el ajuste de las masas del trapiche, entre otros. Dado que el contenido de sacarosa aumenta hasta llegar a su etapa de madurez, la caña de azúcar debe ser cortada en el momento adecuado y debe ser procesada inmediatamente para evitar la disminución de sacarosa.

El porcentaje de sacarosa en el jugo se encuentra entre el 17 % – 20 %, mientras que el remanente en el bagazo, residuo obtenido de la extracción, es aproximadamente del 12 %. Este bagazo fresco pierde su humedad naturalmente al ser secado a la intemperie para posteriormente ser usado como combustible en el proceso de evaporación para la concentración del jugo de caña (Santín Sánchez, 2018).

1.4.2. Pre-limpieza

El jugo de caña se somete a una limpieza por medios físicos y a temperatura ambiente con el propósito de separar las impurezas dispersas en el jugo como los restos de bagazo, bagacillo de la caña, partículas de tierra, entre otros.

1.4.3. Clarificación

El jugo de caña es sometido a la clarificación con el fin de eliminar los sólidos en suspensión y sustancias coloidales presentes, empezando por el calentamiento de este hasta alcanzar temperaturas entre 80 °C y 82 °C. El jugo de caña contiene disueltos: azúcares reductores (fructosa y glucosa), sacarosa, sales, ácidos orgánicos y pectina, mientras que en suspensión contiene productos insolubles como fibra, bagacillo, arena, arcilla y materiales colorantes.

La clarificación se realiza mediante agentes floculantes, provenientes de la maceración de cortezas de árboles en Colombia, mientras que en Perú se utiliza un regulador de pH como el bicarbonato de sodio (Santín Sánchez, 2018), que, al ser adicionados al jugo, hace que los sólidos en suspensión e impurezas del jugo, formen un producto aglutinado llamado cachaza que permanece en la superficie, facilitándose su separación manual. El pH se regula para que permanezca en valores entre 6 y 7 para evitar la inversión de la sacarosa en azúcares reductores que está directamente relacionado con la calidad del producto final.

1.4.4. Concentración

Operación por la cual se eleva el contenido de azúcar en el jugo por medio de la evaporación para alcanzar valores cercanos a 70 °Brix, adquiriendo el nombre de mieles al alcanzar temperaturas entre 86 °C y 98 °C (Santín Sánchez, 2018). Esta operación afecta

directamente la textura final del producto ya que la presencia de un alto contenido de azúcares reductores en el jugo puede llegar a impedir la cristalización.

1.4.5. Punteo

Con el objetivo de obtener el “punto panela” alrededor de los 96 °Brix, que corresponde a una temperatura de 124 °C alcanzada por las mieles, estas son trasvasadas de la paila punteadora a un recipiente llamado bunque, donde se lleva a cabo un energético batido y enfriamiento, lo que permite la granulación de la panela.

1.4.6. Tamizado

Las partículas de panela pasan a ser separadas según los diferentes tamaños mediante un tamiz o cedazo, obteniéndose la panela granulada compuesta por granos finos, y separando el confitillo compuesto por granos que no lograron pasar el tamiz.

1.5. Acrilamida

La acrilamida es una sustancia química que se usa principalmente para hacer compuestos químicos llamados copolímeros de poliacrilamida o de acrilamida (Dearfield, Abernathy, Ottley, Brantner, & Hayes, 1988), pero también se encuentra en algunos alimentos procesados a alta temperatura (horneados, fritos y tostados). En los alimentos que contienen el aminoácido asparagina, al someterse a altas temperaturas en presencia de azúcares reductores (particularmente glucosa y fructosa), ocurre la reacción de Maillard, que es responsable del aroma, color, textura y sabor característicos del producto final (Mottram, Wedzicha, & Dodson, 2002), y se forma acrilamida. Algunos alimentos con alto contenido de acrilamida son, por ejemplo, las papas fritas, galletas, pan y café, no obstante, la concentración de esta depende de las condiciones de elaboración usadas por el fabricante, especialmente el tiempo, método y temperatura de cocción a la que están sometidos (Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Tornqvist, 2002).

1.5.1. Formación de acrilamida en alimentos

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), con fundamentos en evaluaciones del riesgo de acrilamida en alimentos realizados por el Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), menciona que hay evidencia suficiente para considerar la acrilamida como un “carcinógeno humano probable”, pese a que los datos epidemiológicos en humanos son limitados y no proporcionan evidencia suficiente para juzgar el riesgo real a diferencia de los resultados positivos a pruebas en animales de laboratorio, ya que no poseen el mismo índice de absorción de la acrilamida ni metabolizan de maneras similares (Fennel & Friedman, 2005).

En la industria alimentaria se han desarrollado documentos con orientaciones tanto técnicas como de pasos a seguir para poder ser aplicadas en diferentes procesos alimentarios con el fin de reducir los niveles de acrilamida, una de estas es “*Acrylamide Toolbox*”, la cual

fue elaborada por la asociación *FoodDrinkEurope*, siendo una de las más completas. En la quinceava edición “*Acrylamide Toolbox 2019*” se han recopilado orientaciones para la producción de *snacks* a base de papa, frituras, productos a base de cereales, de panadería fina, cereales para el desayuno, café y alimentos para bebés (Unión Europea, 2019). A pesar de no contener información sobre el procesamiento de panela, podemos encontrar recomendaciones generales para disminuir el contenido de asparagina en los productos mencionados anteriormente, que se podrían aplicar a la panela.

1.5.2. Dificultades en la cuantificación de acrilamida

Muchos laboratorios pueden analizar la cantidad de acrilamida presente en los diversos productos alimenticios, pero se debe tener en cuenta la compatibilidad de los laboratorios de los diversos países, ya que, según resultados del seguimiento de nivel de acrilamida de un informe de la EFSA, se identificó que hay mucha incertidumbre de medición significativa entre los resultados presentados por miembros de la Unión Europea, por lo que se recomienda verificar la acreditación ISO 17025:2005 y los métodos de análisis validados antes de elegir trabajar con un laboratorio (Unión Europea, 2019).

En el Perú, todavía no hay laboratorios que realicen análisis de acrilamida en alimentos, por lo que en el marco del proyecto antes mencionado de la Universidad de Piura con Norandino y *Bioversity*, se recurrió a un laboratorio en Alemania para analizar diversas muestras de panela.

Posteriormente se mencionarán los métodos y técnicas que fueron utilizados para el análisis de muestras de panela provenientes de Norandino en el laboratorio de Alemania.

1.5.3. Contenido de acrilamida en panela

Sobre el contenido de acrilamida en la panela, Colombia es uno de los países que promueve el desarrollo de métodos de cuantificación, teniendo así investigaciones hechas por Vargas Lasso et al. (2014) afirmando que se detecta acrilamida en el jugo de caña a partir de la etapa de evaporación hasta el producto final, teniendo concentraciones de 800 µg/kg a 2200 µg/kg, siendo la temperatura uno de los parámetros físicos más importantes que inciden en su formación.

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) de Colombia (2018) realizó un control de contenido de acrilamida en alimentos procesados durante los años 2015 y 2016, dentro del cual se encontraba la panela, por ser el segundo país exportador de este producto en el mundo. Los resultados evidenciaron que la panela posee mayores niveles promedios de acrilamida con 524,4 µg/kg en 2015 y 617,7 µg/kg en 2016.

En investigaciones realizadas por Santín Sánchez (2018), se demostró que la clarificación es una etapa crítica en la formación de acrilamida cuando las temperaturas de clarificación son mayores a 90 °C y cuando los valores de pH en la concentración son altos. Adicionalmente, en investigaciones realizadas durante el año 2019 (Rimaicuna Zurita &

Liviapoma Correa) sobre el contenido de acrilamida en panela granulada procedente de diferentes módulos productivos de Piura, se obtuvo que el valor medio de acrilamida detectada (2726,63 µg/kg) en comparación con otros estudios, es superior a los niveles de referencia establecidos por la Unión Europea.

1.6. Asparagina: agente precursor de la acrilamida en panela

La asparagina es un aminoácido no esencial que es biosintetizado por la asparagina sintetasa a partir del ácido aspártico y el ion amonio. Se la puede encontrar en una gran variedad de alimentos, animales y plantas (EcuRed, 2012).

En la composición del jugo de caña, materia prima en la elaboración de panela, se tiene que el contenido de asparagina libre, uno de los reactivos en la reacción de Maillard, es de 0,71 %, pudiéndose expresar además como el 46 % del contenido total de aminoácidos libres presentes en la caña de azúcar según un estudio realizado por Matsui y Kitagawa (1987).

Por tal motivo se puede afirmar que durante el proceso productivo de la panela se dan las condiciones necesarias para favorecer la formación de acrilamida, al contener asparagina y azúcares reductores, además de ser sometido a altas temperaturas.

1.6.1. Métodos de cuantificación de asparagina

1.6.1.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla compleja para su posterior identificación y determinación, teniendo como principio los diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. La muestra es introducida en pequeñas cantidades y sus compuestos se separan al pasar a través de una fase estacionaria (sólida o líquida), transportados por una fase móvil (líquida), teniendo en cuenta que ambas fases son inmiscibles, dando comienzo a la elución de los solutos transportados por la fase móvil que, al pasar por la columna, adquirirán una velocidad diferente, logrando que salgan de esta por separado, y si al final de la columna se le coloca un detector, al gráfico resultante se denomina cromatograma. El tiempo que tarda el compuesto en salir de la columna se denomina “tiempo de retención” y se considera una propiedad identificativa en una determinada fase móvil y estacionaria. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo (López Ruiz, 2018).

A partir del cromatograma se puede llevar a cabo el análisis cualitativo (tiempo de retención) para averiguar qué compuestos están presentes en la muestra y cuantitativo (área del pico) para determinar la concentración.

1.6.1.2. Cromatografía líquida de Ultra-Alta eficacia (UHPLC). Técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla compleja para su posterior identificación y determinación, teniendo como principio el menor tamaño de partícula, que conlleva a una mayor eficiencia por las rápidas separaciones con mayor resolución y sensibilidad, para lo cual se necesita un equipo capaz de trabajar a alta contrapresión (Science Unfiltered, 2017).

1.6.2. Métodos enzimáticos de reducción de asparagina

Una de las formas propuestas para reducir el contenido de asparagina es añadir una enzima específica al alimento, antes de ser calentado. Esta es la asparaginasa, la cual es una enzima que hidroliza la asparagina en amonio y ácido aspártico, y la glutamina en ácido glutámico y amonio (Ballón Cossío, 2014).

La Organización Mundial de la Salud por medio de los Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) considera que la asparaginasa obtenida de *Aspergillus oryzae* no representa un peligro para la salud humana (Unión Europea, 2019).

Las empresas producen actualmente enzimas comerciales de grado alimenticio, y estas pueden sublicenciar los derechos a empresas de procesamiento de alimentos para poder ser incorporados en sus procesos de producción y así reducir la cantidad de acrilamida.

1.6.3. Métodos de cuantificación de Acrilamida

El método analítico para la cuantificación de acrilamida se basa en la técnica de espectrometría de masas (EM) acoplada a la cromatografía líquida (CL) o a la cromatografía de gases (CG), también conocido como LC-MS/MS (Elbashir, Ali Omar, Wan Ibrahim, Schmitz, & Aboul-Enein, 2014), el cual fue utilizado para realizar los análisis de cuantificación en las muestras de panela granulada provenientes de la Cooperativa Agraria Norandino en el laboratorio GBA Group en Alemania.

Para hacer uso de este método la muestra debe ser homogeneizada antes de tomar una muestra para su análisis debido a que la acrilamida es una molécula diminuta y extremadamente polar, por lo que su extracción y análisis son difíciles.

Este método LC-MS puede utilizarse como método alternativo o de confirmación del método de cromatografía líquida de alta resolución por espectrometría de masas (LC-HRMS) (U.S. Food & Drug administration, 2019) ya que combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular (cromatografía de líquidos) y la capacidad de detección selectiva confirmando la identidad molecular (espectrometría de masas). Su principio es un sistema LC, donde el punto en el que la fase móvil del líquido abandona la columna, la muestra líquida es reciclada para producir microgotas, las cuales se evaporan rápidamente, liberando moléculas de analito ionizadas que posteriormente pasan al MS (Analitek, 2016).

Hasta la fecha no existe ningún método de extracción de acrilamida plenamente aceptado en diversos alimentos, ya que las condiciones de extracción dependen del componente de cada alimento. (Nielsen, Granby, Hedegaard, & Skibsted, 2006).

1.6.4. Métodos enzimáticos para reducir el contenido de acrilamida en panela

Uno de los métodos propuestos por Norandino y sus clientes para evitar la formación de acrilamida en la panela es la adición de asparaginasa al jugo de caña durante el proceso de fabricación, antes del calentamiento, esperando que afecte mínimamente la calidad y

características del producto final. Es decir, la asparaginasa descompone la asparagina en ácido aspártico y amoníaco antes de que se dé lugar a la reacción de Maillard, y por tanto otros productos de la reacción no se verían afectados.

Sin embargo, al adicionar esta enzima se deben tener en cuenta varios factores para garantizar la eficiencia, pues si se agrega demasiado pronto una parte significativa de la misma se eliminaría junto con las corrientes de desechos de cada paso del proceso antes de que tenga la oportunidad de funcionar; si se agregara muy tarde, cantidades significativas de asparagina ya se habrán convertido en acrilamida y la asparaginasa sería ineficaz; y si se agregara muy cerca de un paso de alta temperatura en el proceso, no será eficaz para reducir la formación de acrilamida porque las altas temperaturas desnaturalizarán la asparaginasa.

La empresa Novozymes es una empresa que ofrece soluciones a problemas biológicos por medio de enzimas y microorganismos, dentro de su cartera de productos se encuentran algunos dedicados a la reducción de acrilamida, los cuales tienen por nombre “Acrylaway”, que contienen la enzima asparaginasa (Novozymes, 2022). Estas se pueden encontrar en sus versiones granuladas y líquidas como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Productos de la empresa Novozymes para la reducción de acrilamida

	Líquido Acrylaway® High TL	Líquido Acrylaway® L	Granulado Acrylaway®	Granulado Acrylaway® High T
Fácil de implementar	✓	✓	✓	✓
No hay cambios en el sabor, el olor, la sensación en la boca o la apariencia	✓	✓	✓	✓
Apto para productor sin gluten	✓	✓	✓	×
Eficaz a temperaturas más altas	✓	×	×	✓
Apto para galletas infantiles y biscotes	×	✓	✓	×
Adecuado para alimentos infantiles a base de cereales	×	✓	✓	×
Adecuado para la producción de cereales para el desayuno	✓	×	×	✓

Nota: Adaptado de productos Novozymes (Novozymes, 2022)

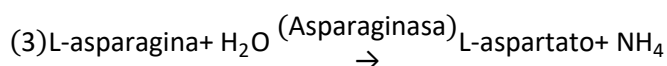
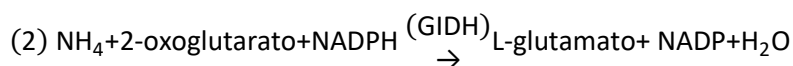
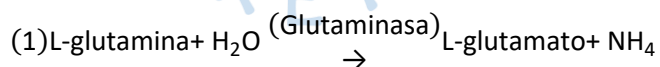
Capítulo 2

Marco metodológico

2.1. Métodos de ensayo

Para la determinación de asparagina en el jugo de caña panelera se ha optado por hacer uso del kit K-ASNAM de la empresa Megazyme. Este está basado en el uso de enzimas recombinantes avanzadas para medir el contenido de asparagina, amoníaco y glutamina para una amplia gama de muestras.

El principio de determinación del kit K-ASNAM se basa en tres pasos sencillos y rápidos: (1) La glutamina se convierte primero, mediante un gran exceso de glutaminasa, en glutamato y iones amonio (NH_4^+). (2) Luego, en presencia de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y glutamato deshidrogenasa (GIDH) reducidos, el amoníaco de la muestra, y también el formado por la reacción (1), reacciona con 2-oxoglutarato para formar glutamato y NADP^+ . La cantidad de NADP^+ formada es estequiométrica con la cantidad de amoníaco. Es el consumo de NADPH lo que se mide por la disminución de absorbancia a 340 nm. (3) En la reacción final, la asparagina se hidroliza rápidamente en aspartato y iones amonio por la asparaginasa. Los iones amonio liberados reaccionan de acuerdo con la reacción (2), conduciendo a una caída adicional en la absorbancia que es estequiométrica con la cantidad de asparagina presente (Megazyme, 2018).



Se hizo uso de un total de 12 kits K-ASNAM para realizar la cuantificación de asparagina, amoníaco y glutamina en las muestras de jugo de caña de azúcar. Cada kit contiene 8 botellas que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido del kit K-ASNAM

Botella 1	Tampón (11 mL, pH 4,9) más azida de sodio (0,02 % p/v) como conservante
Botella 2 (x2)	Tampón (25,5 mL, pH 8,0) más 2-oxoglutarato y azida de sodio (0,02 % p / v) como conservante
Botella 3 (X2)	NADPH. Polvo liofilizado (disolver el contenido de una de las botellas en 12 mL de agua destilada)
Botella 4	Suspensión de glutaminasa (1,1 mL)
Botella 5	Suspensión de glutamato deshidrogenasa (2,2 mL)
Botella 6	Suspensión de asparaginasa (1,1 mL).
Botella 7^a	Solución estándar de amoníaco (5 mL, 0,04 mg / mL) en azida de sodio al 0,02 %.
Botella 8^a	Estándar de control de L-asparagina en polvo (~ 2 g).

^a Solo se analizan cuando hay alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que la inhibición está causada por sustancias en la muestra.

Nota: Adaptado de (Megazyme, 2018)

Cada uno de los análisis realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del manual de procedimiento de ensayo del kit K-ASNAM, el cual se muestra en el Anexo A.

Debido a que el manual recomienda la clarificación de muestras para un correcto análisis en caso sean de un color oscuro, como en este caso lo es el jugo de caña, se hizo uso de filtros de jeringa de nylon (0,45 µm) y jeringas para la preparación de las muestras, las cuales fueron almacenadas en viales, bajo refrigeración.

Además, el material requerido para seguir el procedimiento se muestra en la **Tabla 4**, mientras que para la obtención de resultados se siguió el procedimiento de cálculos mostrado en el Anexo B .

Tabla 4. Materiales, instrumentos y equipos requeridos para el procedimiento del kit K-ASNAM

Material/Instrumento/Equipo	Descripción
Refrigerador (Electrolux, ERD262YEFS)	Para almacenar las muestras de jugo de caña filtradas y contenidas en viales, además del kit K-ASNAM.
Cubetas de plástico desechables	Que permiten paso de luz de 1 cm, con una capacidad máxima de 3,0 mL en donde se llevan a cabo las reacciones y que posteriormente son utilizadas para medir la absorbancia en el espectrofotómetro.
Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10 UV (ThermoSpectronic)	Ajustado a 340 nm para medir la absorbancia de las cubetas durante los ensayos a las distintas muestras de caña de azúcar

Material/Instrumento/Equipo	Descripción
Equipo de destilación	Cabezal de destilación, piedras de ebullición y un Erlenmeyer de 100 mL para recolectar el agua destilada.
Micropipetas	- De volumen fijo de 0,1 mL, modelo 3130 de marca Eppendorf. - Volumen regulable de 0,01-0,1 mL, modelo 4810 marca Eppendorf.
Pipetas graduadas	De 10 mL y 5 mL
Vasos de precipitado	De 50 mL y 100 mL para contener agua destilada y agua de enjuague.
Parafilm	Para cubrir las cubetas antes de agitarlas

2.2. Evaluación del método enzimático para cuantificar asparagina

Se realizó un análisis de cuantificación de asparagina, haciendo uso del kit K-ASNAM, a una muestra estándar obtenida de diluir el contenido de la botella 8 (asparagina en polvo) en agua destilada con el fin de evaluar el método enzimático y tener certeza en los próximos análisis de muestras de jugo. Para las diluciones, se hizo uso de matraces aforados (fiolas).

2.3. Cuantificación de asparagina

Las muestras provenientes de diferentes módulos productivos de la Cooperativa Agraria Norandino fueron recibidas congeladas, en colectores universales plásticos herméticos, los cuales fueron almacenados en un congelador (Coldex CH10) hasta su análisis.

El análisis de las muestras se realizó siguiendo las indicaciones brindadas por el fabricante en el manual. En general se analizó por duplicado cada una de las muestras, y en casos necesarios, en los que los resultados entre los duplicados de la misma muestra eran completamente diferentes, se realizaron verificaciones. Cabe mencionar que se realizaron un máximo de 40 verificaciones a lo largo del desarrollo de la investigación.

2.4. Cuantificación de asparagina en relación con los días post cosecha

Para la cuantificación de asparagina en relación con los días post cosecha se requirió de caña de azúcar recién cortada para extraer jugo de estas en los días consecutivos. Para lo cual, la caña de azúcar brindada por la Cooperativa Agraria Norandino fue guardada en su Planta de Panela en Piura bajo sombra y a temperatura ambiente.

Para evitar variaciones en el ensayo, la caña de azúcar fue separada desde el primer día en pequeños lotes que corresponderían a los días de extracción. Así mismo, para evitar la incertidumbre que se tiene por congelar las muestras de jugo, estos análisis de asparagina fueron realizados el mismo día en que se obtuvieron las muestras.

Los análisis fueron realizados según lo indicado en el manual de procedimiento, con réplicas para cada una de las muestras.

Para estas muestras, se extrajo el jugo en las instalaciones de la Cooperativa Agraria Norandino haciendo uso de un extractor eléctrico de jugo de caña (HENKEL SC002), tratando en lo posible de asemejar la extracción realizada en los módulos productivos.

2.5. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en laboratorio

Para realizar los tratamientos que buscan reducir el contenido de asparagina en el jugo de caña se hizo uso de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada (Novozymes A/S), que según el fabricante es capaz de reducir los niveles de acrilamida en un 50 % a 75 % en los cereales de desayuno y otros alimentos a base de granos procesados a altas temperaturas (hasta 90 °C) según la información del producto (Novozymes, 2022).

Adicionalmente, para evaluar la eficacia del producto en su versión líquida, se hizo un tratamiento con la enzima Acrylaway L High T, que reduce los niveles de acrilamida hasta en un 95 % (Novozymes, 2022).

Según Novozymes, ambos productos son factibles de implementar ya que funcionan en un amplio rango de pH, por lo que se requiere pocas modificaciones en el proceso. El fabricante informa que no se perciben diferencias en el sabor, olor, sensación en la boca o el aspecto del producto final, ya que solo tiene acción sobre la asparagina (Novozymes, 2022).

Sin embargo, los tipos de Acrylaway están diseñados para aplicarse a productos a base de cereales; no se tiene un procedimiento establecido para una materia prima como el jugo de caña de azúcar, por lo que los tratamientos presentes en la tesis se realizaron aplicando la cantidad recomendada por Novozymes y con variaciones de esta con el fin de encontrar la cantidad óptima.

2.5.1. Aplicación según la dosis recomendada por el fabricante

El jugo de caña de azúcar utilizado en los tratamientos fue el que corresponde al tercer día de post cosecha de la caña en los ensayos descritos anteriormente, pues fueron los de mayor concentración de asparagina y además de ser, en la práctica productiva, el último día recomendado para poder procesar la caña. Las muestras de jugo fueron almacenadas en un congelador, previamente separadas en colectores universales plásticos de 100 mL.

Para cada uno de los tratamientos a realizar se tuvo en cuenta el proceso de elaboración de panela granulada en las etapas de clarificación y concentración, en las que la materia prima sigue estando en estado líquido.

Durante la etapa de clarificación, se modifica el pH del jugo de caña de un valor original de aproximadamente 5,5 hasta un valor entre 6 y 7, por adición de bicarbonato de sodio. En el laboratorio, a 100 mL de jugo de caña de azúcar según el pH al que se quería llegar (6 o 7), se añadió bicarbonato de sodio, verificando el pH inicial y final. Para lo cual, se hizo uso de: un agitador magnético (Agimatic – N), balanza analítica (RADWAG), vasos de precipitado de 250 mL y un pH-metro (HANNA, 991301).

Para reproducir lo que ocurre en la etapa de concentración, se calentó el jugo de caña hasta la temperatura elegida para cada ensayo y se añadió 0,01 g / 100 mL aproximadamente de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada, y se controló la temperatura del proceso según correspondía mientras se recogían muestras de 5 mL de jugo en los tiempos de 0, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Para esto, se hizo uso de: balanza analítica, agitador magnético, horno de microondas (Daewoo, DMW-34MCSG), termómetro digital (TP101), cronómetro y porta muestras plásticas de 10 mL.

Para inactivar la enzima se sumergió el recipiente con la muestra recolectada en agua hirviendo durante 5 minutos, y se dejó enfriar en agua por otros 5 minutos. Para esto se hizo uso de una cocina eléctrica (Blackline, BHP-11) y un vaso de precipitado de 250 mL.

Finalmente se preparó la muestra para el análisis por medio de filtración (0,45 μm) y posterior almacenamiento en el congelador, haciendo uso de jeringas, filtros de jeringa y viales.

El análisis de cada una de las muestras se hizo según el manual de procedimiento del kit K-ASNAM, con réplicas.

Adicionalmente, se hizo un tratamiento con la enzima Acrylaway L High T, que se encuentra en estado líquido, con un procedimiento similar al descrito anteriormente, con la diferencia en que se añadió 10 μL /100 mL de jugo en el proceso de calentamiento.

2.5.2. Aplicación con variación en la dosis de Acrylaway

El procedimiento seguido en los tratamientos con variación en la dosis de Acrylaway, es similar al descrito anteriormente para la dosis recomendada por el fabricante, con la diferencia en la dosis de enzima Acrylaway 3500 BG granulada que se añadió, que fue de 1/2 y 1/3 de la cantidad recomendada.

Igualmente, el análisis de cada una de las muestras se hizo según el manual de procedimiento del kit K-ASNAM, con réplicas.

2.6. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en módulos productivos

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos con la aplicación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada en jugo de caña de azúcar en laboratorio, se llevaron a cabo ensayos en un módulo productivo de la Cooperativa Agraria Norandino (en el distrito de Montero, Ayabaca), en condiciones similares a las evaluadas en el laboratorio. Los ensayos en módulo productivo estuvieron a cargo de personal técnico de Norandino y del Proyecto Panela de la UDEP, y las muestras de jugo fueron recolectadas a diferentes tiempos, inactivadas y congeladas para su traslado a Piura.

2.6.1. Aplicación según la dosis recomendada por el fabricante

Los tratamientos se llevaron a cabo en condiciones normales de producción de panela en el módulo, y estuvieron a cargo de los técnicos de Norandino y del Proyecto Panela UDEP.

El proceso productivo de la panela granulada se llevó a cabo en sus condiciones normales hasta la etapa de calentamiento del jugo de caña para conseguir las mieles, es en esta etapa en la que se añadió la enzima 3500 BG granulada en la dosis equivalente a 0,01 g/100 mL a una temperatura menor a 30 °C, es decir, antes de que la temperatura se incremente en el calentamiento.

De cada ensayo en módulo se recolectaron muestras para su posterior análisis. Se tomaron muestras de jugo en tres momentos distintos: cuando el jugo no tenía regulador de pH (bicarbonato de sodio), después de añadido el regulador, y en diferentes tiempos de aplicación de Acrylaway: 0, 10, 20, 30 y 45 minutos. Se incluyó el tiempo de 45 minutos para asegurar la actividad de la enzima, a sugerencia de Norandino.

Del mismo modo explicado anteriormente, se inactivó la enzima sumergiendo el recipiente conteniendo la muestra de jugo colectada en agua hirviendo, justo después de recolectarla para finalmente congelarlas hasta el momento del análisis.

2.6.2. Aplicación con variación en la dosis recomendada

El procedimiento seguido en los ensayos en módulo productivo con variación en la dosis de Acrylaway es similar al descrito anteriormente para la dosis recomendada por el fabricante, con la diferencia de que la dosis de enzima Acrylaway 3500 BG granulada que se añadió, fue de 1/2 y de 1/3 de la dosis recomendada. Se recolectaron muestras de jugo con distintos tiempos de aplicación, de 20, 30 y 45 minutos.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Evaluación del método enzimático para cuantificar asparagina

Se analizó una solución estándar de asparagina con el kit K-ASNAM. Para ello, se disolvió 0,1953 gramos de asparagina en agua destilada, teniendo como concentración final 48,8 mg/L (0,0488 g/L), con la finalidad de evaluar el método enzimático del kit K-ASNAM. La asparagina disuelta es un estándar de control que forma parte de las enzimas del kit K-ASNAM (botella 8).

El volumen utilizado para cada muestra fue de 0,1 mL, tal como indica el manual de procedimiento, y no se utilizó un factor de dilución adicional, ya que la cantidad de glutamina y asparagina presente en la muestra está entre 0,005 y 0,50 g/L.

Al seguir el procedimiento detallado en el manual del Kit K-ASNAM, del cual se tiene evidencia en el Anexo A, se obtuvieron 3 valores de absorbancia de la solución estándar de asparagina por cada ensayo. Cada ensayo se realizó por duplicado y en los resultados se muestra el promedio de estos. Después de realizar los cálculos detallados en el manual se obtuvieron las concentraciones mostradas en la Tabla 5, en los que se tiene un error del 4,76 % respecto del valor esperado.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la evaluación del método enzimático

Amoniaco (g/L)	Glutamina (g/L)	Asparagina (g/L)
0,0001	-0,0038	0,0465

Cómo el análisis se realizó en una disolución de agua destilada y asparagina, se esperaba que los valores obtenidos de amoniaco y glutamina sean nulos; en este caso, se ha obtenido valores cercanos al cero y negativos. Por tal motivo, a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación se presentarán resultados negativos, los que serán considerados como ceros. Adicionalmente, se realizaron análisis con diferentes diluciones de la solución estándar para evaluar el método, obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Resultados de evaluación del método enzimático con diferentes concentraciones de asparagina

Asparagina (g/L)	
Concentración de la solución estándar	Concentración calculada con el método enzimático
0,6510	0,6656
0,4883	0,4518
0,2441	0,2351
0,1221	0,1128
0,0610	0,0703
0,0488	0,0470
0,0244	0,0292
0,0122	0,0158

Con estos resultados se observa que los resultados siguen una tendencia lineal como se muestra en la **Figura 1**.

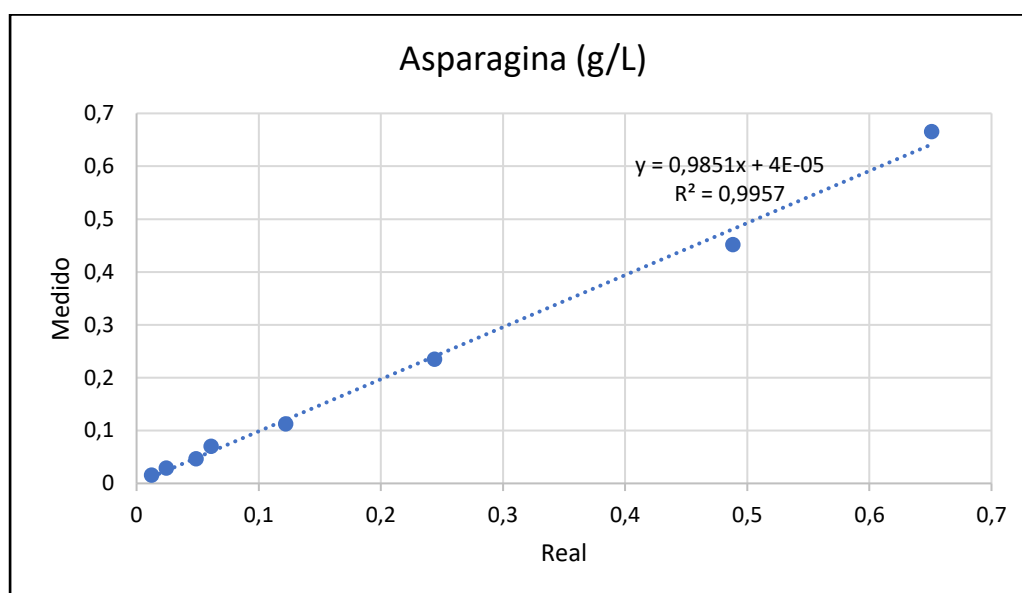


Figura 1. Correlación entre la concentración real y medida de asparagina (g/L)

Además, con un R^2 de 0,9957, se puede decir que se ajusta en un 99,57 % al valor real del contenido de asparagina en jugo de caña de azúcar. Cabe mencionar que en manual del fabricante se tiene un R^2 de 1 para la cuantificación de asparagina.

Con estos resultados se puede comprobar que el método ha cuantificado correctamente la asparagina contenida en la muestra estándar, por lo que se puede continuar con los siguientes análisis sobre muestras de jugo de caña, con mayor certeza en el resultado obtenido.

3.2. Cuantificación de asparagina

Se han analizado un total de 101 muestras procedentes de los diferentes módulos de producción pertenecientes a la Cooperativa Agraria Norandino. Estas son: Cruz Misionera

(24), Santa Rosa de Chonta (30), El Yantuma – Ambasal (24) y Aprocaña (15). Adicionalmente se han analizado 8 muestras de jugo de caña panelera con tratamiento con Acrylaway del año 2020, del módulo de Santa Rosa de Chonta.

Las muestras fueron recibidas hasta febrero del 2021, con el formato de codificación se muestra en la Figura 2, y el correspondiente a los módulos es de: Cruz Misionera (CM), Santa Rosa de Chonta (SR), El Yanyuma – Ambasal (YA) y Aprocaña (AP). Vale aclarar, que la Cooperativa Agraria Norandino estuvo a cargo de establecer la codificación. El criterio para la toma de muestras fue establecido por Cooperativa Norandino, y se basó en resultados anteriores del contenido de acrilamida en panela, de los distintos módulos de producción. Se consideró que, mientras más alto era el valor de acrilamida en panela proveniente de un módulo, más muestras de jugo de caña se recogerían del mismo.

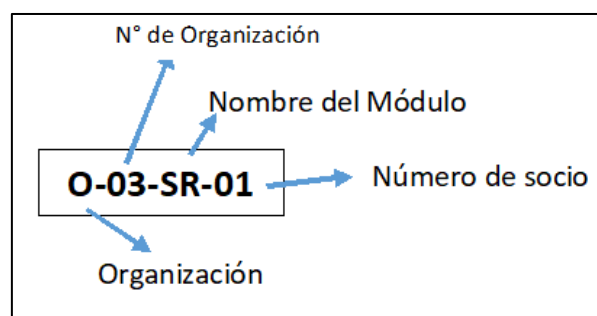


Figura 2. Formato de codificación de muestras provenientes de diversos módulos

Nota: Obtenido de Cooperativa Agraria Norandino (2020)

Las muestras de jugo fueron conservadas en una cadena de frío desde que fueron recolectadas. En primera instancia se almacenaron en un *cooler* con bolsas de gel refrigerante congelado hasta que fueron recibidas en el Laboratorio de Química de la Universidad de Piura, donde se mantuvieron en el congelador.

Para el análisis del contenido de asparagina con el método enzimático se descongelaron las muestras totalmente y se agitaron para evitar sedimentación de partículas. Seguidamente se tomó 4 mL de jugo de caña panelera con una jeringa y se filtró haciendo uso de un filtro de jeringa de 0,45 μm , almacenándose el filtrado en un vial de vidrio con su respectiva codificación. Del contenido filtrado se tomó 0,1 mL y fue analizado según lo indicado en el manual del kit K-ASNAM. En algunos casos se realizó una o dos verificaciones adicionales, a aquellas muestras cuyos resultados tenían un valor extraño en relación con sus correlativas, lo que no significa que en todos los casos el método de cuantificación haya dado un resultado erróneo, sino que la cantidad de asparagina presente en la muestra sí era diferente a sus correlativas.

Para cuantificar los resultados a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas con el espectrofotómetro para cada una de las muestras, se hizo uso de hojas de cálculo de Excel, con las fórmulas de cálculo indicadas por el manual del kit K-ASNAM.

Los resultados de los análisis que se muestran en la **Tabla 7** corresponden a 101 muestras de jugo de caña.

Tabla 7. Resultados obtenidos en los ensayos de cuantificación de asparagina

Nº	Código de muestra	Asparagina (g/L)	Procedencia de muestra
1	0-01-CM-01-J1	0,3444	Módulo Cruz Misionera
2	0-01-CM-01-J2	0,2024	
3	0-01-CM-01-J3	0,2756	
4	0-01-CM-02-J1	0,4622	
5	0-01-CM-02-J2	0,5151	
6	0-01-CM-02-J3	0,4518	
7	0-01-CM-03-J1	0,3677	
8	0-01-CM-03-J2	0,4196	
9	0-01-CM-03-J3	0,4493	
10	0-01-CM-04-02	0,1420	
11	0-01-CM-04-03	0,1618	
12	0-01-CM-04-J1	0,1554	
13	0-01-CM-05-J1	0,4483	
14	0-01-CM-05-J2	0,4765	
15	0-01-CM-05-J3	0,3776	
16	0-01-CM-06-J1	0,2716	
17	0-01-CM-06-J2	0,4186	
18	0-01-CM-06-J3	0,4206	
19	0-01-CM-07-J1	0,1524	
20	0-01-CM-07-J2	0,1494	
21	0-01-CM-07-J3	0,1618	
22	0-01-CM-09-J1	0,5339	
23	0-01-CM-09-J2	0,5067	
24	0-01-CM-09-J3	0,5062	
25	0-03-SR-004-A1-J1	0,3464	Módulo de Santa Rosa de Chonta
26	0-03-SR-004-A1-J2	0,2618	
27	0-03-SR-004-A1-J3	0,2741	
28	0-03-AP-003-A1-J1	0,0856	
29	0-03-AP-003-A1-J2	0,0658	
30	0-03-AP-003-A1-J3	0,0643	
31	0-15-AP-003-A1-J1	0,0618	Módulo de Aprocaña
32	0-15-AP-003-A1-J2	0,0499	
33	0-15-AP-003-A1-J3	0,1212	
34	0-15-SR-004-A1-J1	0,1603	
35	0-15-SR-004-A1-J2	0,1538	
36	0-15-SR-004-A1-J3	0,1058	
37	0-03-SR-01-J1	0,2281	Módulo de Santa Rosa de Chonta
38	0-03-SR-01-J2	0,1356	

Nº	Código de muestra	Asparagina (g/L)	Procedencia de muestra
39	0-03-SR-01-J3	0,1915	
40	0-03-SR-02-J1	0,1945	
41	0-03-SR-02-J2	0,1262	
42	0-03-SR-02-J3	0,1584	
43	0-03-SR-03-J1	0,2172	
44	0-03-SR-03-J2	0,0267	
45	0-03-SR-03-J3	0,1410	
46	0-03-SR-05-J1	0,2336	
47	0-03-SR-05-J2	0,1519	
48	0-03-SR-05-J3	0,1336	
49	0-03-SR-06-J1	0,3048	
50	0-03-SR-06-J2	0,3305	
51	0-03-SR-06-J3	0,3612	
52	0-03-SR-07-J1	0,1806	
53	0-03-SR-07-J2	0,2281	
54	0-03-SR-07-J3	0,1965	
55	0-03-SR-08-J1	0,0490	
56	0-03-SR-08-J2	0,1425	
57	0-03-SR-08-J3	0,0708	
58	0-03-SR-09-J1	0,4177	
59	0-03-SR-09-J2	0,3365	
60	0-03-SR-09-J3	0,5097	
61	0-10-YA-01-J1	0,2246	Módulo El Yantuma
62	0-10-YA-01-J2	0,2108	
63	0-10-YA-01-J3	0,1970	
64	0-10-YA-03-J1	0,5483	
65	0-10-YA-03-J2	0,5117	
66	0-10-YA-03-J3	0,4973	
67	0-10-YA-04-J1	0,3449	
68	0-10-YA-04-J2	0,4053	
69	0-10-YA-04-J3	0,3231	
70	0-10-YA-05-J1	0,4538	
71	0-10-YA-05-J2	0,4483	
72	0-10-YA-05-J3	0,4567	
73	0-10-YA-06-J1	0,4488	
74	0-10-YA-06-J2	0,4597	
75	0-10-YA-06-J3	0,4949	
76	0-10-YA-07-J1	0,4384	
77	0-10-YA-07-J2	0,4617	
78	0-10-YA-07-J3	0,1475	
79	0-10-YA-08-J1	0,4374	
80	0-10-YA-08-J2	0,4616	
81	0-10-YA-08-J3	0,4657	
82	0-10-YA-09-J1	0,2538	
83	0-10-YA-09-J2	0,2544	

Nº	Código de muestra	Asparagina (g/L)	Procedencia de muestra
84	0-10-YA-09-J3	0,2578	Módulo de Aprocaña
85	0-15-AP-001-J1	0,0871	
86	0-15-AP-001-J2	0,1341	
87	0-15-AP-001-J3	0,1534	
88	0-15-AP-002-J1	0,1588	
89	0-15-AP-002-J2	0,1430	
90	0-15-AP-002-J3	0,1777	
91	0-15-AP-004-J1	0,1534	
92	0-15-AP-004-J2	0,1024	
93	0-15-AP-004-J3	0,0801	
94	AC04-SR-001-T1-J1	0,4978	Ensayo con Acrylaway en el Módulo Santa Rosa de Chonta
95	AC04-SR-001-T1-J2	0,4646	
96	AC04-SR-001-T2-J2	0,0143	
97	AC04-SR-001-T2-J3	-0,0212	
98	AC04-SR-001-T3-J1	-0,0143	
99	AC04-SR-001-T3-J2	-0,0203	
100	AC04-SR-001-T4-J1	-0,0232	
101	AC04-SR-001-T4-J2	-0,0158	

Los valores negativos calculados con el método enzimático se considerarán como cero. Así mismo, desde las muestras 41 a la 46, tienen una codificación distinta puesto que fueron procesadas en el módulo de Aprocaña pero son provenientes del módulo de Santa Rosa de Chonta y Aprocaña.

Para una mejor visualización e interpretación de resultados, se ha elaborado un gráfico de caja de bigotes con los datos verificados, mostrado en la **Figura 3**, teniendo como datos principales las cantidades de asparagina y sus lugares de procedencia. Con estos, se deja en evidencia que, al comparar los promedios, se nota que de acuerdo a la procedencia el nivel de asparagina cambia, siendo las muestras de Aprocaña las que tienen menor contenido, y adicionalmente, se pone de manifiesto que el jugo de caña tratado con la enzima Acrylaway presenta bajos o nulos niveles de asparagina, a excepción de las muestras 94 y 95 que son los jugos testigos, es decir antes de aplicar la enzima.

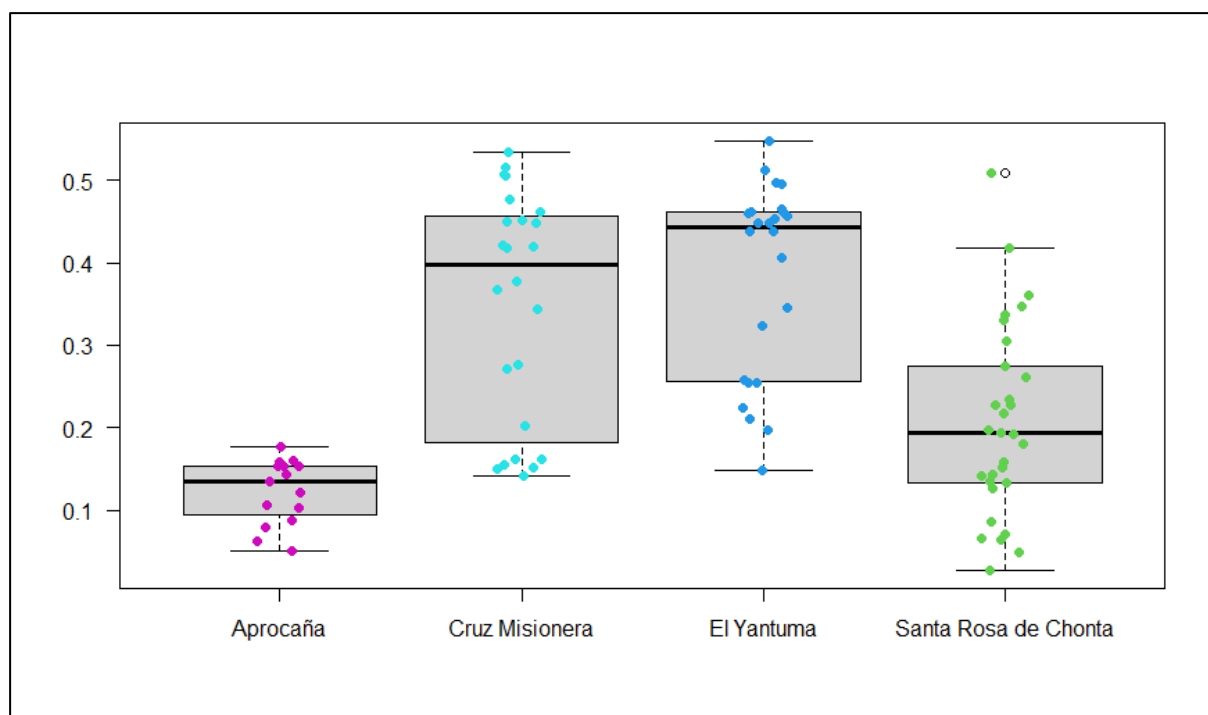


Figura 3. Contenido de asparagina en el jugo según el módulo de procedencia (g/L)

Además, los resultados de las muestras provenientes del módulo de Aprocaña, ubicado en la región Cajamarca, presentan valores más bajos en comparación con los módulos de Cruz Misionera, El Yantuma y Santa Rosa de Chonta, los cuales están ubicados en la región Piura.

Las medianas obtenidas en estos ensayos se muestran en la **Tabla 8** mostrada a continuación.

Tabla 8. Medianas del contenido de asparagina según módulo de procedencia

Módulo de producción	Asparagina (g/L)
Módulo de Aprocaña	0,1341
Módulo Cruz Misionera	0,3981
Módulo El Yantuma	0,4434
Módulo de Santa Rosa de Chonta	0,1930

Aunque el análisis de acrilamida en el producto final (panela granulada) no forma parte de esta tesis, se consideró importante incluir en la discusión de resultados, una correlación entre el contenido de acrilamida en panela y el contenido de asparagina en el jugo de caña del que se obtuvo. En el marco del Proyecto Panela (financiado por SeCompetitivo) y del estudio colaborativo sobre acrilamida de UDEP, Norandino y *Bioversity*, algunas muestras de panela fueron enviadas al laboratorio GBA Group – Food de Alemania. Con el permiso de las instituciones antes mencionadas, se usarán los resultados de acrilamida para mostrar la

correlación que existe con el contenido de asparagina en el jugo de caña, mostrado en la la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de acrilamida en panela, y de asparagina en sus correspondientes jugos analizados por método enzimático

N°	Módulo del proceso	Código Panela	Código Jugo de caña	Asparagina (g/L)	Acrilamida (ppb)
1	Yantuma	O-10-YA-01-P2	O-10-YA-01-J2	0,2108	1432
2	Aprocaña	O-15-AP-003-A1-P2	O-15-AP-003-A1-J2	0,0500	235
3	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-01-P2	O-03-SR-01-J2	0,1356	837
4	Cruz Misionera	O-01-CM-02-P2	O-01-CM-02-J2	0,5151	1697
5	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-02-P2	O-03-SR-02-J2	0,1262	764
6	Aprocaña	O-15-AP-001-A1-P2	O-15-AP-001-A1-J2	0,1341	726
7	Aprocaña	O-15-AP-004-P2	O-15-AP-004-J2	0,1024	601
8	Yantuma	O-10-YA-03-P2	O-10-YA-03-J2	0,5117	3300
9	Cruz Misionera	O-01-CM-01-P2	O-01-CM-01-J2	0,2732	359
10	Yantuma	O-10-YA-04-P2	O-10-YA-04-J2	0,4053	2574
11	Aprocaña	O-15-AP-002-P2	O-15-AP-002-J2	0,1430	1015
12	Cruz Misionera	O-01-CM-03-P2	O-01-CM-03-J2	0,4196	1479
13	Yantuma	O-10-YA-05-P2	O-10-YA-05-J2	0,4483	1675
15	Yantuma	O-10-YA-07-P2	O-10-YA-07-J2	0,1475	374
16	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-05-P2	O-03-SR-05-J2	0,1519	775
17	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-004-A1-P2	O-03-SR-004-A1-J2	0,2618	711
18	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-03-P2	O-03-SR-03-J2	0,0267	567
19	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-06-P2	O-03-SR-06-J2	0,3306	1343
20	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-07-P2	O-03-SR-07-J2	0,2281	850
21	Cruz Misionera	O-01-CM-04-P2	O-01-CM-04-J2	0,1420	362
22	Cruz Misionera	O-01-CM-05-P2	O-01-CM-05-J2	0,4765	1135
23	Cruz Misionera	O-01-CM-06-P2	O-01-CM-06-J2	0,4276	1796
24	Yantuma	O-10-YA-06-P2	O-10-YA-06-J2	0,4597	3070
25	Cruz Misionera	O-01-CM-07-P2	O-01-CM-07-J2	0,1494	2199
26	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-08-P2	O-03-SR-08-J2	0,1425	228
27	Santa Rosa de Chonta	O-03-SR-09-P2	O-03-SR-09-J2	0,3365	1819
28	Cruz Misionera	O-01-CM-09-P2	O-01-CM-09-J2	0,5067	2734
29	Yantuma	O-10-YA-08-P2	O-10-YA-08-J2	0,4617	2449
30	Yantuma	O-10-YA-09-P2	O-10-YA-09-J2	0,2544	861

Nota: Obtenido de (Estudio conjunto Cooperativa Agraria Norandino, Universidad de Piura y Bioversity International, 2021)

Existe una correlación entre el contenido de asparagina del jugo de caña de azúcar y el contenido de acrilamida en la panela granulada, con un coeficiente de correlación de 0,76. Además, tal como se muestra en Figura 4, se puede apreciar que en todos los módulos se puede obtener panela con bajo contenido de acrilamida. Sin embargo, al no existir un máximo permitido de acrilamida en la panela por el momento, la Cooperativa Agraria Norandino ha fijado una meta de 800 ppb, por lo que de las 30 muestras, solo 11 cumplirían con lo esperado.

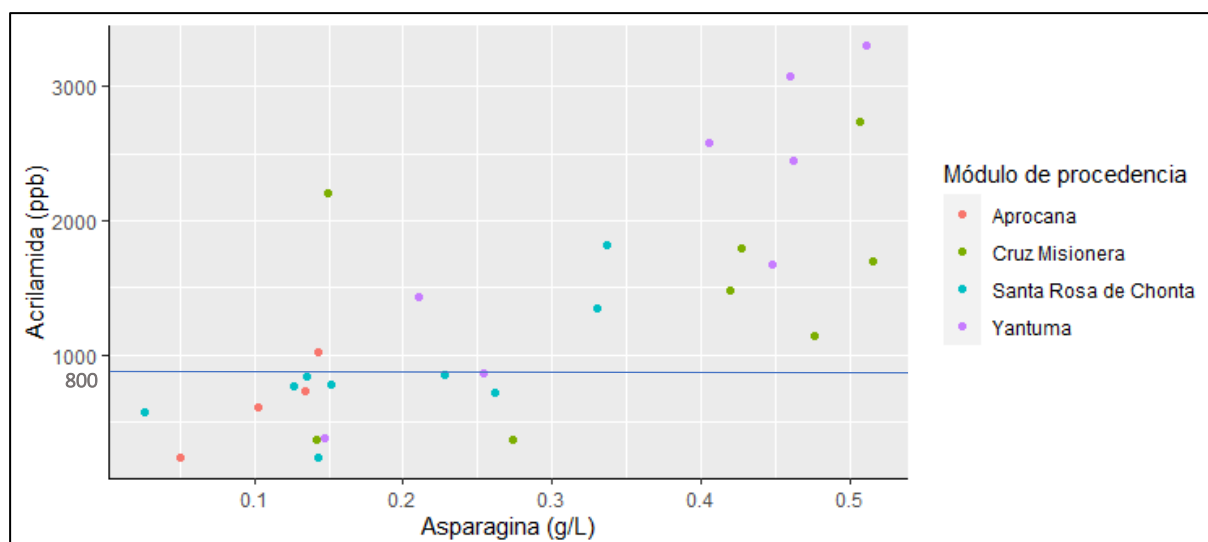


Figura 4. Gráfica de dispersión entre las variables asparagina y acrilamida según módulo de procedencia

A partir de estos resultados, se podría sugerir enfocar los esfuerzos en reducir el contenido de asparagina en el jugo de caña por debajo de 0,2 g/L, más que en buscar modificaciones en el proceso de elaboración de panela, pues se observa que es la asparagina la que determina la formación de acrilamida. Además, se puede monitorear el contenido de asparagina en jugo según regiones, parcelas y temporadas, a un costo de análisis mucho menor que el que demandaría hacer los análisis de acrilamida en el extranjero.

3.3. Cuantificación de asparagina según días post cosecha

Se realizaron dos ensayos para conocer la influencia del tiempo post cosecha de caña (días transcurridos desde que fue cortada) en el contenido de asparagina en el jugo. El primero fue realizado en marzo del 2021 y el segundo en junio del 2021.

Para la realización del primer ensayo, la Cooperativa Agraria Norandino brindó 40 varas de caña panelera provenientes del mismo productor, las cuales llegaron a sus instalaciones de envasado (Planta Panela) el día 8 de marzo del 2021 y fueron almacenadas en condiciones ambientales bajo sombra.

Se cortaron las cañas por la mitad para tener un total de 80 pedazos, los cuales se separaron en grupos aleatoriamente para evitar cualquier variación en el ensayo.

La recolección de muestras de jugo se realizó durante 5 días consecutivos a partir de la llegada de las cañas paneleras. Se extrajo un mínimo de 1,5 L cada día, pero se almacenó según la distribución de la **Tabla 10**.

Tabla 10. Cantidades almacenadas de jugo de caña para primer ensayo post cosecha

Día post cosecha	Cantidad almacenada (L)
1	0,5
2	0,5
3	3,0
4	0,5
5	3,0

El resultado de los análisis se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Resultados de primer análisis según el tiempo post cosecha

N° Muestra	Asparagina (g/L)	
	Réplica 1	Réplica 2
1 Día 1	0,3657	0,3662
2 Día 2	0,6809	0,6626
3 Día 3	0,6626	0,6755
4 Día 4	0,6141	0,6121
5 Día 5	0,2732	0,2484

En los resultados se evidenció una tendencia creciente en el contenido de asparagina presente en el jugo de la caña desde el día 1 de post cosecha hasta el día 2, manteniéndose hasta el día 4 y teniendo una disminución en el día 5, que estuvo posiblemente afectado por el factor de “maduración” de la caña, ya que se extrajo jugo de una combinación de cañas verdes y maduras. Para la representación de los datos mostrados en la Figura 5, se utilizó el promedio simple de los resultados obtenidos para cada día.

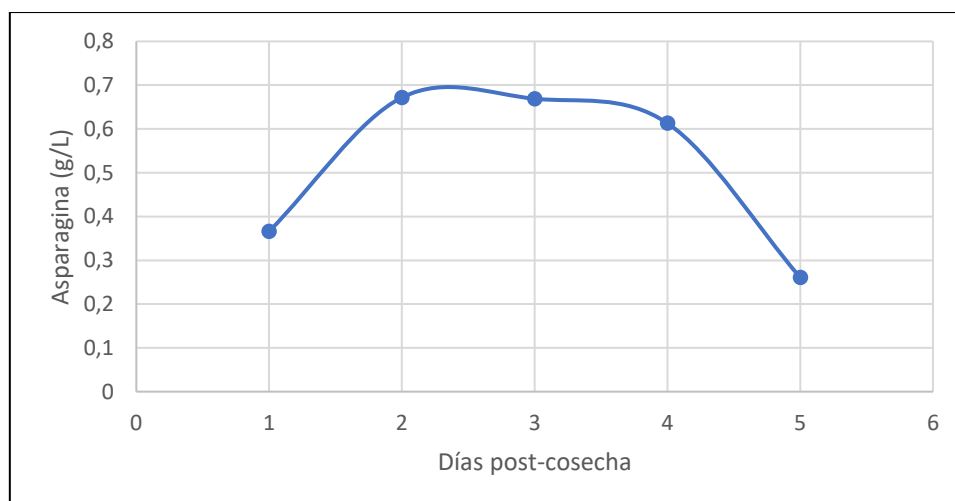


Figura 5. Contenido de asparagina según los días post- cosecha en el primer ensayo

Para la realización del segundo ensayo, la Cooperativa Agraria Norandino brindó 10 varas de caña panelera provenientes del mismo productor, las cuales llegaron a sus instalaciones de envasado el día 14 de junio del 2021 y fueron almacenadas en las mismas condiciones del primer ensayo.

La recolección de muestras se realizó durante 4 días consecutivos a partir de la llegada de las cañas paneleras. A diferencia del primer ensayo, se extrajo solo el volumen requerido para cada uno de los ensayos según la distribución de la Tabla 12.

Tabla 12. Cantidades almacenadas de jugo de caña para el segundo ensayo post cosecha

Día post cosecha	Cantidad almacenada (L)
1	0,5
2	0,5
3	2,0
4	2,0

Los resultados de los análisis se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resultados de segundo análisis según el tiempo post cosecha

N°	Muestra	Asparagina (g/L)	
		Réplica 1	Réplica 2
1	Día 1	0,1767	0,1722
2	Día 2	0,0995	0,0920
3	Día 3	0,4993	0,5033
4	Día 4	0,3177	0,2771

En los resultados se evidenció una tendencia creciente de asparagina presente en el jugo de caña desde el día 1 de post-cosecha hasta el día 3, teniendo una leve disminución en el día 2 y una más notoria en el día 4. Sin embargo, los resultados de los primeros dos días pueden estar influenciados por la poca cantidad de jugo extraído de la caña, ya que se extrajo solo 0,5 L, por lo que el jugo no provenía de una mezcla de cañas, sino de un par de estas. Para la representación de los datos mostrados en la **Figura 6**, se utilizó el promedio simple de los resultados obtenidos para cada día.

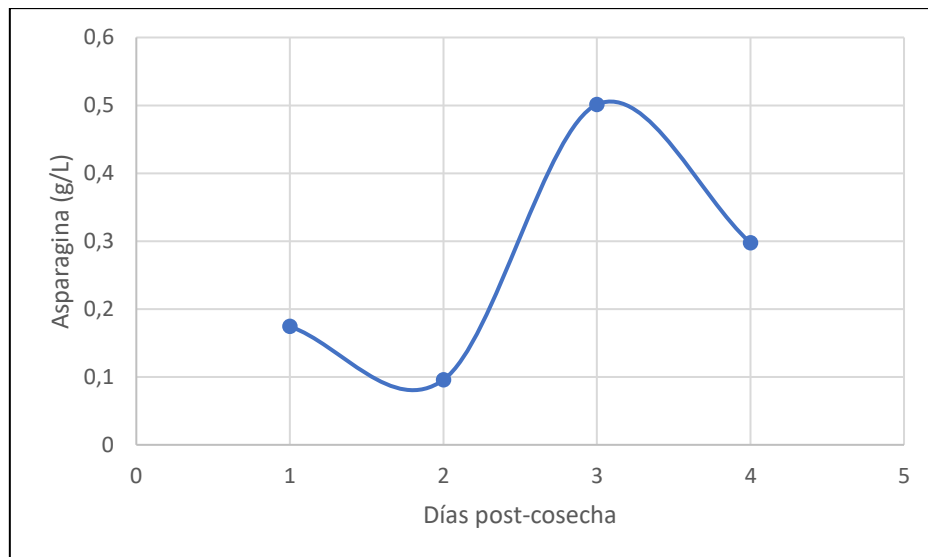


Figura 6. Contenido de asparagina según los días post- cosecha en el segundo ensayo

Los ensayos mostrados en la **Figura 5** y en la **Figura 6** no son comparables, pues muestran tendencias distintas debido a que se tuvieron factores difíciles de controlar como la cantidad de caña disponible y el grado de maduración de estas, por lo que las condiciones no fueron iguales.

3.4. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en laboratorio

Con el fin de obtener a nivel de laboratorio, las mejores condiciones de aplicación, se hicieron tratamientos tomando en cuenta distintas variables, acordes al proceso de producción de panela granulada en los módulos, del cual se tiene evidencia en el Apéndice A.

3.4.1. Aplicación de la enzima Acrylaway según la dosis recomendada

Se realizó un primer tratamiento en marzo del 2021, donde se tuvieron como variables la temperatura de aplicación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada, el tiempo de actuación de la enzima y el pH del jugo de caña panelera. Para lo cual, del mismo jugo de 3 días post cosecha, fueron separadas 12 muestras de 100 mL para la adición de la enzima bajo diferentes condiciones.

Debido a que el pH del jugo de caña panelera es de 5,5 aproximadamente, durante la etapa de clarificación se eleva a 6 con la adición de bicarbonato de sodio. En el laboratorio, en cada muestra se verificó el pH inicial y final (antes y después de la adición de bicarbonato), utilizando un pH-metro.

Para los tratamientos, se optó por tomar dos variaciones en el pH, de 6 y 7, para lo cual se hizo una adición de 0,08 g/100 mL y 0,24 g/mL aproximada y respectivamente. Estas cantidades corresponden a las concentraciones que se utilizan durante en proceso de panela en módulos.

La cantidad de enzima Acrylaway adicionada a la muestra de jugo, después de la regulación de pH, es de 0,01 g/100 mL aproximadamente, que es la concentración recomendada por el fabricante Novozymes.

Las temperaturas de actuación de la enzima fueron de 30 °C, 60 °C y 80 °C, esto debido a que la temperatura recomendada por el fabricante de la enzima es de 60 °C teniendo en cuenta que es una enzima diseñada para procesos de panificación.

El resumen de los parámetros controlados se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Parámetros controlados en el primer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la dosis recomendada por el fabricante

Día post cosecha	Réplica	Temperatura (°C)	Bicarbonato de Sodio (g/100 mL)	Acrylaway (g/100 mL)	pH Inicial	pH Final
3	1	30	0,08499	0,01052	5,22	6,02
3	2	30	0,08563	0,01286	5,67	6,16
3	1	30	0,25181	0,01088	5,18	6,90
3	2	30	0,24386	0,01357	5,35	6,81
3	1	60	0,08479	0,01060	5,29	6,31
3	2	60	0,08465	0,01067	5,39	6,20
3	1	60	0,25221	0,01468	5,17	6,81
3	2	60	0,25342	0,01137	5,29	6,81
3	1	80	0,08557	0,01108	5,63	6,28
3	2	80	0,08525	0,01268	5,73	6,10
3	1	80	0,25437	0,01001	5,11	6,72
3	2	80	0,25620	0,01054	5,42	6,78

Para conseguir jugo a diferentes temperaturas, se colocó la muestra en un horno de microondas por breve tiempo, y la temperatura fue verificada por termómetro digital. Para mantener la temperatura durante todo el tiempo de actuación de la enzima y mantener una agitación constante de la muestra y enzima, se utilizó un agitador magnético con regulación térmica.

Se tomaron muestras de 5 mL de jugo para el análisis, a diferentes tiempos de actuación de la enzima: 0, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Dando un total de 72 muestras a analizar.

Para inactivar la enzima en cada muestra tomada, se sumergió el recipiente con la muestra recolectada en agua hirviendo durante 5 minutos, y se dejó enfriar en agua fría por otros 5 minutos. Finalmente, las muestras de jugo fueron filtradas y almacenadas en el congelador hasta el análisis de contenido de asparagina por el método enzimático.

Es importante mencionar que todos los tratamientos del ensayo fueron realizados por duplicado, al igual que los análisis de asparagina para cada una de las muestras obtenidas, y los resultados se presentan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Resultados obtenidos en el primer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante

N°	pH	Muestra	Asparagina (g/L)	
			Réplica 1	Réplica 2
1	6	Día 3- 30 °C – 0 min	0,2479	0,3553
2	6	Día 3- 30 °C – 10 min	0,0153	0,2029
3	6	Día 3- 30 °C – 15 min	0,0000	0,1059
4	6	Día 3- 30 °C – 20 min	0,0000	0,0000
5	6	Día 3- 30 °C – 25 min	0,0000	0,0000
6	6	Día 3- 30 °C – 30 min	0,0000	0,0000
7	7	Día 3- 30 °C – 0 min	0,4820	0,5260
8	7	Día 3- 30 °C – 10 min	0,2529	0,2727
9	7	Día 3- 30 °C – 15 min	0,0940	0,2544
10	7	Día 3- 30 °C – 20 min	0,1148	0,1242
11	7	Día 3- 30 °C – 25 min	0,0000	0,0322
12	7	Día 3- 30 °C – 30 min	0,0000	0,0000
13	6	Día 3- 60 °C – 0 min	0,5993	0,5923
14	6	Día 3- 60 °C – 10 min	0,5552	0,4558
15	6	Día 3- 60 °C – 15 min	0,5839	0,4696
16	6	Día 3- 60 °C – 20 min	0,5913	0,4820
17	6	Día 3- 60 °C – 25 min	0,5829	0,4661
18	6	Día 3- 60 °C – 30 min	0,5750	0,4003
19	7	Día 3- 60 °C – 0 min	0,4696	0,5938
20	7	Día 3- 60 °C – 10 min	0,4063	0,5859
21	7	Día 3- 60 °C – 15 min	0,4419	0,6012
22	7	Día 3- 60 °C – 20 min	0,4483	0,5889
23	7	Día 3- 60 °C – 25 min	0,4241	0,5894
24	7	Día 3- 60 °C – 30 min	0,4523	0,5854
25	6	Día 3- 80 °C – 0 min	0,3301	0,4765
26	6	Día 3- 80 °C – 10 min	0,6779	0,5592
27	6	Día 3- 80 °C – 15 min	0,6997	0,6354
28	6	Día 3- 80 °C – 20 min	0,6339	0,6591
29	6	Día 3- 80 °C – 25 min	0,6923	0,6591
30	6	Día 3- 80 °C – 30 min	0,5849	0,6245
31	7	Día 3- 80 °C – 0 min	0,5161	0,7705
32	7	Día 3- 80 °C – 10 min	0,4449	0,7245
33	7	Día 3- 80 °C – 15 min	0,4587	0,7923
34	7	Día 3- 80 °C – 20 min	0,4310	0,7918
35	7	Día 3- 80 °C – 25 min	0,4736	0,7596
36	7	Día 3- 80 °C – 30 min	0,5018	0,5681

Los resultados evidenciaron que la enzima se inactiva antes de que el jugo llegue a los 60 °C, por lo que no hubo reducción en el contenido de asparagina en el ensayo realizado a 60 °C, mostrado en la **Figura 7**, ni en el ensayo realizado a 80 °C, mostrado en la **Figura 8**. Cabe mencionar que se ha utilizado el promedio simple entre las réplicas para cada uno de los análisis.

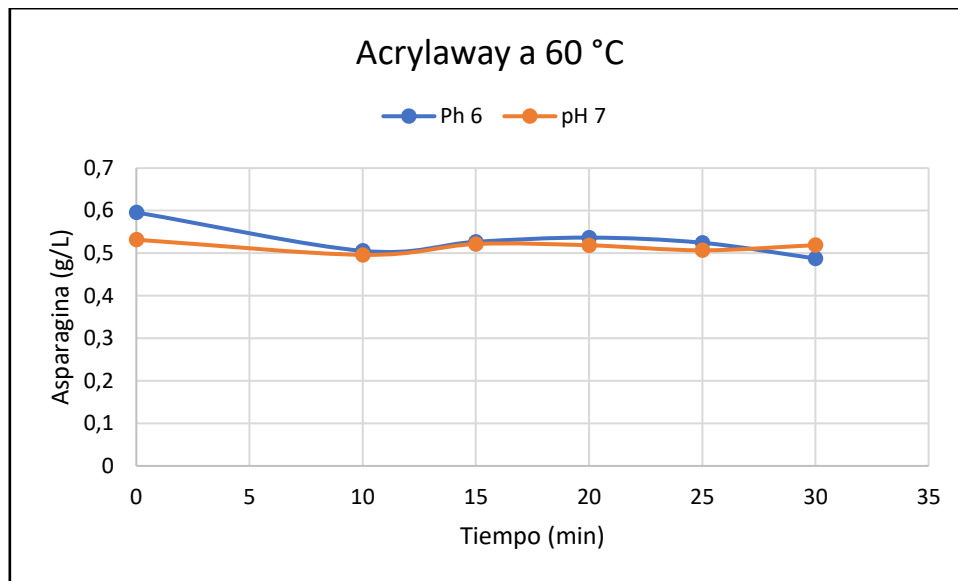


Figura 7. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 60 °C

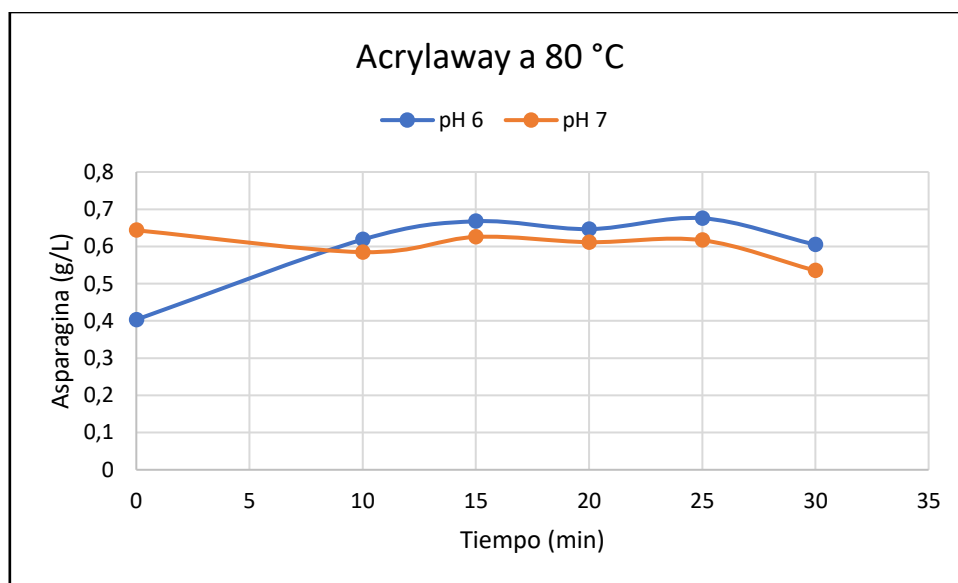


Figura 8. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 80 °C

Mientras que en los tratamientos realizados a 30 °C sí se observó una reducción en la cantidad de asparagina presente en el jugo de caña, como se muestra en la **Figura 9** . Esta reducción es significativa a partir de los 20 minutos de aplicación de la enzima en el jugo de caña.

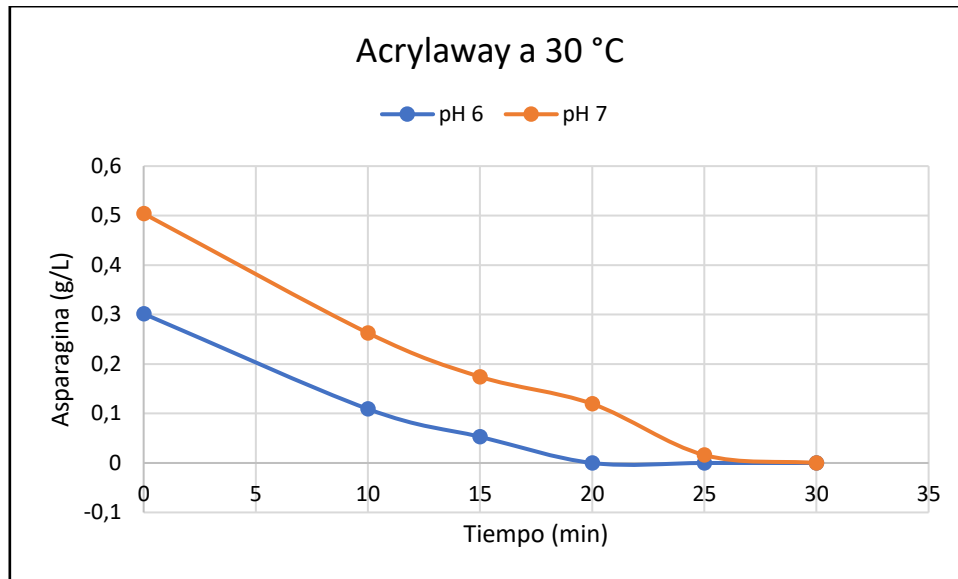


Figura 9. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 30 °C

Por tal motivo, se continuaron con los ensayos de tratamiento con la enzima Acrylaway 3500 BG en el jugo de caña, pero considerando temperaturas inferiores a los 60 °C. Por otro lado, el distinto valor de pH del jugo no evidenció una diferencia significativa en los resultados, por lo que no se tomó como variable para los siguientes ensayos de tratamiento con Acrylaway, además de hacerse notoria la gran cantidad requerida de bicarbonato de sodio para elevar el pH sobre 6.

Tomando el pH 7 como referente, al hacer la comparación entre las tres temperaturas tomadas para los ensayos de tratamiento con la enzima Acrylaway 3500 BG, se aprecia que, en términos de porcentaje, la temperatura de 30 °C es la que obtuvo resultados de reducción del contenido de asparagina en un 100 %, tal como se muestra en la Figura 10.

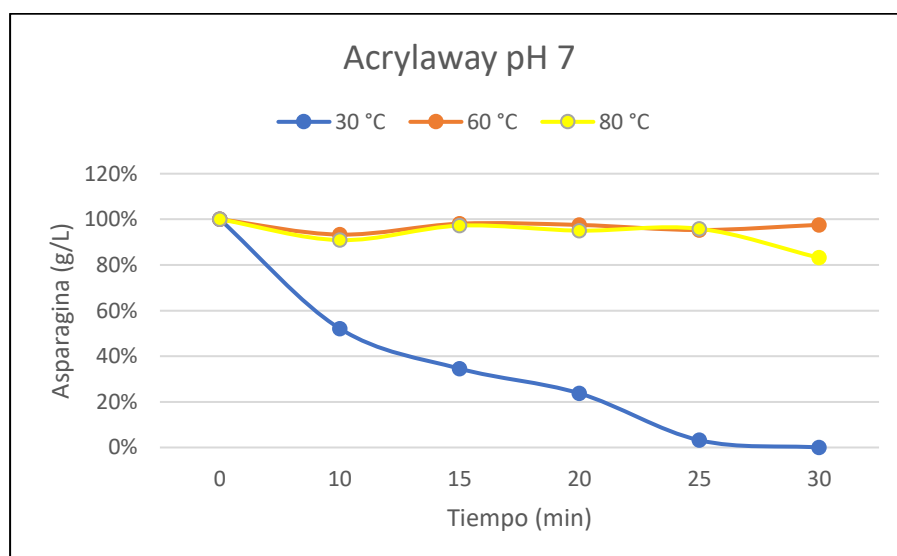


Figura 10. Resultado comparativo del tratamiento con Acrylaway en jugo de caña de pH 7 en términos de porcentaje

Para el segundo tratamiento realizado en junio del 2021, se tuvieron como variables la temperatura de aplicación y el tiempo de actuación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada. Se utilizó jugo de caña de 3 días post cosecha, y fueron separadas 6 muestras de 100 mL para la adición de enzima, con lo que se obtuvieron 36 muestras para análisis del contenido de asparagina.

Las temperaturas de aplicación elegidas para este ensayo fueron de 20 °C, 30 °C y 40 °C, ya que se evidenció en el primer ensayo que a partir de 60 °C la enzima queda inactiva y no hay reducción en el contenido de asparagina, y el pH se mantuvo próximo a 6.

La cantidad de enzima y bicarbonato de sodio adicionados son iguales a los del primer ensayo, y de la misma manera se realizaron los tratamientos por duplicado para reducir incertidumbre en los resultados. El resumen de los parámetros controlados en este ensayo se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Parámetros controlados en el segundo ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante

Día post cosecha	Réplica	Temperatura (°C)	Bicarbonato de Sodio (g/100 mL)	Acrylaway (g/100 mL)	pH Inicial	pH Final
3	1	20	0,08898	0,01296	5,62	6,32
3	2	20	0,08682	0,01620	5,68	6,26
3	1	30	0,08670	0,01621	5,49	6,21
3	2	30	0,08600	0,01449	5,66	6,21
3	1	40	0,08521	0,01205	5,61	6,25
3	2	40	0,08820	0,01152	5,70	6,28

El procedimiento seguido es igual al descrito anteriormente, con diferencia en las temperaturas de aplicación, obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Resultados obtenidos en el segundo ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la cantidad recomendada por el fabricante

N°	Muestra	Asparagina (g/L)	
		Réplica 1	Réplica 2
1	Día 3- 30 °C – 0 min	0,4993	0,5033
2	Día 3- 30 °C – 10 min	0,1682	0,0742
3	Día 3- 30 °C – 15 min	0,2469	0,0134
4	Día 3- 30 °C – 20 min	0,1450	0,0069
5	Día 3- 30 °C – 25 min	0,0584	0,0049
6	Día 3- 30 °C – 30 min	0,0035	0,0045
7	Día 3- 40 °C – 0 min	0,4889	0,4513
8	Día 3- 40 °C – 10 min	0,1890	0,2024
9	Día 3- 40 °C – 15 min	0,0648	0,0727
10	Día 3- 40 °C – 20 min	0,0000	0,0144
11	Día 3- 40 °C – 25 min	-0,0045	0,0035

N°	Muestra	Asparagina (g/L)	
		Réplica 1	Réplica 2
12	Día 3- 40 °C – 30 min	-0,0005	-0,0104
13	Día 3- 20 °C – 0 min	0,4859	0,5275
14	Día 3- 20 °C – 10 min	0,2741	0,3380
15	Día 3- 20 °C – 15 min	0,0821	0,1381
16	Día 3- 20 °C – 20 min	0,0792	0,0752
17	Día 3- 20 °C – 25 min	0,0663	0,0277
18	Día 3- 20 °C – 30 min	0,0500	0,0064

Los resultados mostrados en la **Figura 11**, evidenciaron que a las tres temperaturas se consigue una reducción significativa de la cantidad de asparagina presente, a partir de los 15 minutos de actuación.

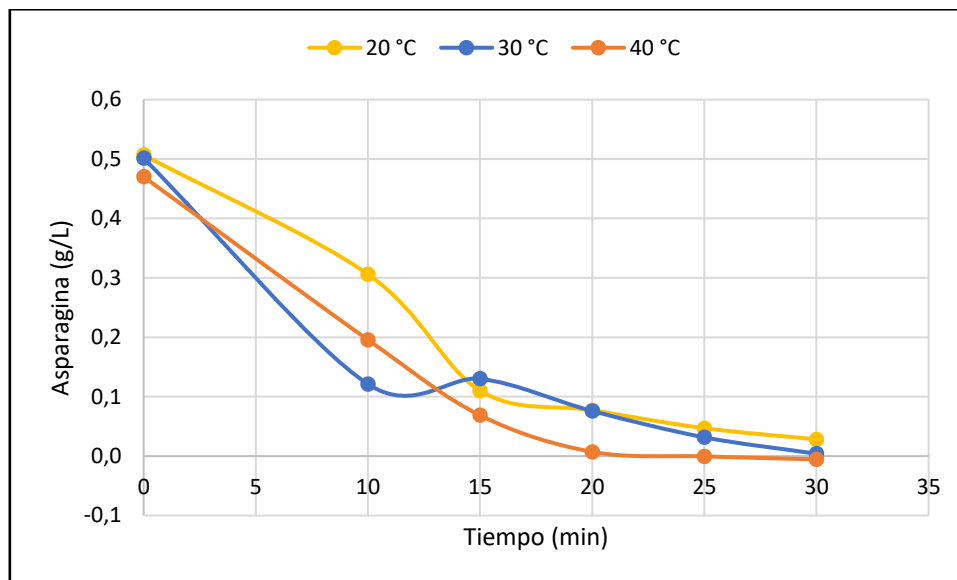


Figura 11. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway a 20 °C, 30 °C y 40 °C

De las temperaturas utilizadas para el ensayo no se evidencia una diferencia significativa entre sus resultados, por lo que a cualquier temperatura dentro de este rango será efectivo el tratamiento del jugo de caña con la enzima Acrylaway 3500 BG granulada.

En el tercer ensayo se utilizó la enzima Acrylaway L High T a una temperatura de 80 °C y manteniendo el pH de 6 aproximadamente. Siguiendo un procedimiento similar a los anteriores, se añadió 10 µL/100 mL de caña de azúcar en el proceso de concentración, recolectando muestras a los tiempos de actuación de la enzima: 0, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, los cuales fueron analizados por duplicado, obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Resultados obtenidos en el tercer ensayo de aplicación de enzima Acrylaway según la dosis recomendada por el fabricante

N°	Código de muestra	Asparagina (g/L)	
		Réplica 1	Réplica 2
1	80 °C/10 µL/0 min	0,2113	0,2138
2	80 °C/10 µL/10 min	0,1005	0,1014
3	80 °C/10 µL/15 min	0,0564	0,0564
4	80 °C/10 µL/20 min	0,0440	0,0297
5	80 °C/10 µL/25 min	0,0327	0,0242
6	80 °C/10 µL/30 min	0,0129	0,0084

Los resultados mostrados en la **Figura 12** evidencian que, a diferencia de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada, la enzima Acrylaway L High T si es efectiva a temperaturas mayores a 60 °C, sin embargo se debe tener en cuenta que el contenido inicial de asparagina en el jugo de caña empleado para este ensayo es casi la mitad del contenido en los tratamientos anteriores, por lo que haría falta comprobar con un nuevo ensayo en las mismas condiciones sobre una muestra con una concentración de asparagina de aproximadamente 0,50 g/L.

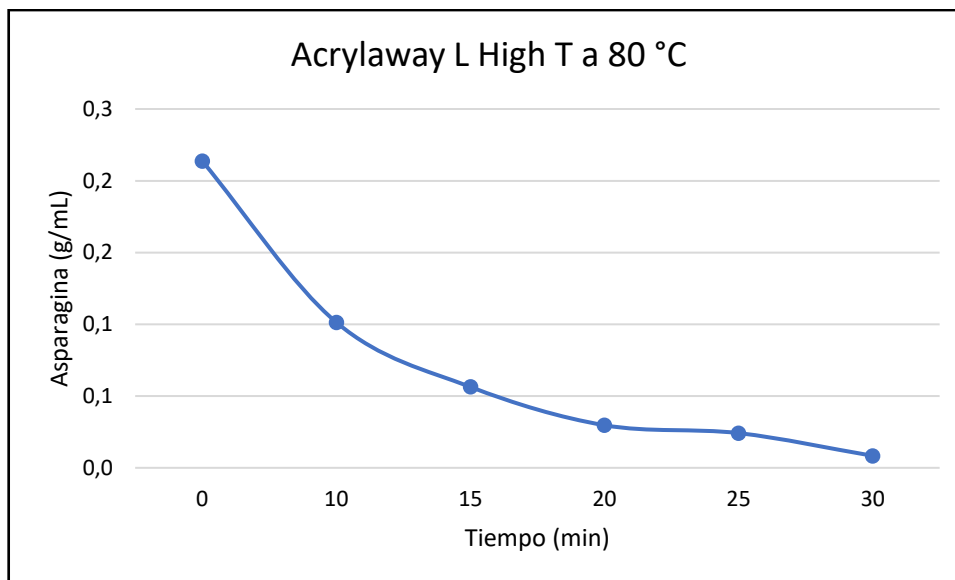


Figura 12. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway L High T a 80 °C

3.4.2. Aplicación de la enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada

Las muestras fueron obtenidas a partir de jugo extraído al tercer día de post cosecha, para tener condiciones similares a los ensayos realizados previamente. Cada tratamiento se aplicó a 100 mL de jugo de caña panelera, llegando a un total de 4 tratamientos.

En el primer ensayo realizado, todos los tratamientos fueron a una temperatura de 30 °C del jugo de caña panelera y con un pH de 6, el cual fue regulado con 0,08 g/100 mL de bicarbonato de sodio aproximadamente.

Las variaciones en la dosis de enzima fueron: la mitad de la dosis recomendada, es decir 0,005 g/100 mL de Acrylaway aproximadamente y un tercio de la dosis recomendada, es decir 0,003 g/100 mL de Acrylaway.

El resumen de los parámetros controlados en este ensayo se muestra en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Parámetros controlados en el ensayo de aplicación de enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada por el fabricante

Día post cosecha	Réplica	Temperatura (°C)	Bicarbonato de Sodio (g/100 mL)	Acrylaway (g/100 mL)	pH Inicial	pH Final
3	1	30	0,08171	0,00530	5,71	6,06
3	2	30	0,08211	0,00507	5,51	6,14
3	1	30	0,08200	0,00354	5,65	6,16
3	2	30	0,08079	0,00347	5,56	6,22

Se hizo una réplica para cada tratamiento, recolectándose muestras de jugo de 5 mL para el posterior análisis a los tiempos de actuación de 0, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos para asegurar la actividad de la enzima.

Al realizar los análisis de asparagina, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Resultados obtenidos en el ensayo de aplicación de enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada por el fabricante

N°	Código de muestra	Asparagina (g/L)	
		Réplica 1	Réplica 2
1	1/2- 30 °C - 0 min	0,2464	0,2103
2	1/2- 30 °C - 10 min	0,0985	0,1005
3	1/2- 30 °C - 15 min	0,0559	0,0747
4	1/2- 30 °C - 20 min	0,0346	0,0500
5	1/2- 30 °C - 25 min	0,0158	0,0302
6	1/2- 30 °C - 30 min	0,0124	0,0178
7	1/3- 30 °C - 0 min	0,2118	0,2167
8	1/3- 30 °C - 10 min	0,1148	0,1193
9	1/3- 30 °C - 15 min	0,0866	0,1049
10	1/3- 30 °C - 20 min	0,0619	0,0807
11	1/3- 30 °C - 25 min	0,0356	0,0549
12	1/3- 30 °C - 30 min	0,0188	0,0396

Al realizar una disminución en la dosis de enzima recomendada por el fabricante, también se obtuvo una reducción en la cantidad de asparagina presente en el jugo de caña de azúcar, lo que significa una posibilidad de disminuir costos de enzima para la reducción de asparagina. Sin embargo, la cantidad inicial de asparagina presente en el jugo usado para este ensayo fue de aproximadamente 0,22 g/L, que es casi la mitad del contenido inicial en el jugo usado en ensayos anteriores, por lo que habría que realizar futuros ensayos con otro jugo, por este motivo, los gráficos de la Figura 11 y la Figura 13 no se pueden superponer y comparar directamente en la temperatura de 30 °C.

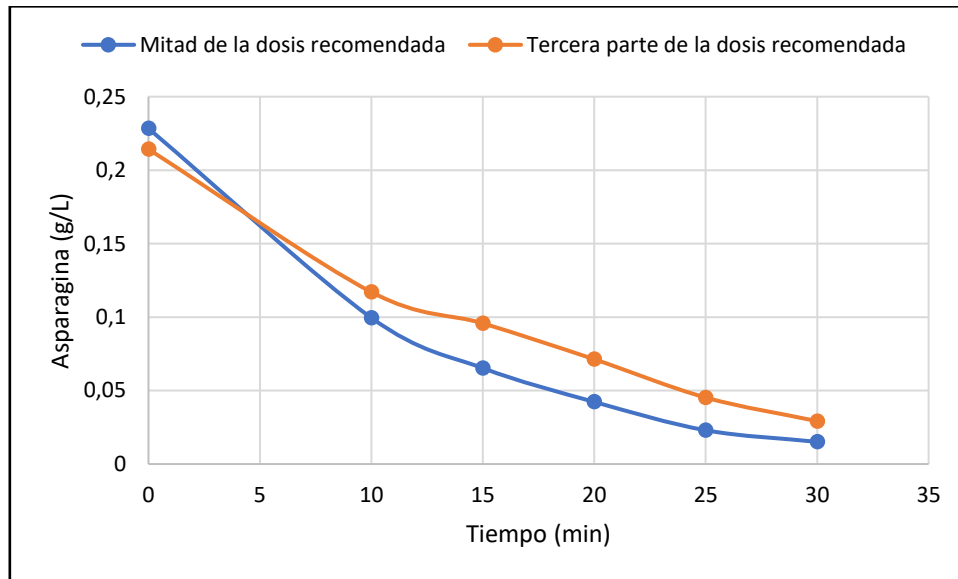


Figura 13. Resultados de tratamiento con enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada

3.5. Aplicación de enzima Acrylaway en jugo de caña panelera en módulos productivos

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos en el laboratorio, se hicieron tratamientos del jugo de caña con Acrylaway en algunos módulos de producción de panela granulada de la sierra de Piura, siguiendo el procedimiento establecido por los técnicos de Norandino en cada caso, con las condiciones sugeridas a partir de los resultados de laboratorio.

3.5.1. Aplicación de la enzima Acrylaway según la dosis recomendada

Se realizaron 3 ensayos de aplicación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada a escala de módulo productivo con el fin de comprobar los resultados obtenidos a escala de laboratorio. Estos ensayos fueron realizados por personal de la Cooperativa Agraria Norandino y del Proyecto Panela de la UDEP, y las muestras de jugo se analizaron posteriormente. Los códigos fueron asignados por Norandino.

En todos los ensayos se recolectaron muestras de jugo para su posterior análisis, tanto del jugo sin regulador de pH como después de haberse añadido el regulador de pH

(bicarbonato de sodio) y a los tiempos de actuación de la enzima de 10, 20, 30 y 45 minutos. Además, se inactivó la enzima sumergiendo el envase conteniendo la muestra en agua hirviendo justo después de recolectarla. Las muestras fueron congeladas para ser enviadas a Piura y se mantuvieron así hasta su análisis.

En el primer ensayo realizado en el módulo Cuñala del 23 al 26 de junio del 2021, la enzima fue añadida a la temperatura ambiente del módulo, que oscilaba entre 20 °C y 25 °C aproximadamente durante los 4 días, donde se procesaron 8 lotes de jugo de caña panelera con enzima Acrylaway en polvo. De este primer ensayo, se obtuvieron 56 muestras para análisis de asparagina y 12 muestras de panela granulada.

Los resultados de los análisis de asparagina se muestran en la **Tabla 21**. La descripción “0 min” significa que es el jugo con pH regulado, justo antes de la aplicación del Acrylaway. Ya que estos ensayos de Acrylaway en módulo productivo eran muy importantes para las decisiones operativas de Norandino, se optó por realizar réplicas en todas las muestras analizadas.

Tabla 21. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Cuñala con la dosis recomendada por el fabricante

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
1	Día 01 - Testigos	CU-2306-TS-01	Testigo sin regulador	0,3850	0,3949
2		CU-2306-TC-02	Testigo con regulador	0,4172	0,4394
3	Día 01 - Ensayo 1	CU-2306-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,3860	0,3939
4		CU-2306-CA1- J10	Acrylaway 10 min	0,1405	0,1717
5		CU-2306-CA1-J20	Acrylaway 20 min	0,0653	0,0648
6		CU-2306-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0109	0,0119
7		CU-2306-CA1-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0119	0,0054
8		CU-2306-CA1-J45b	Acrylaway 45 min "b"	-0,0356	0,0000
9	Día 01 - Ensayo 2	CU-2306-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,4365	0,4335
10		CU-2306-CA2-J10	Acrylaway 10 min	0,2049	0,1984
11		CU-2306-CA2-J20	Acrylaway 20 min	0,1039	0,1044
12		CU-2306-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0104	0,0109
13		CU-2306-CA2-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0163	0,0144
14		CU-2306-CA2-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0124	0,0099
15	Día 02 - Testigos	CU-2406-TS-01	Testigo sin regulador	0,4083	0,4097
16		CU-2406-TC-02	Testigo con regulador	0,3697	0,3825
17	Día 02 - Ensayo 1	CU-2406-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,3603	0,3508
18		CU-2406-CA1-J10	Acrylaway 10 min	0,2479	0,2415
19		CU-2406-CA1-J20	Acrylaway 20 min	0,0614	0,1272
20		CU-2406-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0450	0,0440
21		CU-2406-CA1-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0193	-0,0059
22		CU-2406-CA1-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0252	-0,0099
23	Día 02 - Ensayo 2	CU-2406-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,2489	0,2054
24		CU-2406-CA2-J10	Acrylaway 10 min	0,1890	0,1856

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
25		CU-2406-CA2-J20	Acrylaway 20 min	0,0534	0,0554
26		CU-2406-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0262	0,0242
27		CU-2406-CA2-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0035	-0,0119
28		CU-2406-CA2-J45b	Acrylaway 45 min "b"	-0,0144	0,0139
29	Día 03 - Testigos	CU-2506-TS-01	Testigo sin regulador	0,5379	0,5206
30		CU-2506-TC-02	Testigo con regulador	0,2855	0,2816
31	Día 03 - Ensayo 1	CU-2506-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,5067	0,4597
32		CU-2506-CA1-J10	Acrylaway 10 min	0,3588	0,3355
33		CU-2506-CA1-J20	Acrylaway 20 min	0,0297	0,0346
34		CU-2506-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0109	0,0129
35		CU-2506-CA1-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0015	0,0084
36		CU-2506-CA1-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0000	0,0084
37	Día 03 - Ensayo 2	CU-2506-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,4686	0,4683
38		CU-2506-CA2-J10	Acrylaway 10 min	0,2652	0,2845
39		CU-2506-CA2-J20	Acrylaway 20 min	0,1395	0,1321
40		CU-2506-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0703	0,0322
41		CU-2506-CA2-J45a	Acrylaway 45 min "a"	0,0135	0,0104
42		CU-2506-CA2-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0812	0,0025
43	Día 04 - Testigos	CU-2606-TS-01	Testigo sin regulador	0,2247	0,2192
44		CU-2606-TC-02	Testigo con regulador	0,4953	0,4394
45	Día 04 - Ensayo 1	CU-2606-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,4592	0,4533
46		CU-2606-CA1-J10	Acrylaway 10 min	0,2311	0,2291
47		CU-2606-CA1-J20	Acrylaway 20 min	0,1059	0,0995
48		CU-2606-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0139	0,0183
49		CU-2606-CA1-J45a	Acrylaway 45 min "a"	-0,0124	0,0079
50		CU-2606-CA1-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0020	0,0084
51	Día 04 - Ensayo 2	CU-2606-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,4780	0,4553
52		CU-2606-CA2-J10	Acrylaway 10 min	0,3132	0,2875
53		CU-2606-CA2-J20	Acrylaway 20 min	0,2182	0,2073
54		CU-2606-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0777	0,0886
55		CU-2606-CA2-J45a	Acrylaway 45 min "a"	-0,0059	0,0134
56		CU-2606-CA2-J45b	Acrylaway 45 min "b"	0,0119	-0,0089

Después de realizar el primer tratamiento en el módulo Cuñala, los resultados evidenciaron una disminución significativa en el contenido de asparagina presente en el jugo de caña a partir de los 20 minutos de actuación de la enzima, como se muestra en la **Figura 14**. Al añadir el regulador de pH (bicarbonato de sodio) se presenta un aumento o disminución en el contenido de asparagina, a este comportamiento no se le ha podido encontrar una explicación por el momento. Los resultados mostrados son los promedios de los obtenidos en los análisis de muestras por duplicado.

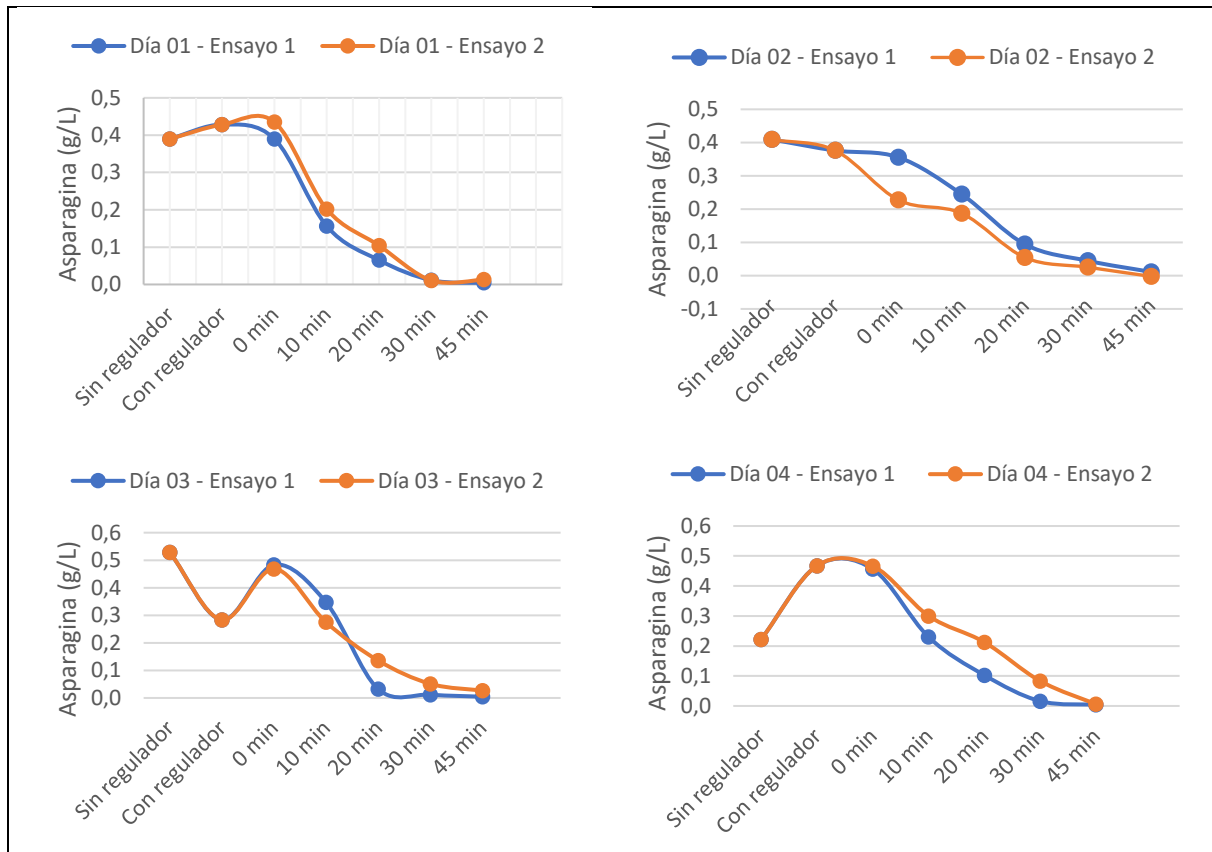


Figura 14. Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Cuñala

En el segundo ensayo con Acrylaway realizado en el módulo Taylin del 13 al 15 de julio del 2021, la enzima fue añadida a la temperatura ambiente del módulo, que oscilaba entre 20 °C y 25 °C aproximadamente, donde se procesaron 8 lotes de jugo de caña panelera con enzima Acrylaway en polvo. De este segundo ensayo se obtuvieron 24 muestras para análisis de asparagina y 8 muestras de panela granulada.

Los resultados de los análisis de asparagina se muestran la **Tabla 22**. La descripción “0 min” significa que es el jugo con pH regulado, justo antes de la aplicación del Acrylaway. Ya que estos ensayos de Acrylaway en módulo productivo eran muy importantes para las decisiones operativas de Norandino, en el módulo se colectaron muestras por triplicado en cada uno de los días, y además de eso, se optó por realizar réplicas en todos los análisis de muestras.

Tabla 22. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Taylin con la cantidad recomendada por el fabricante

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
1	Día 01 - Testigos	TA-1307-TS-01	Testigo sin regulador	0,4078	0,4340
2		TA-1307-TC-02	Testigo con regulador	0,4864	0,4894
3	Día 01 - Ensayo 1	TA-1307-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,4572	0,4563
4		TA-1307-CA1- J20	Acrylaway 20 min	0,0930	0,1019

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
5	Día 01 - Ensayo 2	TA-1307-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0421	0,0455
6		TA-1307-CA1-J45	Acrylaway 45 min	0,0198	0,0163
7		TA-1307-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,4617	0,4587
8		TA-1307-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0861	0,0871
9		TA-1307-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0089	0,0069
10	Día 01 - Ensayo 3	TA-1307-CA2-J45	Acrylaway 45 min	0,0064	0,0025
11		TA-1307-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,4327	0,4924
12		TA-1307-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0198	0,0124
13		TA-1307-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0114	0,0109
14	Día 02 - Testigos	TA-1307-CA2-J45	Acrylaway 45 min	0,0119	0,0109
15		TA-1507-TS-01	Testigo sin regulador	0,4577	0,4622
16	Día 02 - Ensayo 1	TA-1507-TC-02	Testigo con regulador	0,4553	0,4449
17		TA-1507-SA1- J0	Sin enzima con regulador	0,5630	0,5605
18		TA-1507-CA1- J20	Acrylaway 20 min	0,0643	0,0633
19		TA-1507-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0064	0,0054
20	Día 02 - Ensayo 2	TA-1507-CA1-J45	Acrylaway 45 min	0,0035	0,0035
21		TA-1507-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,5406	0,5422
22		TA-1507-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0129	0,0124
23		TA-1507-CA2-J30	Acrylaway 30 min	-0,0124	-0,0094
24	Día 02 - Ensayo 3	TA-1507-CA2-J45	Acrylaway 45 min	-0,0124	-0,0035
25		TA-1507-SA2- J0	Sin enzima con regulador	0,3820	0,3988
26		TA-1507-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0718	0,0604
27		TA-1507-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0114	0,0124
28		TA-1507-CA2-J45	Acrylaway 45 min	0,0059	0,0109

Los cuales también son mostrados en la **Figura 15**, donde se aprecia la disminución significativa en el contenido de asparagina en el jugo de caña a partir de los 20 minutos de actuación. Al añadir el regulador de pH (bicarbonato de sodio) se presenta un aumento o disminución en el contenido de asparagina, a este comportamiento no se le ha podido encontrar una explicación por el momento. Los resultados mostrados son el promedio de lo obtenido en los análisis de muestras.

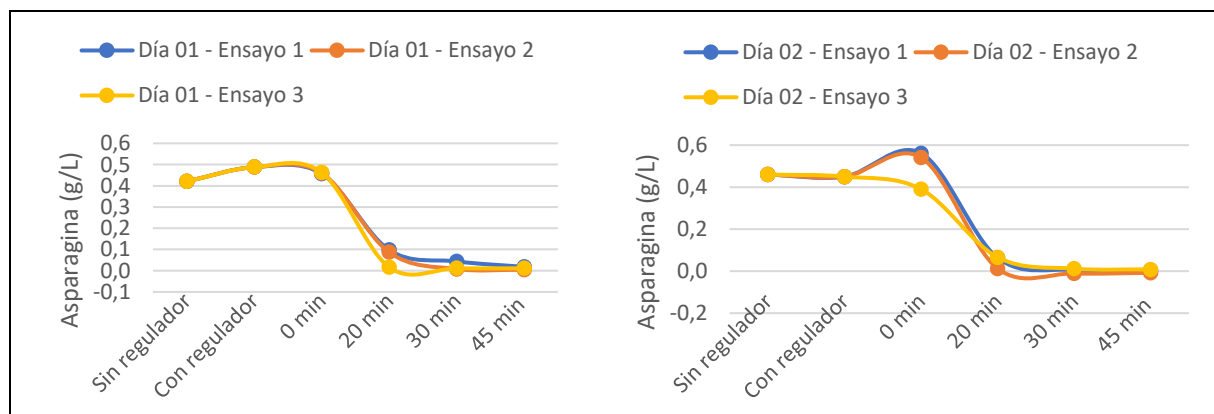


Figura 15 Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Taylin

En el tercer ensayo con Acrylaway realizado en el módulo La Peña del 13 al 15 de julio del 2021, la enzima fue añadida a la temperatura ambiente del módulo, que oscilaba entre 20 °C y 25 °C aproximadamente, donde se procesaron 4 lotes de jugo de caña panelera con enzima Acrylaway, de las cuales se obtuvieron 18 muestras para análisis de asparagina y 4 muestras de panela.

Los resultados de los análisis de asparagina se muestran la **Tabla 23** mostrada a continuación. Ya que estos ensayos de Acrylaway en módulo productivo eran muy importantes para las decisiones operativas de Norandino, en el módulo se colectaron muestras por triplicado en cada uno de los días, y además de eso, se optó por realizar réplicas en todos los análisis de muestras.

Tabla 23. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo La Peña con la cantidad recomendada por el fabricante

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
1	Día 01 - Testigos	PL-1607-TS-01	Testigo sin regulador	0,0035	0,0168
2		PL-1607-TC-02	Testigo con regulador	0,0539	0,0539
3	Día 01 - Ensayo 1	PL-1607-SA1- J0	Acrylaway 10 min	0,0144	0,0178
4		PL-1607-CA1- J20	Acrylaway 20 min	0,0109	0,0139
5		PL-1607-CA1-J30	Acrylaway 30 min	0,0119	0,0144
6		PL-1607-CA1-J45	Acrylaway 45 min	0,0129	0,0099
7	Día 01 - Ensayo 2	PL-1607-SA2- J0	Acrylaway 10 min	0,0134	0,0158
8		PL-1607-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0109	0,0134
9		PL-1607-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0124	0,0084
10		PL-1607-CA2-J45	Acrylaway 45 min	0,0079	0,0084
11	Día 01 - Ensayo 3	PL-1607-SA2- J0	Acrylaway 10 min	0,0109	0,0129
12		PL-1607-CA2- J20	Acrylaway 20 min	0,0109	0,0124
13		PL-1607-CA2-J30	Acrylaway 30 min	0,0069	0,0114
14		PL-1607-CA2-J45	Acrylaway 45 min	0,0129	0,0119

Los resultados mostrados en la **Figura 16**, permiten apreciar la disminución del contenido de asparagina en la caña de azúcar desde los 10 minutos. Sin embargo, es imprescindible mencionar que la cantidad inicial de asparagina en este jugo de caña es relativamente baja, en corto tiempo es degradada por la enzima. Al añadir el regulador de pH (bicarbonato de sodio) se presenta un aumento en el contenido de asparagina, a este comportamiento no se le ha podido encontrar una explicación por el momento.

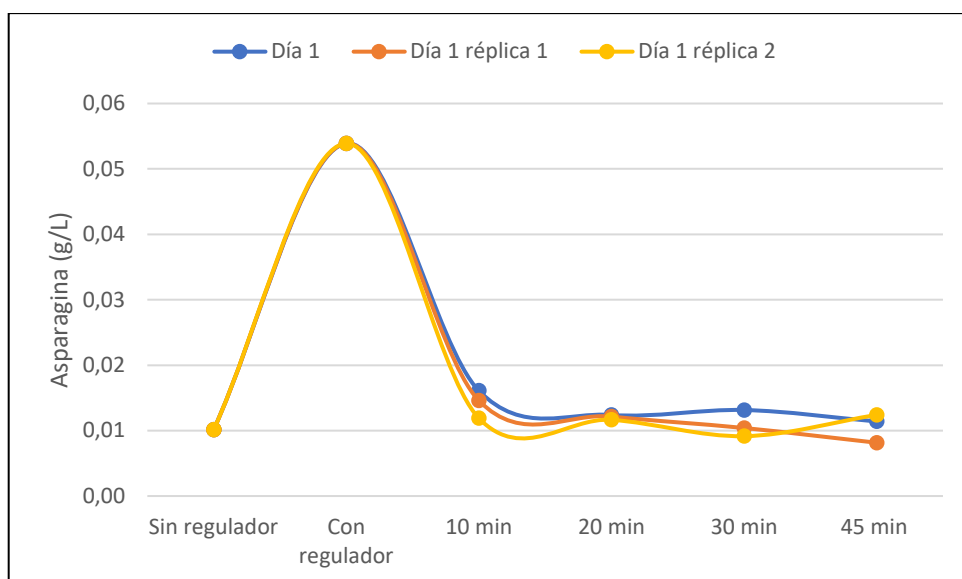


Figura 16. Resultados de aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo La Peña

Con lo mencionado anteriormente, se pueden comprobar los resultados obtenidos en el laboratorio.

La Cooperativa Agraria Norandino y el Proyecto Panela UDEP, mandaron a analizar muestras de panela granulada provenientes del jugo de caña analizado en los módulos de Cuñala, Taylin y La Peña, con el fin de evaluar la correlación que existe entre el contenido de asparagina en el jugo de caña y el contenido de acrilamida en la panela granulada como se muestra en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Resultados de acrilamida a partir de jugo de caña de muestras analizadas por método enzimático con tratamiento de Acrylaway

N°	Módulo del proceso	Código Panela	Descripción	Asparagina (g/L)	Acrilamida (ppb)
1	Cuñala	FUP-01	Sin enzima día 1	0,4283	4109
2		FUP-02	Acrylaway 1° Lote	-0,0046	673
3		FUP-03	Acrylaway 2° Lote	0,0133	216
4		FUP-04	Sin enzima día 2	0,2942	2412
5		FUP-05	Acrylaway 1° Lote	0,0072	53
6		FUP-06	Acrylaway 2° Lote	-0,0022	44
7		FUP-07	Sin enzima día 3	0,4064	2726
8		FUP-08	Acrylaway 1° Lote	0,0081	108
9		FUP-09	Acrylaway 2° Lote	0,0269	175
10		FUP-10	Sin enzima día 4	0,3447	3453
11		FUP-11	Acrylaway 1° Lote	0,0015	34
12		FUP-12	Acrylaway 2° Lote	0,0026	204
13	Taylin	FUP-13	Sin enzima día 1	0,4875	5147
14		FUP-14	Acrylaway 1° Lote	0,0181	477

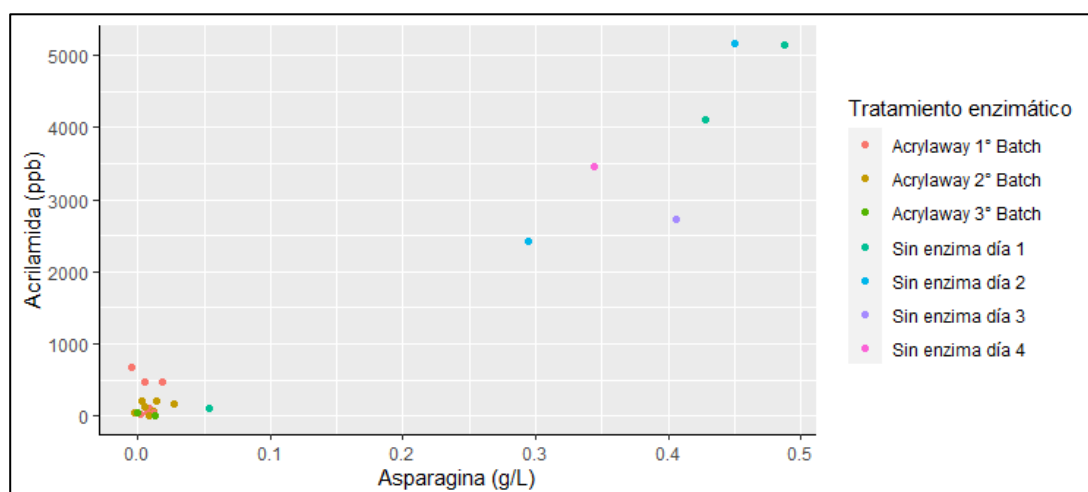
15		FUP-15	Acrylaway 2° Lote	0,0045	124
16		FUP-16	Acrylaway 3° Lote	0,0114	33
17		FUP-17	Sin enzima día 2	0,4501	5152
18		FUP-18	Acrylaway 1° Lote	0,0050	471
19		FUP-19	Acrylaway 2° Lote	0,0112	58
20		FUP-20	Acrylaway 3° Lote	0,0000	50
21		FUP-21	Sin enzima día 1	0,0539	113
22	La Peña	FUP-22	Acrylaway 1° Lote	0,0114	38
23		FUP-23	Acrylaway 2° Lote	0,0082	10
24		FUP-24	Acrylaway 3° Lote	0,0124	<10

Nota: Obtenido de (Estudio conjunto Cooperativa Agraria Norandino, Universidad de Piura y Bioversity International, 2021)

Los resultados de acrilamida mostrados en la **Figura 17**, evidencian la relación entre la asparagina y acrilamida con una correlación de 0,97 obtenido en el programa RStudio. Por lo que es posible predecir el contenido de acrilamida en el producto final de panela granulada a partir del contenido inicial de asparagina presente en el jugo de caña.

También muestra la efectividad del tratamiento enzimático por medio de la aplicación de enzima Acrylaway 3500 BG para la reducción de asparagina, y por tanto de acrilamida en la panela granulada.

Figura 17. Gráfica de dispersión entre las variables asparagina y acrilamida con tratamiento de Acrylaway en módulos



3.5.2. Aplicación de la enzima Acrylaway con variación en la dosis recomendada

Se realizó un ensayo de aplicación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada en el módulo Aroma Monterina el 27 de agosto del 2021, en el que se procesaron 4 lotes de jugo de caña panelera con enzima, de las cuales se obtuvieron 18 muestras para análisis de asparagina.

La enzima fue añadida a la temperatura ambiente del módulo, que oscilaba entre 20 °C y 25 °C aproximadamente. Se usó distintas dosis de Acrylaway: 1/3 de la dosis recomendada en el 2° lote, es decir 0,003 g/100 mL aproximadamente, mientras que en el 3° y 4° lote se añadió 1/2 de la dosis recomendada, es decir 0,005 g/100 mL aproximadamente, mientras que en el 1er lote se añadió la dosis recomendada de 0,01 g/100 mL aproximadamente.

Además, se inactivó la enzima sumergiendo cada muestra en agua hirviendo justo después de recolectarla.

Los resultados de los análisis de asparagina se muestran en la **Tabla 25**. Ya que estos ensayos de Acrylaway en módulo productivo eran muy importantes para las decisiones operativas de Norandino, se optó por realizar réplicas en todos los análisis de muestras.

Tabla 25. Resultados obtenidos en la aplicación de la enzima Acrylaway en el módulo Aroma Monterina con variación en la dosis recomendada por el fabricante

N°	Día de muestreo	Código de muestra	Descripción	Asparagina (g/L)	
				Réplica 1	Réplica 2
1	Día 01 - Testigo	AM-01	Testigo sin regulador	0,4504	0,4449
2		AM-02	Testigo con regulador	0,5013	0,5176
3	Día 01 - Ensayo 1	AM-03	Acrylaway 1/3 0 min	0,4370	0,4092
4		AM-04	Acrylaway 1/3 20 min	0,3855	0,3835
5		AM-05	Acrylaway 1/3 30 min	0,3499	0,3796
6		AM-06	Acrylaway 1/3 45 min	0,3454	0,3489
7	Día 01 - Ensayo 2	AM-07	Acrylaway 1/2 0 min	0,4884	0,4993
8		AM-08	Acrylaway 1/2 20 min	0,2479	0,3123
9		AM-09	Acrylaway 1/2 30 min	0,2464	0,2425
10		AM-10	Acrylaway 1/2 45 min	0,0089	0,0059
11	Día 01 - Ensayo 3	AM-11	Acrylaway 0 min	0,4394	0,4691
12		AM-12	Acrylaway 20 min	0,1202	0,1059
13		AM-13	Acrylaway 30 min	0,0094	0,0035
14		AM-14	Acrylaway 45 min	0,0074	0,0104
15	Día 01 - Ensayo 4	AM-15	Acrylaway 1/2 0 min	0,3375	0,3469
16		AM-16	Acrylaway 1/2 20 min	0,3325	0,3226
17		AM-17	Acrylaway 1/2 30 min	0,2727	0,3325
18		AM-18	Acrylaway 1/2 45 min	0,0124	0,0158

Los resultados mostrados en la **Figura 18**, permiten apreciar la comparación entre las diferentes dosis de enzima aplicada al jugo de caña. Con 1/3 de la dosis recomendada, la enzima no consigue reducir el contenido de asparagina, mientras que con 1/2 de la dosis recomendada, se logra la disminución a los niveles conseguidos con la dosis completa, pero en un tiempo de 45 minutos, que son 15 minutos más que lo requerido para la dosis completa. Al añadir el regulador de pH (bicarbonato de sodio) se presenta un aumento en el contenido de asparagina, a este comportamiento no se le ha podido encontrar una explicación por el momento.

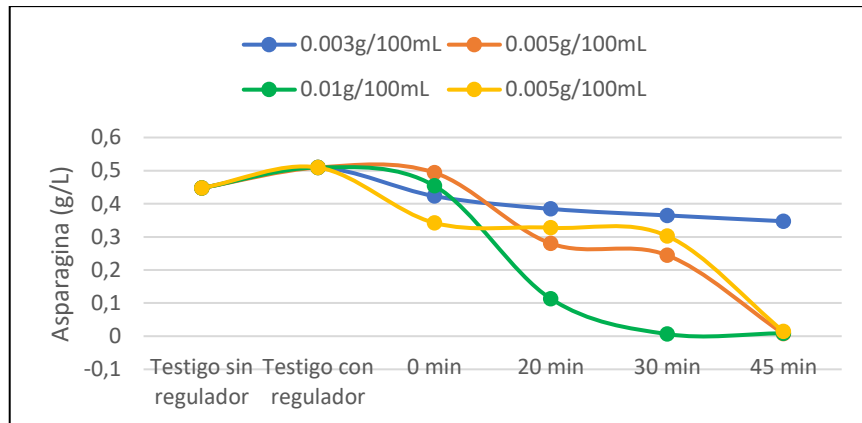


Figura 18. Resultados de aplicación de diferentes dosis de enzima Acrylaway en el módulo Aroma Monterina

Conclusiones

Después de evaluar el método enzimático, en el cual se cuantifica la cantidad de asparagina por medio de la adición y posterior reacción con la asparaginasa, se ha comprobado que permite cuantificar la cantidad de asparagina presente en el jugo de caña por medio de un método rápido y sencillo de implementar, con un coeficiente de correlación del 99,57 %.

Con los resultados obtenidos se pone en evidencia que la formación de acrilamida depende en gran medida del contenido inicial de asparagina presente en el jugo de caña y no tanto del proceso que puedan darse en cuanto a temperatura y tiempos, los cuales ya fueron evaluados en estudios anteriores encontrando una gran variabilidad, sin evidencia de una correlación con el contenido de acrilamida.

El estudio realizado en el presente trabajo permite reportar el contenido de asparagina libre en jugo de caña de azúcar de una variedad de caña poco estudiada en Perú, como la usada en la producción de panela, ya que, a pesar de presentarse en pequeñas cantidades, resulta siendo crucial para la formación de acrilamida.

La enzima Acrylaway 3500 BG granulada puede ser añadida en el rango de temperaturas de 20 °C – 40 °C, pues no se evidencia una diferencia significativa entre su efectividad.

La aplicación de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada en módulos productivos puede hacerse efectiva desde los 20 minutos de aplicación, por lo que se recomienda mantener el tiempo de aplicación entre los 30 y 35 minutos, para asegurar su efectividad.

Al aplicar la mitad de la cantidad recomendada por el fabricante de la enzima Acrylaway 3500 BG granulada en módulos se obtiene una reducción a los 30 minutos de aplicación, por lo que se recomienda hacer una comparación entre los recursos requeridos al momento de tomar una decisión en cuanto a la dosis de la enzima a utilizar.

No es estrictamente necesario llegar a una concentración de 0 g/L de asparagina en el jugo para obtener valores de acrilamida por debajo de los 800 ppb. En el presente trabajo de investigación, las muestras cuyo contenido de asparagina fue menor que 0,2 g/L, obtuvieron niveles de acrilamida por debajo de 800 ppb.



Recomendaciones

Se recomienda que la Cooperativa Agraria Norandino implemente este método de cuantificación de asparagina en su laboratorio de control de calidad de la Planta Panela.

Se recomienda continuar analizando muestras de jugo y de panela de distintos módulos a lo largo del tiempo y de varios años, de modo que con gran número de datos de contenido de asparagina y de acrilamida, se construya una base de datos con la que se pueda realizar prácticas de regresión. Si se sigue verificando una buena correlación asparagina-acrilamida, se podría optar por analizar solo asparagina, y así contribuir a bajar los costos del análisis del contenido de acrilamida en la panela granulada, que exigen los compradores europeos a las cooperativas exportadoras.

Para evitar sesgos en los futuros análisis relacionados a la composición del jugo de caña de azúcar se recomienda extraer como mínimo 2 litros de jugo de caña, ya que existen factores como la maduración que pueden afectar significativamente los resultados.

Se recomienda continuar con los ensayos utilizando la enzima Acylaway L High T, teniendo como variables principales la cantidad y la temperatura de aplicación, con el fin de encontrar los parámetros adecuados para su aplicación en jugo de caña de azúcar.



Referencias bibliográficas

- ABC Bienestar. (24 de octubre de 2019). *¿Cuál es el tipo de azúcar más saludable?* Obtenido de https://www.abc.es/bienestar/alimentacion/abci-cual-tipo-azucar-mas-saludable-201910240310_noticia.html
- Agencia Agraria de Noticias Agraria.pe. (17 de enero de 2018). *Perú debe multiplicar por diez su producción de panela para abastecer la demanda en el exterior.* Obtenido de <https://agraria.pe/noticias/peru-debe-multiplicar-por-diez-su-produccion-de-15721>
- Agencia Agraria de Noticias Agraria.pe. (02 de noviembre de 2020). *Exportación de panela por parte de Norandino crecería 56% en volumen este año.* Obtenido de <https://agraria.pe/noticias/exportacion-de-panela-por-parte-de-norandino-creceria-56-en--22864>
- Analitek. (2016). *Cromatografía líquida - Espectrometría de masas.* Obtenido de https://analitek.com/cromatografia_liquidos_espectrometria_masas/
- Ballón Cossío, D. (2014). L-Asparaginasa, un arma de doble filo pero de vital importancia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría.* Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752014000100007
- Carrasco, J. C. (02 de noviembre de 2020). *Agraria.pe Agencia agraria de noticias.* Obtenido de <https://agraria.pe/noticias/exportacion-de-panela-por-parte-de-norandino-creceria-56-en--22864>
- Chen, J., García, C. A., & Álvarez Medina, C. (1991). *Manual del azúcar de caña para fabricantes de azúcar de caña y químicos especializados.* México: Limusa.
- Cooperativa Sin Fronteras. (24 de febrero de 2017). *Exportaciones de panela en manos campesinas.* Recuperado el 28 de diciembre de 2020, de <http://www.cooperativasinfronteras.net/index.php/noticias/335-peru-exportaciones-de-panela-en-manos-campesinas>
- Cooperativas Sin Fronteras - Desarrollo, Crecimiento e Integración Agrícola. (31 de enero de 2020). *Cooperativas Sin Fronteras.* Obtenido de <http://www.cooperativasinfronteras.net/index.php/noticias/335-peru-exportaciones-de-panela-en-manos-campesinas>

- Dearfield, K., Abernathy, C., Ottley, M., Brantner, J., & Hayes, P. (1988). Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 45-77.
- EcuRed. (7 de febrero de 2012). *Asparagina*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Asparagina#Fuentes_de_procedencia
- Elbashir , A., Ali Omar, M., Wan Ibrahim, W. A., Schmitz, O., & Aboul-Enein, H. (2014). Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Critical Reviews in analytical chemistry*, 107-141.
- Estudio conjunto Cooperativa Agraria Norandino, Universidad de Piura y Bioversity International. (2021). Datos obtenidos en el marco del estudio conjunto de la mitigación de acrilamida en panela, entre las instituciones: Cooperativa Agraria Norandino, Universidad de Piura y Bioversity International. *Con financiamiento del Programa SeCompetitivo de la Cooperación Suiza y otras fuentes*.
- Fennel , T., & Friedman, M. (2005). Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Advances in experimental medicine and biology*, 109-116.
- FoodDrink Europe. (2019). Obtenido de Acrylamide Toolbox 2019
- Higiene ambiental. (21 de octubre de 2019). *Higieneambiental.com*. Obtenido de <https://higieneambiental.com/higiene-alimentaria/acrylamide-toolbox-para-prevenir-la-formacion-de-acrilamida-en-alimentos>
- Instituto Nacional de Calidad. (2013). *NTP 207.200 2013 PANELA GRANULADA. Definiciones y requisitos* (primera ed.). Lima.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria. (4 de agosto de 2021). Congreso Internacional de la Panela 2021. Piura, Piura, Perú.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos . (2018). *Control de acrilamida en alimentos procesados durante los años 2015 y 2016*. Bogotá.
- Larrahondo, J., & Villegas, F. (1995). Control y características de maduración. En C. d. Colombia, *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia* (pág. 17). Cali.
- López Ruiz, B. (2018). cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Capítulo 1. Obtenido de https://www.youtube.com/watch?v=woJp1-jdL5M&ab_channel=MartaSanchez-PaniaguaUCM
- Matsui , T., & Kitagawa, H. (1987). Seasonal Changes of Activities of Asparagine Synthetase and Asparaginase in Relation to Asparagine Content in Sugarcane. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 673-679.
- Matsui, T., & Kitagawa, H. (1987). Seasonal Changes of Activities of Asparagine Synthetase and Asparaginase in Relation to Asparagine Content in Sugarcane. 7.
- Megazyme. (2018). *L-asparagina / L-glutamina/ Amoniaco - Procedimiento de ensayo*. Irlanda.

- Mercados & Regiones. (21 de mayo de 2020). *Regiones del norte: incremento en la exportación de la panela orgánica ha beneficiado a 700 familias en pleno Covid-19*. Obtenido de <https://mercadosyregiones.com/2020/05/21/regiones-del-norte-incremento-en-la-exportacion-de-la-panela-organica-ha-beneficiado-a-700-familias-en-pleno-covid-19/>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). *Agrocadena de la caña de azúcar para la producción de dulce*. Costa Rica.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2017). Boletín N° 5, Producción de caña de azúcar en el Perú.
- Mottram, D., Wedzicha, B., & Dodson, A. (03 de octubre de 2002). *Nature*. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/419448a#citeas>
- Nielsen, N., Granby, K., Hedegaard, R., & Skibsted, L. (2006). A liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. *Analytica Chimica Acta*, 211-220.
- Novozymes. (2022). *Acrylaway® HighT*. Obtenido de <https://biosolutions.novozymes.com/en/baking/products/reduce-acrylamide/acrylawayhigh>
- Novozymes. (2022). *Acrylaway® L*. Obtenido de <https://biosolutions.novozymes.com/en/baking/products/reduce-acrylamide/acrylawayL>
- Novozymes. (2022). *Draft EU legislation on acrylamide: what might it mean for your business?* Obtenido de <https://biosolutions.novozymes.com/en/baking/insights/article/acrylamide-legislation-eu-latest-update-novozymes>
- Novozymes. (2022). *Reducing acrylamide*. Obtenido de <https://biosolutions.novozymes.com/en/baking/acrylamide-reduction>
- PERUCAÑA Asociación Peruana de Agroindustriales de Azúcar y Derivados. (2019). *Memoria Anual 2019*. Lima.
- Rimaicuna Zurita, D. P., & Liviapoma Correa, A. M. (2019). *Cuantificación de acrilamida y humedad de panela granulada por los factores de almacenamiento de caña, regulador del jugo y temperatura de salida [Tesis de título, Universidad Nacional de Piura]*. Repositorio Institucional Universidad Nacional de Piura.
- Robinson, N., Vinall, K., Schmidt, S., & Lakshmanan, P. (2019). Amino acids are a nitrogen source for sugarcane. 8.
- Ruesta Campoverde, N. A., Távara Villegas, J. A., & Neira Espejo, M. E. (2018). Comportamiento productivo de la variedad de caña PVF03-115 para la producción de panela en valles interandinos de la Región Piura, Perú. *Instituto Nacional de Innovación Agraria*, 8.
- Santín Sánchez, M. (2018). *Evaluación del contenido de acrilamida durante el procesamiento de panela granulada y propuesta de reducción [Tesis de título, Universidad de Piura]*. Repositorio Institucional PIRHUA, Piura.

- Science Unfiltered. (18 de diciembre de 2017). *¿Qué es la HPLC y cómo funciona?* Obtenido de <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>
- Stadler, R., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P., . . . Riediker, S. (03 de octubre de 2002). *Nature*. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/419449a#citeas>
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*.
- U.S. Food & Drug administration. (2019). *Liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC - MS/MS) method for the determination of NDMA in ranitidine drug substance and solid dosage drug product*.
- Unión Europea. (2019). *Acrylamide Toolbox 2019*.
- Vargas Lasso, J., Talero Pérez, Y., Trujillo Suárez, F., & Camelo Caballero, L. (2014). Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida. *Ciencia en Desarrollo*, 99-105.



Apéndices





Apéndice A. Evidencia fotográfica de la realización de la tesis



Kit enzimático K-ASNAM de la empresa Megazyme.



Contenido del kit enzimático K-ASNAM.



Equipo utilizado para destilar agua, la cuál es requerida para los análisis enzimáticos.



Uso de espectrofotómetro para medir la absorbancia de la muestra de jugo de caña durante los análisis.

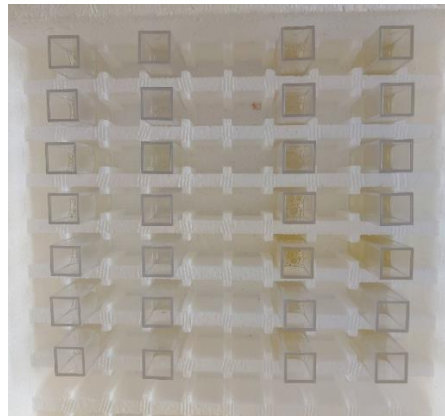


Muestras de jugo de caña debidamente identificadas.

Muestras de jugo de caña congeladas antes de iniciar con los análisis.



Filtración de una muestra de jugo de caña de azúcar previa al análisis enzimático.



Cubetas de plástico en las que se realiza el análisis enzimático.



Cañas de azúcar almacenadas en instalaciones de la planta Panela de la Cooperativa Agraria Norandino para los ensayos de asparagina según los días post cosecha.



Extractor eléctrico, ubicado en las instalaciones de la planta Panela de la Cooperativa Agraria Norandino, utilizado para la extracción de muestras de jugo de caña en los ensayos de asparagina según días post cosecha.



Proceso de extracción de jugo de caña para los ensayos de asparagina según días post cosecha.



Tratamiento con la enzima Acrylaway 3500 BG en el jugo de caña de azúcar a nivel de laboratorio.



Muestras debidamente identificadas pertenecientes a los ensayos de tratamiento con Acrylaway 3500 BG realizados en los módulos productivos de la Cooperativa Agraria Norandino.

Anexo





Anexo A. Formato manual de procedimiento del kit K-ASNAM

Longitud de onda:	340 nm
Cubetas:	Paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura:	~ 25 °C
Volumen final:	2,34 mL (amoníaco y L-glutamina) 2,36 mL (L-asparagina)
Solución de muestra:	0,2-7,0 µg de amoníaco por cubeta o 0,50-50 µg de L-asparagina por cubeta o 0,5-50 µg de L-glutamina por cubeta (en un volumen de muestra de 0,1-1,0 mL)
Leer contra el aire (sin cubeta en la trayectoria de la luz) o contra el agua	

Pipetear en cubetas	Amoníaco		GLN/ASN	
	Blanco	Muestra	Blanco	Muestra
Solución 1 (tampón, 4,9)	-	-	0,20 mL	0,20 mL
Solución de muestra	-	0,10 mL	-	0,10 mL
Suspensión 4 (glutaminasa)	-	-	0,02 mL	0,02 mL
Mezclar^a e incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego añade:				
Agua destilada (a ~ 25 °C)	1,82 mL	1,72 mL	1,60 mL	1,50 mL
Solución 2 (tampón, 8,0)	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL	0,30 mL
Solución 3 (NADPH)	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL
Mezclar ^a y leer las absorbancias de las soluciones (A1) después de aprox. 5 minutos. Luego comience la reacción agregando:				
Suspensión 5 (GIDH)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
Mezclar ^a y leer las absorbancias de las soluciones (A2) al final de la reacción (aprox. 5 min). Si la reacción no se ha detenido después de 5 minutos, continúe leyendo las absorbancias a intervalos de 1 minuto hasta que las absorbancias sigan siendo las mismas. Luego añade:				
Suspensión 6 (asparaginasa)	-	-	0,02 mL	0,02 mL
Mezclar ^a y leer las absorbancias de las soluciones (A3) al final de la reacción (aprox. 5 min). Si la reacción no se ha detenido después de 5 min, continúe leyendo las absorbancias a intervalos de 1 min hasta que las absorbancias permanezcan iguales.				

^a Por ejemplo, con una espátula de plástico o mediante inversión suave después de sellar la cubeta con un tapón de cubeta o Parafilm®.

Nota: Obtenido de Manual del KIT K-ASNAM (Megazyme, 2018)

Anexo B. Cálculo de resultados del formato manual del kit K-ASNAM

Determine las diferencias de absorbancia (A1-A2) y (A2-A3) tanto para blancos como para muestras. Reste la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia de la muestra correspondiente, obteniendo así el cambio de absorbancia (ΔA) resultante del analito en cuestión, como sigue:

Determinación de amoníaco:

$$\Delta A_{\text{amoníaco}} = (A1-A2)_{\text{muestra de amoníaco}} - (A1-A2)_{\text{blanco de amoníaco}}$$

Determinación de L-glutamina:

Para calcular $\Delta A_{\text{L-glutamina}}$, primero es necesario calcular $\Delta A_{\text{(L-glutamina+amoníaco)}}$, para tener en cuenta los iones de amonio libres en la muestra:

$$\Delta A_{\text{(L-glutamina+amoníaco)}} = (A1-A2)_{\text{GLN/ASN muestra}} - (A1-A2)_{\text{GLN/ASN blanco}}$$

Entonces:

$$\Delta A_{\text{L-glutamina}} = \Delta A_{\text{(L-glutamina+amoníaco)}} - \Delta A_{\text{amoníaco}}$$

Determinación de L-asparagina:

$$\Delta A_{\text{L-asparagina}} = (A2-A3)_{\text{GLN/ASN muestra}} - (A2-A3)_{\text{GLN/ASN blanco}}$$

Los valores de $\Delta A_{\text{amoníaco}}$, $\Delta A_{\text{L-glutamina}}$ y $\Delta A_{\text{L-asparagina}}$ debe ser, por regla general, de al menos 0,100 unidades de absorbancia para lograr resultados suficientemente precisos.

La concentración de amoníaco, L-glutamina y L-asparagina se puede calcular de la siguiente manera:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{\text{.....}} \text{ (g/L)}$$

Donde:

- V = volumen final (mL)
- MW = peso molecular del analito (g/mol)
- ϵ = coeficiente de extinción de NADPH a 34 nm = 6300 ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- d = camino de luz (cm)
- v = volumen de la muestra (mL)

Sigue para el amoníaco:

$$c = \frac{2,34 \cdot 17,03}{6300 \cdot 1,0 \cdot 0,10} \cdot \Delta A_{\text{amoníaco}}$$

Sigue para L-glutamina:

$$c = \frac{2,34 \cdot 146,1}{6300 \cdot 1,0 \cdot 0,10} \cdot \Delta A_{L\text{-glutamina}}$$

$$c = 0,5427 \cdot \Delta A_{L\text{-glutamina}} \dots (\text{g/L})$$

Sigue para L-asparagina:

$$c = \frac{2,36 \cdot 132,1}{6300 \cdot 1,0 \cdot 0,10} \cdot \Delta A_{L\text{-asparagina}}$$

$$c = 0,06325 \cdot \Delta A_{L\text{-asparagina}} \dots (\text{g/L})$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución, F.

Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para la preparación de la muestra, el contenido (g/ 100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente manera:

Contenido de amoníaco:

$$= \frac{c_{\text{amoníaco}} (\text{g/L de solución de muestra})}{\text{peso}_{\text{muestra}} (\text{g/L de solución de muestra})} \cdot 100 \dots (\text{g/100 g})$$

Contenido de L-glutamina:

$$= \frac{c_{L\text{-glutamina}} (\text{g/L de solución de muestra})}{\text{peso}_{\text{muestra}} (\text{g/L de solución de muestra})} \cdot 100 \dots (\text{g/100 g})$$

Contenido de L-asparagina:

$$= \frac{c_{L\text{-asparagina}} (\text{g/L de solución de muestra})}{\text{peso}_{\text{muestra}} (\text{g/L de solución de muestra})} \cdot 100 \dots (\text{g/100 g})$$

Nota: Obtenido de Manual del KIT K-ASNAM (Megazyme, 2018)