DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO NATIVO DE *Aspergillus* spp. PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA

LUIS JESÚS RUEDA ROJAS.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO NATIVO DE *Aspergillus* spp. PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA

LUIS JESÚS RUEDA ROJAS.

Trabajo de grado para optar al titulo de Químico

Director:

Daniel Ricardo Molina Velasco.

Profesor adscrito a la escuela de Química

Directora:

Clara Inés Sánchez Suárez.

Profesora adscrita a la escuela de Bacterióloga y Laboratorista Clínico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

A Dios por guiarme, protegerme y sostenerme siempre.

A mis Padres y Hermanos por siempre ser mi apoyo y mi alegría.

A todos mis amigos por ayudarme, apoyarme y entenderme durante esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis hermanos por su amor, por su apoyo incondicional, por tanta paciencia y por q son lo más importante que tengo en la vida.

A los profesores Clara I. Sánchez y Daniel R. Molina por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por todos los conocimientos que me aportaron.

A Andrés M. Rueda por las cosas que me enseñó, por su paciencia y por su gran disposición.

A toda mi familia por creer siempre en mí, y gracias por su apoyo incondicional.

A I. Andrea Gómez, Andrea C. Acosta, Lelys V. Vargas, María E. García, Paola A. Ortiz, Elizabeth Rico, por su amistad, paciencia, comprensión, apoyo, por dejarme estar con ustedes todo este tiempo y hacerme reír y gozar esta etapa.

A los que estuvieron un corto tiempo en esta larga etapa de mi vida y que por eso aun los recuerdo.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN…… 16

1. MARCO DE ANTECEDENTES 18

2. MARCO TEÓRICO 22

2.1. Yuca 22

2.2. Almidón 23

2.2.1. Amilosa 24

2.2.2. Amilopectina 26

2.3. Hidrólisis 27

2.3.1. Hidrólisis Ácida 27

2.3.2. Hidrólisis Enzimática 27

2.4. Enzimas 28

2.4.1. Actividad 29

2.5. Etapas de la Hidrólisis Enzimática de Almidón 30

2.6. Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática 30

2.6.1. Amilasas 30

2.6.2. Glucoamilasa 31

2.7. Jarabes de Glucosa 32

3. METODOLOGÍA 34

3.1. Métodos Analíticos 34

3.1.1. Determinación de proteína en el extracto enzimático. 34

3.1.2. Determinación de glucosa 34

3.2. Elaboración del extracto enzimático 35

3.3. Determinación de parámetros cinéticos para el extracto enzimático 36

3.3.1. Efecto del pH en la actividad enzimática 36

4.3.2. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática. 37

4.3.3. Efecto de la agitación (r.p.m.) en la actividad enzimática. 37

4.3.4. Efecto de la relación enzima/sustrato en la actividad enzimática. 37

4.4. Diseño de experimentos. 38

4.5. Estudio del efecto de los cofactores en la actividad enzimática y su estabilidad térmica 38

4.6. Evaluación de la Sacarificación enzimática del almidón licuado de yuca 39

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS 40

5.1. Determinación de Proteína en el extracto enzimático 40

5.2. Estudio del efecto de los factores que intervienen en la actividad enzimática . 41

5.2.1. Efecto del pH en la actividad enzimática 41

5.2.2. Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática 43

5.2.3. Efecto de la Agitación en la actividad enzimática 44

5.2.4. Efecto de la Relación Enzima/Sustrato en la actividad enzimática 46

5.3. Diseño de Experimentos y Tratamiento Estadístico de los Datos 49

5.4. Estudio del efecto de los cofactores en la actividad enzimática y su estabilidad térmica 54

5.5. Sacarificación enzimática del almidón licuado de yuca 55

6. CONCLUSIONES 58

7. RECOMENDACIONES 59

8. BIBLIOGRAFÍA 60

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura química de amilosa (a) y amilopectina (b), Corradinii E, et al. (2005). 25

Figura 2. Hidrólisis de carbohidratos. Enzymes In FoodProcessing, 1993 27

Figura 3. Estados de ionización del centro activo de la enzima (Bioquímica tema 7, online) 30

Figura 4. Esquema del montaje de elaboración del extracto enzimático 35

Figura 5. A. Efecto de los pH 3, 4, 5 y 6 sobre la actividad enzimática a 20, 40 y 60 minutos, **B**. concentración de glucosa en el tiempo resultado de la hidrólisis enzimática en los pH 3, 4, 5 y 6..... 42

Figura 6.A. Efecto de la Temperatura para la actividad enzimática en el rango de 40 °C a 70 °C y **B**. concentración de glucosa en el tiempo 44

Figura 7A. Efecto de la Agitación para la actividad enzimática en el rango 0 a 600 r.p.m. **B**. concentración de glucosa en el tiempo..... 46

Figura 8. Relación Enzima/Sustrato de las cuatro (4) diferentes concentraciones de Extracto enzimático y las cuatro (4) concentraciones de sustrato **A**. 5 g 48

Figura 9. Concentración de glucosa en la hidrólisis enzimática para las cuatro (4) diferentes concentraciones de Extracto enzimático y la concentración de sustrato de 5 g L^{-1} 49

Figura 10. Diagrama de Pareto Estandarizado para la Actividad Enzimática..... 50

Figura 11. Diagrama de Interacción para la Actividad Enzimática..... 51

Figura 12. Predicción por regresión lineal múltiple para Actividad Enzimática..... 52

Figura 13. Superficie de Respuesta estimado para la Actividad Enzimática..... 53

Figura 14. Contorno de Superficie de la Respuesta Estimada para la Actividad Enzimática 53

Figura 15. Evaluación de cofactores en la actividad enzimática..... 54

Figura 16. Estabilidad térmica de la glucoamilasa proveniente del *Aspergillus* spp., en la actividad en el proceso de sacarificación..... 55

Figura 17. A. Concentración de glucosa en la hidrolisis enzimática para el almidón de yuca licuado, **B** Actividad enzimática para la sacarificación en un tiempo de 30 min 56
Figura 18. Curva de calibración de Bradford 70

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades de las macromoléculas del almidón: amilosa y amilopectina (Dietrich K. et al., 2006). 26

Tabla 2. Clasificación de los jarabes de glucosa según su equivalente de dextrosa (DE) (Sánchez L. A. 2002) 32

Tabla 3. Variables y niveles utilizados en el Diseño de Experimentos 38

Tabla 4. Análisis de varianza para la Actividad Enzimática 51

Tabla 5. Predicción por Statgraphics® 54

Tabla 6. Representación de los factores y niveles para el diseño de experimento. 72

LISTA DE ECUACIONES

Pág.

Ecuación 2. Ecuación de respuesta. Modelo matemático para la actividad enzimática 52

Ecuación 1. Ecuación para determinar la concentración de glucosa (A: Absorbancia, C: Concentración) 71

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO 1 69

ANEXO 2 71

ANEXO 3 72

RESUMEN

TITULO:"DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO NATIVO DE *Aspergillus spp.* PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA"

LUIS JESÚS RUEDA ROJAS*

Palabras Claves: Almidón de yuca, Actividad Enzimática, Hidrólisis Enzimática, Sacarificación.

La obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón se puede realizar por medio de hidrólisis química o enzimática. Para garantizar una producción mayor de glucosa, la hidrólisis enzimática se divide en dos procesos licuefacción y sacarificación, en el primero se utilizan las enzimas α y β-amilasas, en el segundo se utilizan pululanasa, y glucoamilasa. Comercialmente las enzimas de sacarificación son más costosas por ello se requiere investigar su producción para reducir costos. Con el proyecto se buscó determinar las mejores variables para la producción de jarabes de glucosa utilizando un extracto enzimático obtenido de un aislamiento nativo de *Aspergillus* pp.

La determinación de la concentración de proteína en el extracto enzimático se realizó con el método colorimétrico de Bradford y la determinación de la concentración de glucosa con el método de la glucosa oxidasa de Biosystems®. La elaboración del extracto enzimático se realizó en medio de cultivo semisólido, sin agitación, oxigenado con bomba de aire. Los parámetros cinéticos evaluados fueron pH, con soluciones buffer acetato de sodio 16 mM y ácido cítrico 0.1 M; temperatura; agitación; y relación enzima/sustrato. En el diseño de experimentos se tomaron como base los mejores resultados obtenidos de los parámetros cinéticos. Se procedió a la elaboración de un diseño de experimentos 3^3, para establecer, las variables que afectan la actividad enzimática y posteriormente optimizar las variables, para lo cual se utilizó el Statgraphics®.

Para el extracto enzimático proveniente del hongo *Aspergillus spp.,* las mejores condiciones para el proceso de sacarificación son pH 4.0, temperatura 55.0 °C y agitación de 0 r.p.m. según datos obtenidos del Statgraphics®

Adicionalmente se evidenció que el extracto enzimático proveniente del hongo *Aspergillus* spp., sacarifica almidón de yuca, durante este proceso se encontró una relación de producción de glucosa/actividad enzimática de 0.9.

* Proyecto de grado
** Molina Velasco Daniel Ricardo. Facultad de ciencias, Escuela de Química, Director. Ph.D
*** Sánchez Suárez Clara Inés. Facultad de Salud Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Directora. MsC

ABSTRACT

TITLE:"DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS OF THE NATIVE ENZYME EXTRACT Aspergillus spp. FOR THE PRODUCTION OF GLUCOSE SYRUP "

LUIS JESÚS RUEDA ROJAS

Keywords: cassava starch, cassava starch, enzyme activity, Enzymatic Hydrolysis, Saccharification

Obtaining glucose syrups from starch can be performed through chemical or enzymatic hydrolysis. To ensure an increased glucose production enzymatic hydrolysis is divided into two liquefaction and saccharification processes, are used in the first enzyme α and β-amylases, are used in the second pullulanase and glucoamylase. Commercially saccharification enzymes are more expensive so research is needed to reduce production costs. The project sought to determine the best variables for the production of glucose syrups obtained using an enzyme extract of an isolate native Aspergillus spp.

Determining the protein concentration in the enzyme extract was performed using the method Bradford colorimetric determination of glucose with glucose oxidase method Biosystems®. The preparation of enzyme extract was performed in semisolid culture medium, without stirring, oxygenated air pump. The kinetic parameters evaluated were pH, buffer solutions of sodium acetate and 16 mM citric acid 0.1 M, temperature, agitation, and enzyme / substrate ratio. We proceeded to develop a design of experiments 3^3 to establish the variables that affect enzyme activity and subsequently optimize the variables for which we used the Statgraphics®.

For the enzyme extract from the fungus Aspergillus spp., The best conditions for hydrolysis are pH 4.0, temperature 56.0 ° C and agitation 0 rpm according to data obtained from Statgraphics®.

We found a relation of production of glucose / enzymatic activity of 0.9 for the enzymatic extract of Aspergillus spp.

* Degree of project
Daniel Velasco ** Ricardo Molina. Faculty of Science, School of Chemistry, Director. Ph.D
Clara Inés Suárez Sánchez ***. Faculty of HealthSchool of Bacteriology and Laboratory Medicine. Director. MsC.

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta crantz*), es un cultivo radicular nativo de América (González *et al*., 2008) que se ubica como el cuarto cultivo más importante, después del maíz, el arroz, y la caña (Godfrey *et al*., 2000). El mayor componente de la yuca es el almidón (Plate y Lal 2007), sustrato rentable, abundante y económico para la producción de etanol (Amutha *et al*, 2001) (Bai *et al*. 2008).

La obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón se puede realizar por medio de hidrólisis química o enzimática. (Landazábal, 2004). En la hidrólisis química el uso de ácidos, favorece la conversión completa de almidón a glucosa, sin embargo los costos resultan elevados y sus desechos son contaminantes para el ambiente, en contraste la hidrólisis enzimática puede resultar más económica y menos contaminante, presentándose como desventaja el requerimiento de pretratamiento físico del almidón y la conversión incompleta de almidón a glucosa debido a la complejidad de la estructura, por lo cual se requiere el uso de diversas de enzimas para garantizar la mayor conversión de glucosa a almidón.

La hidrólisis enzimática es llevada a cabo en dos procesos, la licuefacción y la sacarificación, en el primero se utilizan las enzimas α y β-amilasas, las cuales realizan cortes al azar dentro de la estructura interna del almidón debido a su actividad endo-enzimática. Siendo esto una desventaja ya que genera una gran diversidad de productos, entre los cuales se encuentra: pululano, dextrinas y glucosa. El pululano y las dextrinas, no son utilizados por los microorganismos como sustrato por tanto no son usados en los procesos de fermentación alcohólica.

Por otra parte, la sacarificación es llevada a cabo por dos enzimas: La pululanasa, que actúa únicamente sobre enlaces α-1,6, formando en su mayoría dextrinas, disacáridos

como la maltosa y en una muy baja concentración glucosa; y la glucoamilasa [α -(1,4)-D-glucanglucohydrolase (EC 3.2.1.3)], también conocida como amiloglucosidasa, que es un biocatalizador que hidroliza enlaces terminales α -1,4 glicosídicos de los olígomeros obtenidos en la licuefacción del almidón, formando principalmente monómeros de glucosa. Las pululanasas son producidas principalmente por bacterias y las glucoamilasas por hongos (Norouzian *et al*., 2005) (Bertoldo *et al*, 2002).

Dentro de las enzimas involucradas en procesos de hidrólisis del almidón, las α- y β-amilasa son las más económicas, por ello es necesario la obtención de enzimas de sacarificación como la pululanasa y glucoamilasa.

El objetivo del presente trabajo fue determinar las variables para la producción de jarabes de glucosa utilizando un extracto enzimático obtenido de un aislamiento nativo de *Aspergillus spp.* Este trabajo hace parte de los proyectos "Producción biotecnológica de etanol y butanol a partir de almidón de yuca" y "Producción de azúcares fermentables a partir de la sacarificación de almidón de yuca mediante la utilización de microrganismos nativos" financiados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, respectivamente.

2. MARCO DE ANTECEDENTES

En 1812, Kirchoff logró la hidrólisis de almidón por calentamiento con ácido sulfúrico. Dos décadas más tarde, Payen y Presoz en 1833 realizaron una precipitación con etanol de sustancias solubles en agua aisladas de un blanco de la germinación de trigo; esta sustancia capaz de hidrolizar el almidón fue nombrada diastasa y más tarde amilasa. En 1835, Berzelius demostró que el extracto de la cebada germinando cataliza con más eficacia la hidrólisis del almidón que con el ácido sulfúrico y en condiciones más leves, se acuñó el término catálisis (Marini, I. 2007)

En 1890 Christian Hansen impulso la producción comercial de enzimas (Illanes F. A. 1994), y más adelante Dale y Langlois (1940) usaron una α-amilasa de hongos para la fabricación de jarabes de glucosa comercial. En 1951, las enzimas de *Aspergillus niger*y *Rhizopus*sp., se caracterizaron y nombraron como amiloglucosidasa y glucoamilasa, respectivamente, aunque en la actualidad el nombre trivial oficial para ambas enzimas es glucoamilasa. Luego en 1992 Schenck, utilizó una mezcla de glucoamilasa y α-amilasa como un nuevo proceso de hidrólisis de almidón.

Posteriormente las investigaciones se centraron en la eliminación de la enzima contaminante transglucosidasa que reduce el rendimiento de la producción de glucosa.

La operación comercial, para la producción de glucosa cristalina, se inició en 1960, alcanzando el éxito comercial con la sacarificación enzimática.

Posteriormente se investigó en la sustitución total de la hidrólisis ácida mediante el desarrollo de una α-amilasa resistente a la temperatura que pudiera licuar el almidón de manera eficiente. La enzima bacteriana termoestable, α-amilasa se había desarrollado en el año 1900 y se utilizó desde entonces en la elaboración de cerveza, textiles y en las

industrias de papel, por lo tanto, se implantaron enzimas termoestables para la licuefacción de almidón. Los primeros procesos comerciales se aplicaron en la década de 1960. (Wageningen University)

Además de las enzimas, los almidones y las féculas también han sido modificados tanto genética como enzimáticamente para obtener almidón con mayor porcentaje de amilosa, ya que la mayoría de los estos almidones contienen entre el 15% y el 30% de amilosa, y así poder formar geles más estables (Konsoula, Z. *et al. 2006*).

A nivel industrial se han desarrollado métodos más económicos para la producción de amilasas para el procesamiento de almidón como la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SMF), siendo el primero el más económico (Harmeet, K. S, *et al. 2005*).

A pesar de las excelentes propiedades catalíticas de las enzimas, estas no siempre poseen todas las propiedades necesarias para su uso en reactores industriales, por lo que requieren mejorarse antes de proceder a su uso (Konsoula *et. al*. 2006). La nueva generación de enzimas por parte de Genecor International (Stargen001) y NovozymesNA (BPX) entre otros, tales como la α-amilasa de *Aspergillus kawachi*y la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (presentes en la enzima comercial, Stargen001), trabajan sinérgicamente para hidrolizar almidones granulares directamente de la materia prima en un solo paso y a una temperatura de 32 °C, muy por debajo de la temperatura de gelatinización. Tienen la ventaja de exo-actividad de glucoamilasa que es capaz de perforar fuerte y profundamente los gránulos de almidón, así como la endo-actividad de á-amilasa, que permite la ampliación de los gránulos del almidón. Esta combinación mejora la liberación de glucosa en un sistema continuo de almidones granulares (Shariffaa, Y. N., *et al. 2009;* Mera I, *et al. 2003*).

Las enzimas pueden ser afectadas positiva o negativamente por las variables del proceso de hidrólisis, motivo por el cual es necesario su optimización para mejorar la viabilidad de estos procesos biotecnológicos. Las variables que pueden afectar los sitios activos de estas son: temperatura, pH, tiempo de reacción, concentración enzimática, viscosidad, velocidad de agitación, concentración de productos hidrolizados, concentración de iones, como cofactores enzimáticos (Leveque, E., *et al. 2000;* Belmaozbek *et al. 2001;* Dilekkilic A. *et al. 2005*).

Otra posibilidad prometedora es la formulación de sistemas multienzimáticos inmovilizados al unir más de un tipo de enzima a la matriz.

También se han buscado métodos de calentamiento rápido, buscando la reducción del consumo de energía. Para el calentamiento de materiales no metálicos (caso del almidón) se ha utilizado durante mucho tiempo técnicas de conducción térmica, de convección y de radiación, en estos casos se aplica el calor a la superficie del material el cual pasa al interior mediante conducción térmica, lo que requiere tiempo considerable debido a la baja conductividad de estos materiales.

Contrario a la conducción, las microondas generan calor dentro del material de manera suficientemente uniforme y rápida, pero a diferencia de los aparatos de calentamiento convencional, poseen una gran limitación en su costo ya que no se justifica ante el reducido valor de los productos además del costo significativo de energía eléctrica que se consume. (Vijay S. 2007)

Baks et al. 2008, realizaron una comparación de rendimientos de producción de glucosa al tratar almidón a altas temperaturas y altas presiones en la etapa de gelatinización, con una misma enzima. Encontraron un alto nivel de dextrosa al tratar el almidón con altas temperaturas (0,1 MPa, 90 °C), por el contrario, al ser tratado con altas presiones (450

MPa, 50 °C) el nivel de dextrosa cayó, aunque no tanto como en la hidrólisis del almidón nativo sin gelatinizar. Estos resultados pueden ser explicados debido a la diferencia estructural del almidón en cada uno de los tres procesos nombrados.

Por otro lado, los procesos de reacción continuos tienen mayores ventajas frente a los procesos por lotes o baches debido a los menores costos del biorreactor, menores requerimientos de mantenimiento y operación, mejor control del proceso y mayor productividad. Permiten además de la utilización de enzimas inmovilizadas (de flujo taponado) y el uso de una membrana de ultrafiltración (de alimentación continua) permitiendo el recirculado de la enzima y del sustrato sin digerir, como la adición de más enzima si es necesario. (Sánchez, Ó. J., *et al. 2005;* Sánchez L. A. 2002; Slominska L, *et al. 2002*).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Yuca

La yuca es una de las principales plantas tropicales difundidas en todos los continentes, originaria de la zona tropical de América. Esta planta florece en suelos pobres de toda la región ecuatorial, con periodos vegetativos que van desde 8 hasta 12 meses (Sánchez L. 2002).

Las variedades de yuca se agrupan en dos grandes grupos: yuca dulce o comestible y yuca amarga o brava. La clasificación se basa en la cantidad de glucósidos tóxicos producidos, los cuales se forman por la acción de la enzima linamarasa, al romper los tejidos sobre dos glucósidos cianogénicos llamados linamarina y lotaustralina (Sánchez L. 2002). Las variedades amargas reciben su nombre por su contenido de ácido cianhídrico libre y de cianoglucósidos; tienen una mayor cantidad de glucósidos tóxicos en la pulpa de la raíz, mientras que la dulce contiene trazas en la cáscara, las cuales desaparecen durante la cocción**.** Las amargas se cultivan para la producción de almidón de yuca comercial, debido a que su contenido de almidón es más alto que en las variedades dulces.

La yuca a nivel mundial es producida principalmente como un cultivo de subsistencia por pequeños agricultores ya que se adapta bien a los suelos pobres en nutrientes y es relativamente resistente a enfermedades lo que favorece un buen rendimiento (Cevallos H. *et al*.). El rendimiento de cultivo es un factor clave y Colombia ofrece un alto rendimiento en caña de azúcar, palma de aceite y yuca, ocupando siempre los primeros puestos en productividad entre los países productores (Delgado, 2004).

Colombia tiene gran importancia en términos de productividad dado su clima, sus suelos fértiles y su capacidad de producción permanente, además exhibe gran disponibilidad y

diversidad. El cultivo de yuca ha venido creciendo rápidamente y su productividad ha aumentado a medida que se implementan nuevas tecnologías de producción. La yuca en Santander junto con otra variedad de productos agrícolas es fuente alternativa de almidón tanto para la producción de etanol como para la obtención de jarabes glucosados y de otros oligosacáridos llamados dextrinas (Sánchez L. 2002).

La variedad amarga es más eficiente en cuanto a la producción de almidón, la hace especialmente apta para ciertos procesos industriales, con rendimientos de hasta 80 ton/ha por año bajo condiciones experimentales, siendo su potencial similar al de caña de azúcar, maíz, sorgo y arroz. Su potencial de rendimiento sobresale al compararse con otros cultivos, por tener la habilidad de crecer donde otros cultivos no lo hacen (Cevallos H. *et al*. 2006).

3.2. Almidón

El almidón se encuentra almacenado en forma condensada como material de reserva de energía química en todas las plantas fotosintéticas. Este carbohidrato se almacena en semillas, tubérculos carnosos y raíces. El almidón suministra un alimento de reserva a los tejidos que se desarrollaran al crecer las plantas. Es sintetizado por las plantas al tomar dióxido de carbono del aire, el agua y la luz solar como fuente de energía produciendo glucosa ($C_6H_{12}O_6$) como intermediario. Se encuentra en las plantas como partículas definidas o gránulos compactos e intracelulares de 1–100 µm de diámetro; su aspecto físico y las propiedades de los gránulos varían ampliamente de una planta a otra y pueden utilizarse para clasificarlos de acuerdo a su origen. Están constituidos por unidades anhidras de D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$), unidas principalmente por enlaces glucosídicos α-(1-4) y α-(1-6) los cuales forman dos tipos mayoritarios de polímeros: la amilosa y amilopectina (Figura 1). La amilopectina es la porción externa del gránulo, el cual es el principal

constituyente, siendo una de las macromoléculas más grandes con un peso molecular de 107 a 109 KDa, dispuesta en una configuración de doble hélice.

Las fracciones de amilosa y amilopectina se encuentran orientadas en los gránulos de almidón en forma radial y es la presencia de estas en la estructura macromolecular lo que da las propiedades fisicoquímicas a este producto y su comportamiento con relación a la viscosidad, hinchamiento, gelificación y engrudización en solución acuosa (Anaya V. F.J. 2004; Dietrich K. *et al*. 2006).

También se ha encontrado que las pastas de almidón de yuca son estables en medio ácido, y por debajo de pH 2,4; hay destrucción del gránulo y del aspecto físico de la pasta, debido a una hidrólisis parcial o total de las pastas. Los gránulos del almidón de papa y yuca contiene menor porcentaje de sustancias grasas comparado con los almidones de los cereales (maíz y arroz), ésta composición favorece al almidón de yuca ya que estos lípidos forman un complejo con la amilosa, que tiende a reprimir el hinchamiento y la solubilización de los gránulos, requiriendo temperaturas más altas (< 125 °C) para romper la estructura amilosa-lípido y solubilizar la fracción de amilosa (Cevallos H. *et al*.).

3.2.1. Amilosa

La amilosa en los extremos posee un hidroxilo primario y dos secundarios así como un grupo aldehído reductor en la forma de hemiacetal, llamado extremo reductor de la molécula. El opuesto no reductor contiene un hidroxilo primario y tres hidroxilos secundarios y es esta abundancia de grupos hidroxílicos la que le imparte la propiedad hidrofílica a este polímero, sin embargo a causa de su linealidad y movilidad y los grupos hidroxilos, tiende a orientarse de forma paralela muy cercana entre sí permitiendo la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos del polímero adyacente resultando

en la reducción de la afinidad del polímero por el agua y la opacidad de la solución (Copeland L. *et al*. 2009). (ver Figura 1a)

La amilosa es capaz de formar rápidamente complejos con ácidos grasos y con alcoholes orgánicos. Aunque no es soluble, forma micelas hidratadas que dan un color azul con el yodo, el cual permite su determinación cualitativa (Sánchez L. A. 2002; Vijay S. 2007)

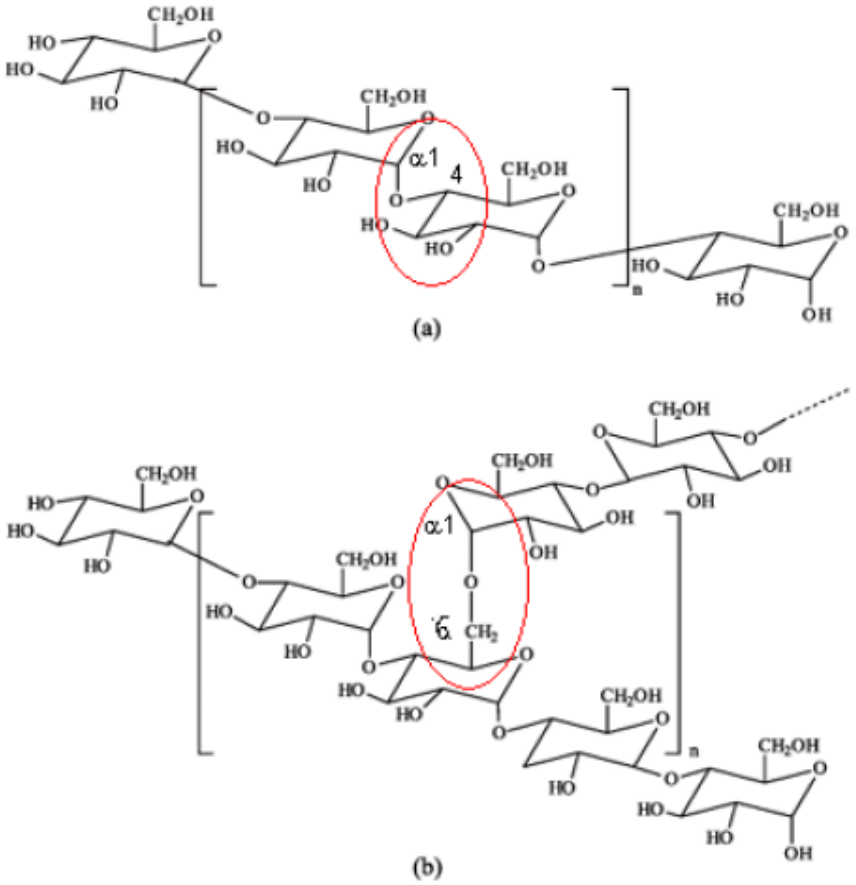


Figura 1. Estructura química de amilosa (a) y amilopectina (b), Corradinii E, et al. (2005).

3.2.2. Amilopectina

Constituye el 70-80% del almidón y es un polímero ramificado constituido de unidades de glucosa, unida mediante enlaces α-1-4 (en su mayoría) y α-1-6 (para las ramificaciones) Figura 1b donde hay un punto de ramificación por cada 20-30 unidades de glucosa. El gran tamaño y la naturaleza de las uniones de amilopectina reducen la movilidad de los polímeros e interfiere con la tendencia de poder llegar a orientarse muy cercanamente entre ellas y permitir la formación de enlaces hidrógeno, significativos. Por lo anterior, en la gelificación las soluciones acuosas de amilopectina son caracterizadas por estabilidad claridad, y las soluciones de amilopectina no forman películas tan fuertes y flexibles como la amilosa (Copeland L. *et al*. 2009).

A diferencia de la amilosa, la amilopectina no forma complejos con ácidos grasos o con alcoholes orgánicos y produce disoluciones helicoidales o micelares que dan una coloración rojo violácea con el yodo, debido a su poca afinidad (Sánchez L. A. 2002; Anaya V. F. J. 2004).

En la Tabla 1, se comparan algunas propiedades de la amilosa y la amilopectina.

Tabla 1. Propiedades de las macromoléculas del almidón: amilosa y amilopectina (Dietrich K. et al., 2006).

Propiedad	**Amilosa**	**Amilopectina**
Peso molecular(Da)	1-2 x 10^5	> 2 x 10^7
Grado de polimerización	990	7200
Ligamentos glicosídicos	α- D (1 – 4)	α- D (1 – 6)
Estructura molecular	Básicamente lineal	Muy ramificada
Susceptible a la retrogradación	Alta	Baja
Afinidad con el yodo	20.1 g/100 g	1.1 g/100 g

3.3. Hidrólisis

El término hidrólisis aplica a las reacciones químicas orgánicas o inorgánicas donde el agua efectúa una doble descomposición con otro compuesto, el hidrógeno va a un componente y el hidroxilo al otro (Figura 2); en el caso del almidón esta hidrólisis puede ser catalizado por ácidos o enzimas (Reinaldo J. Velasco *et al*. 2008).

3.3.1. Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida se lleva a cabo a pH bajo y altas temperaturas, rompiendo las cadenas de almidón, formado dextrinas. El porcentaje de degradación depende la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de hidrólisis. Los ácidos clorhídrico, nítrico y sulfúrico son los más utilizados para la producción de dextrinas. Los productos de degradación son principalmente glucosa, hidroximetilfurfural, ácido levulónico y ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo.

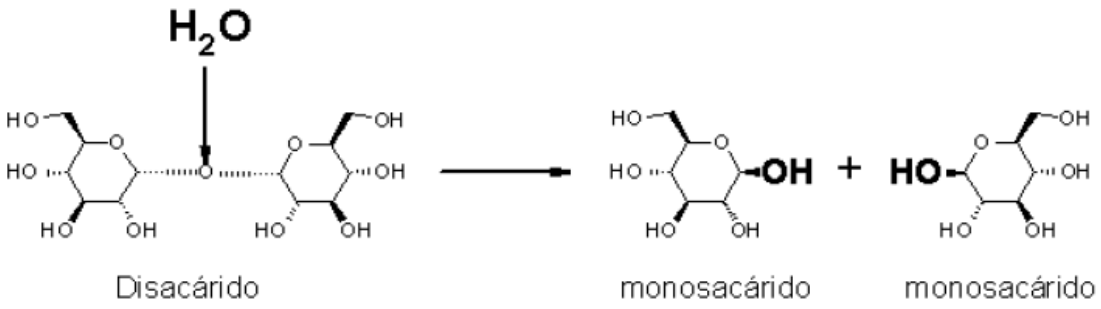


Figura 2. Hidrólisis de carbohidratos. Enzymes In FoodProcessing, 1993

3.3.2. Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática es llevada a cabo por biocatalizadores provenientes de microorganismos, saliva, jugos pancreáticos y semillas, entre otros. En la actualidad estas

enzimas se consiguen como extractos enzimáticos comerciales, en la industria del almidón.

3.4. Enzimas

Las enzimas son proteínas (polipéptidos) que contienen residuos amino-acídicos que actúan como catalizadores, en procesos biológicos o industriales, sin estar directamente relacionados en la interacción con el sustrato o con la reacción. (Mera, *et al*. 2003)

Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas como catalizadores es su alta especificidad respecto al sustrato, razón por la cual este debe poseer los enlaces químicos que pueden ser atacados por los grupos funcionales del centro activo de la enzima permitiendo su correcta ubicación en él para que la reacción tenga lugar. (Cevalloss H. *et al*.)

La conformación tridimensional de la enzima en solución está determinada por complejas interacciones que se establecen tanto en el interior de la proteína como en la superficie, tales como: enlaces puentes de hidrógeno, puentes di-sulfuro, interacciones de Van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas, que originan las diferentes estructuras que conforman una enzima. Los puentes di-sulfuro reducen la posibilidad de desdoblamiento de la enzima y la consecuente desnaturalización al mismo tiempo que limitan la agregación y posterior inactivación irreversible. Los enlaces tipo puentes de hidrógeno juegan un rol importante en la estabilidad de las enzimas en solventes no acuosos. En agua, una cadena polipeptídica totalmente desdoblada puede llenar sus potenciales puentes de hidrógeno a través de interacciones con el solvente (Illanes F. A. 1994).

Algunas enzimas para aumentar la actividad requieren un cofactor, que en la naturaleza son derivados de vitaminas o iones metálicos. Los grupos prostéticos son diferenciados de las coenzimas por interacción estricta con las enzimas (Illanes F. A. 1994).

3.4.1. Actividad

La capacidad catalítica o actividad es la propiedad esencial de una enzima. Desde el punto de vista termodinámico, la enzima como todo catalizador actúa disminuyendo la magnitud de la energía de activación que requiere una reacción de transformación de sustrato a producto. La capacidad catalítica reside en el centro activo el cual es una estructura compleja cuya configuración permite ubicar la molécula de sustrato en la posición correcta para que los grupos funcionales de la enzima efectúen su transformación química resultando así clara la relación entre funcionalidad biológica y estructura tridimensional. Desde el punto de vista cinético, la actividad enzimática se traduce en un incremento en la velocidad de la reacción.

Adicionalmente, la actividad enzimática es dependiente de factores externos como: La temperatura de la reacción enzimática, la cual afecta la energía vibracional que puede provocar la ruptura de los puentes de hidrógeno y la destrucción de las interacciones apolares; la reducción de la fuerza iónica del medio, que afecta la estabilidad de la enzima, dado que disminuye, las interacciones enzima-solvente y el incremento de las interacciones iónicas intracadena que pueden desestabilizar su estructura; el pH afecta fuertemente la estabilidad debido a que la carga de los residuos aminoacídicos de la proteína depende de la concentración de protones en el medio, valores de pH que provoquen acumulación de las cargas (negativas o positivas por encima o por debajo del punto isoeléctrico) pueden provocar desestabilización de la estructura de la enzima debido a las fuerzas de repulsión (Figura .3) (Bioquímica tema 7, online).

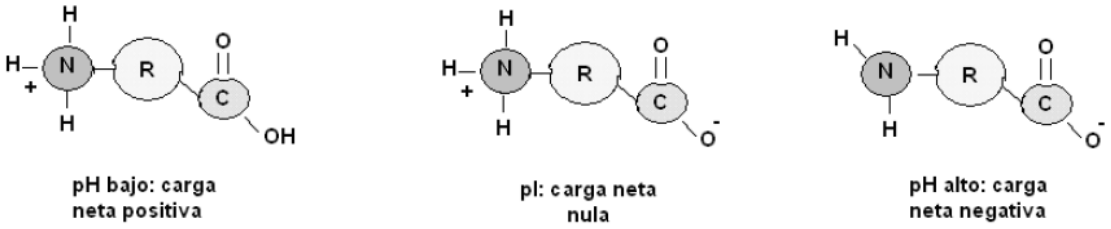


Figura 3. Estados de ionización del centro activo de la enzima (Bioquímica tema 7, online)

3.5. Etapas de la Hidrólisis Enzimática de Almidón

La hidrólisis enzimática del almidón se realiza en dos etapas: licuefacción y sacarificación. La **licuefacción** es la primera etapa en el que actúan enzimas como α-amilasas y β-amilasas y se da la formación de jarabes de dextrinas. La etapa de **sacarificación**, se realiza utilizando enzimas como glucoamilasas, pululanasas o mezclas de enzimas; que forman moléculas de D-glucosa a partir del jarabe obtenido durante la licuefacción. La actividad de estas enzimas depende principalmente del pH y de la temperatura (Anaya V. F. J. 2004; Mera I., *et al*. 2003).

3.6. Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática

3.6.1. Amilasas

Desdoblan los enlaces α-(1-4) del almidón en varios azúcares dentro de los que se encuentran la glucosa y la maltosa; se caracterizan por la facilidad de fragmentación de los almidones en dextrinas reductoras que no dan color con el yodo.

Existen dos tipos, α- y β- amilasas, las cuales en su mayoría provienen de *Bacillus amylo liquefaciens*, *Bacillus liqueniformis* y *Aspergillus oryzae*. Las enzimas se diferencian por su termorresistencia, siendo la amilasa de *B. liqueniformis*la más estable con una

temperatura óptima de 90 °C, los productos que se obtienen con su uso son maltosa, maltotriosa, maltopentosa; en contraste la amilasa de *B. amyloquifaciens* tiene una temperatura óptima de 70 °C y se obtienen como producto de la hidrólisis las maltohexosas. Finalmente, la enzima de *A. orizae*, es usada en la producción de jarabes de maltosa (Illanes F. A. 1994).

3.6.1.1. α-amilasa

La α-amilasa (α-1-4-glucan-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1). Es una endoenzima extracelular que actúa al azar en la hidrólisis de los enlaces α-(1-4) glucosídicos internos de las moléculas de amilosa y amilopectina, dando lugar a la formación de oligosacáridos de bajo peso molecular que pueden ser de cadenas lineales o ramificadas (dextrinas), pero no son capaces de actuar sobre enlaces α-(1-6).

3.6.1.2. β-amilasa

La β-amilasa (exo-maltohidrolasa, α-1-4-glucan-maltohidrolasa, EC 3.2.2.1), actúa sobre la hidrólisis del almidón de manera secuencial desde el extremo no reductor de la amilosa y de la amilopectina (razón por la que se clasifica como una exo-enzima) invirtiendo los enlaces α-(1-4) en β-(1-4) glucosídicos. El producto de la hidrólisis es la maltosa.

3.6.2. Glucoamilasa

Dentro de las que se encuentran las obtenidas de *Aspergillus niger*y de *Rhizopussp.*, siendo más frecuente el uso de las primeras. La amiloglucosidasa (β-amilasa,α-(1-4) glucan-glucohidrolasa EC 3.2.1.3) actúa como un exo-catalizador de la hidrólisis de enlaces α-(1-4) glucosídicos y debido a su bajo grado de especificidad enlaces α-(1-3) y α-(1-6)

glucosídicos, su accionar es más lento en la producción de moléculas de glucosa (Sánchez L. A. 2002; Illanes F. A. 1994; Morales A. S, 2008).

3.7. Jarabes de Glucosa

Los jarabes de D-glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D-glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas. Estos son caracterizados y clasificados por su "equivalente de dextrosa" (ED) que está definido como: el porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de los sólidos totales de oligosacáridos o que su poder reductor es similar al de una solución con % de glucosa igual al ED.

Los jarabes de glucosa se pueden clasificar según su contenido de dextrosa (ver Tabla. 2). Siendo los jarabes de glucosa tipo III los jarabes fermentables y contienen entre 75-85% de D-glucosa, maltosa y maltotriosa.

Tabla 2. Clasificación de los jarabes de glucosa según su equivalente de dextrosa (DE) (Sánchez L. A. 2002)

TIPO DE JARABE	DE
I	20-38
II	38-58
III	58-73
IV	> 73

Los jarabes de glucosa obtenidos por medio del uso de ácidos no superan ED superiores a 60 debido a las reacciones de reversión y deshidratación que sufre la glucosa al estar en contacto con el ácido (Sánchez L. A. 2002; Anaya V. F. J. 2004) . Jarabes con altas concentraciones de glucosa solamente se preparan mediante la utilización de enzimas. A

altas concentraciones de glucosa la enzima cataliza la reacción reversa, estableciendo enlaces α(1-4) y α (1-6) entre moléculas de glucosa, por lo que aunque no es posible superar por esta vía valores de ED entre (97 - 98) en el proceso convencional por lotes, o de 95 ED en procesos continuos al inmovilizar la glucoamilasa.

Una vez obtenido el grado de hidrólisis requerido, el jarabe de glucosa se concentra hasta aproximadamente 60° Brix y el pH se ajusta a los requerimientos para la fermentación para la obtención de etanol (Illanes F. A. 1994).

4. METODOLOGÍA

4.1. Métodos Analíticos

4.1.1. Determinación de proteína en el extracto enzimático.

Se usó el método colorimétrico de Bradford (Anexo 1) a 50 µL de la muestra se añadieron 2.5 mL del reactivo de Bradford y después de 3 minutos de reacción se realizó la lectura a 595 nm en un Espectrofotómetro UV-vis. La concentración de proteína del extracto enzimático se determinó por interpolación en una curva de calibración previamente realizada con soluciones de albumina de suero bovino (ABS) cuyas concentraciones se variaron de 0.1 hasta 1.0 mg mL^{-1}.

4.1.2. Determinación de glucosa

Se realizó por el método de la glucosa oxidasa, de Biosystems® (Anexo 2), que consiste en la formación de un complejo coloreado (quinonaimina).

Las muestras, blanco y patrón fueron preparadas según el protocolo para el método de glucosa oxidasa y leídas en un lector de microplacas a 490 nm. La concentración de glucosa se determinó por la ecuación 1:

$$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}} \, X \, C_{Patrón} = C_{Muestra} \qquad \textbf{[Ecuación 1]}$$

en donde A: Absorbancia, C: Concentración

4.2. Elaboración del extracto enzimático

A partir de un cultivo en agar papa dextrosa del aislamiento de *Aspergillus* ssp., de tres días de crecimiento, se realizó una suspensión de esporas en agua destilada estéril y se sometió a choque térmico por 60 minutos a 80 °C, posteriormente se realizó inoculación en agar papa dextrosa se incubó por 5 días a 35 °C, lo anterior incrementó la producción de esporas.

Cumplido el tiempo de incubación se realizó recolección de propágulos (esporas y fragmentos de hifas) en agua destilada y se inoculó en el biorreactor con el soporte sólido (estropajo) a un volumen de 150 mL de medio de cultivo con maltosa al 0,5% (Rueda et al. 2011) se obtuvo una concentración inicial de $5x10^5$ esporas mL^{-1}. El biorreactor se incubó a 35 °C por 5 días, realizando oxigenación con una bomba de aire con filtro con capacidad de 6 L min^{-1}. El montaje completo se muestra en la Figura 4.

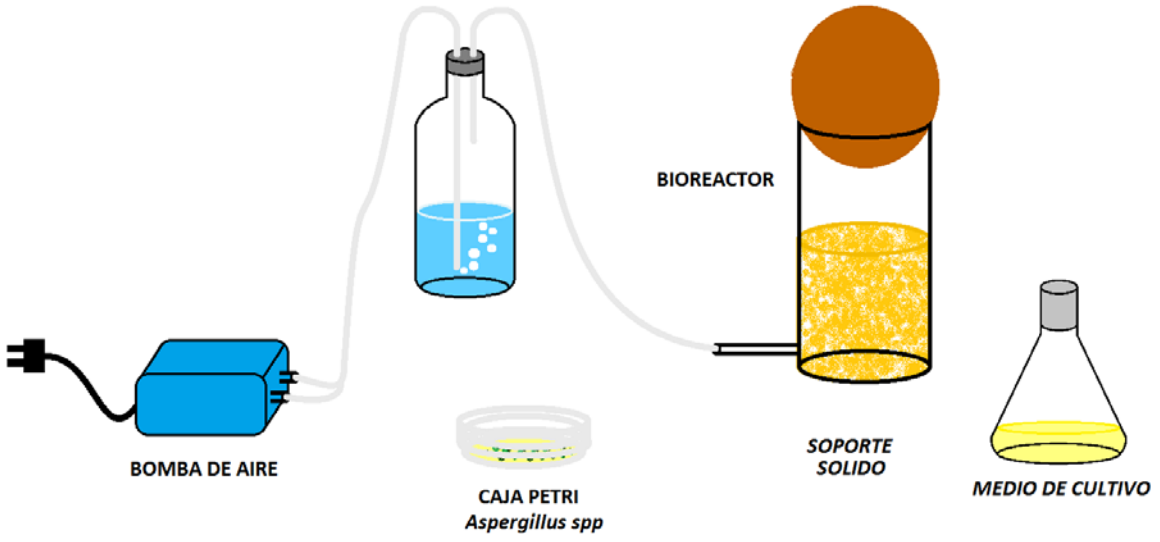


Figura 4. Esquema del montaje de elaboración del extracto enzimático

Cumplido el tiempo de incubación se separó la parte líquida del biorreactor y se centrifugó a 10.000 gravedades, a 4 °C por 15 min en tubos falcón de 15 mL, se descartó el pellet y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de celulosa de 0.45 micras de tamaño de poro. El extracto se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su utilización. La concentración total de proteínas del extracto enzimático obtenido se determinó por el método de Bradford.

4.3. Determinación de parámetros cinéticos para el extracto enzimático.

Se determinaron los parámetros cinéticos concentración de glucosa y actividad enzimática, utilizando como sustrato maltosa. Los factores evaluados fueron pH, temperatura, agitación, relación enzima/sustrato.

Las evaluaciones se realizaron en tubos de ensayo de 15 mL manteniendo una relación 1:1 de extracto enzimático y sustrato en un volumen de 2 mL. Para evaluar las mejores condiciones de trabajo del extracto enzimático se realizó variación de un factor, dejando los demás constantes. Las constantes de cada factor se mantuvieron de acuerdo con lo establecido por Rueda et al., 2011, Temperatura de 50 °C, Agitación de 200 r.p.m. y pH de 6,5.

Las variables se trabajaron bajo las condiciones que se describen a continuación.

4.3.1. Efecto del pH en la actividad enzimática

Para realizar las variaciones de pH en los rangos de 3 a 9 se prepararon buffers de acetato de sodio 16 mM y ácido cítrico 0.1 M se trabajó con la solución de maltosa a una concentración de 5 gL^{-1}. En resultados preliminares se observó que a pH básicos la

actividad enzimática disminuía, por ello se redujo el rango de trabajo, en intervalos de pH de 3 a 6 la lectura se realizó en los tiempos 0, 20, 40 y 60 minutos.

4.3.2. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

La variación de la temperatura se realizó en baño termostatado (Lauda E 100). Los valores oscilaron entre 30 °C y 90 °C, en una primera etapa se realizaron en intervalos de 20 °C, la evaluación se realizó a 0, 15, 30 y 45 minutos. Los resultados de esta primera etapa concluyeron que el punto máximo de actividad se encontraba alrededor de los 50 °C por tanto para los siguientes experimentos se redujo el rango a intervalos de temperatura de 40 °C a 70 °C con intervalos de 10 °C, utilizando los mismos tiempos.

4.3.3. Efecto de la agitación (r.p.m.) en la actividad enzimática.

Las variaciones de agitación se realizaron en plancha de agitación magnética (VelpScientifica) utilizando velocidades de agitación de 0, 50, 200, 400, y 600 r.p.m. con lecturas a 0, 15, 30 y 45 minutos.

4.3.4. Efecto de la relación enzima/sustrato en la actividad enzimática.

Se realizaron tres diluciones de la concentración original del extracto enzimático para un total de cuatro (4) concentraciones diferentes. Teniendo en cuenta que la concentración máxima de proteína fue de 0.060 g L^{-1}, los valores para esas cuatro diluciones fueron ajustados a 0.100, 0.075, 0.050 y 0.025 g L^{-1}. Para las concentraciones de sustrato igualmente se prepararon cuatro (4) concentraciones diferentes 10, 20, 30 y 40 g L^{-1}, la lectura de actividad enzimática y de concentración de glucosa se realizó a los 0, 15, 30 y 45 minutos.

4.4. Diseño de experimentos.

Para determinar las mejores condiciones de las variables que afectan positivamente la actividad enzimática, inicialmente se había propuesto la realización de un diseño de experimentos 3^4 (3 niveles, 4 factores). No obstante, con los resultados iníciales de la evaluación de la relación enzima/sustrato, se excluyó este factor, quedando un diseño de experimentos de 3^3. En este diseño se utilizaron los mejores resultados obtenidos de los parámetros cinéticos. Las variables utilizadas y sus respectivos niveles se reportan en la Tabla 3, para cada uno de los ensayos las mediciones se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados con el software Statgraphics®.

Tabla 3. Variables y niveles utilizados en el Diseño de Experimentos

Nivel / Factor	-1	0	1
pH	4.0	4.5	5.0
Temperatura	55	60	65
Agitación	0	200	400

4.5. Estudio del efecto de los cofactores en la actividad enzimática y su estabilidad térmica

Se determinó el efecto de los cofactores Cu^{+2}, K^{+}, Mg^{+2}, y Na^{+} sobre la actividad del extracto enzimático, siguiendo la metodología propuesta por Bhatti, H. *et al* 2007 que consiste en la adición del cofactor a una concentración de 1 mM, las condiciones de trabajo se ajustaron a las previamente establecidas en el diseño de experimentos es decir pH 4,0 y 5 g L^{-1} de maltosa y 55 °C. Adicionalmente se evaluó la estabilidad térmica de la enzima a 55 °C realizando lectura de actividad en términos de producción de glucosa cada 15 minutos por 180 minutos.

4.6. Evaluación de la Sacarificación enzimática del almidón licuado de yuca

La evaluación se realizó en dos procesos, licuefacción y sacarificación, se utilizó la metodología propuesta por Ruiz, 2011.

El proceso de licuefacción se realizó en las siguientes etapas:

- Pretratamiento del almidón. En una solución buffer de 200 mL de acetato de sodio 16 mM y ácido cítrico 0.1 M de pH 4.0, se adicionó almidón al 10% (p/v) se llevó a una temperatura de 66 °C en baño térmico, con agitación mecánica de 300 r.p.m. por 30 minutos.
- Licuefacción. A la solución anterior se le adicionó 0,0280 % (p/p) de enzima α-amilasa del *Bacillus licheniformis* Liquozyme® SCDS de Novozymes posteriomente se llevó a 80 °C de temperatura en baño termostatado con agitación mecánica por 30 minutos. Para evaluar la concentración de glucosa inicial se utilizó el método de glucosa oxidasa.

El proceso de sacarificación se realizó como se describe a continuación.

Se tomaron tubos de ensayo con capacidad de 15 mL, se les adicionó 1 mL de la solución de almidón licuado y 1 mL del extracto enzimático proveniente del hongo *Aspergillus spp*., se trabajaron con las condiciones establecidas en el diseño de experimentos, Temperatura 55 °C, pH 4.0, cofactor Mg^{+2} 1 mM, sin agitación. La actividad se determinó por la concentración de glucosa con el método de glucosa oxidasa, la lectura se realizó cada 5 minutos hasta los 30 minutos, dado que según los resultados anteriores este era el tiempo límite de actividad enzimática.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Actividad enzimática se define como la velocidad de la reacción catalizada, para este trabajo fue la velocidad a la cual la enzima proveniente del *Aspergillus* spp., hidrolizaba la maltosa en moléculas de glucosa, la cual es la respuesta a cada uno de los factores o variables que intervienen, como lo son la concentración de la enzima, de sustrato, pH, temperatura, agitación y el efecto entre ellos.

5.1. Determinación de Proteína en el extracto enzimático

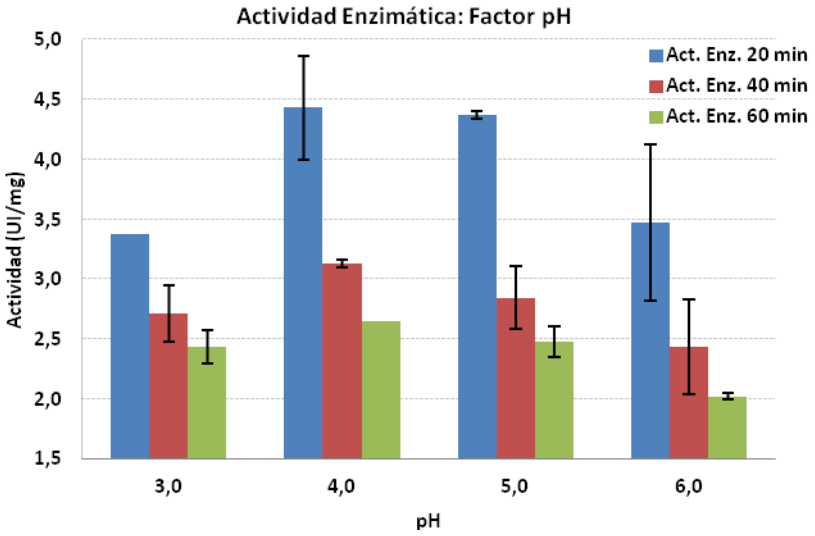
Para aumentar la concentración de proteína en el extracto enzimático se realizó variación del método de cultivo incluyendo un soporte sólido como se describe en el literal 4.1.1. de la metodología. Se evaluaron diferentes soportes, pero el que logró mejores resultados para el proceso fue el estropajo. Con esta variación se evidenció el aumento de concentración de proteína a 0.060 g L^{-1}, con lo cual se estandarizó el método de elaboración del extracto enzimático obteniendo resultados constantes de concentración de proteína. Lo anterior confirma lo referenciado por Rodríguez *et al*. 2005 en el cual se menciona que el soporte sólido favorece el incremento de la concentración de proteína. El método utilizando como soporte estropajo no ha sido reportado en la literatura por lo cual podría adaptarse a otro tipo de experimentos con otros microorganismos. La concentración de proteína es menor a la referenciada para *Fusarium solani* por Bhatti, et al 2007 quienes realizaron procesos de concentración y purificación de la proteína.

5.2. Estudio del efecto de los factores que intervienen en la actividad enzimática

5.2.1. Efecto del pH en la actividad enzimática

En la Figura 5A se reportan los resultados del efecto del pH sobre la actividad y en la Figura 5B se muestra la concentración de glucosa en el tiempo obtenida por la hidrólisis enzimática.

A



B

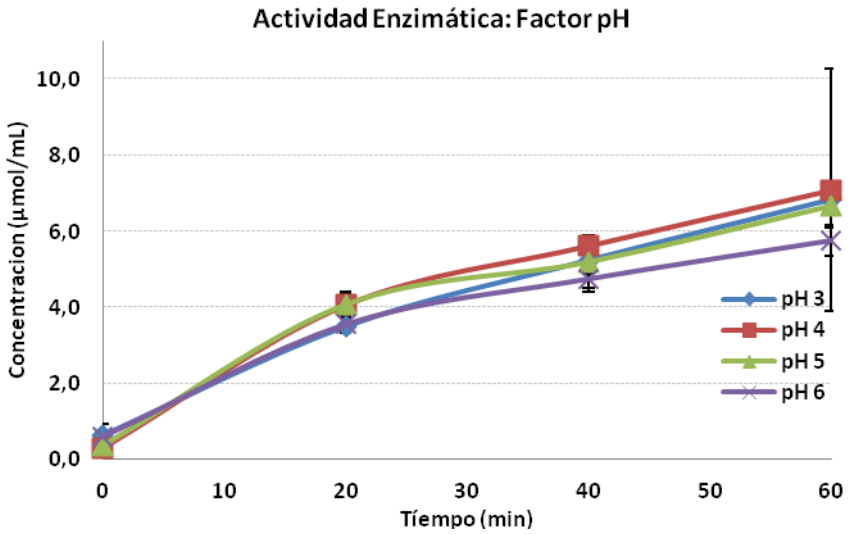


Figura 5. A. Efecto de los pH 3, 4, 5 y 6 sobre la actividad enzimática a 20, 40 y 60 minutos, **B**. concentración de glucosa en el tiempo resultado de la hidrólisis enzimática en los pH 3, 4, 5 y 6.

Como se puede observar en la Figura 5A la mayor actividad se presenta a los 20 minutos en rangos entre 3.4 y 4.4 UI mg^{-1} de actividad enzimática, siendo mayor en los pH 4 y 5 (4.4 UI mg^{-1} de actividad enzimática), los resultados se correlacionan con lo expuesto por Norouzian *et. al.,* 2006 quienes mencionan que la actividad óptima de la gluocamilasa es de 4.5 a 6.5. Con base en estos resultados para los posteriores ensayos y para el diseño de experimentos se redujo el tiempo de toma de muestras para la lectura a 0, 15, 30 y 45 minutos y para el diseño de experimentos se trabajó con los pH de 4.0 y 5.0, considerando un valor intermedio adicional de 4.5.

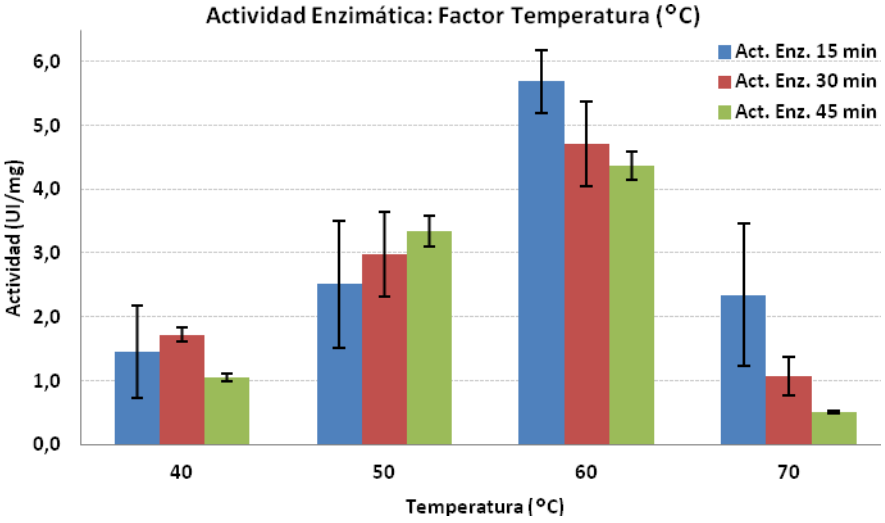
En la Figura 5B se muestra la concentración de glucosa a través del tiempo para cada uno de los pH, se observa que la pendiente positiva entre 0 y 20 minutos es mayor que la de los otros tiempos para la producción de glucosa (6.8 µmol mL^{-1}), sin diferencias de producción entre los 40 y 60 minutos, estos datos confirman la reducción del tiempo de

experimentación y los datos obtenidos con la actividad. Adicionalmente se observa que no existen diferencias significativas de producción de glucosa en los diferentes pH.

5.2.2. Efecto de la Temperatura en la actividad enzimática

En las Figura 6A se presenta el cambio en la actividad enzimática en relación a la variación de la temperatura para los tiempos establecidos y 6B se muestra el efecto en la concentración de glucosa a través del tiempo para cada una de las temperaturas. De la Figura 6A se observa que el pico de máxima actividad es a los 60 °C (5.6 UI mg^{-1}), adicionalmente se evidencia que no existen diferencias de actividad entre los tiempos de medida.

A



B

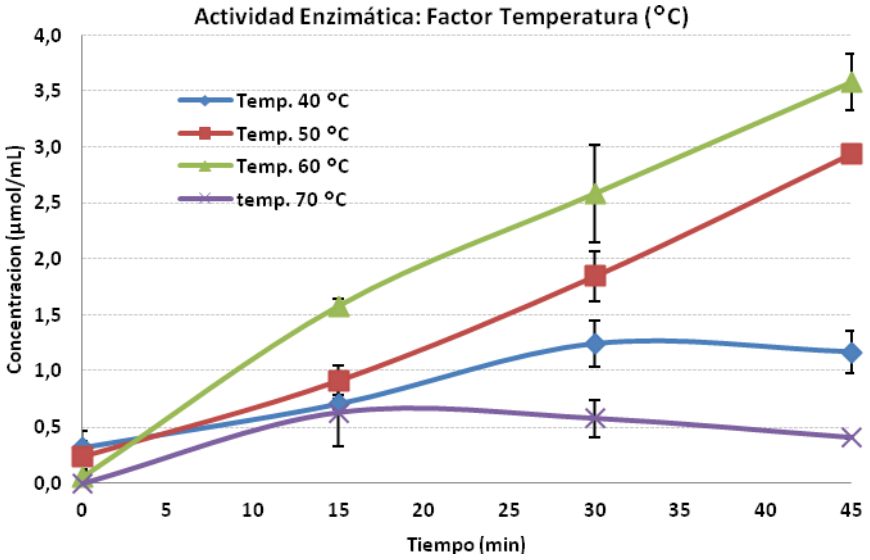


Figura 6.A. Efecto de la Temperatura para la actividad enzimática en el rango de 40 °C a 70 °C y **B**. concentración de glucosa en el tiempo.

En la Figura 6B se evidencia que a temperatura de 60 °C hay mayor producción de glucosa, estas variaciones son estadísticamente significativas respecto a los resultados con las otras temperaturas, alcanzando una concentración de glucosa de 3.5 µmol mL^{-1} a los 45 minutos; igualmente se observa que a los 50 °C existe producción de glucosa, estos resultados concuerdan con los referenciado por Norouzian *et al.,* 2006 quienes establecen que la actividad enzimática óptima de la glucoamilasa se encuentra entre 50 y 70°C.

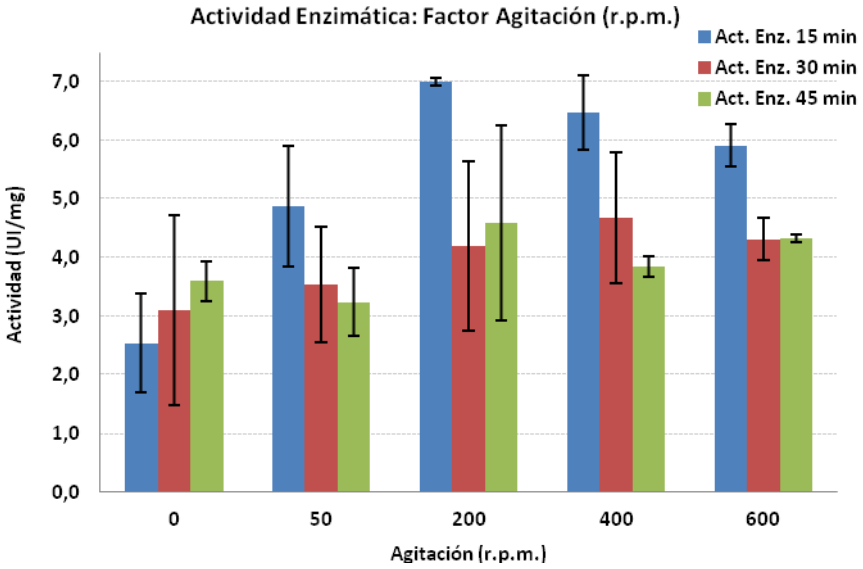
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió que para el diseño de experimentos se consideraría como valor intermedio de ensayo 60 °C y los extremos con variaciones de 5° C (55 °C y 65 °C).

5.2.3. Efecto de la Agitación en la actividad enzimática

En la Figura 7A se presenta el comportamiento de la actividad enzimática con respecto a la agitación (r.p.m.) a los 15, 30 y 45 minutos se observa que la actividad enzimática mayor

se encuentra a los 200 r.p.m. y 400 r.p.m. de agitación, siendo significativamente alta a los 15 minutos de lectura. Por lo anterior se consideró para el diseño de experimentos utilizar los valores de 200 y 400 r.p.m. e incluir el parámetro sin agitación para que el rango de diferencia entre los valores de agitación fuera el mismo y así se pudieran correlacionar. Respecto a la concentración de glucosa a través del tiempo, hubo incremento de la concentración, pero no se presentaron diferencias significativas entre valores de agitación (Figura 7B).

A



B

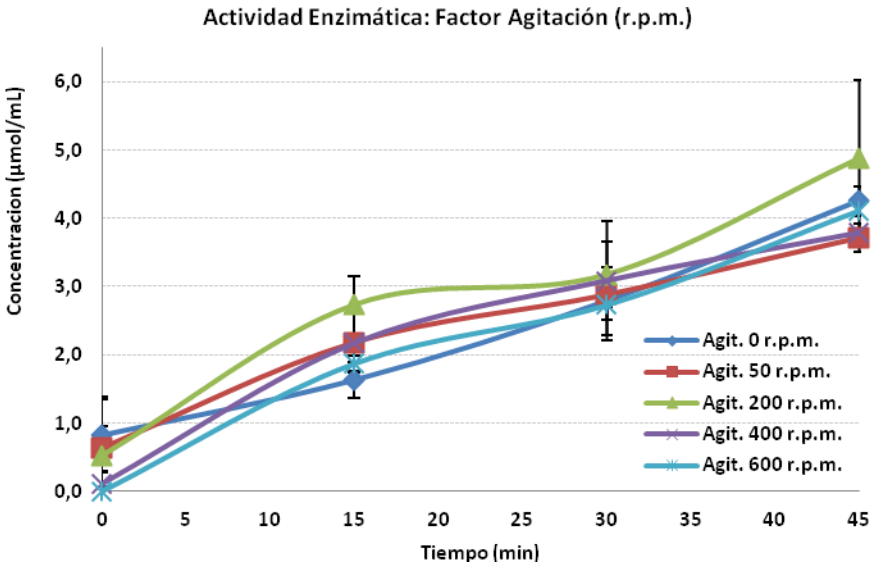
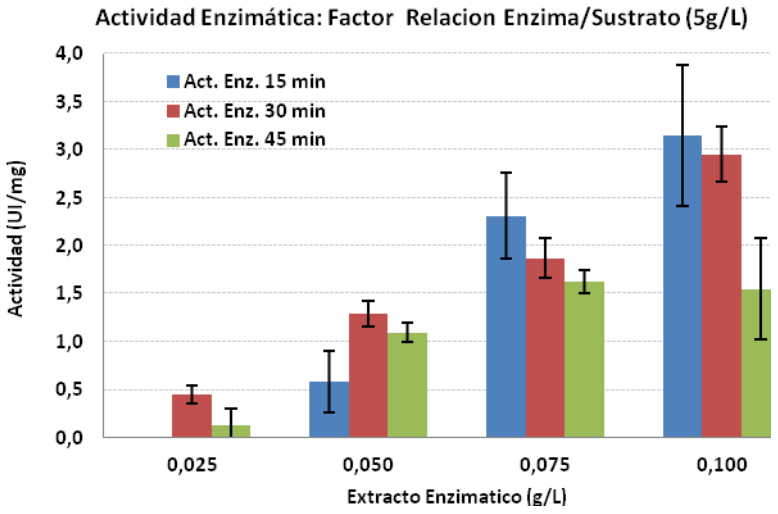


Figura 7A. Efecto de la Agitación para la actividad enzimática en el rango 0 a 600 r.p.m. **B**. concentración de glucosa en el tiempo.

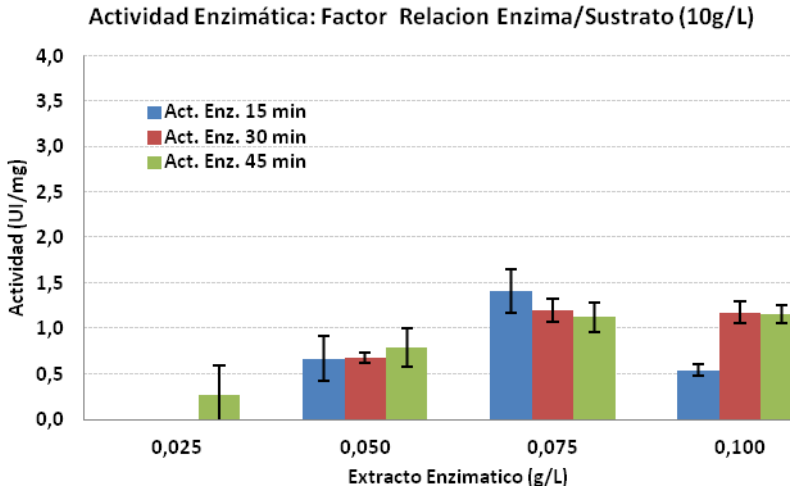
5.2.4. Efecto de la Relación Enzima/Sustrato en la actividad enzimática

Se evaluó el efecto de la relación enzima/sustrato sobre la actividad enzimática, variando las concentraciones de sustrato y de enzima, la concentración de sustrato (maltosa) fue de 5 gL^{-1}, 10 gL^{-1}, 20 gL^{-1}, 30 gL^{-1} y 40gL^{-1} y las de extracto enzimático como se mencionó en la metodología (0.100 gL^{-1}; 0.075 g L^{-1}; 0.050 gL^{-1}; 0.025 gL^{-1}). En la Figura 8A se presentan los resultados de actividad enzimáticas para las diferentes concentraciones de extracto con la concentración de sustrato de 5 gL^{-1}, así mismo en las Figuras 8B, 8C, 8D y 8E se presentan los resultados para las otras concentraciones de sustrato.

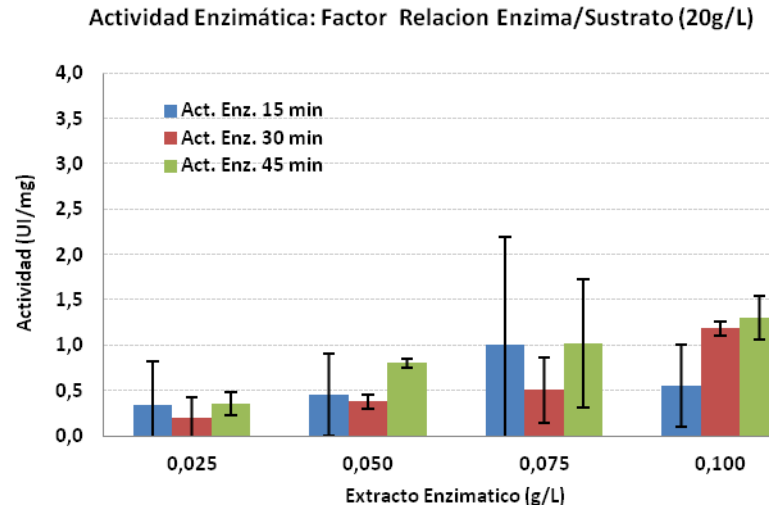
A


Actividad Enzimática: Factor Relacion Enzima/Sustrato (5g/L)
Act. Enz. 15 min
Act. Enz. 30 min
Act. Enz. 45 min
Actividad (UI/mg)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,025
0,050
0,075
0,100
Extracto Enzimatico (g/L)

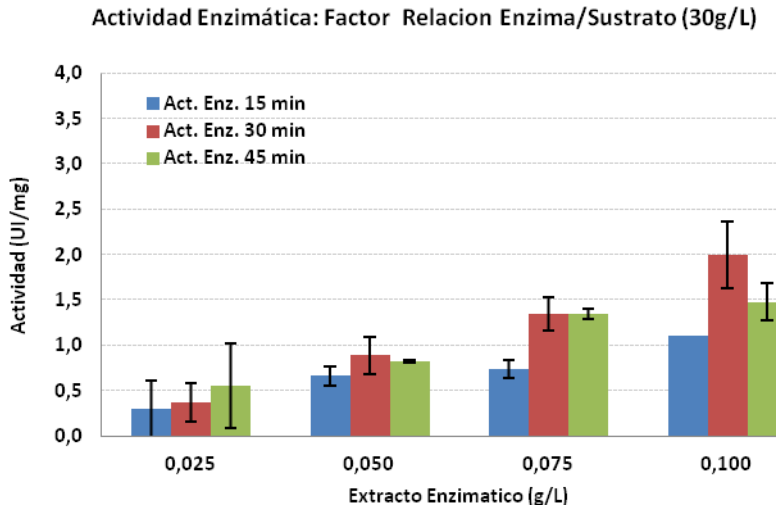
B


Actividad Enzimática: Factor Relacion Enzima/Sustrato (10g/L)
Act. Enz. 15 min
Act. Enz. 30 min
Act. Enz. 45 min
Actividad (UI/mg)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,025
0,050
0,075
0,100
Extracto Enzimatico (g/L)

C


Actividad Enzimática: Factor Relacion Enzima/Sustrato (20g/L)
Act. Enz. 15 min
Act. Enz. 30 min
Act. Enz. 45 min
Actividad (UI/mg)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,025
0,050
0,075
0,100
Extracto Enzimatico (g/L)

D



E

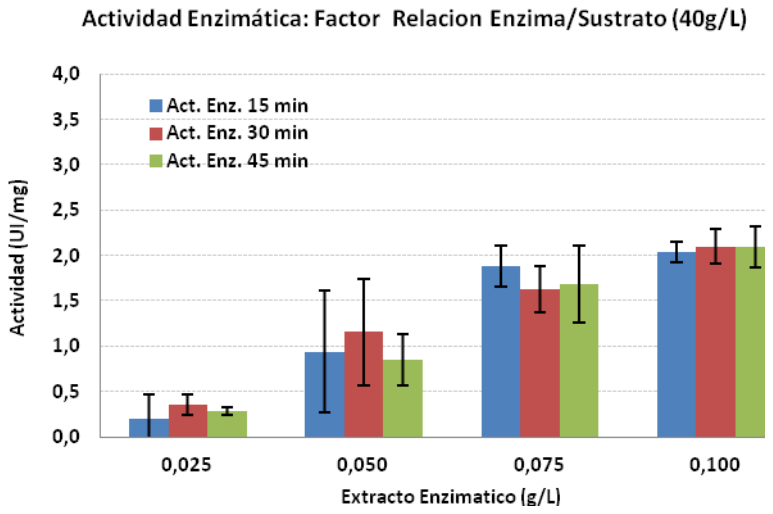


Figura 8. Relación Enzima/Sustrato de las cuatro (4) diferentes concentraciones de Extracto enzimático y las cuatro (4) concentraciones de sustrato **A**. 5 g L^{-1}, **B** 10 g L^{-1}, **C** 20 g L^{-1}, **D** 30 g L^{-1} y **E** 40 g L^{-1}.

Como se puede observar en los resultados a mayor concentración de sustrato, la actividad enzimática disminuye, esto puede ser explicado por el efecto de inhibición que tiene el exceso de sustrato sobre la enzima. Por tanto la mejor concentración de trabajo de sustrato es a 5 g L^{-1}. Así mismo, se observa que a mayor concentración de enzima mayor actividad, no obstante con las concentraciones de trabajo no se encontró inhibición por

competencia enzimática esto es debido a que la concentración máxima de extracto enzimático que se puede obtener con el método de soporte sólido a las condiciones anteriormente mencionadas es de 0.060 g L^{-1}.

Igualmente se evaluó la concentración de glucosa a través del tiempo para los diferentes ensayos. En la Figura 9 se presentan los resultados para la concentración de sustrato de 5 g L^{-1}, como se evidencia la concentración de glucosa aumenta a través del tiempo en la concentración de extracto enzimático de 0.1 g L^{-1}. Estos mismos resultados se observaron para las otras concentraciones de sustrato (datos no mostrados).

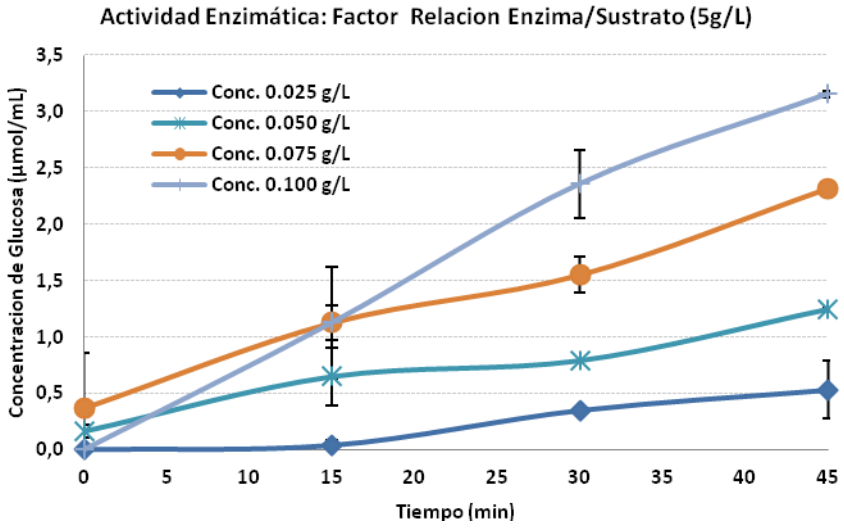


Figura 9. Concentración de glucosa en la hidrólisis enzimática para las cuatro (4) diferentes concentraciones de Extracto enzimático y la concentración de sustrato de 5 g L^{-1}

5.3. Diseño de Experimentos y Tratamiento Estadístico de los Datos

En el Anexo 3 se presentan los resultados obtenidos en el diseño de experimentos estos datos fueron analizados con el programa estadístico Statgraphics®.

El diagrama de Pareto (Figura 10) muestra en forma decreciente el grado de importancia (significancia) que tiene los diferentes factores y sus combinaciones. En este caso siete (7) efectos tienen valor de P menores a 0.05, siendo estos valores significativos con un nivel de confianza del 95.0 % (son aquellos que superan la línea Vertical).

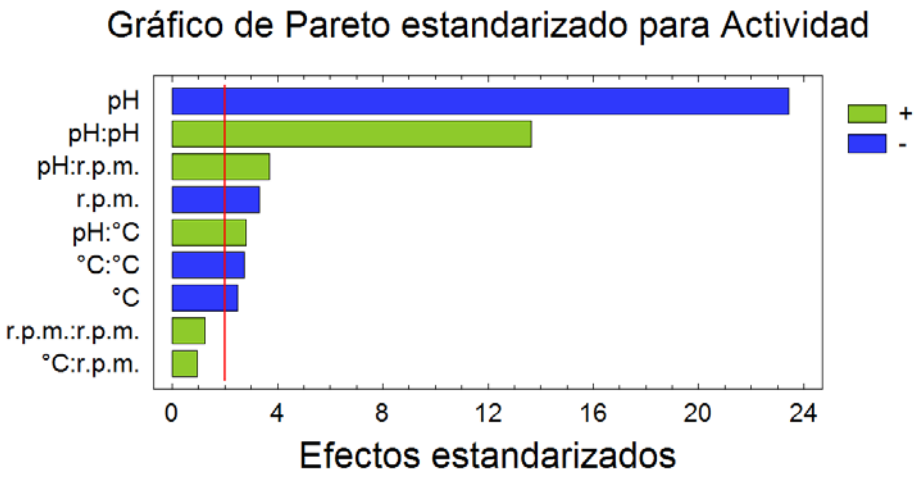


Figura 10. Diagrama de Pareto Estandarizado para la Actividad Enzimática

El diagrama de Pareto también se puede explicar por la existencia de las interacciones que se presentan entre los factores estudiados (Figura 11), las líneas paralelas de la combinación BC (Temperatura/Agitación) son indicio de la poca o nula interacción existente entre estas variables, contrario a lo que se observa con las combinaciones AB (pH/Temperatura) y AC (pH/Agitación) siendo esta última la que mayor divergencia presenta por lo que la interacción de esta combinación es significativa. Los signos negativos y positivos de las barras del diagrama de Pareto, son el efecto en el decrecimiento o aumento en la variable respuesta, respectivamente, y por ende su aporte sobre la respuesta o modelo obtenido Ecuación 2.

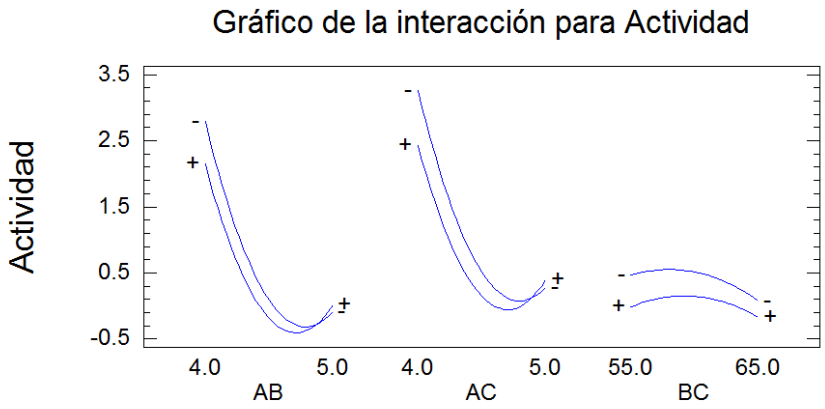


Figura 11. Diagrama de Interacción para la Actividad Enzimática

Tabla 4. Análisis de varianza para la Actividad Enzimática

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	84.5096	1	84.5096	389.55	**0**
B:Temperatura	1.01556	1	1.01556	4.68	**0.034**
C:RPM	1.80346	1	1.80346	8.31	**0.0052**
AA	28.5834	1	28.5834	131.75	**0**
AB	1.24843	1	1.24843	5.75	**0.0192**
AC	2.02467	1	2.02467	9.33	**0.0032**
BB	1.07175	1	1.07175	4.94	**0.0295**
BC	0.119731	1	0.119731	0.55	0.4601
CC	0.307913	1	0.307913	1.42	0.2376
Bloques	1.34571	2	0.672855	3.1	0.0513
Error Total	14.9691	69	0.216944		
Total (Corr.)	136.999	80			

GI = Grados de Libertad

Corr = Correlación

En negrilla subrayado se presentan los valores P menores a 0.05 mencionados en el diagrama de Pareto.

El modelo estadístico obtenido (Ecuación 2) muestra por medio de su R-cuadrado de 89.0736 % y un R-cuadrado ajustado 87.6885 %, que es estadísticamente capaz de explicar la variabilidad de la actividad enzimática, con una desviación estándar de los residuos o Error Estándar de Estimación de 0.465772 % y un Error absoluto de la media de 0.3003 % la variabilidad de este modelo figura 12, que por medio del método de mínimos cuadrados calcula la ecuación de la línea óptima, permite ser entendida al observar el grado de desviación de los datos (puntos) que representan el resultado de cada uno de los experimentos realizados en el diseño.

Actividad Enzimática = 103.29 - 52.81*pH + 0.79*Temperatura - 0.016*RPM + 5.04*pH^2 + 0.074*pH*Temperatura + 0.002*pH*RPM - 0.009*Temperatura^2 + 0.00005*Temperatura*RPM + 0.000003*RPM^2

Ecuación 2. Ecuación de respuesta. Modelo matemático para la actividad enzimática

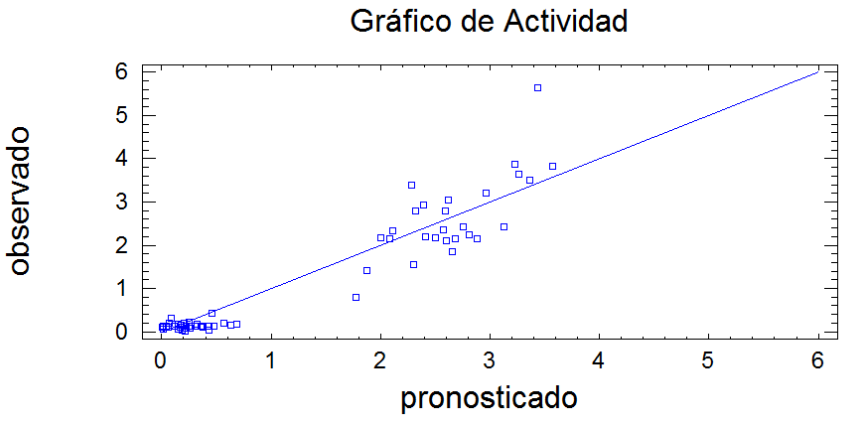


Figura 12. Predicción por regresión lineal múltiple para Actividad Enzimática

A partir del valor de los coeficientes que acompañan al modelo matemático obtenido (Ec. 2) es posible decir que las variables independientes que mayor grado de contribución sobre el valor de la respuesta de la actividad enzimática son el pH y el pH^2 en menor proporción, para finalmente encontrar el resto de combinaciones de primer y segundo orden, cuyo aporte sobre la respuesta es mínima.

Finalmente, por medio del análisis tanto de la superficie de respuesta como de la superficie de contorno (Figura 13 y Figura 14) en la que se mantiene fija la agitación a 0 r.p.m. se ve como a medida que disminuye el pH, los valores para la Actividad Enzimática van aumentando.

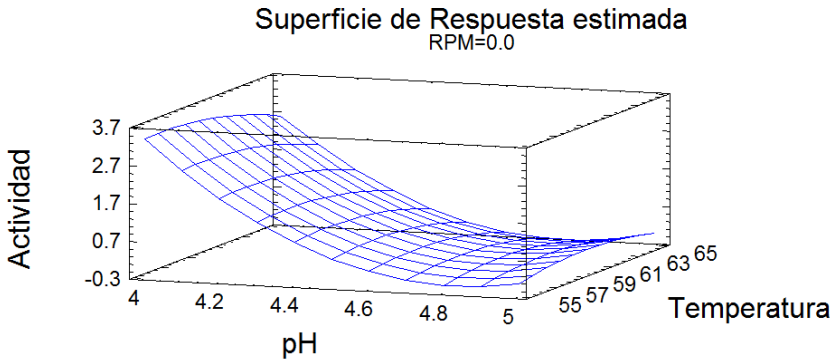


Figura 13. Superficie de Respuesta estimado para la Actividad Enzimática

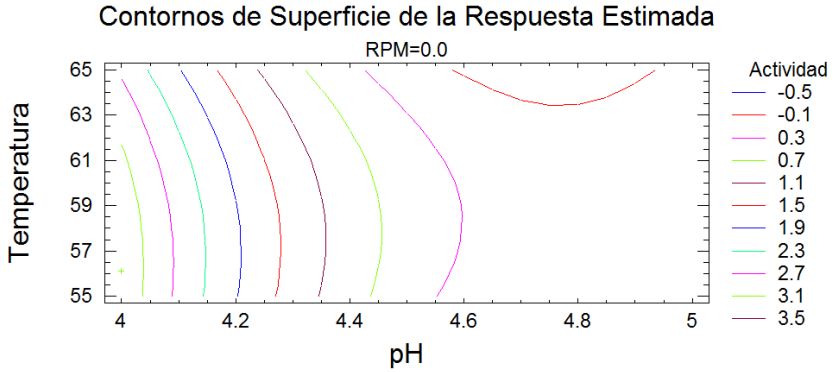


Figura 14. Contorno de Superficie de la Respuesta Estimada para la Actividad Enzimática

Tabla 5. Predicción por Statgraphics®

Factor	Inferior	Mayor	Optimo
pH	4.0	5.0	4.0
Temperatura (°C)	55.0	65.0	56.1
Agitación (r.p.m.)	0.0	400.0	1.206E-06

5.4. Estudio del efecto de los cofactores en la actividad enzimática y su estabilidad térmica

En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los cofactores sobre la actividad enzimática, todos los cofactores evaluados tienen influencia positiva sobre la actividad enzimática, siendo mayor esta influencia para el cofactor de Mg^{+2}, quien aumenta la actividad en 1,32 UI/mg (32.4 %) respecto al control estos resultados coinciden con lo referenciado por Bhatti, *et al*. 2007[u1] quien encontró un 32 % de aumento de actividad en la glucoamilasa de *Fusarium solani*.

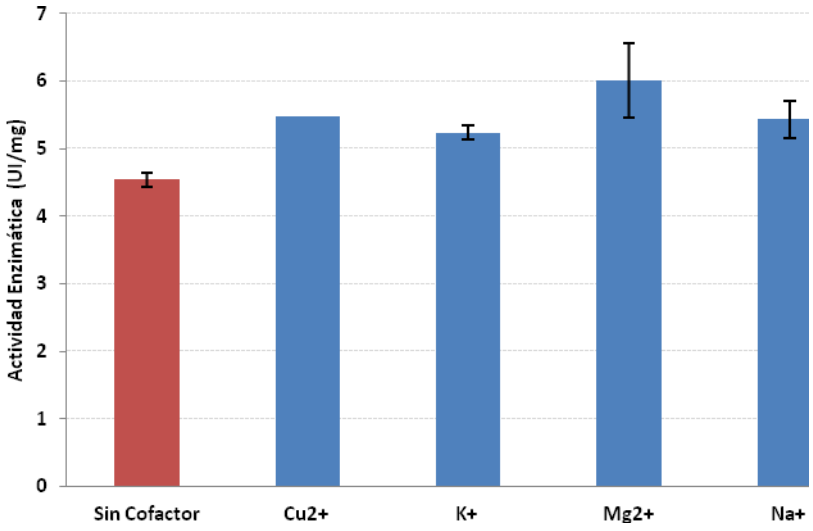


Figura 15. Evaluación de cofactores en la actividad enzimática

El incremento en la actividad enzimática por la parte del cofactor Mg^{+2} en el proceso de sacarificación del almidón de yuca licuado hace que sea menor el tiempo necesario para una completa conversión de almidón a glucosa.

Con respecto a la estabilidad térmica del extracto enzimático (Figura 16) se observa que a los 30 minutos hay un aumento en la actividad enzimática que disminuye a los 45 minutos para posteriormente permanecer constante hasta los 120 minutos, después de los 120 minutos la enzima pierde propiedades catalíticas, el tiempo de vida media (VM) fue de 60 minutos, esto es comparativamente superior a lo encontrado para la glucoamilasa de *Fusarium solani* la cual tiene un VM de 26 minutos

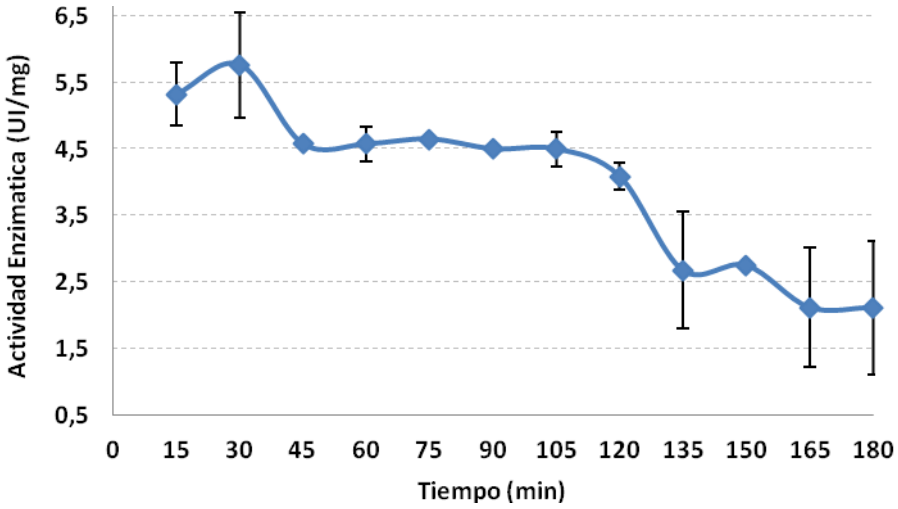


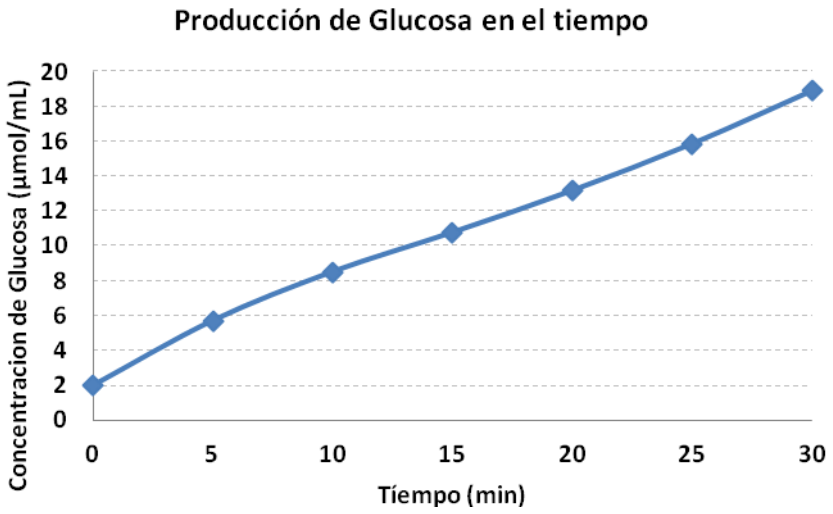
Figura 16. Estabilidad térmica de la glucoamilasa proveniente del *Aspergillus* spp., en la actividad en el proceso de sacarificación

5.5. Sacarificación enzimática del almidón licuado de yuca

Para la sacarificación del almidón licuado de yuca se utilizó la metodología descrita en el numeral 4.6., en la Figura 17A se muestra la producción de glucosa a través del tiempo

durante el proceso de sacarificación de almidón licuado de yuca, se evidencia aumentó de la concentración a través del tiempo, siendo la velocidad de formación aparentemente similar entre los tiempos de medida, durante el tiempo de estudio no se llega al punto máximo de producción.

A



B

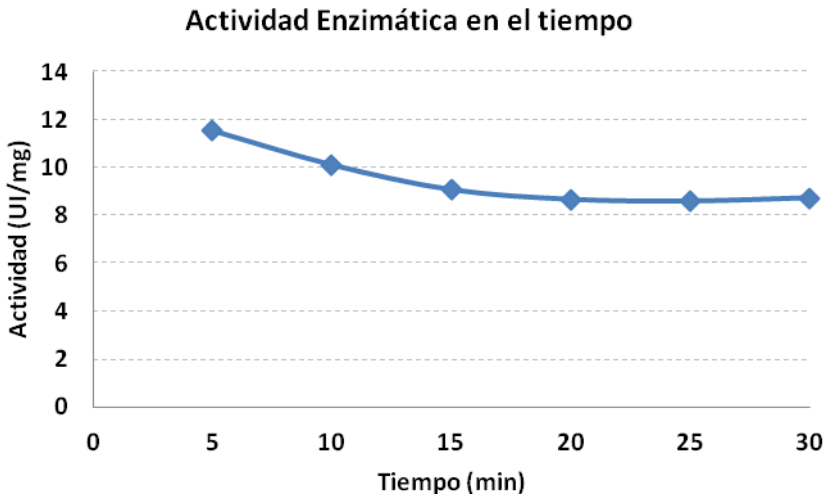


Figura 17. A. Concentración de glucosa en la hidrolisis enzimática para el almidón de yuca licuado, **B** Actividad enzimática para la sacarificación en un tiempo de 30 min.

En la Figura 17B se presenta la actividad enzimática en el tiempo durante el proceso de sacarificación de almidón licuado de yuca. Como se observa la actividad enzimática se

estabiliza a los 15 minutos manteniéndose constante durante el tiempo de experimentación, no observándose disminución de la actividad luego no se comprueba el punto máximo en el que la enzima sacarifica el sustrato disponible en el medio.

Los datos encontrados evidencian una relación producción de glucosa/actividad enzimática de 0.9 para el extracto enzimático del *Aspergillus* spp., que es una relación menor a los datos obtenido por Ruiz et al., 2011 quienes encontraron una relación de 3.7, es necesario aclarar que estos datos reportados provienen de una glucoamilasa comercial (Spirizyme® Fuel), la cual ha sido purificada.

Debido a que en la metodología planteada para este trabajo el modo de inactivar la enzima proveniente del *Aspergillus* spp., en el proceso de sacarificación fue la utilización de ácido perclórico al 3 % (p/v) el cual interfiere con el reactivo de DNS, ya que este no trabaja a pH ácido (Whistler, *et al.* 1994), por lo tanto no se pudo determinar la concentración de azúcares reductores para de esta forma poder tener el resultado de conversión de almidón a glucosa como lo reporta Johnson *et al.* 2009

6. CONCLUSIONES

- La obtención del extracto enzimático proveniente del hongo *Aspergillus* spp. fue mejorada por medio de fermentación en estado sólido, alcanzando una concentración de 0.06 g/l.

- Las mejores condiciones para el proceso de hidrólisis de maltosa por el extracto enzimático proveniente de *Aspergillus* spp. fueron

  pH 4.0,

  Temperatura 55,0 °C,

  Sin agitación

  CofactorMg^{2+} a 1 mM.

- De manera preliminar se evidenció que el extracto enzimático proveniente del hongo *Aspergillus* spp. realiza sacarificación de almidón licuado de yuca.

7. RECOMENDACIONES

- Determinar el tiempo en que el extracto enzimático nativo de *Aspergillus* spp. produce la mayor concentración de glucosa.

- Purificar del extracto enzimático de *Aspergillus* spp.

- Escalar el proceso de sacarificación para determinar la variabilidad financiera.

- Evaluar la posibilidad de protección intelectual de los resultados.

8. BIBLIOGRAFÍA

AMUTHA, R., AND GUNASEKARAN. Production of Ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co-Immobilized Cells of Zymomonasmobilis and Saccharomycesdia staticus. Journal of Bioscience and Bioengineering, (2001).Vol. 92, No. 6, 560-564. Bai, F.;

ANAYA VEGA F. J. Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca mediante hidrólisis ácida asistida por microondas. Bucaramanga 2004. Tesis de pregrado en Química. Facultad de ciencias.

ANDERSON, W.; AND MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstock's. Biotechnology Advances 26 (2008) p. 89–105. Disponible en www.sciencedirect.com

ANDRÉS RUEDA, CLARA SÁNCHEZ, RODRIGO TORRES & DANIEL MOLINA. OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO CON ACTIVIDAD SACAROLITICA A PARTIR DEL AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS NATIVOS. Bucaramanga, Colombia.

ARISTIZÁBAL, J., F. MORENO. Y G. BASTO; Estudio de una nueva técnica e implementación de una línea piloto de proceso para la obtención de dextrinas a partir de almidón de yuca. Ingeniería e Investigación, ISSN: 0120-5609 (en línea), 27 (2), 26-33 (2007). http://www.scielo.org.co/pdf/- iei/v27n2/v27n2a04.pdf. Acceso: 6 de octubre (2007).

BAI, F.; ANDERSON, W.; AND MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feed stock's. Biotechnology Advances 26 (2008) p. 89–105. Disponible en www.sciencedirect.com

BAKS, T., BRUINSM.E., MATSER A.M., JANSSENA.E.M& BOOM R.M. (2008)."Effect of Gelatinization and HydrolysisConditionsontheSelectivity of Starch Hydrolysis with α-Amylase from Bacillus licheniformis".J. Agric. FoodChem. 56, 488–495. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

BELMAOZBEK&SEMRAYUCEER. (2001). "Alfa-Amylasein activation during wheat starch hydrolysis process". Process Biochemistry. 37, 87–95. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

BERTOLDO COSTANZO AND ANTRANIKIANGARABED. Starch-hydrolyzing enzymes fromthermophilic archaea and bacteria. CurrentOpinion in ChemicalBiology 2002, Vol 6 p 151–160. Disponible en www.sciencedirect.com

Bhatti, H; Rashid, M; Nawaz, R; Asgher, M; Perveen, R; Jabbar, A. 2007. Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusariumsolani.* FoodChem. Vol. 103, 338–343.

BIOQUÍMICA tema 7. Enzimas, extraído de http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r63869.PDF

CEVALLOS H, CRUZ G. A & MEJÍA DE TAFUR M. S. La Yuca en el Tercer Milenio: Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Cap. 1, 2, 3 [libro en línea] Recuperado en, www.clayuca.org, 2006.

COPELAND L, BLAZEK J, SALMAN H & CHIMINGTANG M.(2009). “Form and functionality of starch”. FoodHydrocolloids. 23, 1527–1534. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

CORRADINII E, et al. (2005). “Comparativ estudies of corn thermoplastic starches with different amylose content”. Polímeros [versión en línea] vol. 15, n. 4, 268-273. Recuperado de la base de datos Scielo, en, http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282005000400011&script=sci_abstract

CURRENTPROTOCOLS IN PROTEINSCIENCE, Unit 7.7 y 20.8

DIETRICHKNORR, VOLKER HEINZ &ROMANBUCKOW. (2006).“High pressureapplicationforfoodbiopolymers”. Biochimicaet Biophysica Acta 1764, 619–631. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

DILEKKILIC A &BELMAOZBEK. (2005). “α-Amylaseinactivationduring rice starchhydrolysis”.ProcessBiochemistry. 40, 1367–1379. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

EMMANUEL LÉVEQUEA, S TEFANJANECEKC, BERNARD HAYEA, ABDELBELARBI. Thermophilic archae alamylolytic enzymes. Enzyme and Microbial Technology 26 (2000) p 3–14. Disponible en ELSEVIER

ENZYMATIC STARCH HYDROLYSIS: background. Wageningen University. Recuperado en http://www.bpe.wur.nl/UK/Research2/Dissertations/Enzymatic+starch+hydrolysis/Enzymatic+starch+hydrolysis+background/default.htm

ENZYMES IN FOODPROCESSING. Tercera edición. NAGODAWITHANA T, REED G. Academic press, Inc. HarcourtBrace & company. San Diego. New York Boston. 1993. Cap 1,2,3 y 6

ERTAN F, YAGAR H, BALKAN B (2007). “Optimization of alphaamylaseimmobilization in calciumalginatebeads”.PrepBiochemBiotechnol. 37, 195-204. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

ESTRATEGIA DE DESARROLLO DE BIOCOMBUSTIBLES: implicaciones para el sector agropecuario. Recuperado en http://www.minagricultura.gov.co/archivos/biocombustibles.pdf.

Glucose Oxidase/Peroxidase (Biosystems) http://www.biosystems.es/products.aspx?sector=DIAGNOSTICS&line=Qu%25u00edmica+Cl%25u00ednica&prdline=BIOQU%25u00cdMICA&AspxAutoDetectCookieSupport=1

GODFREY T. Y REICHELT J. Industrial Enzymology. Macmillan Publishers Ltd United Izquierdo y G. De la Riva, “Plantbiotechnology and foodsecurity in LatinAmerica and theCaribbean” Electronic Journal of Biotechnology (2000).

GONZÁLEZ, C., FARIÑA, J. Y DE FIGUEROA, L. Optimized amylolytic enzymes production in Saccharomycopsisfibuligera DSM-70554 anapproach to efficient cassava starch utilization Version electronic Enzyme and MicrobialTechnology (2008).Vol. 42, 272–277.

HARMEET, K. S, KANUPRIYA, S, JUGAL, K. G &SANJEEVK. S. (2005). “Production of a termostable α-amylase from Bacillussp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production”.Process Biochemistry. 40, 525–534. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

ILLANES F. A. (1994) “Biotecnología de enzimas”. Ediciones universitarias de la universidad católica de Valparaíso. Chile. Monografía No 35. Capítulos 2 y 4

JOHNSONREGY, PADMAJAG. AND MOORTHYS.N. “Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques”. Innovative FoodScience and Emerging Technologies 10 (2009) 616–620

KONSOULA, Z & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. (2006). “Starch hydrolysis by the action of anentrapped in alginate capsules α-amylase from Bacillus subtilis”. Process Biochemistry 41, 343–349. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

KOVALENKOGALINA A &PERMINOVA LARISA V. (2008). “Immobilization of glucoamylase by adsorptionon carbon supports and its application for heterogeneous hydrolysis of dextrin”.Carbohydrate Research 343, 1202–1211. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

LANDAZABAL DELGADO P. Obtención de etanol a partir de almidón de yuca variedad chile en un proceso de 2 etapas: hidrólisis (Aspergillus niger) – fermentación (Zymomonasmobilis). Bucaramanga 2004. Tesis de pregrado en Química. Facultad de ciencias.

LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR. Segunda edición. LEHNINGERA. L. Ediciones omega, S.A. Barcelona. 1995. Cap 8

LEVEQUE, E., JANECEK, S., HAYE, B. &BELARBI, A. (2000). “Termophilic archae alamylolytic enzymes. Review”. Enzyme and Microbial Technology 26, 3-14. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

LOPEZ-ULIBARRI R & HALL G.M. (1997). “Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fibermembrane reactor”.Enzyme and MicrobialTechnology 21, 398-404. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

MARINI, I.Two hydrolytic enzymes and anepistemological historical approach. Recuperado en http://www.scienceinschool.org/repository/docs/issue4_enzymes.pdf, 2007

MERA I, HOYOS J. L, CARRERA J, FORERO C. L. & VELASCO R. (2003). “Caracterización enzimática de alfa-amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de yuca (manihot esculenta)”. Revista biotecnología I. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 1 No. 1

Modified Starches: Properties And Uses. O. B. Wurzburg, M. S. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1987. Cap 1.

MOLECULAR STRUCTURE AND FUNTION OF FOODCARBOHYDRATE.G. G. BIRCH and L. F. GREEN. John Wiley & sons . New York- Toronto. SessionIV. Paper11. Thestructure of starch. W. Banks, C. T. Greenwood and D. D. Muir. pág. 177

MORALES A. S, ALVAREZ B. H & SÁNCHEZ C.C. (2008). “Dynamic models for the production of glucosesy rups from cassava starch. Short communication”. food and bioproducts processing 86, 25 – 30. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

NOROUZIAN, D., AKBARZADEH, A., SCHARER, J., AND YOUNG, M. Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances (2006). 24, 80–85. Disponible en www.sciencedirect.com

NOROUZIAN, D., AZIMAKBARZADEH, JENO M. SCHARER, MURRAY MOO YOUNG. Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances 24 (2006) p 80–85 Disponible en www.sciencedirect.com

O'BRIEN, S. AND WANG, YJ.Susceptibility of annealedstarchestohydrolysisby -amylase and glucoamylase.CarbohydratePolymers (2008). 72, 597–607

PATLE S, LAL B. "Investigation of the potential of agroindustrial material as low cost substrate for ethanol production by using Candida tropicalis and zymomonas".Biomass and Bioenergy. (2008), Recuperado de la base de datos Sciencedirect

Pornpong Sutthirak, Saovanee Dharmsthiti, Sittiwa tLertsiri. Effect of glycationon stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from Aspergillus niger. Process Biochemistry 40 (2005) 2821–2826

Purificación y aislamiento de enzimas. Recuperado en,http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte04/02.html.

REINALDO J. VELASCO, WILLIAM A. LUNA, JULIÁN A. MERA Y HÉCTOR S. VILLADA. Producción de Dextrinas a partir de Almidón Nativo de Yuca por Ruta Seca en una Agroindustria Rural. Información Tecnológica Vol. 19 Nº 2 2008. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de agroindustria.

RODRÍGUEZ S., SANROMÍNA A., Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production, Biochemical Engineering Journal 22 (2005) 211–219

RUEDA, A., RUEDA, L., SANCHEZ C., MOLINA, D., "Screening and characterization of the enzymatic extract from filamentous native fungi for the sacharification of cassava starch to produce glucoses y rups" Puerto Rico. 2011. 43 IUPAC World Chemistry Congress, 46 IUPAC General Assembly

Ruiz MónicaI., Sanchez Clara I. Torrres Rodrigo G. and Molina Daniel R., “Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild YeastStrain”. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-7, 2011

SÁNCHEZ LOPEZ A. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisisenzimática de almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile). Cultivadas en provincia Guanenta (Santander). Bucaramanga 2002. Tesis de pregrado en Química. Facultad de ciencias

SÁNCHEZ MONTERO, J.M. Inmovilización de enzimas. Recuperado en, http://www.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/00_INMOVILIZACION_Introduccion.pdf

SÁNCHEZ, A. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática de almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile). Cultivadas en provincia Guanenta (Santander). Bucaramanga 2002. Tesis de pregrado en Química. Facultad de ciencias.

SÁNCHEZ, Ó. J Y CARDONA, C. A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. [Versión electrónica]. INCI. nov. 2005, vol. 30, no. 11, p. 671-678. Recuperado en <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100005&lng=es&nrm=iso>. IS

SHANKAR, V., NEHETE, P.N. & KOTHARI, R.M. (1993). “Immobilization of amyloglucosidase”.Indian J. Biochem Biophys. 30,62-70. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

SHARIFFAA, Y. N., KARIMA, A. A, FAZILAHA, A. & ZAIDULB, I.S.M (2009).“Enzymatic hydrolysis of granular native and mildlyheat-treated tapioca and sweet potato starches at sub gelatinization temperature”. Food Hydrocolloids Food Hydrocolloids 23, 434– 440. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

SLOMINSKA L, SZOSTEK A & GRZESKOWINAK A. (2002). “Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins ultrafiltration membrane bioreactor”. Carbohydrate Polymers 50, 423-428. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

TESAFFRIRZOR & ZVISELINGER. (1996). “Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies”. Analytical Biochemistry 236, 302-308 Article No. 0171

VIJAY SINGH (2007). Ethanol Production in US. Recuperado en http://www.istc.illinois.edu/about/SeminarPresentations%5CEthanol-Production.pdf.

WHISTLER. Roy L. SMITH, Robert J, Be MILLER, James N. Y Wolfrom, M.L.. Methods in Carbohydrate Chemistry. volumen IV, Starch. 1994. Academic Press. New York 1964 Pagina 67

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN UNA ENZÍMA POR EL MÉTODO DE BRADFORD. Tesaffrir Z. & ZviS. (1996).

El máximo de absorbancia del colorante azul de Coomasie en solución ácida varía de 495 a 595 nm. Emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido. Fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, reacciona principalmente con residuos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe, originando un color azul intenso que se puede medir fácilmente; es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol.

- **Preparación de 500 ml de reactivo de Bradford**:

Disolver 50 mg de azul brillante de CoomasieG250 lentamente en 25 mL de etanol, al 95 % cubriendo el recipiente con papel aluminio (para evitar reacciones secundarias por acción de la luz). Una vez diluido agregar 50 mL de ácido orto-fosfórico (H_2PO_4) al 85 % (p/v), la solución resultante se afora a 500 mL con agua destilada y almacenar refrigerado.

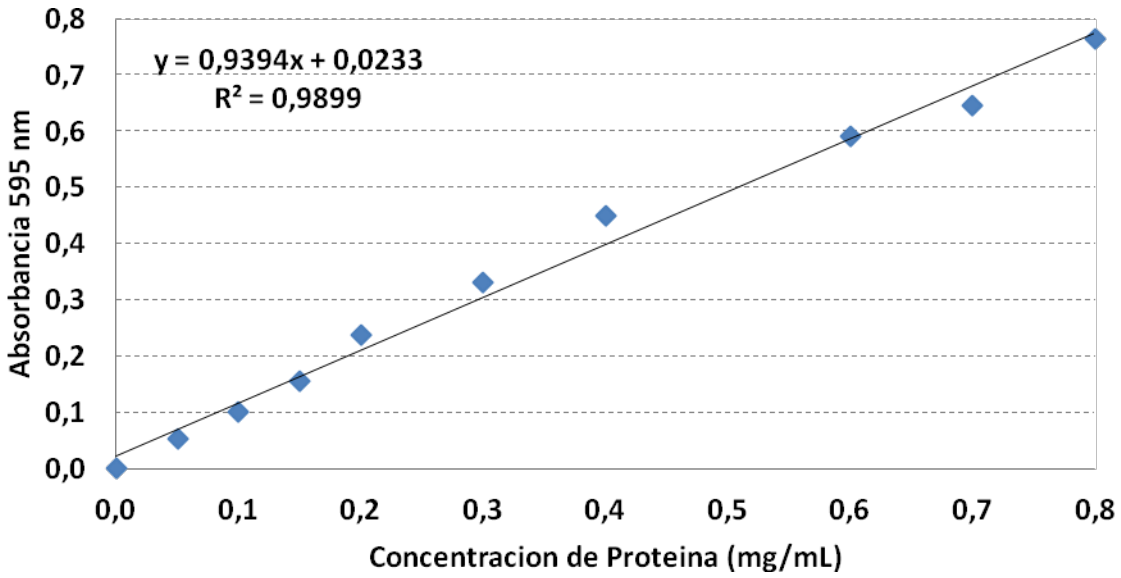


Figura 18. Curva de calibración de Bradford.

De la Figura 18 se obtiene la siguiente ecuación de la curva Y = 0.9394 [proteina](mg mL^{-1}) + 0.0233 la cual se utiliza para la determinación de la concentración de proteína de las enzimas analizadas por interpolación de los datos.

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO DEL LA GLUCOSA OXIDASA. Biosystems

LA Glucosa Oxidasa es una flavoproteina que cataliza la oxidación de la β-D-glucosa formando así el peróxido de hidrogeno y D-glucono-δ-lactona. El peróxido de hidrógeno se cuantifica vía la reacción de peroxidasa donde el oxígeno se transfiere del peróxido de hidrógeno a un aceptador cromático produciendo un tinte de quinonaimina, la cual es medida directamente a 500 nm. La intensidad del color del tinte es directamente proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra del suero. El esquema de la reacción ilustra los eventos que ocurren en este procedimiento:

$$\textbf{Glucosa} + \tfrac{1}{2}\,O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucosa Oxidasa}} \textbf{Glucónico} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \textbf{4-Aminoantipirina} + \textbf{Fenol} \xrightarrow{\text{Peroxidas}} \textbf{Quinonaimina} + 4\,H_2O$$

La concentración de glucosa en cada una de las muestras se calcula de la siguiente manera.

$$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patrón}}\ X\ C_{Patrón} = C_{Muestra}$$

Ecuación 1. Ecuación para determinar la concentración de glucosa (A: Absorbancia, C: Concentración)

ANEXO 3

Tabla 6. Representación de los factores y niveles para el diseño de experimento.

pH	Temperatura (°C)	Agitación (r.p.m.)	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
4	55	0	3.81699	3.64453	3.51662
4.5	55	0	0.15293	0.11915	0.12607
5	55	0	0.13751	0.11828	0.13395
4	60	0	5.64427	2.42969	3.86828
4.5	60	0	0.17807	0.11339	0.13348
5	60	0	0.41516	0.05847	0.22046
4	65	0	2.23335	2.17834	2.10997
4.5	65	0	0.13408	0.1326	0.11968
5	65	0	0.19123	0.08669	0.13109
4	55	200	3.2079	1.84321	2.42256
4.5	55	200	0.13408	0.09897	0.10938
5	55	200	0.31417	0.08871	0.19663
4	60	200	2.15213	2.34591	2.14905
4.5	60	200	0.12151	0.09417	0.09826
5	60	200	0.11817	0.19893	0.15293
4	65	200	2.80183	2.17834	2.34441
4.5	65	200	0.14455	0.08072	0.09929
5	65	200	0.03867	0.08468	0.05958
4	55	400	3.04547	1.54997	2.18812
4.5	55	400	0.17807	0.09032	0.11783
5	55	400	0.0043	0.1203	0.06356
4	60	400	2.80183	3.39319	2.93052
4.5	60	400	0.1655	0.10954	0.12339
5	60	400	0.18908	0.08871	0.13109
4	65	400	2.15213	0.79593	1.40665
4.5	65	400	0.15922	0.1057	0.11041
5	65	400	0.03653	0.13508	0.08342