

**OBTENCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A PARTIR DE ALMIDÓN
DE YUCA POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, PARA SER
USADOS COMO SUSTRATO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.**

MÓNICA IRENE RUIZ CAMACHO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2009**

**OBTENCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A PARTIR DE ALMIDÓN
DE YUCA POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, PARA SER
USADOS COMO SUSTRATO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.**

MÓNICA IRENE RUIZ CAMACHO

Trabajo de grado para optar al título de Química

Director:

DANIEL RICARDO MOLINA VELASCO

Profesor adscrito a la escuela de Química

Directora:

CLARA INES SANCHEZ SUÁREZ

Profesora adscrita a la escuela de Bacteriología y Laboratorio
Clínico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2009**

*Con todo mi amor
A mi familia por su amor y comprensión
y a todos aquellos que contribuyeron
a mi empeño de alcanzar la meta.*

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermana, por su constante apoyo, comprensión y aguante, por guiarme con amor y llenarme de razones para seguir adelante.

A los profesores: Daniel Molina, Rodrigo Torres y Clara Sánchez, por compartirme sus conocimientos, su colaboración y su disposición.

A Gabriel por su amistad y compañía.

A mis compañeros de estudio y de trabajo por compartir el camino con migo.

A todos aquellos que no han sido una simple casualidad en mi vida y de una u otra forma han participado en mi crecimiento espiritual, personal e intelectual.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO DE ANTECEDENTES.....	4
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Yuca	9
2.1.1 Generalidades	9
2.2. Almidón	10
2.2.1 Generalidades	10
- Amilosa	12
- Amilopectina	13
2.2.2. Gelatinización	15
2.3 Hidrólisis de almidones	17
2.3.1. Hidrólisis ácida	17
2.3.2. Hidrólisis enzimática	18
2.4. Enzimas	18
2.4.1. Generalidades	18
- Actividad	19
- Estabilidad	20
- Interacciones que contribuyen a la estabilidad de la enzima...	21
- Especificidad	21
2.5. Enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis del almidón	22
2.5.1. Amilasas	22
- α -amilasa	23
- β -amilasa	23

2.5.2 Glucoamilasas	23
2.6. Jarabes de glucosa	24
3. METODOLOGÍA	26
3.1. Obtención de la materia prima	26
3.2 Métodos analíticos	26
3.2.1 Análisis de la concentración de proteína por el método del Bradford	26
3.2.2. Determinación de la concentración de azúcares reductores por el método del DNS	27
3.2.3. Determinación de la concentración de glucosa por el método de la glucosa oxidasa	27
3.3. Determinación de la actividad enzimática	28
3.3.1 Actividad α -amilasa	28
3.3.2 Actividad glucoamilasa	29
3.4. Hidrólisis enzimática de la yuca	29
3.4.1 Licuefacción del almidón de yuca	29
3.4.2. Sacarificación	30
3.4.3. Licuefacción y sacarificación simultáneas	30
3.5. Pre-tratamiento del almidón de yuca	31
3.5.1 Evaluación de la estabilidad térmica sobre la actividad Enzimática	31
3.5.2 Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	31
3.5.3 Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática	31
3.6. Comprobación de las condiciones para la producción de jarabes de glucosa	32
Hidrólisis enzimática de almidón de yuca a escala de Laboratorio	32
3.7. Diseño de experimentos y tratamiento estadístico de los datos.....	32
3.7.1 Validación del modelo de predicción.....	33

3.8 . Estudio de las enzimas y sus productos en un proceso de fermentación	33
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
4.1 Actividad enzimática y concentración de proteína de las enzimas en Estudio	35
4.2. Estudio de efecto de los factores que intervienen en la hidrólisis en el almidón de yuca	36
4.2.1 Efecto de la relación enzima / sustrato en la hidrólisis Enzimática	36
4.2.2 Efecto de la temperatura.....	37
4.2.3 Efecto del pH.....	39
4.2.4 Efecto de la concentración de sustrato	41
4.3 Diseño de experimental y tratamiento estadístico de los datos.....	43
4.4 Prueba de las enzimas de estudio y sus productos en un proceso de fermentación a partir del almidón de yuca	49
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES.	52
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	53
ANEXO 1	62
ANEXO 2	64
ANEXO 3	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la yuca.....	9
Tabla 2. Propiedades de las macromoléculas del almidón: amilosa y amilopectina.....	14
Tabla 3. Clasificación de los jarabes de glucosa según sus equivalentes de dextrosa (ED).....	24
Tabla 4. Preparación de las muestras para la determinación de la concentración de glucosa.....	27
Tabla 5. Representación de los niveles para el diseño de experimentos.....	33
Tabla 6. Reporte de actividad de las enzimas y concentración de proteína de las enzimas de estudio.....	35
Tabla 7. Diseño de experimentos.....	43
Tabla 8. Análisis de varianza para la concentración de glucosa.....	45
Tabla 9. Validación del modelo descrito por la ecuación 1.....	48
Tabla10 Resultados de los diferentes procesos de fermentación Probados.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la amilosa (a) amilopectina (b).....	13
Figura 2. Cinética de gelatinización de los gránulos de almidón.....	16
Figura 3. Esquema de gelatinización del almidón.....	16
Figura 4. Hidrólisis de carbohidratos.....	17
Figura 5. Estados de ionización del centro activo de la enzima	20
Figura 6. Equivalentes de dextrosa como función de la relación enzima / sustrato en la hidrólisis enzimática.....	37
Figura 7. Actividad enzimática como función de la temperatura en la hidrólisis enzimática	38
Figura 8. Actividad enzimática como función del pH en la hidrólisis Enzimática.....	40
Figura 9. Actividad enzimática como función de la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática.....	42
Figura 10 Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de Glucosa	44
Figura 11 Interacción de los factores.....	45
Figura 12 Predicción por regresión lineal múltiple.....	46
Figura 13 Superficie de respuesta estimada.....	47
Figura 14 Contorno estimado de la superficie de respuesta.....	48
Figura 15 Curva calibración Bradford en Buffer = 0,016M, pH = 5,0.....	64
Figura 16 Curva calibración DNS en Buffer = 0,016M, pH = 5,0.....	65

LISTA DE ECUACIONES

	Pág
Ec. 1 Ecuación de respuesta. Modelo matemático del proceso de sacarificación con la enzima Spirizyme Fuel.....	46
Ec. 2 Cálculo de la actividad enzimática.....	65
Ec. 3 Cálculo de los equivalentes de dextrosa (ED).....	65
Ec. 4 Cálculo de la concentración de glucosa.....	66

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Determinación de la cantidad de proteína en una enzima por el método de Bradford	62
Anexo 2. Determinación de azúcares reductores por método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	64
Anexo 3. Determinación de la concentración de glucosa por método de la glucosa oxidasa.	66

RESUMEN

TITULO:

“OBTENCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA POR MEDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, PARA SER USADOS COMO SUSTRATO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”

Ruiz Camacho Mónica Irene*

Palabras claves: Almidón de yuca, Almidón, Hidrólisis enzimática, Yuca

Se evaluaron a nivel de laboratorio los parámetros de la hidrólisis enzimática del almidón, para la producción de jarabes de glucosa. Se compararon las enzimas de Novozymes y Genecor International. Se evaluaron la α -amilasa del *Bacillus licheniformis* (Liquozyme® SC DS, de Novozymes), en un rango de pH 5,7-6,0, de temperatura 82-86°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,013-0,025; igualmente, la glucoamilasa del *Aspergillus niger* (Spirizyme® Fuel, de Novozymes), en un rango de pH 3,5-5,5, de temperatura 32-70°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,04-0,06; y finalmente la mezcla enzimática fúngica α -amilasa del *Aspergillus kawachi* y glucoamilasa del *Aspergillus niger* (STARGEN™ 001, de Genecor International), en un rango de pH 3,0-4,5., temperatura de fermentación de 20-40°C, dosificación de enzima 1,0-2,5 kg/MT de grano seco. Se utilizaron los métodos analíticos del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), glucoasa oxidasa y Bradford, para medir y determinar los valores de equivalentes de dextrosa (ED) y actividad enzimática, concentración de glucosa y concentración de proteína, respectivamente. Adicionalmente se estandarizaron y validaron las condiciones, por tamizaje y estudio estadístico (ANOVA) de los datos obtenidos por medio del programa estadístico STATGRAPHIC Centurión XV. Se encontró que las mejores condiciones de hidrólisis enzimática de almidón de yuca fueron: α -amilasa (Liquozyme® SC DS) a pH 5,0, temperatura de 80°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,0280; con glucoamilasa (Spirizyme® Fuel) pH 4,5, temperatura 70°C, dosificación de enzima % (p/p) 0,0631; y finalmente la mezcla enzimática α -amilasa y glucoamilasa (STARGEN™ 001) pH 4,5, temperatura de 46 °C, dosificación de enzima 0,023% (p/p).

* Proyecto de grado

** Molina Velasco Daniel Ricardo, Facultad de ciencias, Escuela de Química, Director. Ph.D

*** Sánchez Súares Clara Inés, Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Directora. MSc

ABSTRACT

TITLE:

**"PRODUCTION OF GLUCOSE SYRUP FROM CASSAVA STARCH
HYDROLYSIS USING ENZYME, SUBSTRATE TO BE USED PROCESSES
FOR BIOETHANOL PRODUCTION"**

Ruiz Camacho Mónica Irene*

Keywords: Cassava starch, starch, enzymatic hydrolysis, cassava

Enzymatic hydrolysis of starch for producing glucose syrups were evaluated at laboratory scale. Enzymes provided from Novozymes and Genecor International were compared. Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* (Liquozyme® SC DS from Novozymes), in a range of pH 5.7 - 6.0, temperature 82-86 ° C, enzyme dosage % (w/w) 0.013-0.025; and also glucoamylase of the *Aspergillus niger* (Spirizyme® Fuel of Novozymes), in a range of pH of 3.5-5.5 , temperature 32-70 ° C, enzyme dosage % (w/w) 0.04-0.06; and finally the enzyme mixture of fungal α -amylase and *Aspergillus Kawachi* glucoamylase of *Aspergillus niger* (STARGEN™ 001 of International Genecor), in a range of 3.0-4.5 pH, fermentation temperature of 20-40 ° C, enzyme dosage of 1.0-2.5 kg / MT of dry grain were evaluated. The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), glucose oxidase and Bradford analytical methods were used to measure and determine dextrose equivalent (ED) and enzyme activity, glucose concentration and protein concentration, respectively. Additionally, standardized and validated conditions for screening and statistical analysis (ANOVA) of data obtained through the statistical program STATGRAPHICS Centurion XV . It was found that the best conditions for the enzymatic hydrolysis of cassava starch were: α -amylase (Liquozyme® SC DS) at pH 5.0, temperature at 80 °C, enzyme dosage of 0.0280 % (w/w); and with glucoamylase (Spirizyme® Fuel) at pH 4.5, temperature at 70 ° C, enzyme dosage 0.0631 % (w/w); and finally enzymatic mixture of α -amylase and glucoamylase (STARGEN™ 001) at pH 4.5, temperature 46 ° C, and enzyme dosage of 0.023% (w/w).

* Degree of project

** Molina Velasco Daniel Ricardo , Faculty of Science, School of Chemistry, Director. Ph.D

*** Sánchez suáres Clara Inés, Faculty of Health, School of Bacteriology and Clinical Laboratory. Director. MSc

INTRODUCCIÒN

Colombia entró en la era de los bio-combustibles mediante la Ley 693/2001, que ha llevado al gobierno a extremar las medidas de control y prevención de requisitos exigidos tanto para las condiciones de operación de los motores de combustión interna, como la formulación de los combustibles. Se considera el uso de etanol carburante en las gasolinas y en el combustible diesel en los principales centros urbanos, como: vía de reducción de las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera, ya que estos son productos 85% biodegradables en aproximadamente 28 días; disminución de la dependencia de combustibles fósiles y la autosuficiencia energética del país. Además los bio-combustibles representan una nueva reactivación para la agricultura y el empleo productivo tanto agrícola como industrial, permitiendo el desarrollo tanto local, como regional.¹

Actualmente, el etanol se genera de una gran variedad de productos agrícolas como caña, maíz, remolacha, trigo, cebada, yuca, y sustancias celulosicas entre otros; sin embargo, la producción mundial se basa principalmente en la caña de azúcar (Brasil) y el maíz (Estados Unidos) ^{2,3}

Para aprovechar la ventaja que representan los bio-combustibles en el sector agrícola, deben desarrollarse desde una perspectiva energética, nuevos cultivos más productivos, de fácil acceso, segura, efectiva y con menores costos de producción.^{4,5}

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) 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 presentando buen rendimiento.^{2, 6} Existen y se buscan explotar algunas variedades que no son de consumo humano, como las de yuca amarga, nombre dado por su contenido de ácido cianhídrico libre y de cianogluucosidos ⁶. Además el rendimiento de cultivo es un factor clave al momento de decidir dónde invertir en un proyecto de este tipo 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.⁷

Colombia tiene gran importancia en términos de productividad dado su clima, sus suelos fértiles y su capacidad de producción permanente, a demás exhibe gran disponibilidad y diversidad. El cultivo de yuca ha venido creciendo rápidamente y su productividad ha venido mejorando a medida que se implementan nuevas tecnologías de producción. ⁸

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.⁹

Con este estudio de la producción de jarabes de glucosa que son utilizados como precursores en la obtención de bioetanol (alcohol carburante), se busca probar nuevos métodos y enzimas tomando como precursor el almidón de yuca, que presenten una menor cantidad y concentración productos secundarios no deseados, la disminución de costos en el procesamiento y una producción más limpia. La innovación continua de los medios enzimáticos y su tecnología permiten que cada

día los resultados sean mucho mejores y que este tipo de bio-combustible pueda ser una alternativa energética real, que no solo presente características equivalentes a los de procedencia fósil, produzca menos contaminación, sino que también en el conjunto de procesos de obtención se consigan balances energéticos positivos y que además puedan llegar al mercado con un costo similar al de productos derivados del petróleo a los que tratan de sustituir.^{4,5,8}

El estudio de las variables y su validación en la producción de jarabes de glucosa por medios enzimáticos, es el objetivo de este trabajo y uno de los objetivos del macroproyecto. “Aumento de la Productividad del Cultivo de la Yuca en Santander, su utilización como Materia Prima para la Obtención de Bio-etanol y Bio-butanol y Estudio del Proceso de Transformación Catalítica de Bio-etanol a Butanol” en el cual esta incluida la presente investigación (proyecto del Ministerio de Agricultura y desarrollo rural).

1. 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, acuñándose el término de catálisis.¹⁰

En 1890 Christian Hansen impulsó la producción comercial de enzimas¹¹, y más adelante Dale y Langlois (1940) usaron una α -amilasa de hongos para la fabricación de jarabe comercial. En 1951, las enzimas de *Aspergillus Níger* y *Rhizopus* se caracterizaron y nombraron como amiloglucosidasa y glucoamilasa, respectivamente (Kerr et al. 1951 y Phillips y Caldwell, 1951 a y b), 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.

Posterior se investigó en la sustitución total de la hidrólisis ácida mediante el desarrollo de un α -amilasa resistente a la temperatura que pueda licuar el almidón de manera eficiente. La bacteria termoestable bacteriana α -amilasas se había desarrollado en el año 1900 por Boidin y Effront (1917a, b) y se utilizó desde entonces en la elaboración de la cerveza, los textiles y las industrias de papel, por lo tanto, era un paso lógico utilizar estas α -amilasas termoestables para la licuefacción de almidón. Los primeros procesos comerciales se aplicaron en la década de 1960.¹²

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 (Wong et al. 2007)¹⁵ ya que la mayoría de los estos almidones contienen entre el 15% y el 30% de amilosa y así poder formar geles más estables.

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 barato.¹⁴

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 utilización (Konsoula et.al. 2006)^{15,16}, como es el caso de la nueva generación de enzimas por parte de Genecor International (Stargen001) y Novozymes NA (BPX) entre otros, tales como la α -amilasa de *Aspergillus kawachi* y la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (presentes en la enzima comercial, STARGEN 001TM.), las cuales 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 α -amilasa, que permite la ampliación de los gránulos del almidón. Esta combinación mejora la liberación de glucosa en un sistema continuo de almidones granulares.^{17,18}

Las enzimas pueden ser afectadas positiva o negativamente, por lo que la identificación y la optimización de las variables mejora la viabilidad de estos procesos biotecnológicos. Las condiciones 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 Ca^{+2} . Esto último debido a que algunas enzimas resultan ser calcio dependientes para su activación, pero altas concentraciones del mismo también la pueden afectar.^{19,20,21}

La alternativa de inmovilizar enzimas resulta muy atractiva para evitar costos asociados a su extracción y su recuperación,¹¹ generando un valor agregado a las reacciones de degradación enzimática, comparadas con las que se aplican en forma soluble. Estas producen un aumento de la estabilidad de la enzima inmovilizada al hacerla más resistente a la autólisis, un aumento de la productividad al aumentar su tiempo de vida media, además pueden ser reutilizadas después de un simple lavado, facilitando la operación y control de procesos, se pueden obtener productos más purificados y es fácil de recuperar por filtración o centrifugación simple sin la ayuda de inhibidores, ni de precipitantes.

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

Dentro de los tipos de inmovilización enzimática se encuentran los métodos de retención química generando enlaces covalentes y no covalentes (absorción) y una retención física o atrapamiento que se da en una variedad de matrices y de membranas.

Sin embargo, ni el soporte sólido o matriz ni los ligandos deben reaccionar con el sustrato y el producto. Algunos de estos incluyen esferas de vidrio o de metal, poliestireno, cerámica, tela de algodón, alginato y quitosán, entre otros.^{22, 23, 24, 25, 26,27}

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 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.²⁸

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. ²⁹

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, mayor productividad. Permiten además de la utilización de enzimas inmovilizadas (de flujo taponado) o 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. ^{5, 9,30}

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Yuca

2.1.1. Generalidades

La yuca es una de las principales plantas tropicales difundidas en todos los continentes, es 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.

Según su clasificación taxonómica, la *yuca Manihot esculenta crantz*, pertenece a la familia Euphorbiaceae. Tabla 1

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la yuca.⁹

Clase	<i>Dicotyledonea</i>
Subclase	<i>Archichlamydeae</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Tribu	<i>Manihoteae</i>
Género	<i>Manihot</i>
Especie	<i>Manihot esculenta crantz</i>

Existe una gran variabilidad de arquitectura de la planta dentro de esta familia, desde los tipos arbóreos hasta los arbustos.³¹ Las variedades de yuca se agrupan en dos grandes grupos: yuca dulce o comestible y yuca amarga o brava. Esta clasificación se basa en el mayor o menor cantidad de glucósidos tóxicos, los cuales se forman por la acción de la enzima linamarasa al romper los tejidos sobre dos glucósido cianogénicos llamados linamarina y lotaustralina.² Las variedades amargas 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.

Los gránulos de almidón de yuca son redondos, ovales y poseen un borde dentado, haciéndolos más blandos que los gránulos de maíz, y menos rígida y compacta su estructura.²⁸

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 la caña de azúcar, el maíz el sorgo y el arroz. Su potencial de rendimiento sobresale al compararse con otros cultivos, por tener la habilidad de crecer donde otros cultivos no lo hacen.³¹

2.2 Almidón

2.2.1. Generalidades

Los almidones se encuentran almacenados en forma condensada como material de reserva de energía química en todas las plantas fotosintéticas. Este carbohidrato se almacena en las semillas, los tubérculos carnosos y las raíces con la finalidad de suministrar 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 -D-(1-4), las cuales forman dos tipos mayoritarios de polímeros: uno lineal llamado amilosa (porción interna del gránulo) y uno ramificado denominado amilopectina (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 explica las propiedades fisicoquímicas de este producto y su comportamiento con relación a la viscosidad, hinchamiento, gelificación y engrudización en solución acuosa.^{28,32,33}

El almidón de yuca gelatiniza como el almidón de arroz y el de maíz ceroso a temperaturas relativamente bajas (55-65°C); el pico máximo es alcanzado rápidamente, lo que implica que es un almidón fácil de cocinar tiene una tendencia baja a la retrogradación y produce un gel muy claro y estable. Aunque la viscosidad de la pasta es inicialmente alta, ésta decae bruscamente con solubilización continua y agitación por encima de 90°C sin formación de gel al enfriarse.

Este comportamiento del almidón de yuca lo hace conveniente tecnológicamente como sustrato para procesos hidrolíticos, pero inapropiado como sustituto para los almidones de cereales en procesos que requieren retrogradación.

También se ha encontrado que las pastas de almidón de yuca son estables a medio ácidos por debajo de pH 2,4, medio en el cual 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 el 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 ($<125^{\circ}\text{C}$) para romper la estructura amilosa-lípido y solubilizar la fracción de amilosa.³¹

- **Amilosa**

Es un polímero lineal que forma largas cadenas, formadas por unidades anhidras de glucosa, unidas mediante enlaces α -(1-4) (el carbono-1 de unidad de D-glucosa enlazado al carbono-4 de la siguiente) Figura 1a. La mayoría de los almidones contiene entre un 20-30% de amilosa. Por su estructura flexible presenta una estructura helicoidal de 6 o 7 residuos de glucosa³⁴ unida por átomos de hidrógeno por lo que es lipofílica, mientras que los grupos hidroxilos están situados en el exterior de la hélice haciéndolo hidrofílicos.

En los extremos, esta molécula polimérica de unidades de glucosa anhidra posee un hidroxilo primario y dos secundarios así como un grupo aldehídico reductor en la forma de hemiacetal, el cual es 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 si

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.

La linealidad de la amilosa favorece la formación de fuertes películas debido a la asociación intermolecular además de ser la responsable del fenómeno de retrogradación.^{32, 35}

Es capaz de formar rápidamente complejos con ácidos grasos y con alcoholes orgánicos. Aunque no es soluble, forma micelas hidratadas que da un color azul con el yodo, el cual permite su determinación cualitativa.^{9,28,36}

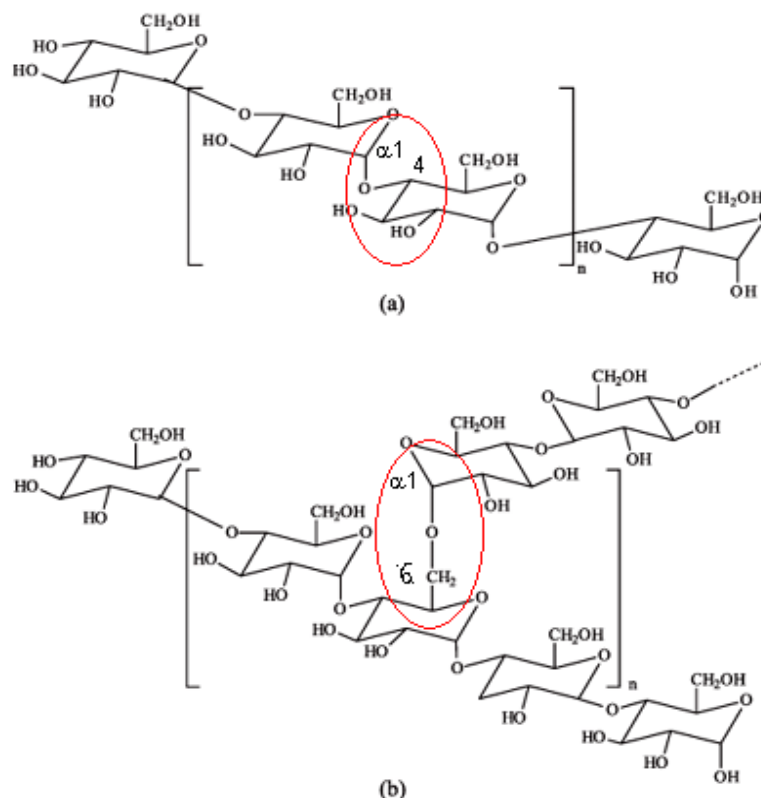


Figura 1. Estructura química de amilosa (a) y amilopectina (b)³⁷

- **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 reduce 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 y claridad, y las soluciones de amilopectina no forman películas tan fuertes y flexibles como la amilosa.^{32, 35}

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.^{9,28, 36}

En la Tabla 2. se comparan algunas propiedades de la amilosa y la amilopectina.

Tabla 2. Propiedades de las macromoléculas del almidón: amilosa y amilopectina.³³

Propiedad	Amilosa	Amilopectina
Peso molecular	$1-2 \times 10^5$	$> 2 \times 10^7$
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 don el yodo	20.1 g/100 g	1.1 g/100 g

2.2.2. Gelatinización

Para los almidones, es un tratamiento hidrotérmico que facilita la acción enzimática y química dado que en su estado nativo presentan resistencia a estos dos procesos y poseen baja capacidad de embeber agua. Cuando una suspensión de almidón es calentada a temperaturas mayores a 55°C, ³³ la naturaleza semi-cristalina de los gránulos se vuelve totalmente amorfa y las moléculas de agua alrededor de los gránulos alcanzan un nivel energético suficiente para disociar los enlaces de hidrógeno que mantiene ordenadas las cadenas moleculares de las dobles hélices en el interior del gránulo por lo que se hinchan irreversiblemente superando varias veces su propio peso aumentando la viscosidad y perdiendo las propiedades de birefringencia de los gránulos.^{33,34,35} (Figura 2)

Cuando estas pastas o engrudos se dejan enfriar o son almacenados se produce un fenómeno conocido como retrogradación el cual es la formación de un precipitado (cristalización) según sea el origen o la concentración de almidón debido a la asociación lenta de las moléculas de amilosa.^{9,28}

El grado de gelatinización es un parámetro importante que se ve afectado por la temperatura, la presión, la concentración de almidón y el tiempo de tratamiento.²⁹ Aparte de la temperatura, la gelatinización también se inicia por altas presiones hidrostáticas, aunque la degradación de los gránulos sucede de diferente manera, por lo que la viscosidad suele ser menor que después del tratamiento con calor, debido que los gránulos de almidón se mantienen intactos en su mayoría y la amilosa solubiliza pobremente.³³ (Figura.3)

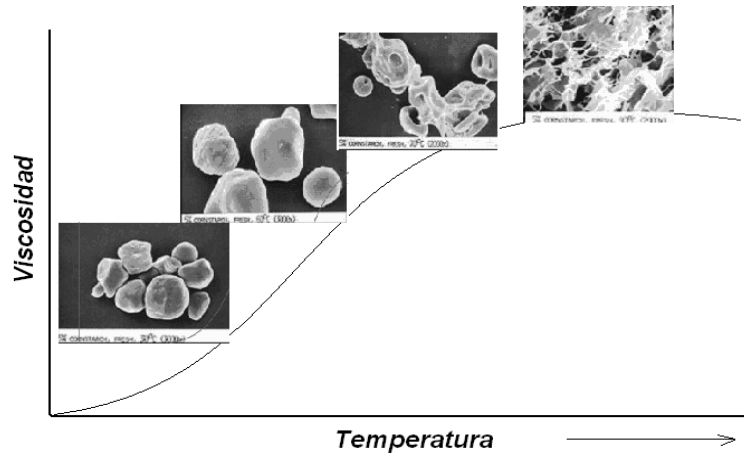


Figura 2. Cinética de gelatinización de los gránulos de almidón

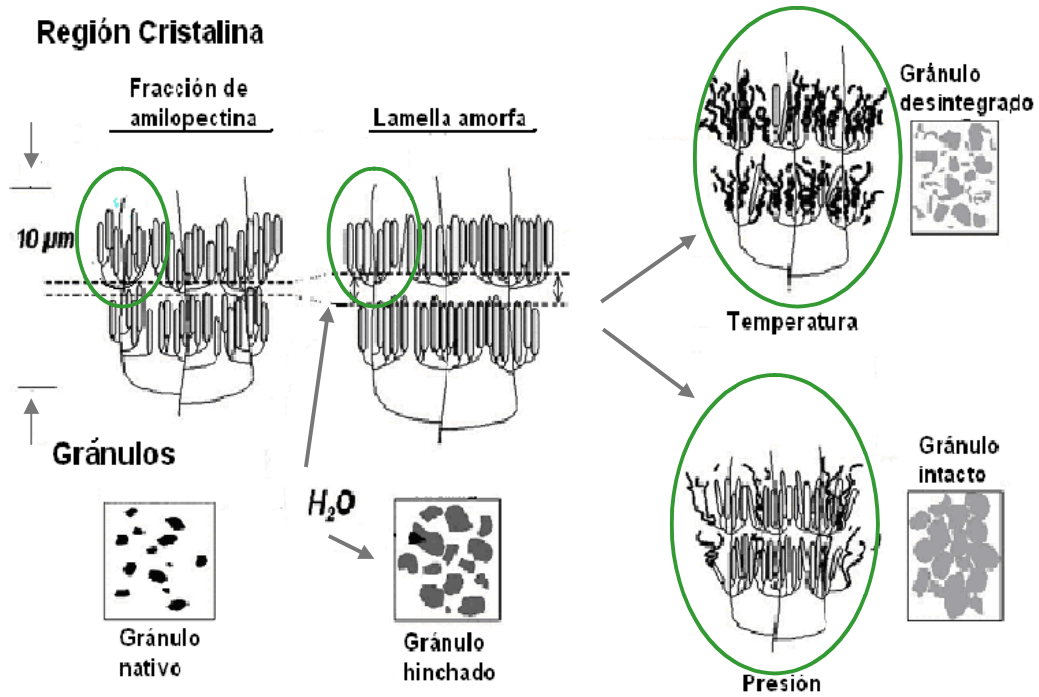


Figura 3. Esquema de gelatinización del almidón. La estructura cristalina al hidratarse se convierte en laminas amorfas. Al ser sometidas a presiones altas la desintegración es incompleta.³³

2.3 Hidrólisis de almidones

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 4)

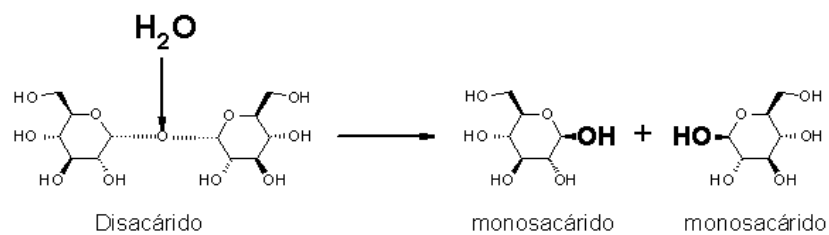


Figura 4. Hidrólisis de carbohidratos.⁴⁰

2.3.1 Hidrólisis ácida

Las moléculas de almidón tratadas con ácidos en caliente se rompen en cadenas cortas de dextrinas. El porcentaje de degradación depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de hidrólisis. Los ácidos más utilizados para la producción de dextrinas son el ácido clorhídrico, el ácido nítrico y el ácido sulfúrico. Los productos de degradación son principalmente jarabes de glucosa, el hidroximetilfurfural, el ácido levulónico y el ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo. La combinación de unidades de D-glucosa o de esta con fragmentos como maltosa, conduce a la formación de productos de reversión los cuales pueden ser hidrolizados, un ejemplo de estos productos de síntesis es la genciobiosa.⁶

2.3.2. Hidrólisis enzimática

Este proceso llevado a cabo por enzimas tiene por objeto la transformación de las materias primas amiláceas en azúcares. Ellas pueden encontrarse en la saliva, los jugos pancreáticos, las células de la sangre, las semillas, los granos de muchas plantas, en hongos y bacterias. Estas se dividen en dos clases formalmente conocidas como Exo y Endo-enzimas.^{6,9}

2.4 Enzimas

2.4.1 Generalidades

Las enzimas son proteínas (polipéptidos) que contiene cientos de residuos aminoacídicos que actúan como catalizadores efectivos en procesos tanto biológicos como industriales, pero son pocos los que están directamente relacionados en la interacción con el sustrato o con la catálisis de la reacción.³⁹

La estructura tridimensional de una proteína está determinada por su estructura primaria que determina sus propiedades funcionales y por las condiciones ambientales que las rodean. La estructura secundaria es la resultante de la interacción entre los residuos aminoacídicos próximos en la estructura primaria. La estructura tridimensional terciaria es la resultante de la interacción de residuos aminoacídicos alejados de la estructura primaria y le confieren a la molécula proteica una estructura compacta y retorcida. Esta estructura configura el sitio catalítico activo de la enzima, por lo que su preservación es esencial para su funcionalidad biológica.¹¹

La naturaleza de la reacción que es catalizada por enzimas es dependiente de la identidad de los aminoácidos que constituyen el sitio activo. Estos residuos en virtud de su potencial de ionización y la polaridad determinan la especificidad de la reacción y su mecanismo. Los otros residuos aminoacídicos de la cadena polipeptídica prevén la orientación espacial entre el sitio activo, el sustrato y los cofactores necesarios para catalizar la reacción. La flexibilidad de la estructura polipeptídica y la interacción con el (micro) medioambiente son los responsables del control y la regulación de la actividad enzimática.

Algunas requieren un cofactor para aumentar la actividad, que en la naturaleza son derivados de vitaminas provistas para la dieta. Los cofactores pueden ser clasificados como grupos prostéticos, coenzimas e iones metálicos. Los grupos prostéticos son diferenciados de las coenzimas por su unión más estricta con las enzimas.⁴⁰ Algunas de las generalidades de las enzimas son:

- **Estabilidad**

La capacidad catalítica (actividad) de una enzima depende de la manutención de la configuración particular denominada estructura nativa, que es la resultante de muchas fuerzas de interacción en la estructura tridimensional, como las descritas anteriormente.

La desnaturalización o alteración por algún factor se traduce en una pérdida total o parcial de su actividad la cual puede llegar a ser irreversible dependiendo del tipo de estructura que sea desnaturalizada.

Un aumento de la temperatura en la enzima se traduce en un aumento de la energía vibracional que puede provocar la ruptura de los puentes de hidrógeno y la destrucción de las interacciones apolares.

La disminución de la fuerza iónica del medio también afecta la estabilidad de la enzima por que se disminuyen de 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 isoelectrico) pueden provocar desestabilización de la estructura de la enzima debido a las fuerzas de repulsión. (Figura .5)

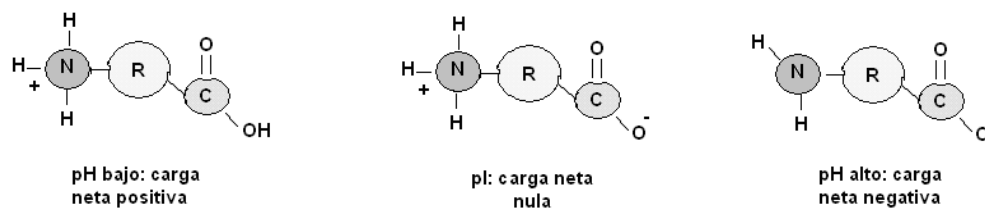


Figura 5. Estados de ionización del centro activo de la enzima

- **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.

- **Interacciones que contribuyen a la estabilidad de la enzima**

La conformación tridimensional de la enzima en solución esta 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 disulfuro, interacciones de Van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas.

Los puentes disulfuro 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.¹¹

- **Especificidad**

Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas como catalizadores es su alta especificidad respecto al sustrato, razón por la cual esta 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.¹¹

2.5 Enzimas utilizadas en la hidrólisis del almidón

La hidrólisis enzimática del almidón se realiza en dos pasos: licuefacción y sacarificación. La **licuefacción** es el primer paso en el que se utiliza como catalizadores enzimas como α -amilasas y β -amilasas para la formación de jarabes de dextrinas. El segundo paso, la **sacarificación**, se realiza utilizando enzimas como glucoamilasas, pullulanases o mezclas de enzimas; transformando el jarabe obtenido en el paso anterior y llevándolo hasta la formación de moléculas de D-glucosa. La actividad de estas enzimas depende principalmente del pH y de la temperatura. ^{28,39}

2.5.1. 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. ⁶

Existen tres tipos de amilasas que se utilizan en el proceso de licuefacción: la de *Bacillus amyloliquefaciens*, la de *Bacillus liqueniformis* (bacterianas) y la *Aspergillus oryzae*. Estas se diferencian por su termoresistencia, siendo la *B. liqueniformis* la más estable con una temperatura óptima de 90°C (dando como productos: maltosa, maltotriosa, maltopentosa) contra 70°C de la *B. amyloquifaciens* (dando como producto: maltohexosas), finalmente, la última de las enzimas se utiliza cuando el propósito es producir jarabes de maltosa siendo el disacárido de mayor producción. ¹¹

- **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).

- **β -amilasas**

La β -amilasas (exo-maltohidrolasa, α -1-4-glucan-maltohidrolasa, EC 3.2.2.1). Actúa sobre la hidrólisis del almidón produciendo unidades del disacárido maltosa de manera secuencial desde el extremo no reductor de la amilosa y de la amilopectina (razón por la que se denomina como una exo-enzima) invirtiendo los enlaces α -(1-4) en β -(1-4) glucosídicos.

2.5.2. Glucoamilasa

Dentro de las que se encuentran las de *Aspergillus niger* y las de *Rhizopus sp*, siendo más frecuente el uso de la primera.

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 acción es más lenta en la producción de moléculas de glucosa. ^{9,11, 36,41}

2.6. 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 (Tabla.3) según su contenido de dextrosa. Siendo los jarabes de glucosa tipo III los jarabes fermentables y contienen entre 75-85% de D-glucosa, maltosa y maltotriosa.

Tabla 3. Clasificación de los jarabes de glucosa según su equivalente de dextrosa (DE)⁹

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

Estos jarabes de altas concentraciones de glucosa solamente se preparan mediante la utilización de enzimas ya que al usar ácidos no se consiguen productos con ED superiores a 60 debido a las reacciones de reversión y deshidratación que sufre la glucosa al estar en contacto con el ácido.^{6,9,28} A altas concentraciones de glucosa la enzima cataliza la reacción reversa, estableciendo enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ entre moléculas de glucosa, por lo que aunque no ha sido 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 tercera etapa: ¹¹ la fermentación para la obtención de etanol.

3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención del almidón y de las enzimas.

El almidón de yuca se obtuvo de la planta productora de harina de yuca de la Ganadería Manzanares y Cia Ltda.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinación de la concentración de proteína por el método del Bradford ⁴²

Para la determinación de la cantidad de proteína presente en cada una de las enzimas evaluadas, se procedió a preparar las curvas de calibración a partir de una solución concentrada de albúmina de suero bovino (ABS) (1mg/mL), realizando diluciones seriadas en agua (Genecor) o Buffer de trabajo (Novozymes) de 0.1 a 1.0 mg/mL.(Anexo1)

La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico de Bradford¹, tomando 50 µL de cada dilución y adicionando 2,5 mL de reactivo Bradford. Después de transcurridos 3 minutos de reacción se realizó la lectura a 595nm en un espectrofotómetro Genesys 20. Los resultados se reportan en la Tabla 6

¹ Método fácil de manejar, rápido y sensible que da respuesta al interaccionar y estabilizarse con el entorno hidrofóbico al interior de la proteínas presentes en las muestras.

3.2.2 Determinación de azúcares reductores por el método del DNS ⁴³

Para la determinación de los azúcares reductores se utilizó una concentración de glucosa de (1mg/mL), se realizaron diluciones seriadas en agua (Genecor) o Buffer de trabajo (Novozymes) de 0.1, a 1.0 mg/mL. (Anexo. 2)

Se determinó la concentración de glucosa en función de la concentración de azúcares reductores por el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se preparó una relación 1:1, (muestra: reactivo), se calentó en baño termostático a 93°C aprox., por 5 minutos, se detuvo la reacción por choque térmico, se adicionó 10mL de agua destilada y se leyó a 540nm en un espectrofotómetro Genesys 20.

3.2.3 Determinación de la concentración de glucosa por el método de la glucosa-oxidasa

La concentración de glucosa presente en cada una de las muestras tomadas en los procesos de sacarificación fue determinada por la formación de un complejo coloreado mediante el método colorimétrico de la glucosa oxidasa. (Anexo 4)

Las muestras, blanco y patrón fueron de la siguiente manera:

Tabla 4. Preparación de las muestras para la determinación de la concentración de glucosa ⁴⁴

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón (S)	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Algunas de las muestras fueron diluidas antes de la reacción con el reactivo A, pero su cantidad de adición se mantuvo como se indica en la Tabla 4. Todas las lecturas se realizaron a 500nm en el mismo orden de preparación.

3.3. Determinación de la actividad enzimática

El estudio inicial de la actividad catalítica de las enzimas, se realizó para mantener controladas las condiciones de trabajo de estas, ya que por encontrasen en estado líquido, su actividad va descendiendo con el tiempo.

3.3.1 Actividad de la α -amilasa⁹

Para la determinación de la actividad de la α -amilasa del *Bacillus licheniformis* Liquozyme® SC DS de Novozymes se preparó una solución de almidón al 10% (p/v) en Buffer acetato 0,016M de pH 4,5, una vez pre-tratado térmicamente se adicionaron 20 μ L de enzima en dilución 1/100 a 70 °C de temperatura y agitación de 300 rpm por 3 minutos, pasado este tiempo, se tomo 1mL de muestra de almidón y se le adicionó 1mL de reactivo de DNS procediéndose de la misma manera descrita en el numeral 3.2.2. Los resultados se reportan en la Tabla. 6.

3.3.2 Actividad de la Glucoamilasa⁹

Para la determinación de la actividad enzimática de la glucoamilasa del *Aspergillus niger* Spirizyme® Fuel, de Novozymes, se preparó una solución de almidón al 10% (p/v) en Buffer acetato 0,016M de pH 4,5, una vez pre-tratado térmicamente se adicionaron 20 µL de enzima en dilución 1/50 a 60 °C de temperatura y agitación de 300 rpm por 10 minutos, pasado este tiempo, se tomo 1mL de muestra de almidón y se le adicionó 1mL de reactivo de DNS procediéndose de la misma manera descrita en el numeral 3.2.2. Los resultados se reportan en la tabla. 6.

3.4. Hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

Las enzimas utilizadas en este proceso fueron donadas por distribuidores de Novozymes y Genecor international, especializadas para sustratos de almidones céreos como el de maíz y el de trigo especialmente, se utilizaron la α -amilasa (Liquozyme® SC DS) y la glucoamilasa (Spirizyme® Fuel) de Novozymes y la mezcla α -amilasa-glucoamilasa (Stargen™ 001) de Genecor.

3.4.1 Licuefacción del almidón de yuca

En esta primera etapa de hidrólisis, se utilizó la α -amilasa, (Liquozyme® SC DS de Novozymes) para la obtención de las dextrinas del almidón de yuca y para la reducción de la viscosidad de esta solución. En todas las etapas incluyendo la descrita, se estudiaron

variables como relación de la concentración enzima / sustrato, el pH, la temperatura, y concentración de sustrato. Las dextrinas producidas fueron determinadas como azúcares reductores y reportadas en términos de actividad enzimática (Ec.2 Anexo 2) y de equivalentes de dextrosa (ED) (Ec.3 Anexo 2) utilizando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), por espacio de 30 minutos a diferentes intervalos de tiempo.

3.4.2 Sacarificación

En esta segunda etapa, se utilizó la glucoamilasa, (Spirizyme® Fuel de Novozymes), para producción de jarabes de glucosa a partir de las dextrinas obtenidas en el paso anterior, teniendo en cuenta las variables: temperatura, pH y relación de la concentración enzima / sustrato.

Por último, se determinó la eficiencia en el proceso de conversión de las dextrinas a glucosa en unidades de mg/mL, por medio del método colorimétrico de la glucosa-oxidasa (Ec.4 Anexo 3). Durante el proceso total de la hidrólisis se mantuvo la agitación a 390 rpm desde el pre-tratamiento térmico.

3.4.3 Licuefacción y sacarificación simultáneas

Para este proceso, se trabajó con el almidón nativo (sin gelatinizar), disuelto en agua destilada, con la adición de la mezcla enzimática α -amilasa y glucoamilasa (Stargen™ 001), para la cual se estudiaron las mismas variables, con los mismos métodos de los numerales 3.4.1. y

3.4.2. El monitoreo se realizó por espacio de 180 minutos en intervalos de 30 minutos, manteniendo la agitación de 390 rpm y 37°C en un baño de agua.

3.5 Pre-tratamiento del almidón de yuca

El almidón disuelto en el agua o Buffer acetato 0,016M de trabajo, se sometió a tratamiento térmico a una temperatura de 66°C ⁴⁵, en un baño de agua bajo una agitación mecánica por 30 minutos, para facilitar la acción de las enzimas sobre este.

3.5.1 Evaluación de la estabilidad térmica sobre la actividad enzimática

La estabilidad de las enzimas a cambios térmicos, se determinaron incubando las enzimas a diferentes temperaturas (66, 70, 80°C) Liquozyme® SC DS, y Spirizyme® Fuel, (30, 47, 56°C) Stargen™ 001, durante 30 minutos para las dos primeras y dos horas para la última, tiempos entre los cuales se tomaron periódicamente alícuotas. Los resultados se reportan en el numeral 4.2.2

3.5.2 Estudio del efecto del pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

La influencia del pH sobre la actividad catalítica de las enzimas, se determinó incubando las enzimas en un rango de pH cuyos valores se variaron de la siguiente manera (pH de 3,0 a 6,0 con intervalos de 0,5). Así mismo, se evaluaron concentraciones mas altas de sustrato de 10%

a 30% (p/v), midiendo los parámetros previamente descritos. Los resultados se reportan en el numeral 4.2.3

3.6 Estandarización de las condiciones para la producción de jarabes de glucosa

3.6.1 Hidrólisis enzimática de almidón de yuca a escala de laboratorio

Se estudiaron los mejores rendimientos de producción de glucosa y la hidrólisis del almidón utilizando las enzimas sin diluir. Algunos de los resultados se reportan en la tabla 5

3.7. Diseño experimental y tratamiento estadístico

Se realizó un diseño de experimentos 3^3 (3 niveles, 3 factores) Tabla 5 para el proceso de sacarificación utilizando el programa STATGRAPHICS Centurión XV.II, por el método multinivel factorial, con una replica, para analizar las variables que afectan directamente el proceso.

Para el diseño de experimentos se dejaron fijos los valores de las variables como fueron pH y temperatura, debido a que los valores obtenidos en la estandarización de las enzimas resultaron ser similares a los reportados por las fichas técnicas de uso de esta ^{46,47,48} y Shariffaa et al.(2009) ¹⁷.

Tabla 5. Representación de los niveles para el diseño de experimentos en la sacarificación con la enzima Spirizyme Fuel de Novozymes.

Factor \ Nivel	Nivel		
	-1	0	1
Enzima Sustrato ($\mu\text{g/L}$)	2	4	6
[Sustrato] (g/L)	25	30	45
Tiempo (min)	15	30	45

3.7.1. Validación del modelo de predicción

Se efectuaron experimentos adicionales para validar la superficie de respuesta del modelo matemático procedente de esta, en los intervalos que van para la relación Enzima / Sustrato y [Sustrato] desde 4,4 a 5,6 $\mu\text{L/g}$ y de 31 al 34% respectivamente, fijando como lo muestran las figuras 13 y 14 en el nivel cero (30 minutos). Los resultados se presentan en la tabla 9

3.8. Estudio de las enzimas y sus productos en un proceso de fermentación

Para esta prueba se trabajó con las condiciones estandarizadas del proceso de hidrólisis enzimática y fue llevado hasta las condiciones de trabajo de la levadura nativa estandarizada en una trabajo de tesis paralelo para el proceso de fermentación*, como son: concentración del inóculo de 0,3 g/L, Buffer acetato de sodio de concentración 0,2M, pH 5, 32°C de temperatura y una agitación orbital de 120 rpm, para la que se empleo un Shaker Max Q Mini 4450.

Se trabajaron dos tipos de procesos: hidrólisis - fermentación discontinua con las enzimas de Novozymes, adicionando 187 μ L de la α -amilasa Licuozyme SC DS y 562 μ L de la glucoamilasa Spirizyme fuel® e hidrólisis - fermentación simultaneas con la enzima de Genecor International con la adición de 76 μ L de la mezcla enzimática Stargen™ 001, ambos a una concentración de almidón de 25% (p/v).

Se tomaron 120 mL tanto del hidrolizado, como de la solución de almidón nativo, sobre los cuales se agregaron 20 mL de extracto de levadura de concentración 10 g/L, este sistema de fermentación fue inoculado con una concentración de biomasa de 0.3 g/L.

Fueron tomadas muestras bajo un medio estéril para evitar la contaminación de la solución a diferentes intervalos de tiempo (7, 20, 30 y 45 horas de fermentación), las cuales fueron centrifugadas a 10.000 G por 15 minutos para separarlas de la biomasa producida en el proceso, congeladas y analizadas para la determinación de la presencia y concentración de etanol por el método de Cromatografía gaseosa – Head Space (GCHS), empleando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, utilizando el método estandarizado para la determinación de etanol por la Escuela Nacional de Cromatografía, Facultad de Ciencias Universidad Industrial de Santander. Los resultados se reportan en la Tabla 10

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Desde el punto de vista cinético, la actividad enzimática se traduce en un incremento en la velocidad de la reacción catalizada, la cual es el análisis cuantitativo del efecto de cada uno de los factores o variables que intervienen en la expresión de dicha actividad como son la concentración de la enzima, de sustrato y productos (inhibidores y activadores) pH, y temperatura.¹¹ El efecto individual de estos factores son interdependientes.⁴⁰

4.1. Actividad enzimática y concentración de proteína

Tabla 6. Reporte de actividad y de la concentración de proteína de las enzimas en estudio

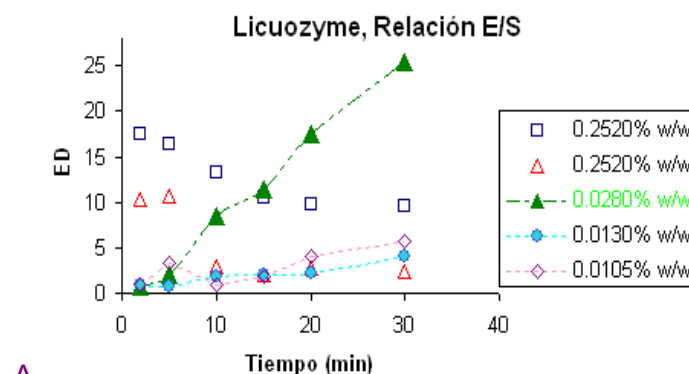
Enzima	Actividad Experimental U/mL	Actividad Ficha técnica U/mL	Concentración de proteína mg/mL
Licuzyme SC DS	9.4×10^4	7.6×10^4	8.20
Spirizyme Fuel	8.6×10^4	1.3×10^3	58.8
Stargen 001	2.49	396.5	148.8

Una posible explicación de las diferencias entre los valores de actividad reportados (Tabla 6) es debido a las diferentes condiciones y sustratos de trabajo en que fueron realizadas, debido a que el almidón de yuca posee menos contenido de grasas que el maíz y el trigo, por lo que no necesita altas temperaturas para romper la estructura amilosa-lípido³⁶.

4.2 Estudio del efecto de los factores que intervienen en la hidrólisis enzimática del almidón de yuca

4.2.1 Efecto de la relación Enzima / Sustrato en la hidrólisis enzimática

En el estudio de las variables, se comenzó con la búsqueda de la mejor relación enzima / sustrato, para la medición del proceso. Después que se experimentó con varias relaciones como se muestra en Figura 6A, se concluyó que la relación de 0,0280% (p/p) permitió la mejor velocidad de reacción y por ende la mejor condición de trabajo para la enzima de Novozymes (encargada de la licuefacción), la de 0,0631 % (p/p), (Figura 6B) para el proceso de sacarificación, bajo las condiciones mencionadas y la de 0,023 % p/p, (Figura 6C) para la mezcla enzimática de Genecor. Estas relaciones son menores comparadas con los datos reportados para las dos enzimas de Novozymes por Castaño y col. (2008)⁴⁵ sobre almidón de yuca de 0.125 % (p/p) y 0.375 % (p/p) respectivamente y la ficha técnica de Genecor⁴⁹ que reporta 0.25% (p/p), pero similares a que reportan las fichas técnicas^{47,48} de Novozymes sobre almidón de maíz siendo de 0,025% (p/p), 0,06 % (p/p), respectivamente.



A

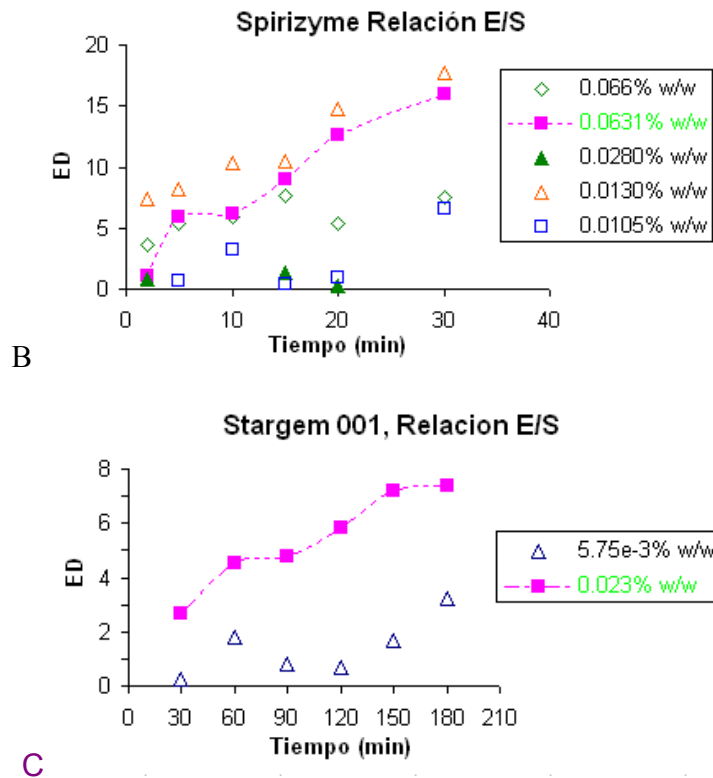


Figura.6. Equivalentes de dextrosa como función de la relación enzima/sustrato en la hidrólisis enzimática, **A.** Licuefacción. **B.** Sacarificación. (Pre-gelatinizado, Buffer acetato de sodio 0.016M pH= 4.0, [sustrato] = 10% (p/p) y 66°C). **C.** Licuefacción-sacarificación simultaneas (Agua destilada a pH= 4.0, [sustrato] = 10% (p/p) y 37°C).

4.2.2 Efecto de la temperatura

Los valores de temperatura que fueron usados en la experimentación oscilaron entre los 30 y 86°C partiendo del rango recomendado por las fichas técnicas de las enzimas ^{47,48,49}. El pH inicial de trabajo se mantuvo en 4,0 (Figura 7), mostrando el marcado y significativo efecto (pico) de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática (constante catalítica). 80°C para Liquozyme® SC DS, de 70 °C para Spirizyme® Fuel (amilasa y glucoamilasa de Novozymes) y de 47°C

para la mezcla enzimática Stargen™ 001, sobre la reactividad enzimática (constante catalítica).

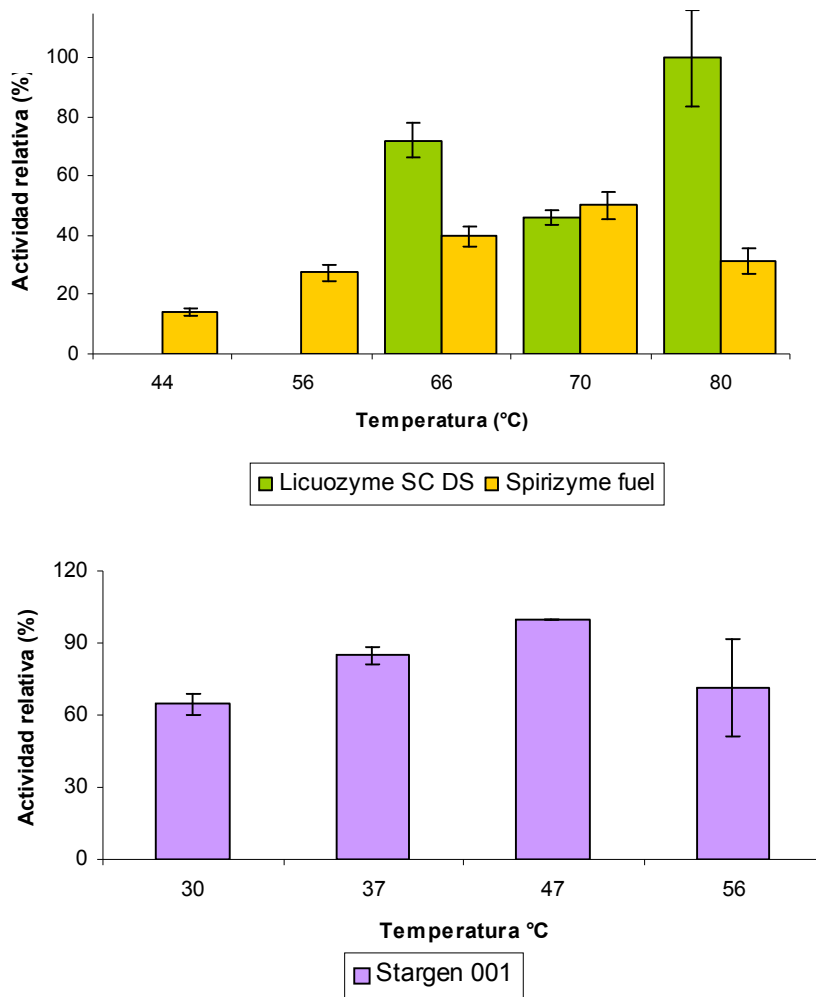


Figura 7. Actividad enzimática como función de la temperatura en la hidrólisis enzimática, ■ Licuefacción. ■ Sacarificación. (Pre-gelatinizado, Buffer acetato de sodio 0.016M pH= 4.0, [sustrato] = 10% (p/p) y 0.0280% (p/p) y 0.0631% (p/p) respectivamente) ■ Licuefacción-sacarificación simultaneas (Agua destilada a pH 4.0, [sustrato] = 10% (p/p), 0.023% p/p).

100% de Actividad relativa (Licuozyme SC DS, Spirizyme Fuel) = 58907 U/mL

100% de Actividad relativa Stargen 001 = 1944 U/mL

Este comportamiento que presentan las dos graficas, esta relacionado con el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de las enzimas, la cual sufren un incremento a medida que esta aumenta, mientras se mantenga en el intervalo en el que la enzima es estable y permanece totalmente activa. Los picos que se observan en las figuras se producen debido a que las enzimas al ser proteínas se desnaturalizan por la acción del calor,³⁶ que al aumentar la energía vibracional interna provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno y la destrucción de las interacciones apolares, inactivándola irreversiblemente al sobrepasar un cierto punto (temperatura óptima de trabajo de la enzima) mostrándose como la disminución rápida, razón por la cual los procesos de licuefacción no son muy largos,^{11, 36}

4.2.3 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad de las enzimas como se aprecia en la Figura 8 se debe a la ionización reversible tanto del sustrato como de los residuos aminoacídicos de la enzima, manifestándose en el cambio de actividad catalítica y de estabilidad de esta o en el equilibrio de la reacción⁵⁰.

El efecto del pH en la actividad enzimática sobre la hidrólisis del almidón de la yuca, fue probado con valores de pH de 0,5 por encima y por debajo de los reportados en las fichas técnicas^{47,48,49}. (Figura 8). Se fijaron como pH de trabajo en los que las enzimas adquieren el estado de ionización que le brinda mayor actividad¹¹. Los pH de trabajo fueron 5,0 para licuefacción; 4,5 para la sacarificación y 4,0 para la licuefacción-sacarificación simultáneas. Estos valores resultaron

similares a los encontrados en otros estudios para las mismas enzimas en Castaño y col. (2008)⁴⁵ de 5,5 y 5,0 para las enzimas de Novozymes, y Shariffaa et al. (2009)³³ de 5,0 para la enzimas de Genecor. Es necesario aclarar que aunque para la mezcla enzimática Stargen 001 se presenta un pico de actividad a pH 3,0 posiblemente debido a que a bajos valores de pH se puede producir también hidrólisis ácida.

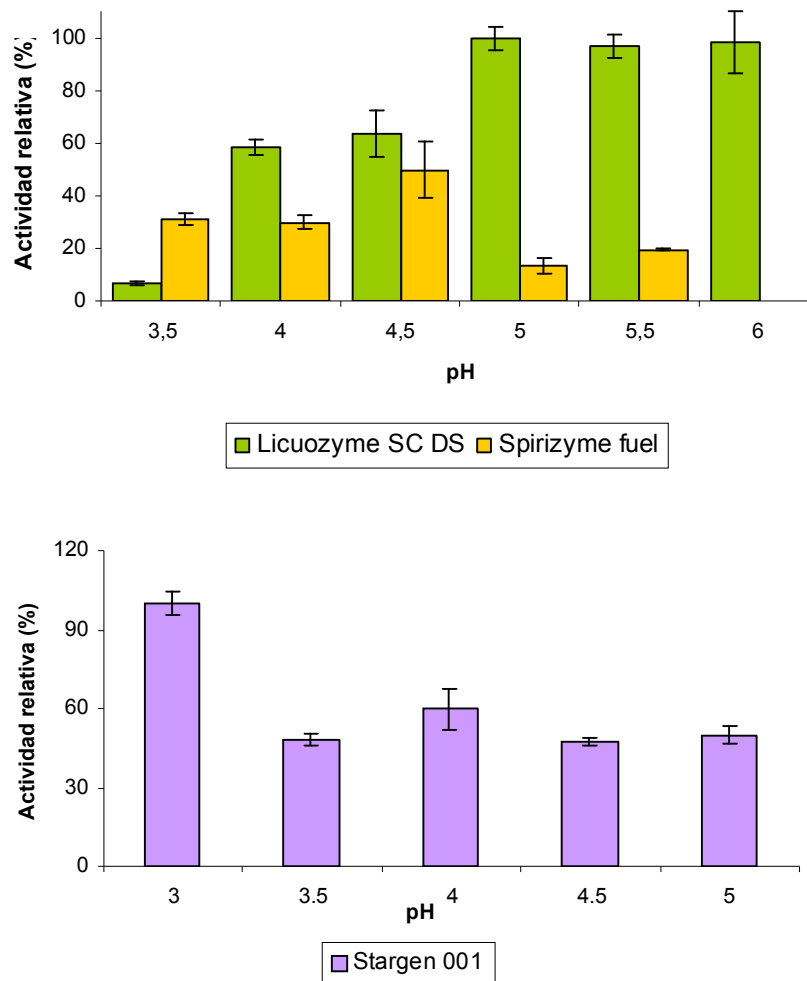


Figura 8. Actividad enzimática como función del pH en la hidrólisis enzimática, ■ Licuefacción. ■ Sacarificación. (pregelatinizado, Buffer acetato de sodio 0.016M, [sustrato] = 10% (p/p), 66°C y 0.0280% (p/p) y 0.0631% (p/p) respectivamente) .

■ Licuefacción-sacarificación simultáneas (Agua destilada, [sustrato] = 10% (p/p), 0.023% (p/p) y 37°C).

100% de Actividad relativa (Licuozyme SC DS, Spirizyme Fuel) = 78963 U/mL

100% de Actividad relativa Stargen 001 = 3500 U/mL

Este comportamiento sigmoidal (Figura 8), típico de la actividad al variar el pH, se ha analizado con base en la hipótesis de Michaelis y Davidsohn, suponiendo que el sitio activo de la enzima existe en tres formas iónicas sucesivas, de las cuales el estado iónico intermedio es el activo por encontrarse en su punto isoeléctrico (Figura 5). Se puede explicar considerando que la curva ascendente es causada por la desprotonación de un aminoácido de este sitio disminuyendo las interacciones enzima-solvente e incrementando las interacciones iónicas intracadena que pueden desestabilizar su estructura y la curva descendente por la desprotonación de un segundo aminoácido (que provoca igual desestabilización debido a las fuerzas de repulsión). Dicha tendencia es debido al solapamiento de dos titulaciones y solo depende de la concentración de protones en el medio, ligandos, temperatura, constante dieléctrica y fuerzas iónicas.^{11, 40,21}

4.2.4 Efecto de la concentración del sustrato

En la Figura 9 se muestra el efecto de la concentración de sustrato en la actividad enzimática observando la disminución de la actividad de la enzima en el mismo tiempo de reacción. Lo cual pudo deberse a una posible limitación difusional durante el proceso de hidrólisis⁵¹ provocado por un aumento de la viscosidad, tal y como se ha reportado por Baks et al. (2008) en estudios donde se trabaja a altas concentraciones de almidón (65% (p/v))⁵¹.

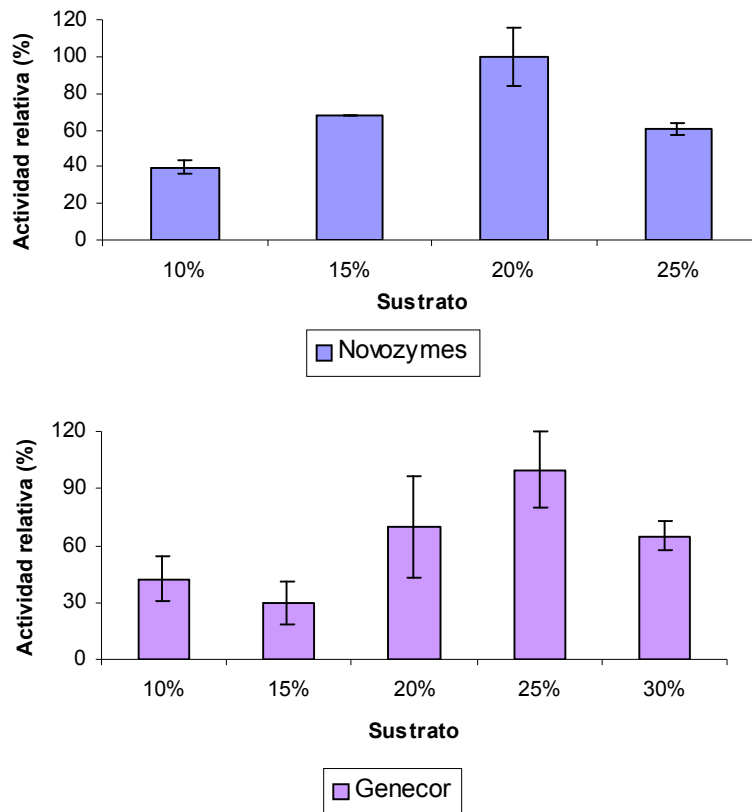


Figura 9. Actividad enzimática como función de la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática, ■ Licuefacción (pre-gelatinizado, Buffer acetato de sodio 0.016M pH= 4.0, 66°C y 0.0280% (p/p)) ■ Licuefacción-sacarificación simultaneas (Agua destilada a pH= 4.0, 0.023% (p/p) y 37°C).

100% de Actividad relativa Novozymes = 58907 U/mL

100% de Actividad relativa Genecor = 3277 U/mL

Con estos resultados (Figura 9) se seleccionó como concentración máxima de trabajo 20% (p/v) para Novozymes y 25% (p/v), para la enzima de Genecor.

La agitación durante la hidrólisis se mantuvo a 390 rpm incluido el proceso de gelatinización. Dicha agitación no es tan alta que pueda afectar la actividad enzimática provocada por las fuerzas generadas en

el fluido ¹¹, ni tan baja que no permita la transferencia de sustratos y transporte entre las fases ⁵¹.

4.3. Diseño de experimental y tratamiento estadístico de los datos ^{52,53}

En la Tabla 7 se reportan las variables que se estudiaron y algunos de los 54 experimentos aleatoriamente propuestos por el programa para el diseño y análisis estadístico multinivel factorial 3³ ortogonal con una replica, teniendo como respuesta la concentración de glucosa en g/L procesada con el método de la glucosa-oxidasa. Ec.3

Tabla 7. Diseño de experimentos

Bloque	Enzima Sustrato % (p/p)	[Sustrato] g/L	Tiempo minutos	[Glucosa] g/L
1	0	1	-1	225.5
1	-1	-1	-1	86.2
1	1	1	0	349.0
1	-1	1	1	189.0
1	0	-1	-1	118.0
1	-1	0	1	165.4
1	1	-1	0	181.0
1	0	0	1	213.4
1	1	1	1	405.0
1	1	0	-1	182.0
1	-1	1	0	220.9
1	0	-1	0	195.7
2	0	0	0	198.9
2	0	1	1	210.0
2	1	1	0	265.4
2	0	1	0	171.7
2	-1	0	-1	93.2
2	1	0	0	262.2
2	-1	-1	0	144.5
2	1	0	-1	183.9
2	1	1	1	300.6
2	0	-1	-1	75.0
2	1	-1	-1	137.8

El Diagrama de Pareto (Figura 10) muestra en forma decreciente el grado de importancia (significancia) que tienen los diferentes factores y sus combinaciones. En este caso cuatro efectos tienen valores de P menores a 0.05 como se aprecia en la Tabla 8, indicando que estos son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0% y son aquellos que traspasan la línea vertical.

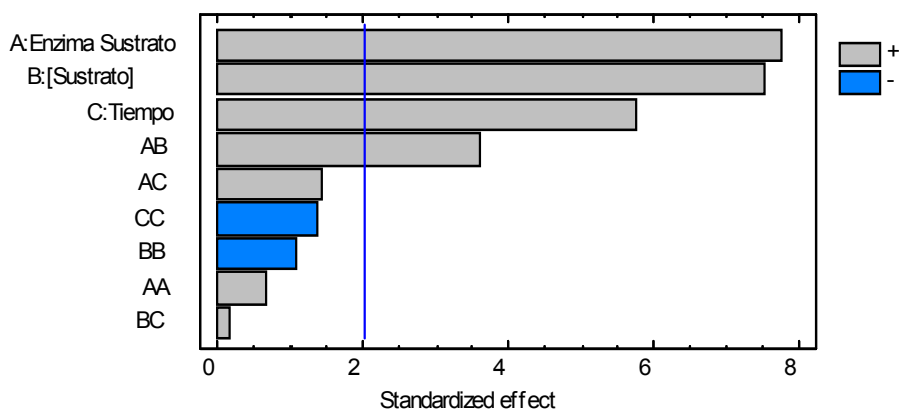


Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de glucosa

Este diagrama también puede ser explicado por las interacciones que se presentan entre los factores estudiados Figura 11, las líneas paralelas de la combinación BC ([Sustrato]*Tiempo) son indicio de la poca o nula interacción existente entre estas variables, contrario a lo que se observa con las combinaciones AC (Enzima / Sustrato*Tiempo) y AB (Enzima / Sustrato*[Sustrato]) siendo esta última la que mayor divergencia presenta por lo que la interacción de esta combinación es mucho mayor y es esta la razón por la que en el diagrama anterior la combinación BC ([Sustrato]*Tiempo) aparece al final y es casi imperceptible y la combinación AB (Enzima / Sustrato*[Sustrato]) sobrepasa la línea de significancia. Los signos negativos y positivos de las barras del diagrama de Pareto, son indicadores de los signos que presentaran los coeficientes de cada uno de los factores y por ende su

aporte sobre la respuesta o modelo obtenido Ec.1.

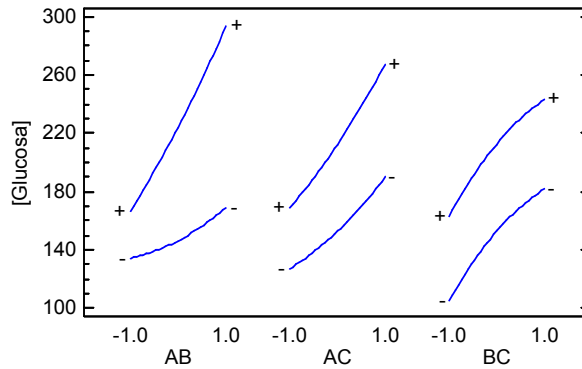


Figura 11. Interacción de los factores

Tabla. 8. Análisis de varianza para la concentración de glucosa

Factor	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Factor-F	Valor - P
A: Enzima Sustrato	58599.6	1	58599.6	59.41	0.0000
B:[Sustrato]	54814.1	1	54814.1	55.58	0.0000
C: Tiempo	32064.7	1	32064.7	32.51	0.0000
AA	370.704	1	370.704	0.38	0.5431
AB	12556.0	1	12556.0	12.73	0.0009
AC	1921.65	1	1921.65	1.95	0.1699
BB	1063.8	1	1063.8	1.08	0.3048
BC	17.6268	1	17.6268	0.02	0.8943
CC	1752.11	1	1752.11	1.78	0.1896
blocks	4128.51	1	4128.51	4.19	0.0469
Total error	42410.5	43	986.29		
Total (corr.)	209699.	53			

Gl= Grados de libertad
Corr = correlación

El modelo estadístico obtenido (Ec.1) muestra por medio de su R-cuadrado ajustado estadísticamente que es capaz de explicar el 75,6 % de la variabilidad de la concentración de Glucosa, con una desviación estándar de los residuos o error estándar de estimación de 31,4% y un 23.0% de error absoluto medio. 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.

$$[\text{Glucosa}] = 194,8 + 40,3 * \text{Enzima Sustrato} + 39,0 * [\text{Sustrato}] + 29,8 * \text{Tiempo} + 5,6 * \text{Enzima Sustrato}^2 + 22,9 * \text{Enzima Sustrato} * [\text{Sustrato}] + 8,9 * \text{Enzima Sustrato} * \text{Tiempo} - 9,4 * [\text{Sustrato}]^2 + 0,86 * [\text{Sustrato}] * \text{Tiempo} - 12,1 * \text{Tiempo}^2$$

Ec. 1 Ecuación de respuesta. Modelo matemático del proceso de sacarificación con la enzima Spirizyme.

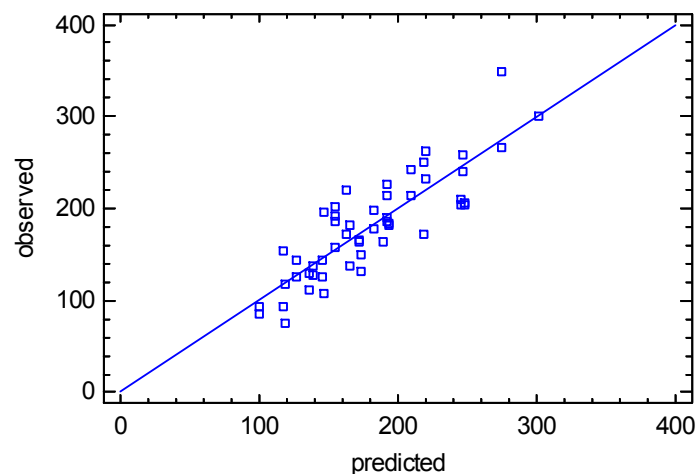


Figura 12. Predicción por regresión lineal múltiple

A partir del valor de los coeficientes que acompañan al modelo matemático obtenido (Ec.1) es posible decir que las variables independientes que mayor grado de contribución sobre el valor de la respuesta [Glucosa], son [Sustrato], la relación Enzima / Sustrato y el tiempo, corroborando una vez más el alto valor de significancia de estas variables arrojado por el diagrama de Pareto, seguida en menor grado por la combinación [sustrato]*Enzima / Sustrato, para finalmente encontrar el resto de combinaciones de 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 14) en la que se mantiene fija el tiempo en el nivel 0, se ve como a medida que se aumenta la cantidad de sustrato (de 25% a 35% p/v), y utilizando la menor relación Enzima /Sustrato evaluada experimentalmente (2 μ L/g) a lo largo de este aumento, los valores de la [Glucosa] comienzan a perder su comportamiento ascendente para comenzar a decaer, debido a una posible perdida de la difusibilidad y a la gran cantidad de sustrato en el medio de reacción, pero igualmente se puede ver que a medida que se aumenta la concentración de sustrato, y con ella la relación Enzima / Sustrato, hasta los limites estudiados la pendiente ascendente continuó creciendo.

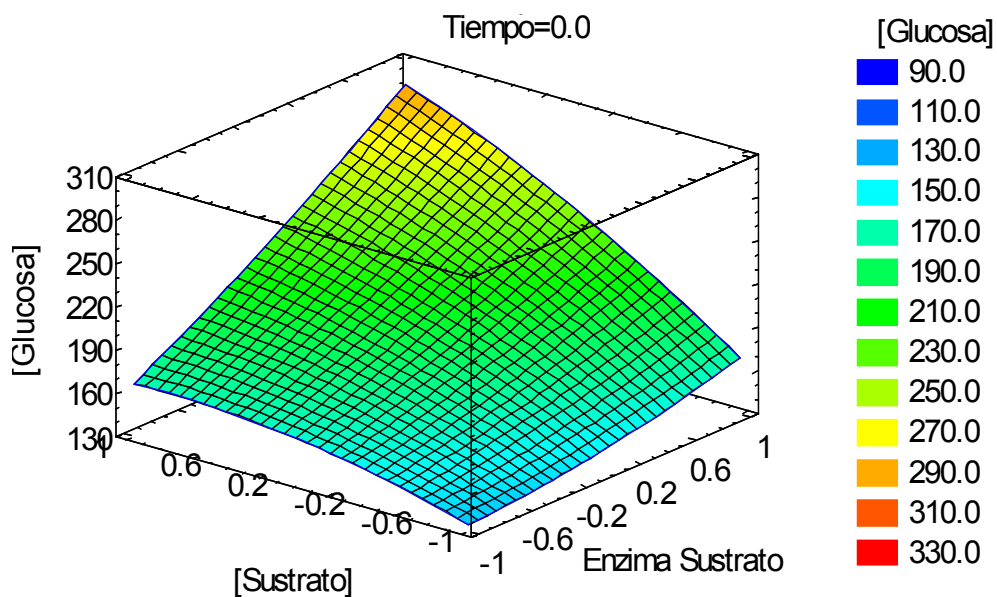


Figura 13. Superficie de respuesta estimada

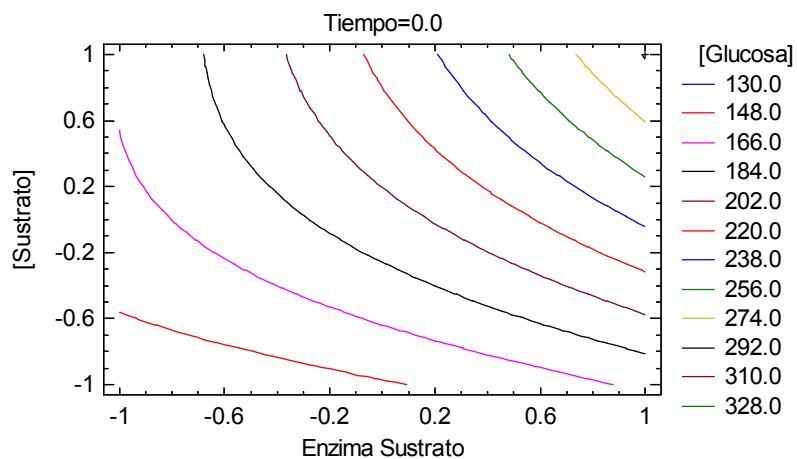


Figura 14. Contorno estimado de la superficie de respuesta

En la Tabla 9 se reportan los resultados de la validación del modelo de predicción

Tabla 9. Validación del modelo descrito por la ecuación 1

Condiciones de hidrólisis		Concentración de Glucosa			
Enzima	Sustrato	[Sustrato]	Predicho	Experimental	% Error
5		32	235,0	215,5	8,3
5,6		31	241,7	220,1	8,9
4,4		34	231,9	218,5	5,8
4,8		33	237,3	229,0	3,5
4,4		32	257,2	235,8	8,3
4,8		31	219,0	205,8	6,0
5,2		34	244,3	228,6	6,5
Porcentaje de error promedio					6.8

Como el porcentaje de error en promedio no sobrepasó el 10%, se puede decir que el modelo matemático se ajusta experimentalmente a

la ecuación 1 y representa la influencia de las variables, sobre la respuesta, [Glucosa] producida de manera confiable.

4.4. Estudio de las enzimas y sus productos en un proceso de fermentación a partir del almidón de yuca

Los resultados obtenidos en esta etapa (Tabla. 10) mostraron ser favorables para ambos procesos: hidrólisis - fermentación discontinuo e hidrólisis - fermentación simultaneas, comparadas con los valores de fermentación obtenidos en la estandarización interna del proceso de fermentación las cuales partían de glucosa analítica, siendo el coeficiente de productividad volumétrica con el almidón de yuca hidrólizado el de mayor similaridad al de glucosa como sustrato.

Tabla. 10 Resultados de los diferentes procesos de fermentación probados.

Sustrato de fermentación	qp (h ⁻¹)	Qp (g/l*h)	T-f (h)
Almidón hidrolizado	64,8	3,2	20
Almidón nativo	36,4	1.8	20
Glucosa*	82,5	3,6	23

qp (h⁻¹)= productividad específica

Qp (g/l*h) = productividad volumétrica

T-f (h)= tiempo de fermentación

* Galvis J.M. Bucaramanga 2009. Tesis de pregrado en Química. Facultad de ciencias.

CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones de licuefacción del almidón de yuca a un volumen de 200ml para la α -amilasa (Liquozyme® SC DS) son: pH 5,0, temperatura de 80°C, dosificación de enzima 0,0280 %(p/p).
- Para la glucoamilasa (Spirizyme® Fuel), las mejores condiciones para el proceso de sacarificación son: pH 4,5, temperatura de 70°C, dosificación de enzima 0,0631 % (p/p).
- Para la mezcla enzimática α -amilasa y glucoamilasa (Stargen™ 001) utilizada en el proceso licuefacción –sacarificación simultaneas las mejores condiciones de trabajo son: pH 4,0, temperatura de 46 °C, dosificación de enzima 0,023% (p/p).
- Algunas de las condiciones de trabajo recomendadas por las fichas técnicas y por otros artículos de estas enzimas (Liquozyme SC DS y Spirizyme de Novozymes) como las temperaturas de 80 y 70 y pH de 5,0 y 4.5 respectivamente, las cuales fueron creadas para trabajar con sustratos diferentes al almidón de yuca, fueron comprobadas en la optimización del proceso.
- Al escalar de 200 a 600 mL el proceso de hidrólisis del almidón de yuca utilizando la enzima en su estado puro se encontraron mejores resultados, además de reducción en el tiempo de trabajo, al igual que al aumentar la concentración de sustrato de 25 a 40%.

- Se comprobó en el proceso de hidrólisis - fermentación simultaneas, utilizando la enzima Stargen 001 de Genecor como lo recomienda su ficha técnica y su capacidad de acción a temperaturas de fermentación (32°C), causando el ahorro tanto de procesos como de costos energéticos.
- Los jarabes glucosados obtenidos en los procesos de licuefacción sacarificación en discontinuo y la licuefacción sacarificación simultaneas son aprobados como sustratos para el proceso de fermentación.

RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios y verificar las condiciones de trabajo encontradas para estas enzimas a escala de planta piloto y así verificar la viabilidad de industrializar tanto dichas enzimas, como la utilización de almidón de yuca como sustrato.
- El análisis del proceso de licuefacción-sacarificación simultánea, con la enzima Stargen™ 001, al momento de escalar a nivel de planta piloto puede ser prometedor por el ahorro de energía y de procesos que el uso de enzima puede generar.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. ESTRATEGIA DE DESARROLLO DE BIOCOMBUSTIBLES: implicaciones para el sector agropecuario. Recuperado en Septiembre de 2008, en <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Convenio/Documentos/EstrategiaDesarrolloBiocombustiblesColombia.pdf>.
2. La yuca y su contexto. Recuperado del centro internacional de agricultura tropical. CIAT el 27 de Septiembre del 2009, en http://www.ciat.cgiar.org/agroempresas/sistema_yuca/yuca.htm
3. PATLE S, LAL B. (2008). "Investigation of the potential of agro-industrial 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
4. Estrategia de desarrollo de biocombustibles: implicaciones para el sector agropecuario. Recuperado en Septiembre de 2008, en <http://www.minagricultura.gov.co/archivos/biocombustibles.pdf>.
5. SANCHEZ, 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 Octubre 2008, en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100005&lng=es&nrm=iso. IS

6. OCHOA M Y HERAZO G. BIOETANOL: Alcohol Carburante
Recuperado en Octubre del 2008, en
www.fedebiocombustibles.com/docs/BIOETANOL20%PPT_pdf.

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

8. Recuperado en Agosto del 2008, en
<http://www.proexport.com.co/vbecontent/library/documents/DocNewsNo5709DocumentNo6982.PDF>.

9. SANCHEZ LOPEZ 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

10. MARINI, I. Two hydrolytic enzymes and an epistemological historical approach. Recuperado el 26 de Septiembre del 2009, en
http://www.scienceinschool.org/repository/docs/issue4_enzymes.pdf

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

12. Enzymatic starch hydrolysis: background. Wageningen University. Recuperado el 24 de Septiembre del 2009, en
<http://www.bpe.wur.nl/UK/Research/Dissertations/Enzymatic+starch+hy>

drolysis/Enzymatic+starch+hydrolysis+background/

13. WONG, C.W, MUHAMMAD, S.K.S, DZULKIFLY, M.H., SAARI, N & GHAZALI, H.M. (2007). "Enzymatic production of linear long-chain dextrin from sago (Metroxylon sago) starch". *Food Chemistry*. 100, 774–780. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

14. HARMEET, K.S, KANUPRIYA, S, JUGAL, K.G & SANJEEV K.S. (2005). "Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. 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.

15. KONSOUA, Z & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. (2006). "Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*". *Process Biochemistry* 41, 343–349 . Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

16. El ABC de los Alcoholes Carburante. Recuperado en Julio del 2008 en, <http://www.fedebiocombustibles.com/articulo02.htm>.

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

18. VIJAY SINGH (2007). Ethanol Production in US. Recuperado en Octubre del 2008 en,

<http://www.istc.illinois.edu/about/SeminarPresentations%5CEthanol-Production.pdf> .

19. LEVEQUE, E., JANECEK, S., HAYE, B. & BELARBI, A. (2000). "Termophilic archaeal amylolytic enzymes. Review". *Enzyme and Microbial Technology* 26, 3-14. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

20. BELMA OZBEK & SEMRA YUCEER. (2001). " α -Amylase inactivation during wheat starch hydrolysis process". *Process Biochemistry*. 37, 87–95 . Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

21. DILEK KILIC A & BELMA OZBEK. (2005). " α -Amylase inactivation during rice starch hydrolysis". *Process Biochemistry*. 40, 1367–1379. Recuperado de la base de datos Sciencedirect.

22. 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.

23. ERTAN F, YAGAR H, BALKAN B (2007). "Optimization of alpha-amylase immobilization in calcium alginate beads". *Prep Biochem Biotechnol*. 37, 195-204. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

24. SÁNCHEZ MONTERO, J.M. Inmovilización de enzimas. Recuperado en Octubre del 2008 en, http://www.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/00_INMOVILIZACION_Introduccion.pdf

25. Purificación y aislamiento de enzimas. Recuperado en Octubre del 2008 en, http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmac_euticas/schmidth02/parte04/02.html.

26. LOPEZ-ULIBARRI R & HALL G.M. (1997). "Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor". *Enzyme and Microbial Technology* 21, 398-404. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

27. KOVALENKO GALINA A & PERMINOVA LARISA V. (2008). "Immobilization of glucoamylase by adsorption on carbon supports and its application for heterogeneous hydrolysis of dextrin". *Carbohydrate Research* 343, 1202–1211. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

28. 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.

29. BAKS, T., BRUINS M.E., MATSER A.M., JANSSEN A.E.M & BOOM R.M. (2008). "Effect of Gelatinization and Hydrolysis Conditions on the Selectivity of Starch Hydrolysis with α -Amylase from *Bacillus licheniformis*". *J. Agric. Food Chem.* 56, 488–495. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

30. 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

31. 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

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

33. DIETRICH KNORR, VOLKER HEINZ & ROMAN BUCKOW. (2006). “High pressure application for food biopolymers”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 619–631. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

34. Molecular Structure And Function Of Food Carbohydrate. G.G. BIRCH and L.F.GREEN. John Wiley & sons . New York- toronto. Session IV. Paper 11. The structure of starch. W.Banks, C.T Greenwood and D.D Muir. pag 177

35. COPELAND L, BLAZEK J, SALMAN H & CHIMING TANG M. (2009). “Form and functionality of starch”. *Food Hydrocolloids*. 23, 1527–1534. Recuperado de la base de datos Sciencedirect

36. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. Segunda edición. LEHNINGER A.L. Ediciones omega, S.A. Barcelona.1995. Cap 8

37. CORRADINI E, et al. (2005). “Comparative studies 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

38. La Química de los Carbohidratos. Recuperada el 11 de Marzo del 2009, en, <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/informacion%20carbohidratos.html>

39. 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

40. Enzymes In Food Processing. Tercera edición. NAGODAWITHANA T, REED G. Academic press, Inc. Harcourt Brace & company. San Diego. New York Boston. 1993. Cap 1,2,3 y 6

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

42. TSAFFRIR ZOR & ZVI SELINGER. (1996). “Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies”. *Analytical Biochemistry*. 236, 302–308 Article No. 0171

- 43.** 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
- 44.** FICHA de aplicación del producto. Biosystems
- 45.** Castaño P H. I & Mejía G .C. E, “producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultáneas (SSF)”. (2008). *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica*. Volumen 15 número 2, págs. 251-258, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- 46.** Sandoval A A P, Farhat I & Fernández Q. A. (2007). “Comportamiento reológico de harinas y almidones de yuca (*manihot esculenta crantz*) durante un proceso de extrusión”. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*. Volumen 14 número 1, año 2007. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 6-15
- 47.** FICHA de datos del producto LIQUOZYME® SC DS y FICHA de aplicación. Novozymes
- 48.** FICHA de datos del producto SPIRIZYME® FUEL y FICHA de aplicación. Novozymes
- 49.** FICHA de datos del producto STARGEN™ 001 y FICHA de aplicación. Genecor
- 50.** Nagodawithana T & Reed G. (1993). “*Enzymes In Food Processing*” Third edition. San Diego New York Boston Academic press, Inc. Harcourt Brace & company. pag 122

- 51.** Baks T, Kappenb F. H. J, Janssen A. E. M & Boom R. M. (2008). "Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*", *Journal of Cereal Science*. 47, 214–225. Recuperado de la base de datos Sciencedirect
- 52.** Tutorial programa STATGRAPHICS Centurion XV. II
- 53.** STATGRAPHICS PLUS. User Manual. Versión 1. Manugisticis, Ing. 1994
- 54.** Glucose Oxidase Reagent. Recuperada el 25 de Octubre del 2009, en, http://www.catacheminc.com/index_files/Page2117.htm.

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN UNA ENZÍMA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.⁴²

El máximo de absorbancia del colorante azul de Coomassie en solución ácida varía de 495 a 595nm. 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 500ml de reactivo de Bradford:**

Disolver 50mg de azul brillante de Coomassie G250 lentamente en 25ml de etanol, al 95% cubriendo el recipiente con papel aluminio (para evitar reacciones secundarias por acción de la luz). Una vez diluido agregar 50ml de ácido orto-fosfórico (H_2PO_4) al 85% (p/v), la solución resultante se afora a 500ml con agua destilada y almacenar refrigerado.

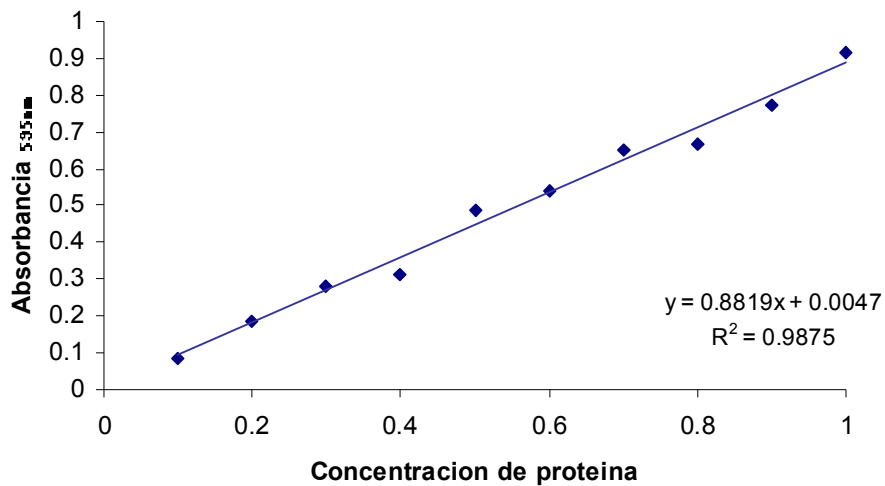


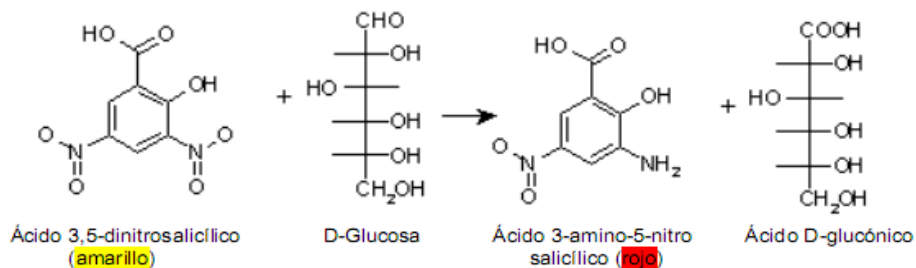
Figura 15. Curva de calibración de Bradford en Buffer 0.016M pH: 5,0

De la Figura 15 se obtiene la siguiente ecuación de la curva $Y = 0.8819$ [proteína](mg/mL) + 0,0047 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 AZÚCARES REDUCTORES POR MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS).⁴³

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), esta reducción produce una coloración que se hace mas intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores la cual se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia a 540 nm conllevando a la aplicación de la Ley de Beer_Lambert.



- **Preparación de 250ml del reactivo DNS al 1%**

Mezclar 4.0g de NaOH con 75g de tartrato de sodio y potasio, en un recipiente protegido de la luz con papel aluminio, calentar y agitar adicionando lentamente 2.5g del ácido 3,5-dinitrosalicílico; tapar dejar enfriar y aforar a 250ml con agua destilada. Posteriormente se guarda almacena en un frasco ámbar, cubierto con papel aluminio, para evitar posteriores reacciones secundarias.

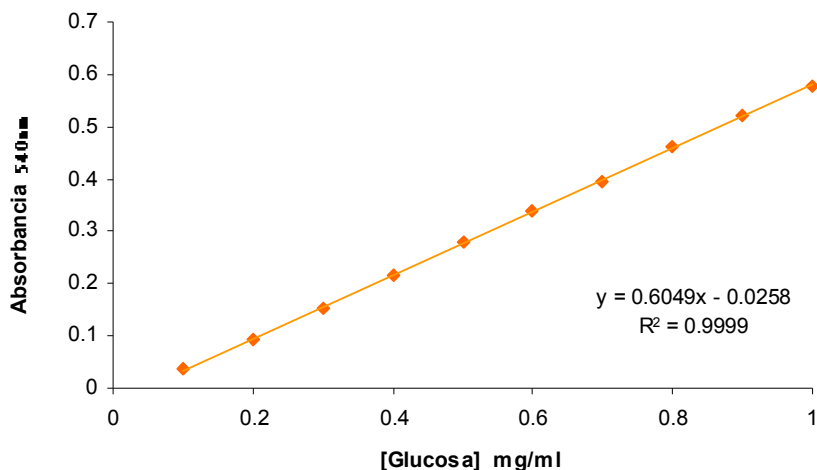


Figura 16. Curva de calibración de glucosa en Buffer 0.016M pH: 5,0

La siguiente es la ecuación obtenida de la curva de calibración Figura 16, la cual se utilizó para la obtención de los datos requeridos en la determinación de la actividad enzimática. $Y = 0.6049 [Glucosa] (mg/ml) - 0.0258$ y de los equivalente de dextrosa (ED) junto con las Ec. 2 y 3.

$$Actividad\ enzimática = Glucosa\ (g/L) * \frac{1\ mol}{PM} * \frac{10^{-6}\ \mu mol}{1\ mol} * \frac{V_{Montaje}}{V_{Enzima}} * fd$$

Ec. 2. Cálculo de la actividad enzimática

PM = peso molecular de la glucosa (g/mol)

$V_{Montaje}$ = volumen del montaje de reacción

V_{Enzima} = Volumen de adición de enzima

fd = Factor de dilución

$$\% Equivalentes\ de\ dextrosa\ (ED) = \frac{W_{azúcares\ reductores\ como\ glucosa\ (g/L)}}{W_{Sustrato\ seco\ (g/L)}} * 100$$

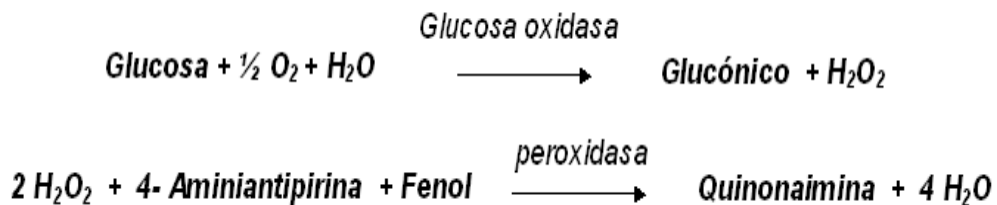
Ec.3. Cálculo de equivalentes de dextrosa

W = Peso (g/L)

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO DEL LA GLUCOSA OXIDASA. ⁵⁴

LA Glucosa Oxidasa es una flavoproteína 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 500nm. 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 las eventos que ocurren en este procedimiento:



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

Ec.3 Cálculo de la concentración de glucosa

$$C_{\text{Muestra}} = \frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} * C_{\text{Patrón}}$$