

**ESTUDIO A ESCALA PILOTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
JARABES GLUCOSADOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN  
DE YUCA**

**YENY MINERY CARREÑO MARTÍNEZ  
CÉSAR ROMÁN RUGELES CAMARGO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2005**

**ESTUDIO A ESCALA PILOTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
JARABES GLUCOSADOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN  
DE YUCA**

**YENY MINERY CARREÑO MARTÍNEZ  
CÉSAR ROMÁN RUGELES CAMARGO**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico**

**Director:**

**Crisóstomo Barajas Ferreira M.Sc. en Ing. Química**

**Codirector**

**Daniel Ricardo Molina Velasco M.Sc en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2005**

*A mi abuelo y a mi padre,  
Por ser siempre luz y compañía en mi camino.*

*Yeny Minery*

*A Dios, artista omnipotente de este triunfo  
A mis padres, por su confianza e incansable apoyo  
Y a quienes me han acompañado incondicionalmente.*

*César Román*

## **AGRADECIMIENTOS**

Expresamos nuestro sincero agradecimiento a las personas que se mencionan a continuación, y a todas aquellas que de una u otra forma participaron en la realización del presente trabajo.

A Luis Eduardo Carreño Pérez y Wilson Eduardo Carreño Soler, Técnicos del laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Química, por su incondicional y eficiente colaboración.

A Pedro Enrique Caldas Barrera, Técnico de mantenimiento, por sus oportunas y acertadas asesorías.

Al profesor Daniel Ricardo Molina por la confianza depositada.

Al Dr. Rodrigo Torres por sus aportes y enseñanzas.

Al Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PRONATTA, por el apoyo económico brindado para el desarrollo del proyecto.

A Alberto Sánchez López por su desinteresada cooperación y sus inspirados chistes.

A Leydy y Mario, compañeros de investigación y ocio, por tantos momentos compartidos.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1        FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	20
1.1      ALMIDÓN .....	20
1.1.1    Constituyentes químicos del Almidón. ....	21
1.1.1.1   Amilosa.....	21
1.1.1.2   Amilopectina.....	22
1.1.2    Comportamiento Hidrotérmico del Almidón. ....	23
1.1.2.1   Gelatinización .....	24
1.1.2.2   Retrogradación .....	24
1.1.3    Enzimas.....	24
1.1.3.1 $\alpha$ -Amilasa.....	25
1.1.3.2   Glucoamilasa.....	26
1.1.4    Catálisis Enzimática. ....	27
1.1.5    Cinética de las reacciones enzimáticas'.....	28
1.1.5.1   Modelo de Michaelis-Menten para las reacciones de un solo sustrato.....	29
1.1.5.1.1   Catálisis en fase heterogénea.....	31
1.1.5.2   Modelo cinético empírico desarrollado para la licuefacción del almidón de yuca. ....	32
1.1.5.3   Modelo cinético para un Reactor Enzimático con Membrana operado en Continuo utilizado para la etapa de sacarificación.....	33
1.1.5.4   Modelo cinético empírico para la sacarificación del almidón de yuca. ....	35
1.1.6    Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. ....	36
1.1.7    Efecto del pH sobre la actividad enzimática. ....	36

1.1.8	Jarabes de D-glucosa.....	37
1.1.9	Purificación de los jarabes de D-glucosa. ....	37
1.1.9.1	El Reactor Enzimático con Membrana (EMR). ....	38
2	METODOLOGÍA.....	40
2.1	TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	42
2.1.1	Determinación de azúcares reductores por el método de DNS. ....	42
2.1.1.1	Preparación del reactivo DNS. ....	42
2.1.1.2	Curva de calibración de absorbancia en función de la Concentración de Maltosa.....	42
2.1.1.2.1	Preparación de las soluciones de maltosa.....	42
2.1.1.2.2	Procedimiento para obtener los datos de la curva.....	43
2.1.2	Determinación de Glucosa por el método de Glucosa-Oxidasa. ....	43
2.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA $\alpha$ -AMILASA.....	43
2.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOAMILASA .....	44
2.4	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS APROPIADAS PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A ESCALA LABORATORIO .....	45
2.4.1	Determinación del Rango de Temperatura de Gelatinización .....	45
2.4.2	Determinación de la influencia de las variables concentración de sustrato([S]), relación g de enzima/g de sustrato seco y tiempo de reacción (t) sobre el equivalente en dextrosa en el proceso de Licuefacción.....	45
2.4.3	Determinación de los parámetros cinéticos para el modelo empírico del proceso de licuefacción .....	47
2.4.4	Determinación de la estabilidad de la enzima AMG en un reactor de membrana.....	47

2.4.5	Determinación de los parámetros cinéticos para la Glucoamilasa como enzima soluble.....	49
2.4.6	Determinación de los parámetros cinéticos del modelo de desempeño del Reactor Enzimático de Membrana .....	50
2.4.6.1	Evaluación del modelo .....	50
2.4.7	Determinación de los parámetros cinéticos para el modelo empírico del proceso de sacarificación .....	51
2.5	PRODUCCIÓN EN CONTINUO DE JARABES DE GLUCOSA.....	51
2.5.1	Gelatinización del almidón.....	51
2.5.2	Licuefacción con $\alpha$ -amilasa.....	52
2.5.3	Sacarificación con glucoamilasa utilizando un reactor con membrana de ultrafiltración.....	52
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.1	CURVA DE CALIBRACIÓN DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALTOSA .....	54
3.2	RANGO DE TEMPERATURA DE GELATINIZACIÓN.....	55
3.3	INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO ([S]), RELACIÓN g DE ENZIMA/g DE SUSTRATO SECO Y TIEMPO DE REACCIÓN (t) SOBRE EL EQUIVALENTE DE DEXTROSA EN EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN .....	56
3.4	PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL MODELO EMPÍRICO DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN.....	58
3.5	ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AMG EN UN REACTOR DE MEMBRANA.....	62
3.6	PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA GLUCOAMILASA COMO ENZIMA SOLUBLE .....	65
3.7	PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE DESEMPEÑO DEL REACTOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA .....	66
3.8	EVALUACIÓN DEL MODELO CINÉTICO .....	69

3.9	PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL MODELO EMPÍRICO DEL PROCESO DE SACARIFICACIÓN.....	70
3.10	PRODUCCIÓN EN CONTINUO DE JARABES DE GLUCOSA .....	72
3.10.1	Gelatinización del almidón.....	72
3.10.2	Licuefacción con $\alpha$ -amilasa .....	73
3.10.3	Sacarificación con glucoamilasa utilizando un Reactor con Membrana de ultrafiltración .....	74
3.11	COSTOS DE OPERACIÓN.....	75
4	CONCLUSIONES .....	78
5	RECOMENDACIONES .....	80
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
	BIBLIOGRAFÍA.....	85

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1	Variables y sus niveles para obtener las condiciones apropiadas para la etapa de licuefacción..... 46
Tabla 2	Constantes a y b para las diferentes concentraciones de almidón a 0,02% gE/gS ..... 59
Tabla 3	%DE predicho por el modelo para diferentes concentraciones de almidón y enzima con un tiempo de reacción de 15 minutos ..... 60
Tabla 4	Parámetros cinéticos Km y Vmax para la glucoamilasa como enzima soluble..... 66
Tabla 5	Parámetros cinéticos para el reactor EMR ..... 67
Tabla 6	Factor de correlación para evaluar el modelo cinético del reactor de membrana a diferentes concentraciones de almidón ..... 70
Tabla 7	Constantes a y b para concentraciones de almidón de 200 y 300g/L ..... 70
Tabla 8	Porcentaje de Equivalente de Dextrosa experimental y predicho a partir de la ecuación 1-7 (a = 130,589 g/Ly b = 22 min) para una concentración de almidón del 20%P/V y concentración de enzima 0,02% g E/g S..... 74
Tabla 9	Consumo de materia prima, insumos y servicios por kilogramo de jarabe de glucosa producido ..... 76

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Amilosa (fragmento de fórmula), $\alpha$ - 1,4 – glucano, no ramificada.	22
Figura 2. Amilopectina (fragmento de fórmula) $\alpha$ - 1,4 - glucano, ramificada, con enlaces $\alpha$ 1,6.	23
Figura 3. Diagrama esquemático comparativo del perfil de energía libre para una reacción química, sin catalizador (línea punteada) y catalizada por vía enzimática.	27
Figura 4. Representación gráfica del comportamiento cinético observado en enzimas que obedecen el modelo de Michaelis-Menten	29
Figura 5. Determinación de parámetros cinéticos mediante el método de linealización Lineweaver-Burk	31
Figura 6. Metodología utilizada en el estudio de la producción de jarabes de glucosa	41
Figura 7. Diagrama del reactor enzimático con membrana operando en reciclo total para el estudio de la estabilidad de la enzima AMG	48
Figura 8. Sistema en continuo para la producción de jarabes de glucosa	50
Figura 9. Curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración de maltosa (g/L)	54
Figura 10. Curva de cambio de Viscosidad Vs Temperatura para una solución de almidón 6%	56
Figura 11. Diagrama de Pareto de las variables independientes y el % DE	57
Figura 12. Superficie estimada de respuesta	58

Figura 13	Modelo cinético empírico para la producción de maltosa en el proceso de licuefacción a diferentes concentraciones de almidón y 0,02% g de Enzima/g de Almidón	60
Figura 14	Velocidad de producción de Maltosa calculada con el modelo empírico a diferentes concentraciones de enzima, para una concentración de almidón de 200g/L.	61
Figura 15	Efecto del pH sobre la actividad de la enzima AMG a la máxima presión de operación (19 Psi) y temperatura de 55°C	63
Figura 16	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima AMG a la máxima presión de operación (19 Psi) y pH 4,5.	64
Figura 17	Efecto de la presión sobre la actividad de la enzima AMG a una temperatura de 55°C y pH 4,5 donde presentó la mayor estabilidad.	65
Figura 18	Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de glucosa en un reactor enzimático con membrana.	67
Figura 19	Determinación del orden de reacción para un reactor de membrana	68
Figura 20	Resultados experimentales y teóricos de desempeño para el reactor enzimático con membrana utilizado en la etapa de sacarificación	69
Figura 21	Curva que describe la formación de glucosa como una función del tiempo (Concentración de sustrato 200 g/L; Concentración de AMG 1,5 g/L)	71
Figura 22	Velocidad de producción de glucosa calculada con el modelo empírico a diferentes concentraciones de glucoamilasa	72
Figura 23	Conversión durante la hidrólisis continua del almidón ( 200 g/L almidón; 1,5 g/L AMG)	75

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR EL MÉTODO DE GLUCOSA OXIDASA.... 89
ANEXO B	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA $\alpha$ -AMILASA ..... 90
ANEXO C	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOAMILASA ..... 91
ANEXO D	DISEÑO EXPERIMENTAL MULTINIVEL PARA LA ETAPA DE LICUEFACCIÓN..... 92
ANEXO E	TABLA DE ABSORBANCIA OBTENIDA PARA CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE MALTOSA..... 93
ANEXO F	ANÁLISIS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS REALIZADO EN EL PROGRAMA ESTADÍSTICO STATGRAPHICS PLUS 5.1 ..... 94
ANEXO G	MODELO EMPÍRICO PARA LA PRODUCCIÓN DE MALTOSA EN EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALMIDÓN ..... 96
ANEXO H	VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MALTOSA CALCULADA CON EL MODELO EMPÍRICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA, PARA UNA CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN DE 60 g/L..... 97

ANEXO I	VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MALTOSA CALCULADA CON EL MODELO EMPÍRICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA, PARA UNA CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN DE 100 g/L.....	98
ANEXO J	RESULTADOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS DE DESEMPEÑO PARA EL REACTOR ENZIMÁTICO CON MEMBRANA UTILIZADO EN LA ETAPA DE SACARIFICACIÓN CON UNA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA 1,5 g/L.....	99
ANEXO K	CURVA QUE DESCRIBE LA FORMACIÓN DE GLUCOSA COMO UNA FUNCIÓN DEL TIEMPO (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 300 g/L; CONCENTRACIÓN DE AMG 1,5 g/L).....	102

## RESUMEN

TÍTULO\*:

### **ESTUDIO A ESCALA PILOTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE JARABES GLUCOSADOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA**

Carreño Martínez Yeny Minery, Rugeles Camargo César Román, Barajas Ferreira Crisóstomo\*\* y Molina Velasco Daniel Ricardo\*\*\*

Palabras claves: Jarabes glucosados, hidrólisis enzimática, almidón de yuca, reactor enzimático con membrana, modelos cinéticos,  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de jarabes de glucosa a partir del almidón de yuca en tres etapas: gelatinización, licuefacción con la enzima  $\alpha$ -amilasa (Fungamyl® 4000 BG) y sacarificación utilizando la enzima glucoamilasa (AMG 1000 BG); los dos primeros pasos se llevan a cabo en un reactor por lotes y el último en un reactor enzimático con membrana de ultrafiltración operado en continuo.

Inicialmente se realizó una experimentación a escala de laboratorio (Volumen de 500 mL) para definir las variables que afectaban el proceso determinando el rango de temperatura de gelatinización, y la incidencia del tiempo de reacción ( $t$  (min)), la concentración de almidón ( $[S]$  (g/L)) y la relación gramos de enzima  $\alpha$ -amilasa por gramo de sustrato (gE/gS) en la etapa de licuefacción con un diseño experimental multinivel, estudio que fue corroborado con un modelo empírico para la hidrólisis de oligosacáridos no hidrolizables. Posteriormente se analizó la estabilidad de la AMG y se evaluó un modelo cinético para el desempeño del reactor con membrana, determinando los parámetros  $K_m$  y  $V_{máx}$ ; un modelo empírico también es propuesto para cuantificar la producción de glucosa con respecto al tiempo de reacción.

Finalmente, el proceso se efectuó a una escala de producción de 8 Litros por día con las condiciones más adecuadas para alcanzar la máxima producción de glucosa, obtenidas anteriormente; La conversión de glucosa fue del 75% con una productividad de 106,56 g de glucosa/L\*h.

Un análisis de costos permitió establecer los efectos de cada una de las operaciones sobre el costo total del producto.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, programa de Ingeniería Química, director: Crisóstomo Barajas Ferreira, MSc. en Ingeniería Química.

\*\*\*Facultad de Ciencias, programa de Química, codirector: Daniel Ricardo Molina, MSc. en Química

## ABSTRACT

TITLE\*:

### STUDY TO PILOT SCALE OF THE OBTAINING PROCESS OF GLUCOSE SYRUP BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FROM CASSAVA STARCH

Carreño Martínez Yeny Minery, Rugeles Camargo César Román, Barajas Ferreira Crisóstomo\*\* y Molina Velasco Daniel Ricardo\*\*\*

Keywords: Glucose syrups, hydrolysis enzymatic, cassava starch, kinetic models, enzymatic membrane reactor,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase.

The objective of this work was to evaluate in three stages the glucose syrups production by cassava starch: gelatinization, liquefaction with the enzyme  $\alpha$ -amylase (Fungamyl® 4000 BG) and saccharification using the enzyme glucoamylase (AMG 1000 BG); the two first steps carry out in a batch reactor, the third in a continuous enzymatic ultrafiltration membrane reactor.

Initially it was carried out a preliminary experimentation to laboratory scale (Volume 500 mL) to define the variables with more influence in the process determining the gelatinization temperature range and the incidence of time reaction ( $t$  (min)), substrate concentration ( $[S]$  (g/L)) and the relationship gram of enzyme  $\alpha$ -amylase per gram of substrate (gE/gS) in the liquefaction stage with a multilevel experimental design, this study was corroborated with an empirical model. Later on was analyzed the AMG stability and a kinetic model of enzymatic reactor performance was evaluated to determine the  $K'_m$  and  $V_{m\max}$  parameters; an empirical model is proposed too that quantifies the glucose production with respect to reaction time.

Finally, the process was carried out to production scale of 8 Liters per day with the best conditions obtained previously, glucose conversion was 75% with a productivity of 106,56 (g glucose /L\*h).

A costs analysis allowed to establish the effects of each of operations on the product total cost.

---

\* Degree Project

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering, program in Chemical Engineering,  
Principal: Crisóstomo Barajas Ferreira, MSc. in Chemical Engineering.

\*\*\* Faculty of Science, program in Chemistry, advisor: Daniel Ricardo Molina, MSc.  
in Chemistry.

## INTRODUCCIÓN

La glucosa, que comercialmente se emplea en la elaboración de un gran número de alimentos, se obtiene generalmente de la hidrólisis controlada del almidón. La forma antigua de obtener los jarabes de glucosa, por hidrólisis ácida, ha sido prácticamente desplazada en los últimos 30 años por la hidrólisis enzimática que permite obtener un jarabe de mayor calidad y a un costo muy competitivo; durante este proceso se involucran dos pasos enzimáticos: la licuefacción del almidón por la enzima  $\alpha$ -amilasa y posteriormente la sacarificación, donde se utiliza la *glucoamilasa*.

El maíz es la materia prima más explotada por la industria biotecnológica de los edulcorantes naturales en el mundo, y según las estadísticas de los últimos 20 años, el mercado de los edulcorantes de sacarosa cayó más del 50%; en países como México, uno de los mayores productores de caña de azúcar a nivel mundial, la tendencia a preferir estos jarabes generó grandes pérdidas teniendo en cuenta que no son producidos por empresas nacionales sino importados de los Estados Unidos. En Colombia la demanda de jarabes de glucosa y alta maltosa asciende a las 120 000 toneladas anuales y el 80% se encuentra en manos de proveedores extranjeros como Corns Products Andina.

La yuca, un producto subvalorado actualmente, es una de las principales fuentes de almidón en nuestro país y por ende una de las materias primas más atractivas para la producción de jarabes de glucosa y fructosa.

Estos edulcorantes son utilizados ampliamente en la elaboración de bebidas refrescantes, conservas de frutas, repostería, etc., como sustitutos del azúcar de caña.

La yuca, una planta de raíz amilácea, es un arbusto cultivado en los cinco continentes que se caracteriza por ser una fuente de energía a bajo costo y

representa muchas ventajas para el cultivador ya que se produce en suelos pobres o en tierras marginales donde no se pueden desarrollar satisfactoriamente otros cultivos. Ha sido producto propio de los agricultores con menos recursos, quienes valoran que éste tolera la sequía estacional y además tiene una capacidad inigualable de recuperarse del daño que le causan las plagas y las enfermedades; Un agricultor colombiano puede producir en promedio cerca de 10 toneladas de yuca por hectárea, pero esta cifra puede mejorarse hasta un 40% si se utilizan variedades mejoradas.

Colombia es un país tradicionalmente agrícola, sin embargo sus productos de exportación y consumo interno tienen muy poco valor agregado, razón por la cual es necesario explorar las nuevas técnicas de procesamiento y adaptarlas a nuestros procesos productivos para hacerlas competitivas a nivel internacional.

El propósito del presente trabajo es el estudio a escala piloto de las variables más representativas en cada una de las etapas de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca para obtener jarabes de glucosa, la obtención de modelos cinéticos que servirán como herramienta para la predicción y optimización del proceso y la evaluación del diseño del mismo mediante un análisis económico.

## 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En la producción de jarabes glucosados por vía enzimática es fundamental comprender el fenómeno existente en la transformación de almidón a glucosa. Por lo tanto es conveniente una descripción inicial del almidón y su estructura química, las enzimas utilizadas en la hidrólisis y la forma en que actúan, el estudio de la cinética enzimática, el desarrollo de la ultrafiltración como medio de purificación de los jarabes y el conocimiento del reactor enzimático con membrana de ultrafiltración en el que se efectúa parte importante del proceso.

### 1.1 ALMIDÓN

El almidón es un homopolisacárido vegetal, constituido por unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos, que se encuentra principalmente en el endospermo de los cereales, en los tubérculos como la papa y la yuca, en algunas frutas como el plátano y en varias legumbres<sup>1</sup>.

A diferencia de los demás hidratos de carbono, el almidón se presenta en la naturaleza bajo la forma de gránulos intracelulares compactos, con aspecto y estructura característica que varían dependiendo de la fuente extraída. Estos gránulos son esferocristales visibles al microscopio electrónico, que con rayos X generan redes de difracción; son relativamente densos e insolubles en agua fría<sup>1</sup>, en la que se dispersan dando lugar a la formación de suspensiones de baja viscosidad que pueden ser fácilmente mezcladas y bombeadas, incluso a concentraciones mayores del 35%.

El almidón constituye la principal fuente de calorías en la alimentación humana, además tiene un número enorme de posibles aplicaciones en la tecnología alimenticia debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Se utiliza como adhesivo, ligante, enturbiantes, formador de películas, estabilizante de

espumas, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante. El efecto de los almidones sobre la reología, consistencia y textura de numerosos alimentos se debe principalmente a sus propiedades hidrocoloidales<sup>1</sup>.

La despolimerización del almidón, o hidrólisis, puede lograrse por medios químicos o enzimáticos. Entre los productos que se obtienen en la hidrólisis del almidón se encuentran los jarabes de D-glucosa<sup>2</sup>.

### **1.1.1 Constituyentes químicos del Almidón.**

Químicamente el almidón es un homopolímero conformado por dos polisacáridos, la amilosa, no ramificada (22 – 26%), y la amilopectina, de estructura ramificada (74 – 78%), la porción relativa de éstos define las propiedades y características del almidón.

Estas estructuras se disponen en forma de espiral (hélice), tal que cada vuelta de la espiral contiene de 5 a 7 unidades de glucosa<sup>3</sup>; las cadenas de amilosa y de amilopectina se asocian por enlaces de hidrógeno entre los grupos alcohólicos directamente o por medio de moléculas de agua.

#### **1.1.1.1 Amilosa.**

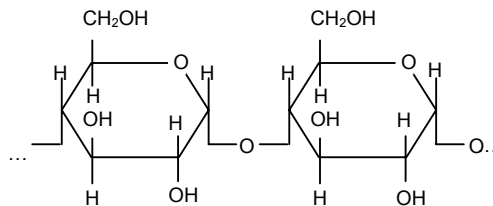
La amilosa es un polímero que contiene 500 o más unidades de D-glucosa, unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→4) glucosídicos. En los gránulos de almidón, este polímero está presente bajo forma cristalizada, debido principalmente al gran número de enlaces de hidrógeno existentes entre los grupos hidroxilo<sup>1</sup>. Estos enlaces de hidrógeno de la amilosa son también responsables de la adsorción de agua y de la formación de redes tridimensionales.

Como consecuencia de su estructura lineal las soluciones acuosas de amilosa no son estables, sobre todo cuando la temperatura de sus soluciones calientes desciende. Las soluciones concentradas que se enfrían rápidamente dan geles

amorfo, más o menos rígidos, elásticos y algunas veces fisotrópicos; bajo estas condiciones sus cadenas lineales se encuentran desordenadas y al retirarle calor éstas se asocian por puentes de H en un retículo que se solidifica en forma de gel. Con el tiempo y en soluciones menos concentradas que se dejan en reposo también hay formación de geles cristalinos y precipitados irreversibles en los que las moléculas lineales de la amilosa se ordenan en haces cristalinos expulsando el agua adsorbida, y los enlaces de hidrogeno entre moléculas de amilosa reemplazan a los que están entre amilosa y agua<sup>1,3</sup>.

La estructura flexible de la amilosa le permite constituir una figura tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilos están situados en el exterior. Las moléculas de amilosa tienen pesos moleculares de alrededor de  $10^6$  Dalton, variando con la fuente del almidón.

**Figura 1.** Amilosa (fragmento de fórmula),  $\alpha$  - 1,4 – glucano, no ramificada.



### 1.1.1.2 Amilopectina.

La amilopectina es un polímero ramificado de D-glucosa, los enlaces son del tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos exceptuando las cadenas ramificadas que se unen a las lineales por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glucosídicos.

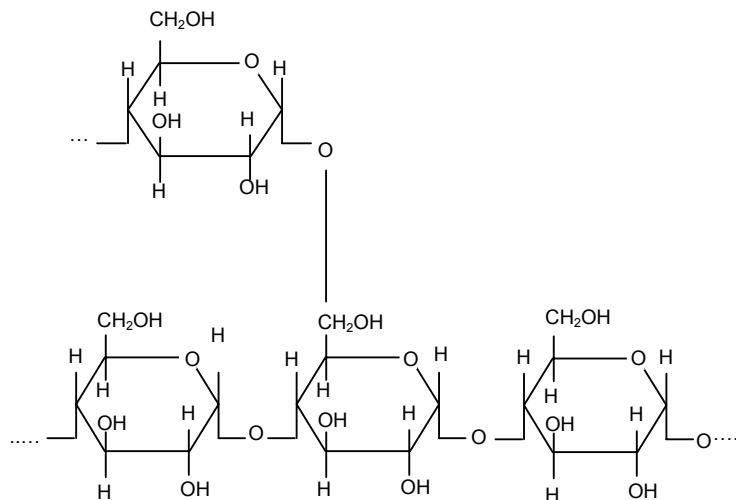
Por lo general tiene de 20 a 30 unidades de glucosa entre dos puntos de ramificación. Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices.

El peso molecular de este constituyente del almidón varía desde  $1 \cdot 10^7$  hasta  $5 \cdot 10^8$  Daltons, esto hace que las moléculas de amilopectina se encuentren entre las más grandes moléculas existentes en la naturaleza.

La amilopectina presenta un grado de cristalinidad muy inferior al de la amilosa, tiene poca tendencia a la retrogradación y posee un alto poder de retención de agua; sus soluciones calientes, al enfriarse, se hacen viscosas, pero no gelifican como consecuencia de su estructura ramificada, poco apta para la formación de redes moleculares<sup>1,4</sup>.

El contenido de amilopectina en los almidones naturales varía de un 75% a un 85%, exceptuando algunos que se encuentran constituidos exclusivamente por amilopectina y se les conoce como almidones waxy o céreos<sup>5</sup>.

**Figura 2.** Amilopectina (fragmento de fórmula)  $\alpha$  - 1,4 - glucano, ramificada, con enlaces  $\alpha$  - 1,6.



### 1.1.2 Comportamiento Hidrotérmico del Almidón.

Las suspensiones acuosas de los gránulos de almidón no son susceptibles a la acción química y enzimática; sin embargo en presencia de calor adquieren

ciertas propiedades que ayudan a realizar transformaciones estructurales que facilitan la hidrólisis con enzimas amilolíticas<sup>1</sup>.

#### **1.1.2.1 Gelatinización**

Cuando el almidón se expone al calentamiento en presencia de suficiente cantidad de agua, se produce un cambio aparente en los gránulos, prolongándose hasta que se alcanza una temperatura crítica, denominada temperatura de gelatinización. En este momento, los gránulos pierden su estructura organizada, debido a que el nivel energético que alcanzan es suficiente para disociar los enlaces de hidrógeno que mantienen ordenadas las cadenas moleculares, se hinchan por la absorción de agua de los grupos polares hidroxilo y pierden sus cruces de polarización<sup>1,3</sup>.

#### **1.1.2.2 Retrogradación**

Se refiere a la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente y accionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidroxilos; este fenómeno con frecuencia se efectúa por diversas rutas que dependen de la concentración y de la temperatura del sistema. La velocidad de retrogradación está influenciada por el pH, concentración y masa molecular de la amilosa y por la presencia de iones<sup>1,3,4</sup>.

Las moléculas de amilopectina no presentan tendencia a la recristalización, por lo cual poseen un elevado poder de retención de agua, contrariamente a las de amilosa, por lo tanto las soluciones de amilopectina no retrogradan<sup>1</sup>.

#### **1.1.3 Enzimas.**

Las enzimas son proteínas, que constan de largas cadenas de aminoácidos

unidas covalentemente mediante enlaces peptídicos. Son consideradas como catalizadores biológicos que están sujetas a las mismas restricciones cinéticas y termodinámicas de la catálisis química, por tanto aumentan la rapidez de una reacción química sin sufrir un cambio permanente en si mismas, influyendo en la velocidad de la reacción sin afectar su equilibrio.

Las enzimas sin embargo presentan características importantes que las distinguen de los catalizadores en general, entre las más relevantes están: alto poder catalítico, alta especificidad, y pueden trabajar a bajas presiones y en intervalos moderados de pH y temperatura; además tienen la capacidad para regular su actividad mediante diversos compuestos de origen natural<sup>7,8,1</sup>.

Una de las aplicaciones más importantes y que demanda la mayor utilización de enzimas es la industria del procesamiento del almidón, debido principalmente al éxito de los procesos enzimáticos para la producción de jarabes de D-glucosa, los cuales presentan grandes ventajas en cuanto a rendimiento y pureza y facilitan la cristalización, en comparación con la hidrólisis ácida<sup>1,8,10,11</sup>.

#### **1.1.3.1 $\alpha$ -Amilasa.**

La  $\alpha$ -Amilasa es una endohidrolasa que actúa de manera aleatoria sobre los enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos de la amilosa y de la amilopectina. Los productos primarios son oligosacáridos (dextrinas) los cuales más adelante se rompen para producir maltosa, algo de glucosa, isomaltosa y cadenas ramificadas de bajo peso molecular; esto representa un ataque preferentemente sobre cada paso de hélice de la cadena espiral de la amilosa o la amilopectina.

Se le conoce con el nombre de enzima licuante ya que se produce una rápida disminución de la viscosidad de las soluciones de almidón.

Los enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) de la amilopectina no son hidrolizados por esta enzima, tampoco los segmentos del polímero que forman dobles hélices<sup>3,8,10</sup>.

La saliva humana, el páncreas de porcino, la malta, hongos y bacterias son las principales fuentes de esta enzima.

La  $\alpha$ -amilasa forma parte de un grupo de proteínas homogéneas y bien caracterizadas; son ligeramente acídicas, solubles en agua, tiene un peso molecular de alrededor de 50 000 Daltons y contiene un ión de calcio por mol de enzima, influyendo este último no solo sobre la actividad de la enzima, sino también en el aumento de su estabilidad frente a los cambios de pH y temperatura<sup>3,10,12</sup>.

#### **1.1.3.2 Glucoamilasa.**

Es una enzima extracelular producida por *Aspergillus* o *Rhizopus* sp. Es una glicoproteína que contiene manosa, glucosa, galactosa y ácido urónico y tiene un peso molecular de 60 a 100 000 Daltons; los rangos óptimos de pH y temperatura varían entre 4,3-4,7 y 50-60°C, respectivamente<sup>3,8</sup>.

La glucoamilasa actúa como catalizador de los enlaces  $\alpha$ -(1→4) glucosídicos de los polisacáridos, liberando unidades sencillas de D-glucosa a partir de los extremos no reductores de las cadenas.

La amilosa y la amilopectina son totalmente hidrolizados, debido al bajo grado de especificidad de esta enzima que le permite catalizar la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1→4) y  $\alpha$ -(1→6) glucosídicos<sup>3,10,11</sup>.

La actividad máxima de la enzima, para producir jarabes de D-glucosa a gran escala, se alcanza sobre almidones previamente sometidos a licuefacción, ya que la glucoamilosa es inactiva sobre almidón nativo<sup>3,10,11,13</sup>.

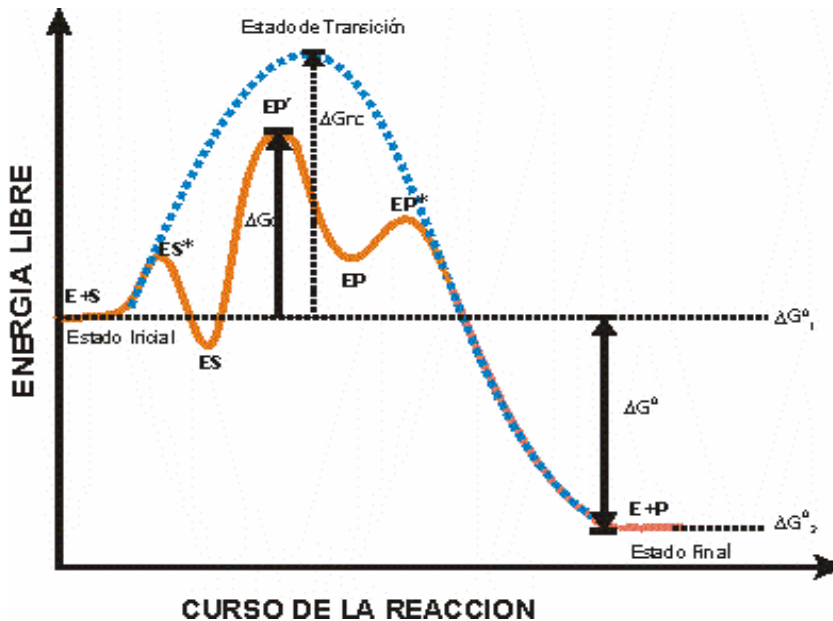
Cuando se hidroliza el almidón con glucoamilasa como catalizador, las cadenas poliméricas que contienen enlaces  $\alpha$ -(1→4) glucosídicos se hidrolizan más rápido que aquellos que contienen enlaces  $\alpha$ -(1→6) glucosídicos<sup>14</sup>.

### 1.1.4 Catálisis Enzimática.

Las enzimas están sujetas a las mismas restricciones cinéticas y termodinámicas que los catalizadores químicos, alterando la velocidad a la cual una reacción procede sin afectar la posición final de equilibrio entre sustrato(s) y producto(s)<sup>8</sup>.

En una reacción química ocurre una transformación que transcurre a través de un *estado de transición* el cual posee una energía, denominada *energía libre de activación de Gibbs*, que es siempre mayor que la energía de las especies presentes, esta *energía libre* disminuye cuando la combinación de catalizador y sustrato crea una nueva vía de reacción acelerando de esta forma la velocidad de la reacción<sup>15</sup>. La enzima puede lograr lo anterior pasando por diferentes estados de transición intermedios que se descomponen rápidamente para formar el producto<sup>7</sup>, como se aprecia en la Figura 3.

**Figura 3.** Diagrama esquemático comparativo del perfil de energía libre para una reacción química, sin catalizador (línea punteada) y catalizada por vía enzimática.



Al transcurrir el tiempo suficiente se establece un equilibrio dinámico entre el sustrato(s) y el producto(s) en el cual el cambio neto de energía libre  $\Delta G$  es cero.

$$\Delta G_{\text{Productos}} - \Delta G_{\text{Reactivos}} = 0 \quad \text{Ecuación 1-1}$$

$\Delta G$  se relaciona con el calor de reacción por la siguiente expresión:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Ecuación 1-2}$$

Donde S y H son la entropía y la entalpía de la reacción, respectivamente,  $\Delta G$  es el cambio en la energía libre de Gibbs y T es la temperatura absoluta.

La velocidad a la cual se aproxima al equilibrio es independiente de la magnitud de  $\Delta G^8$ .

El potencial catalizador de cada enzima se define en función de la *unidad de actividad enzimática*. Una unidad internacional equivale a la cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de 1 micromol ( $\mu\text{mol}$ ) de sustrato por minuto en condiciones específicas de concentración de sustrato, temperatura, pH y fuerza iónica.

Las enzimas poseen una región en donde se lleva a cabo la catálisis denominada “*sitio activo*”. Este sitio es aquella posición de la proteína en la que se localiza la actividad catalítica de la enzima, participando directamente en la unión y transformación del sustrato<sup>15</sup>.

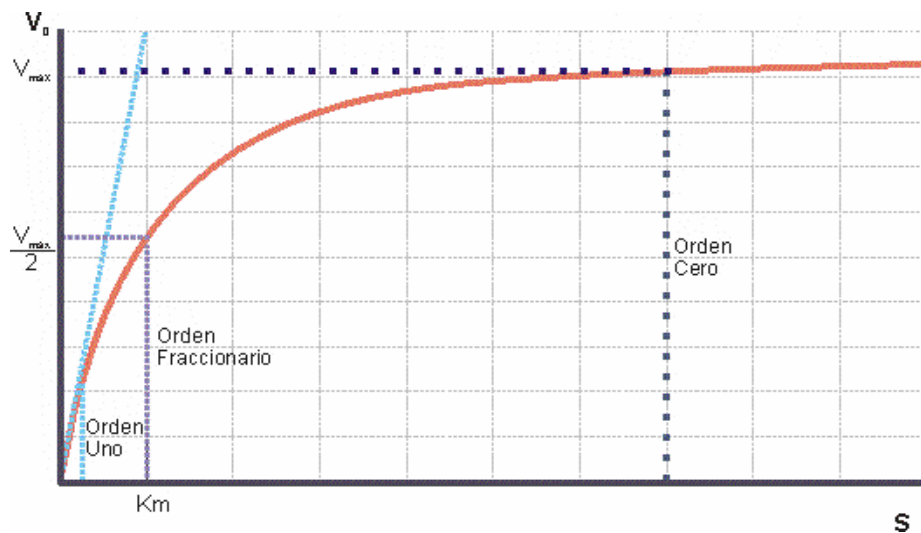
### 1.1.5 Cinética de las reacciones enzimáticas

La cinética enzimática aplicada desarrolla expresiones matemáticas, para el diseño y operación de reactores, que son el resultado de un análisis cuantitativo de las interacciones con cada uno de los factores que intervienen en el mecanismo de la reacción catalizada y es evaluada a través de la velocidad de reacción<sup>7,8,1,16</sup>.

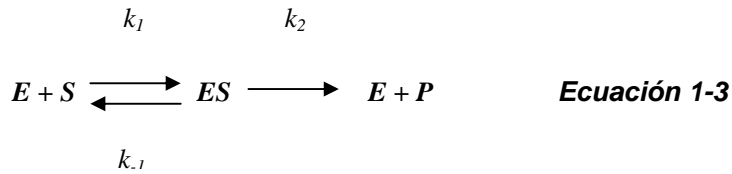
### 1.1.5.1 Modelo de Michaelis-Menten para las reacciones de un solo sustrato.

Las reacciones catalizadas por enzimas exhiben cinética de saturación, a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción es proporcional a su concentración y por lo tanto se establece una reacción de *primer orden* con respecto al mismo<sup>7,16,1,18</sup>. A medida que la concentración de sustrato aumenta, la rapidez de la reacción disminuye; la reacción es de *orden fraccionario*. A concentraciones aún más altas la rapidez de reacción es constante e independiente de la concentración de sustrato, la reacción es de *orden cero*<sup>7</sup>.

**Figura 4.** Representación gráfica del comportamiento cinético observado en enzimas que obedecen el modelo de Michaelis-Menten



Estos factores llevaron a Michaelis y Menten en 1913 a proponer una teoría general de cinética enzimática que más tarde fue extendida por Briggs y Haldane, la cual se ha desarrollado a fondo para las reacciones en que existe un solo sustrato y supone la formación de un complejo enzima-sustrato que posteriormente da lugar al producto, regenerando la enzima, según la siguiente reacción<sup>7,18</sup>:



Desarrollando las ecuaciones de velocidad que implica esta reacción, suponiendo que se alcanza el estado estacionario  $\frac{d(ES)}{dt} = 0$ , que la reacción que da origen al producto es prácticamente irreversible y que la velocidad de reacción  $v = \frac{dP}{dt} = k_2[ES]$  es máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) cuando la totalidad de la enzima en el medio se encuentra en forma de complejo, podemos llegar a la ecuación:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 1-4}$$

Donde  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  **Ecuación 1-5**

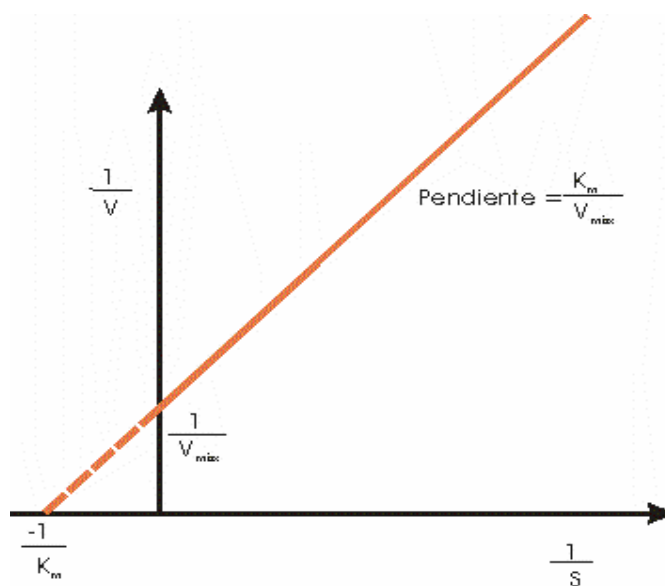
$K_m$  es la constante de Michaelis y equivale a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de la máxima; permite tener una idea de la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, pues cuanto menor sea su valor menor será la concentración de sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo de velocidad.

La ecuación de Michaelis–Menten puede reagruparse matemáticamente al tomar los recíprocos de ambos lados de la expresión de la ecuación 1-4; para obtener la representación lineal de Lineweaver – Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ecuación 1-6}$$

Una grafica de  $\frac{1}{v}$  contra  $\frac{1}{[S]}$  produce una línea recta con una pendiente  $\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}$  una ordenada al origen  $\frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$  y una ordenada sobre la abcisa de  $-\frac{1}{K_m}$ .

**Figura 5.** Determinación de parámetros cinéticos mediante el método de linealización Lineweaver-Burk



Se han propuesto muchos otros métodos de linealización como la gráfica de Eadie – Hofstee y Hanes y la gráfica lineal directa de Cornish – Bowden – Eisenthal para los casos en que es difícil determinar con precisión  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

#### 1.1.5.1.1 Catálisis en fase heterogénea.

Es el fenómeno de catálisis enzimática que se desarrolla a partir de enzimas inmovilizadas en soportes sólidos. Por ello, estos sistemas deben ser analizados como un proceso en fase heterogénea, dado que los reactantes y el catalizador se encuentran en fases distintas, estando este último inmerso en un

microambiente cuyas propiedades difieren de las del macroambiente (seno del líquido), donde se determinan los efectos de la reacción ( $S \rightarrow P$ ).

La inmovilización de enzimas provoca cambios en sus propiedades cinéticas, por esta razón se establece una diferencia en los parámetros dependiendo de las condiciones a las cuales fueron determinados; la cinética intrínseca es la que se observa en ausencia de perfiles de concentración y el comportamiento intrínseco de la enzima inmovilizada no es necesariamente igual al de la enzima soluble, ya que sus parámetros cinéticos podrían diferir debido a cambios estructurales provocados por la inmovilización. La cinética aparente es medida en presencia de restricciones difusionales y los parámetros efectivos son aparentes ya que no reflejan el verdadero comportamiento de la enzima inmovilizada, quedando éste enmascarado por un fenómeno de transferencia de masa<sup>18</sup>.

#### **1.1.5.2 Modelo cinético empírico desarrollado para la licuefacción del almidón de yuca.**

Para el modelamiento de la hidrólisis del almidón, en la etapa de licuefacción, un análisis cinético teórico de la reacción resulta impráctico ya que la distribución del peso molecular del almidón nativo pocas veces es conocida y el mecanismo cinético de la reacción es muy complejo. Por tal razón se recurre a ecuaciones semiempíricas con el fin de estudiar lo concentración de producto con respecto al tiempo de reacción.

Las curvas que describen el progreso de la hidrólisis para los oligosacáridos no hidrolizables (dextrinas con un grado de polimerización de 1 a 3) pueden ser ajustadas por la siguiente ecuación<sup>19</sup>:

$$P(t) = \frac{a.t^2}{b^2 + t^2} \quad \text{Ecuación 1-7}$$

Donde,  $P(t)$  es la concentración de maltosa en  $gL^{-1}$  en un tiempo  $t$ ,  $t$  es el tiempo en  $min.$ ,  $a$  es la concentración máxima de maltosa en  $gL^{-1}$  y  $b$  es el tiempo requerido para alcanzar la mitad de la concentración de  $a$  en  $min.$

Al derivar la ecuación 1.7 se obtiene la siguiente expresión para la velocidad de formación de maltosa ( $r(t)$ ):

$$r(t) = \frac{2ab^2t}{(b^2 + t^2)^2} \quad \text{Ecuación 1-8}$$

En el modelo propuesto se cuantifica la maltosa, glucosa o maltotriosa producida respecto al tiempo a diferentes concentraciones de sustrato y enzima.

### 1.1.5.3 Modelo Cinético para un Reactor Enzimático con Membrana Operado en Continuo utilizado para la Etapa de Sacarificación.

El modelo cinético para la reacción de sacarificación está fundamentado en la combinación del balance de materiales para el reactor y una expresión matemática que describe la cinética enzimática para la producción de glucosa.

Un estudio previo sobre la distribución de tiempos de residencia para un reactor enzimático con membrana demuestra que éste puede ser modelado como un reactor CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor)<sup>13,20</sup>. Partiendo de un balance de masa general en estado estable para este tipo de reactores se obtiene la siguiente expresión de velocidad de reacción:

$$r_G = \frac{S_0 JX}{V} = \frac{JP}{1.11(V)} \quad \text{Ecuación 1-9}$$

Donde:

$$r_G \quad \text{Velocidad de reacción} \quad \left[ g_{\text{Producto}} \text{ min}^{-1} L^{-1} \right]$$

$S_0$	Concentración inicial de sustrato	$[gL^{-1}]$
$J$	Flujo de permeado	$[L \text{ min}^{-1}]$
$X$	Conversión fraccional obtenida dentro del reactor	
$V$	Volumen de reacción	$[L]$
$P$	Concentración del producto dentro del reactor	$[gL^{-1}]$

Sin embargo la velocidad de reacción para el proceso también puede ser definida a partir del modelo cinético de Michaelis-Menten (Ecuación 1.10), el cual representa más adecuadamente el sistema para el caso de catálisis enzimática heterogénea.

$$r_G = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} = \frac{k_2 ES}{S + K_m} \quad \text{Ecuación 1-10}$$

$S$	Concentración del sustrato no hidrolizado	$[gL^{-1}]$
$V_{\max}$	Velocidad máxima de reacción	$[g_{\text{Producto}} \text{ min}^{-1} L^{-1}]$
$K_m$	Constante de Michaelis	$[gL^{-1}]$
$k_2$	Constante de velocidad de reacción	$[\text{min}^{-1}]$
$E$	Concentración de la enzima dentro del reactor	$[gL^{-1}]$

Igualando las ecuaciones 1-9 y 1-10 tenemos la expresión final del modelo cinético

$$X + \frac{XK_m}{1.11S_0(1-X)} = \frac{k_2 EV}{S_0 J} \quad \text{Ecuación 1-11}$$

Un nuevo parámetro fue definido como tiempo espacial modificado<sup>13</sup>

$$\tau = \frac{EV}{S_0 J} \quad \text{Ecuación 1-12}$$

$\tau$  Tiempo espacial modificado [min]

#### 1.1.5.4 Modelo cinético empírico para la sacarificación del almidón de yuca.

La modificación enzimática del almidón constituye un objeto de estudio de innumerables autores quienes han reportado diversas alternativas para la sacarificación de este biopolímero. Una de estas investigaciones es la producción de jarabes de maltosa utilizando un reactor con membrana y maltogenasa como enzima en la cual se desarrolló un modelo cinético empírico en el que se describe la producción de maltosa respecto al tiempo y que se ajusta satisfactoriamente para la glucosa. El modelo se presenta en forma análoga al modelo de Michaelis-Menten y cuantifica la glucosa formada con el tiempo.

El progreso de la hidrólisis puede ser ajustado por la siguiente ecuación:

$$G(t) = G_i + \frac{a't}{b'+t} \quad \text{Ecuación 1-13}$$

Donde,  $t$  es el tiempo en *min*,  $G(t)$  es la concentración de glucosa en  $gL^{-1}$  en un tiempo  $t$ ,  $G_i$  es la concentración inicial de glucosa presente en el sustrato en  $gL^{-1}$ ,  $a'$  es la máxima concentración de glucosa obtenida en  $gL^{-1}$  y  $b'$  es el tiempo requerido para alcanzar la mitad de la concentración de  $a'$  en *min*.

Al derivar la ecuación **1.13** se obtiene la siguiente expresión para la velocidad de formación de glucosa ( $r'(t)$ )<sup>20</sup>:(Ecuación 1-14)

$$r'(t) = \frac{a'b'}{(b'+t)^2} \quad \text{Ecuación 1-14}$$

### 1.1.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Las reacciones catalizadas por enzimas, al igual que toda reacción química, aumentan su velocidad con un incremento en la temperatura, debido a la mayor energía de las moléculas, sin embargo, este fenómeno se sobrepone a la desnaturalización de la enzima por su origen proteico. Estas interacciones se unen para dar un perfil con una velocidad máxima a una temperatura óptima<sup>1</sup>.

A medida que aumenta la temperatura ocurre un incremento en la actividad y una disminución de la estabilidad de la enzima como resultado de la inactivación térmica<sup>8</sup>.

El efecto del aumento de la velocidad de reacción respecto a la elevación de la temperatura está descrito por la ecuación de Arrhenius:

$$K = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Ecuación 1-15}$$

Donde  $K$  es la constante de velocidad de reacción,  $A$  es la constante de Arrhenius,  $E_a$  la energía de activación,  $R$  la constante universal de los gases y  $T$  la temperatura absoluta.

### 1.1.7 Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

En general, las enzimas presentan una máxima actividad catalítica a un limitado rango de pH.

Las enzimas poseen muchos grupos ionizables de tal forma que los cambios de pH pueden alterar la conformación de la enzima, la unión del sustrato y la actividad catalítica de los grupos en el sitio activo de la enzima. Los efectos se manifiestan en cambios en la velocidad máxima de reacción  $V_{m\acute{a}x}$ , en la afinidad de la enzima por el sustrato  $K_m$ , o en una alteración en la actividad de la enzima.

De igual forma los grupos ionizables en el sustrato pueden ser afectados por el pH y pueden ser importantes en la formación del complejo enzima-sustrato<sup>8</sup>.

### 1.1.8 Jarabes de D-glucosa.

Los jarabes de D-Glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D-glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas.

Según las condiciones de hidrólisis y el medio utilizado, se obtiene una gama muy amplia de jarabes, con características y usos específicos. Es posible obtener jarabes poco dulces ricos en dextrinas y pobres en maltosa y D-glucosa (< 20%); al hidrolizar en forma más completa los jarabes son muy dulces y la concentración de maltosa o D-glucosa es superior al 90% de los hidratos de carbono totales.

Existe una forma de diferenciar los hidrolizados anteriormente mencionados por medio de su porcentaje de equivalente de dextrosa (%DE), que es el porcentaje en peso de reductores presentes en el jarabe con respecto al total de sólidos o peso seco de jarabe<sup>1,3, 10</sup>.

$$ED = \frac{W_{gr}}{W_{ST}} * 100 \qquad \text{Ecuación 1-16}$$

Donde  $W_{gr}$  : Peso de reductores presentes en el jarabe.

$W_{ST}$  : Peso de sólidos totales presentes en el jarabe.

### 1.1.9 Purificación de los jarabes de D-glucosa.

La industria de alimentos ha incrementado su mercado, en gran parte por el auge y la aceptación de edulcorantes calóricos y no calóricos cuya producción mundial en los últimos años ha crecido vertiginosamente como resultado de la calidad y demanda de sus productos.

Las exigencias mercantiles implican la obtención de jarabes de glucosa altamente purificados, libres de coloración, impurezas y trazas extrañas<sup>21</sup>.

El proceso de ultrafiltración se caracteriza por ser muy adecuado entre los diferentes métodos convencionales que existen en este campo, la finalidad de este proceso, además de la purificación es recuperar las enzimas para poder reutilizarlas.

### 1.1.9.1 El Reactor Enzimático con Membrana (EMR).

El reactor con membrana es un dispositivo de mezcla completa en el que una membrana selectiva separa los productos de bajo peso molecular de los sustratos de mayor tamaño. El soluto permeable puede ser separado de la mezcla de reacción mediante una fuerza conductora específica (presión, potencial eléctrico, actividad)<sup>8,11,22,23,24</sup>. Las membranas de ultrafiltración (*UF*) son de naturaleza porosa y generalmente tienen una estructura rígida y muy permeable<sup>22</sup> y separan moléculas de tamaño entre 100 y 500 000 Daltons.

El interés en la investigación e implementación de estos sistemas en procesos biotecnológicos como fermentación, reacciones con enzimas como catalizadores y biotransformaciones, radica en los beneficios que éstos proporcionan, entre los que se encuentra la recuperación y reutilización de microorganismos y enzimas, tiempos de proceso más cortos, y un mejoramiento en la calidad de los productos, logrando así una mayor productividad en los bioprocesos<sup>7,13,22</sup>.

En un reactor enzimático de membrana, considerado un sistema de enzima inmovilizada por el método de confinamiento, una membrana semipermeable de ultrafiltración es usada para retener la enzima dentro del reactor y lograr una purificación del producto, por lo tanto, un factor fundamental para un alto rendimiento en la operación es la adecuada selección de la misma teniendo en cuenta los tamaños moleculares de las especies presentes en la mezcla reaccionante, su naturaleza química y la reactividad que puedan tener con el material de la membrana escogida.

La configuración de este reactor se presenta como un diseño alternativo para la reacción de sacarificación con enzimas solubles en la producción de jarabes de glucosa, ya que el sistema ayuda a la retención de la enzima confinándola en una región definida de la membrana asegurando de esta forma la interacción con el sustrato macromolecular. El reactor opera como un CSTR con reciclo, donde es posible controlar y optimizar independientemente la reacción y la separación del producto<sup>13</sup>, esto permite tener control sobre el ensuciamiento y la polarización por concentración en la membrana, fenómeno que se origina por

la acumulación de soluto retenido en su superficie<sup>23,24,25</sup>.

La producción en continuo de jarabes de glucosa está apoyada en una estructura teórica basada en la química del almidón, la cinética enzimática y en el modelamiento del desempeño de un reactor enzimático con membrana.

Utilizando este último como método de inmovilización para la enzima y aplicando nuevas técnicas de purificación con el fin de garantizar una mayor productividad y una buena calidad del producto.

## 2 METODOLOGÍA

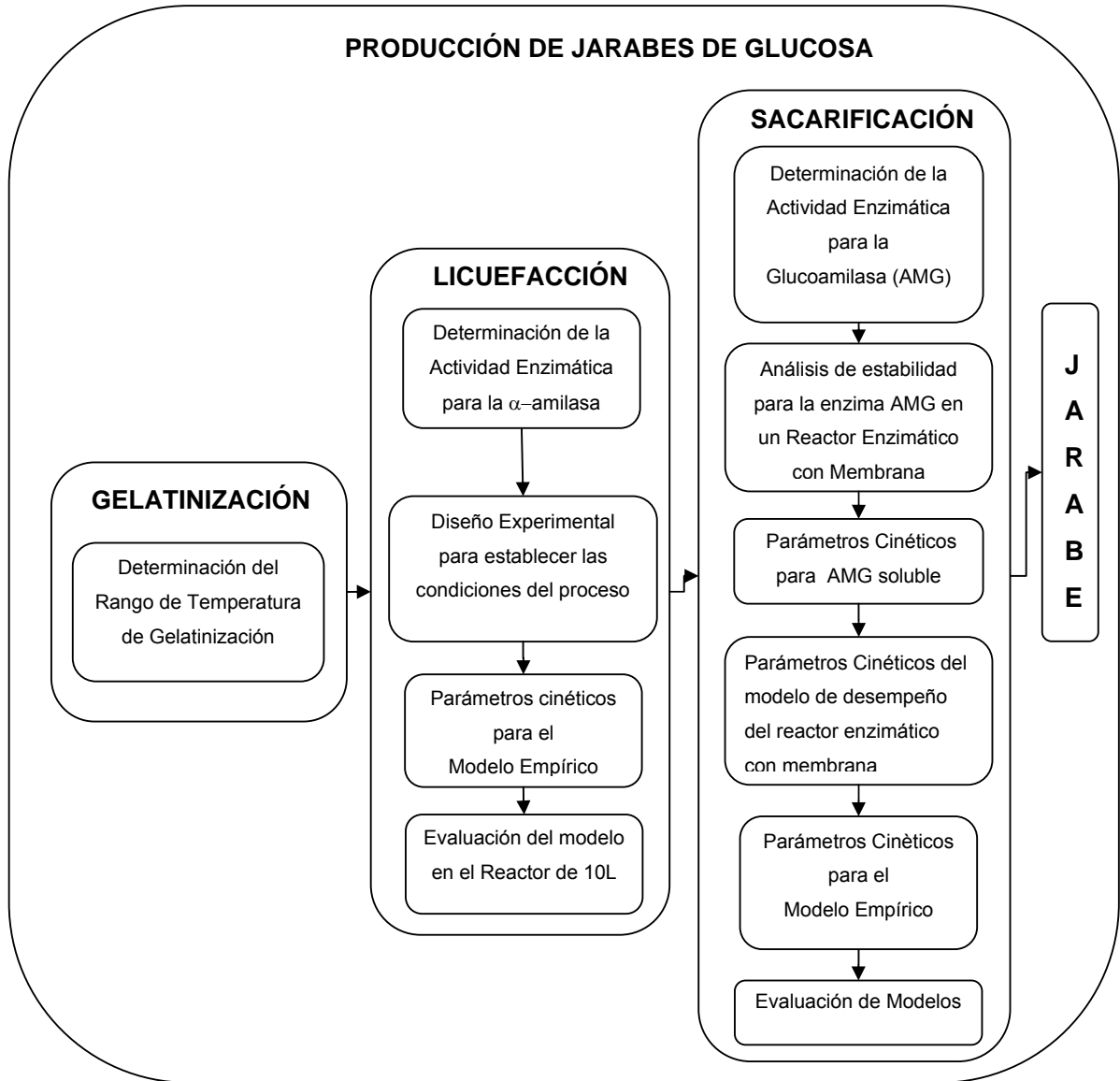
La producción de Jarabes de D-Glucosa se realizó en tres etapas, utilizando como materia prima almidón Almiyuca ®. En la primera etapa se lleva a cabo el proceso de gelatinización, necesario para aumentar la velocidad de hidrólisis del almidón, en la segunda la viscosidad de la solución disminuye por acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa obteniéndose así un licuado compuesto principalmente por maltosa y oligosacáridos y en la tercera etapa se produce el jarabe con el perfil de sacáridos deseados por acción de la enzima glucoamilasa, el cual es sometido a purificación utilizando una membrana de ultrafiltración capaz de separar la solución de glucosa de las enzimas y del almidón no hidrolizado.

Para la obtención de estos Jarabes fue necesaria una experimentación previa, tomando como punto de partida la información reportada en la literatura, con el propósito de determinar las variables que afectan el proceso, estableciendo el rango en el cual se obtiene la mayor eficiencia y asumiendo como parámetro de respuesta la conversión almidón a glucosa.

Este procedimiento se realizó a escala de laboratorio con un seguimiento continuo de la producción de azúcares reductores y la conversión de almidón a glucosa por medio de los métodos de DNS y Glucosa–Oxidasa, respectivamente.

El siguiente paso fue llevar el proceso a una producción de 8 L por día donde la experimentación se realizó con las mejores condiciones obtenidas anteriormente y finalmente los modelos fueron corroborados.

**Figura 6** Metodología utilizada en el estudio de la producción de jarabes de glucosa



## **2.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS**

### **2.1.1 Determinación de azúcares reductores por el método de DNS.**

La determinación de los azúcares reductores se fundamenta en la reacción que ocurre entre éstos y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) la cual produce el compuesto 3-amino-5-nitrosalicilate, cuya absorbancia a 540 nm guarda una relación directamente proporcional a la concentración molar de los azúcares reductores.

#### **2.1.1.1 Preparación del reactivo DNS.**

8 g de NaOH y 15 g de tartrato de sodio y potasio se mezclaron y se disolvieron en 250 mL de agua destilada. Posteriormente bajo calentamiento se agregaron 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se aforó a 500 mL con agua destilada y se almacenó a temperatura ambiente en un frasco ámbar para protegerlo de la luz.

#### **2.1.1.2 Curva de calibración de absorbancia en función de la Concentración de Maltosa.**

##### **2.1.1.2.1 Preparación de las soluciones de maltosa.**

Se preparó una solución de maltosa (Merck, Darmstadt) de concentración 1000 ppm. Por dilución de ésta se prepararon seis soluciones de 100, 200, 300, 500, 800 y 900 ppm, respectivamente.

#### **2.1.1.2.2 Procedimiento para obtener los datos de la curva.**

En un tubo de ensayo con tapa se mezcló 1 mL de solución de maltosa con 1 mL de reactivo DNS, se introdujo en un baño con agua en ebullición y se dejó reaccionar por un tiempo de 5 min. Una vez finalizado este tiempo, el tubo de ensayo se colocó en un baño de hielo por 5 minutos para detener la reacción en curso. Posteriormente se adicionaron 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 10 min. Finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro Merck Spectroquant® Nova 400 a 540 nm. El blanco utilizado fue una solución preparada con el procedimiento anterior pero agregando agua destilada en lugar de solución de maltosa.

#### **2.1.2 Determinación de Glucosa por el método de Glucosa-Oxidasa.**

La concentración de glucosa del jarabe obtenido en la etapa de sacarificación y purificación se cuantificó por medio del análisis enzimático con  $\beta$ -D-glucosa-oxidasa. Este método consiste en una reacción colorimétrica, en el que la glucosa se convierte por la acción de la glucosa-oxidasa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno en un compuesto de color rojo que absorbe a 500 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en el jarabe. Esta técnica es considerada exclusiva para la glucosa y se ha determinado que la oxidación de otros azúcares que son subproductos de la sacarificación como fructosa, maltosa, dextrinas y demás oligosacáridos es insignificante. Este método se describe en el anexo A.

### **2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\alpha$ -AMILASA<sup>6</sup>**

La cuantificación de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa (de origen fúngico, Fungamyl® 4000BG<sup>26</sup>, Novo Nordisk), se realizó siguiendo el método de

Whelan modificado<sup>10</sup>. Inicialmente se preparó una solución de almidón en buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7), con una concentración final de 10 mg de S/ mL; posteriormente la solución de almidón se sometió a calentamiento hasta alcanzar su gelatinización; 0,5 mL de esta solución se mezclaron con 0,5 mL de solución de enzima, preparada de la siguiente manera: se disolvió  $\alpha$ -amilasa en buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7) y cloruro de calcio 1 % p/v tal que la concentración final fue de 0.3 % g de enzima/ g de S. Esta mezcla se incubó a 55 °C durante 3 min. Seguidamente se agregó 1 mL de reactivo DNS y se dejó en baño con agua en ebullición por 5 min. La reacción se detuvo dejándola en un baño de hielo por 5 min. Finalmente se agregaron 10 mL de agua destilada y se dejó en reposo durante 10 min. La absorbancia se leyó a 540 nm contra un blanco obtenido siguiendo el anterior procedimiento pero agregando agua destilada en lugar de solución enzimática. La actividad enzimática se determinó a partir de la concentración de grupos reductores, expresados como maltosa, por interpolación en la curva de calibración del numeral 2. 1. 1. 2.

Los resultados de la actividad enzimática para la  $\alpha$ -amilasa se reportan en el anexo B.

### **2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCOAMILASA<sup>6</sup>**

Para la determinación de la actividad de la amiloglicosidasa (de origen fúngico, AMG 1000BG<sup>27</sup> Novo Nordisk), la solución inicial de almidón fue preparada y gelatinizada de igual manera que en el numeral 2.1.2. 0,5 mL de esta solución se mezclaron con 0,5 mL de solución de enzima; esta última se preparó disolviendo la enzima AMG en buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7) hasta obtener una concentración final de 2% g de E/g de S. Esta mezcla se incubó a 55°C y el tiempo total de reacción fue de 10 min.

Para desactivar la enzima la solución se llevó a un baño con agua a ebullición

por 5 min.

La cuantificación de la actividad enzimática se logró determinando la concentración de glucosa por el método de la glucosa-oxidasa descrito en el anexo A.

Los resultados de la actividad enzimática para la AMG se reportan en el anexo C.

## **2.4 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS APROPIADAS PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA A ESCALA LABORATORIO**

### **2.4.1 Determinación del Rango de Temperatura de Gelatinización**

A partir de una suspensión de almidón al 6% preparada en solución buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7) y por medio de un Viscosímetro Digital Programable DV-II Brookfield equipado con un control de temperatura que hace posible programar un calentamiento tipo rampa (1,0°C/min), se obtuvo un perfil de viscosidad con respecto a la temperatura en un periodo de tiempo (realizado por triplicado); este reporte sirvió como punto de partida para determinar el rango de la temperatura de gelatinización; se debe tener en cuenta que este intervalo se observa más claramente en un amilograma (gráfica realizada por un amilógrafo).

### **2.4.2 Determinación de la influencia de las variables concentración de sustrato([S]), relación g de enzima/g de sustrato seco y tiempo de reacción (t) sobre el equivalente en dextrosa en el proceso de Licuefacción**

Se propuso un diseño experimental multinivel en el que las variables a tratar fueron concentración de sustrato, tiempo y relación g de enzima/ g de sustrato

seco. La temperatura y el pH se tomaron de los datos reportados en la literatura<sup>10,26</sup>. La variable de respuesta es el %DE. Las variables y niveles se reportan en la Tabla 1. Cada uno de los puntos de la matriz original se efectuó por triplicado obteniéndose un total de 36 experimentos.

Para llevar a cabo la parte experimental se utilizó un reactor de 1 litro de capacidad con un volumen de reacción de 500 mL, dentro de un baño termostataado y con agitación continua de 150 rpm.

**Tabla 1** Variables y sus niveles para obtener las condiciones apropiadas para la etapa de licuefacción

Variable \ Nivel	-1	0	1
[S] (g/L)	60	130	200
Tiempo (min)	15	-	30
g Enz/g S	0,02%	-	0,05%

Cada experimento se realizó pesando la cantidad de almidón requerida preparada en solución buffer de acetato de sodio (0,016M, pH 4,7), la cual se llevó a un volumen final de 500 mL. Seguidamente se introdujo en el baño de calentamiento, se encendió la agitación y se dispuso a gelatinizar la muestra a las condiciones apropiadas según el experimento anterior (2.4.1). Finalizado el tiempo de gelatinización y alcanzada la temperatura de reacción para la licuefacción (55°C) se adicionó la solución de enzima  $\alpha$ -amilasa cuya reacción se prolongó de acuerdo a los valores de tiempo predeterminados.

Una vez culminado el tiempo de reacción de la enzima, se dispuso a desactivarla con solución de HCl (5N) bajando el pH hasta alcanzar el valor de 2,5.

El siguiente paso fue la determinación de azúcares reductores por el método de DNS, con el objeto de cuantificar la formación de maltosa que garantice las condiciones óptimas de esta parte del proceso, expresado como % DE

(equivalente de Dextrosa).

Posteriormente estos resultados se analizaron con ayuda del programa estadístico *Statgraphics Plus 5.1*, donde se corroboró la importancia de las variables que intervinieron y el grado de significancia de éstas para llevarlas posteriormente a un volumen de reacción de 10 litros.

Los resultados del diseño experimental se reportan en el anexo D.

### **2.4.3 Determinación de los parámetros cinéticos para el modelo empírico del proceso de licuefacción**

El modelo cinético empírico que describe el progreso de la hidrólisis del almidón contiene los parámetros cinéticos  $a$  y  $b$ , donde  $a$  es la concentración máxima de producto y  $b$  es el tiempo requerido para alcanzar la mitad de este valor ( $a/2$ ),  $a$  y  $b$  fueron determinados por seguimiento de la reacción en batch a diferentes concentraciones de almidón y enzima.

Para los experimentos se trabajó con soluciones de almidón a tres concentraciones diferentes 60, 100 y 200g/L con un volumen de reacción de 300mL; éstas soluciones fueron preparadas en solución buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7) y después sometidas a calentamiento hasta gelatinización (72°C, 30 min). Seguidamente la temperatura fue ajustada a 55°C y la enzima  $\alpha$ -amilasa fue adicionada. Las muestras se tomaron a diferentes tiempos hasta que la producción de maltosa se mantuvo constante.

La maltosa fue determinada por el método de DNS.

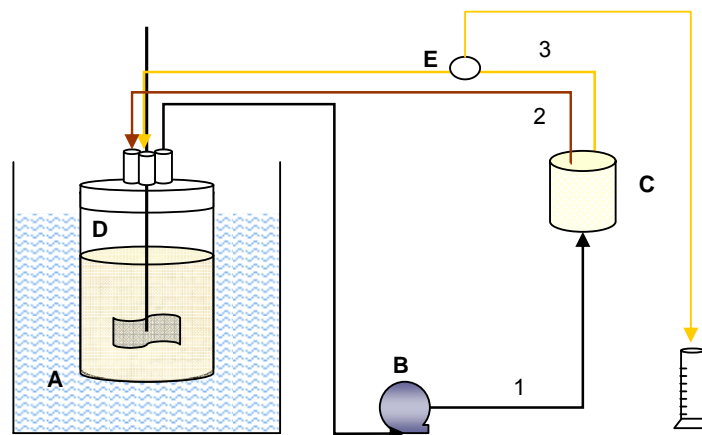
Los valores de  $a$  y  $b$  encontrados se reportan en la Tabla 2.

### **2.4.4 Determinación de la estabilidad de la enzima AMG en un reactor de membrana<sup>13,28,29</sup>**

Una serie de experimentos fueron realizados para evaluar el paso de la enzima a través de la membrana de ultrafiltración, la estabilidad térmica y mecánica de la AMG, y el efecto del pH sobre su actividad. Para este propósito el reactor fue

operado en reciclo total, donde las dos corrientes que salen de la membrana de ultrafiltración (C), permeado (3) y retenido (2), retornaron al recipiente de reacción (D). Se adecuó una válvula de tres pasos (E) para permitir un muestreo del permeado sin causar disturbios en el reactor y para prevenir la contaminación de las muestras con trazas de enzima proveniente de la mezcla reaccionante, como se puede apreciar en la Figura 7.

**Figura 7** Diagrama del reactor enzimático con membrana operando en reciclo total para el estudio de la estabilidad de la enzima AMG



La actividad enzimática en la corriente de permeado fue determinada en todos los experimentos para evaluar el paso de la enzima a través de la membrana.

Para el análisis del efecto del pH sobre la actividad de la enzima, las soluciones de AMG se prepararon a una concentración de 12 g/L disueltas en buffer de acetato de sodio 0,016 M a valores de pH de 4 – 4,5 – 5, para un volumen de reacción de 300 mL. Estas fueron bombeadas a través de la membrana, con condiciones de operación de 19 Psi y 55°C, hasta que un total de cinco volúmenes del reactor la permearon.

La estabilidad térmica y mecánica de la glucoamilasa se estudió realizando un seguimiento de la actividad enzimática en la corriente de retenido utilizando soluciones de AMG preparadas de la misma manera que para el análisis del efecto del pH, salvo que éstas fueron ajustadas a un pH de 4,5 y los experimentos se llevaron a cabo a tres valores de temperatura (46, 55 y 60 °C),

controlada por un baño termostatado (A), y a diferentes presiones (0, 10 y 19 psi)

La actividad enzimática fue chequeada por alícuotas reaccionantes de permeado y retenido con una suspensión de almidón 2% P/V. A cada tiempo de muestreo, 1 mL de permeado y 1 mL de retenido fueron adicionados a tubos de ensayo separados que contenían 2 mL de suspensión de almidón, se mezcló completamente y se incubó a 55°C por 15 min. Después de la incubación se introdujeron los tubos de ensayo en un baño de agua a ebullición para desactivar la enzima.

Se utilizaron dos blancos de reacción bajo las mismas condiciones como control para considerar cualquier glucosa que pudo haber estado presente en la solución de enzima o que pudo producirse durante la inactivación. Un blanco con 2 mL de suspensión y 1 mL de agua destilada (sustrato pero no enzima), y el otro blanco con 2 mL de agua destilada y 1 mL de retenido tomado directamente del reactor al inicio del experimento (enzima pero no sustrato).

Los resultados se reportan en el numeral 3.5

#### **2.4.5 Determinación de los parámetros cinéticos para la Glucoamilasa como enzima soluble**

Se realizó un experimento previo por lotes a diferentes concentraciones de enzima y de sustrato para determinar las constantes  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  intrínsecas.

Utilizando el almidón ya gelatinizado y licuado con un %ED entre 20 y 30, se procedió a sacarificar con la enzima AMG con las siguientes condiciones pH = 4,5 y T = 55°C, tomando muestras a diferentes tiempos de reacción hasta que la concentración de glucosa se mantuvo constante.

El volumen de reacción utilizado fue de 300 mL, las concentraciones de almidón fueron 20 – 40 – 60 – 100 – 200 g/L para 1g/L de concentración de enzima glucoamilasa.

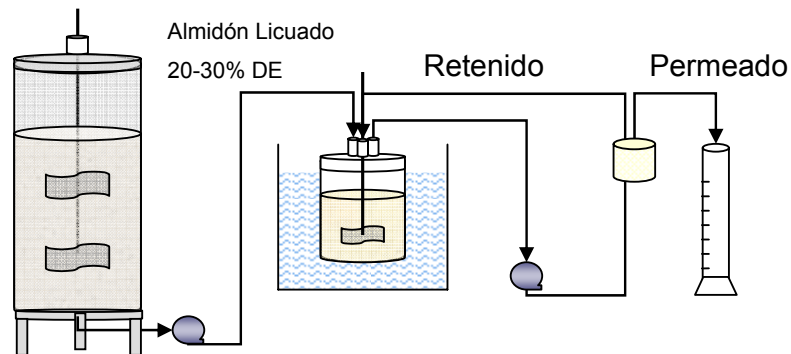
Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  intrínsecas se reportan en el numeral 3.6.

## 2.4.6 Determinación de los parámetros cinéticos del modelo de desempeño del reactor enzimático de membrana<sup>13,22</sup>

Para desarrollar un modelo de desempeño de un reactor enzimático de membrana es necesario determinar los parámetros cinéticos del proceso que en este caso son las constantes  $K'_m$  (aparente) de Michaelis y  $k_2$  de velocidad de reacción; éstos fueron hallados operando el sistema como se muestra en la Figura 8, donde el hidrolizado es bombeado al reactor de sacarificación, en el que el volumen de reacción y el flujo de permeado permanecen constantes, hasta alcanzar el estado estable, el experimento se realizó para diferentes concentraciones de sustrato (1 - 5 - 10 - 15 - 20 - 30 %P/V). Los datos de estado estable fueron usados para calcular la velocidad de reacción dada por la ecuación 1.9.

Los datos de velocidad inicial de reacción para cada concentración se utilizaron para estimar  $K'_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  con la técnica de linealización de Lineweaver-Burk. Estos valores fueron reemplazados en la ecuación 1.11.

**Figura 8** Sistema en continuo para la producción de jarabes de glucosa



### 2.4.6.1 Evaluación del Modelo

Para la evaluación del modelo se realizaron corridas similares a las descritas en el numeral 2.4.6, pero éstas se realizaron a 5 diferentes tiempos de residencia para cada una de las concentraciones de almidón hasta alcanzar el estado estable.

#### **2.4.7 Determinación de los parámetros cinéticos para el modelo empírico del proceso de sacarificación**

Para la etapa de sacarificación el modelo cinético empírico que describe el progreso de la producción de glucosa contiene los parámetros cinéticos  $a'$  y  $b'$ , donde, al igual que para la licuefacción,  $a'$  es la concentración máxima de producto y  $b'$  es el tiempo requerido para alcanzar la mitad de este valor ( $a'/2$ ), estos valores fueron determinados por seguimiento de la reacción en continuo a dos diferentes concentraciones de almidón (200 y 300 g/L).

En el numeral 3.9 se reportan los parámetros  $a'$  y  $b'$ .

### **2.5 PRODUCCIÓN EN CONTINUO DE JARABES DE GLUCOSA**

La producción en continuo de jarabes de glucosa se efectuó con base en los datos obtenidos de los experimentos anteriormente explicados y los datos reportados en la literatura.

#### **2.5.1 Gelatinización del almidón**

La gelatinización es la parte inicial del proceso, en donde una suspensión de almidón a una concentración del 20% P/V preparada en una solución buffer de acetato de sodio de pH 4,7 fue llevada a un reactor enchaquetado de acero inoxidable de 12 litros de capacidad y con un volumen de reacción de 10 litros, en donde se sometió a un proceso de calentamiento a 72 °C durante 30 minutos con una velocidad de agitación de 150 rpm.

Estas condiciones garantizaron la gelatinización del almidón.

### **2.5.2 Licuefacción con $\alpha$ -amilasa**

Una vez gelatinizado el almidón, fue necesario disminuir la temperatura hasta 55°C y agregar la solución de enzima licuante  $\alpha$ -amilasa a una concentración de 0,02% g Enz/g Almidón seco durante 15 minutos, condiciones favorables para obtener un hidrolizado con un porcentaje de DE entre 20 y 30 que garantiza la presencia de grupos no reductores para mejorar el desempeño de la enzima glucoamilasa en la etapa de sacarificación.

Al finalizar el tiempo de reacción, se procedió a desactivar la enzima  $\alpha$ -amilasa con HCl (5N), bajando el pH hasta 2,5 durante 1 minuto y luego se adicionó NaOH (5N) hasta pH 4,5 para proseguir con la siguiente etapa.

### **2.5.3 Sacarificación con glucoamilasa utilizando un reactor con membrana de ultrafiltración**

El almidón licuado es conducido por una bomba peristáltica Buchler Instruments hasta el sistema de reactor con membrana con las condiciones establecidas: %DE entre 20 y 30, T : 55°C, pH: 4,5, rpm: 150.

Para garantizar la operación en continuo, se diseñó un control de nivel adaptado al reactor de sacarificación y conectado a la bomba de alimentación al sistema.

El reactor es un recipiente de vidrio de 1000 mL de capacidad el cual fue llenado a un volumen de reacción de 500 mL con el almidón licuado y es vertida una solución de glucoamilasa para obtener una concentración final de 1,5 g/L. Del recipiente de reacción sale el flujo de alimentación a la membrana a través de una bomba peristáltica Master-Flex L/S ® Economic Driver; el producto final ( jarabe de glucosa) permea la membrana mientras la enzima y el almidón no hidrolizado fueron retenidos y reciclados por el sistema.

A partir de esta bomba y de la variación de la presión a la entrada de la membrana de UF entre 0 y 20 psi se mantuvo la velocidad de flujo en el permeado de 5,5 mL/min con un tiempo de residencia de 90 minutos; para

evaluar el modelo cinético se realizó un seguimiento de la producción de jarabe de glucosa durante 12 horas.

El tratamiento experimental desarrollado a lo largo de este proyecto, se basó en un planteamiento inicial del problema, en el que se propuso producir jarabes glucosados en continuo a la mayor concentración posible de almidón, mejor conversión a glucosa y mayor productividad; para tal fin, la metodología dada incluyó las técnicas, análisis, experimentos y montajes más apropiados, dentro de los recursos asignados.

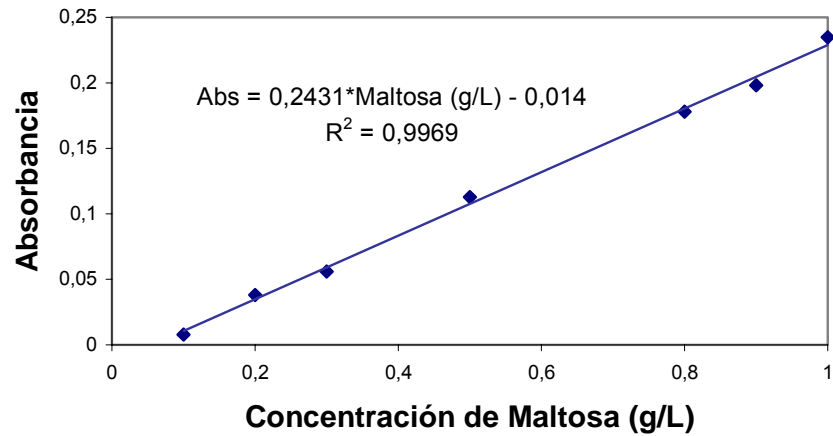
### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este capítulo se expone un seguimiento previo realizado a las variables para establecer su influencia en el proceso y se proponen dos modelos empíricos tanto para la etapa de licuefacción como para la de sacarificación. Adicionalmente se evalúa un modelo cinético para el reactor con membrana y se presenta el proceso de producción en continuo de jarabes de glucosa junto con los costos de operación.

#### **3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALTOSA**

La Figura 9 se realizó a partir de los datos reportados en el anexo E, el factor de correlación (0,9969) muestra que la relación entre la absorbancia y la concentración de maltosa cumple la ley de Beer en el intervalo de concentraciones escogido; por lo tanto la maltosa presente en una solución que no supere la concentración de 1 g de maltosa /L puede ser cuantificada utilizando la ecuación de la recta.

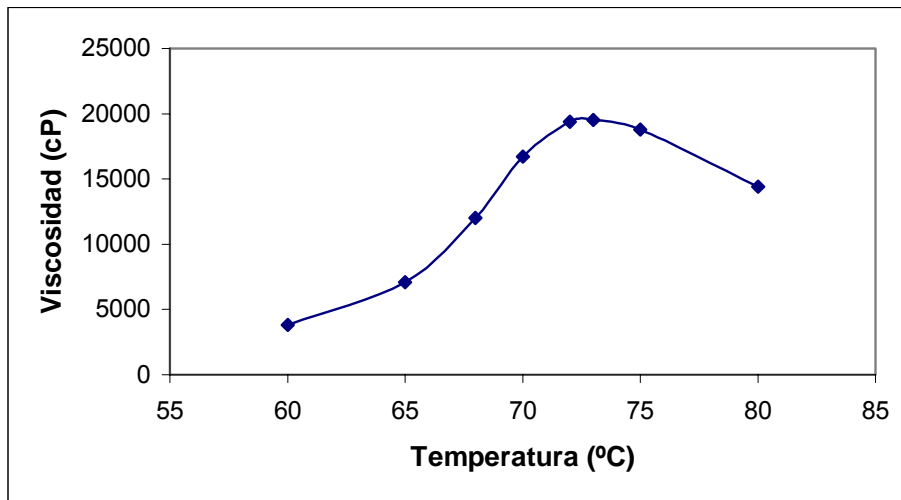
**Figura 9** Curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración de maltosa (g/L)



### 3.2 RANGO DE TEMPERATURA DE GELATINIZACIÓN

En la Figura 10 se observa que la viscosidad de la solución de almidón al 6% P/V alcanza su valor máximo de 20000 cp entre 70 y 75°C, este rango de temperatura coincide con el reportado en un trabajo previo<sup>10</sup>, y garantiza la disrupción del ordenamiento de las moléculas en los gránulos que permite que la enzima licuante hidrolice satisfactoriamente las cadenas de almidón.

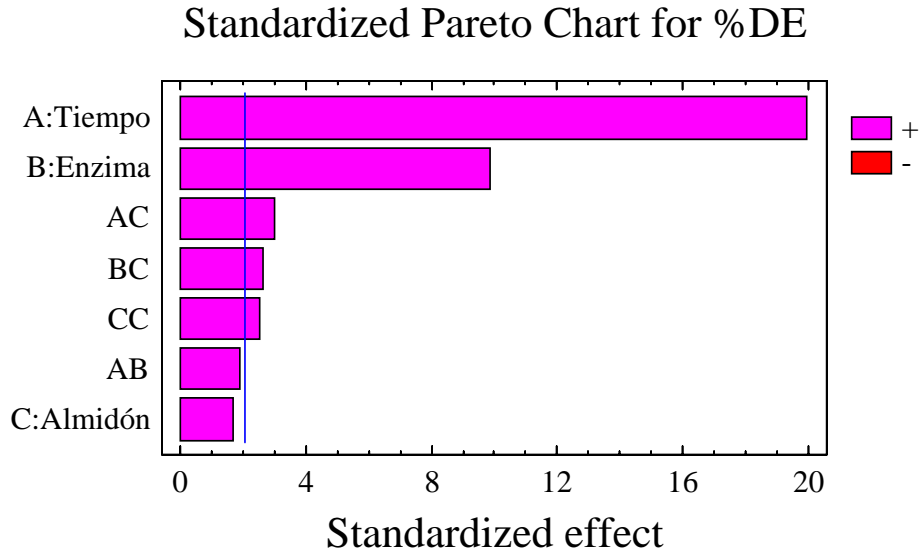
**Figura 10** Curva de cambio de Viscosidad Vs Temperatura para una solución de almidón 6%



### 3.3 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO ([S]), RELACIÓN G DE ENZIMA/G DE SUSTRATO SECO Y TIEMPO DE REACCIÓN (T) SOBRE EL EQUIVALENTE DE DEXTROSA EN EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN

En el diagrama de Pareto (Figura 11) se muestra el efecto estimado sobre el equivalente de dextrosa (%DE) de cada uno de los factores y sus interacciones, tiempo de reacción (A), relación g de enzima/g de sustrato seco (B) y concentración de sustrato (C), se puede apreciar tanto el factor C como sus combinaciones (AC), (BC) y (CC) no son muy significativas comparadas con el tiempo de reacción y la relación g enzima/g sustrato. El nivel de confianza para los valores que sobrepasan la línea vertical es de 95%, y corresponde a los efectos más significativos estadísticamente.

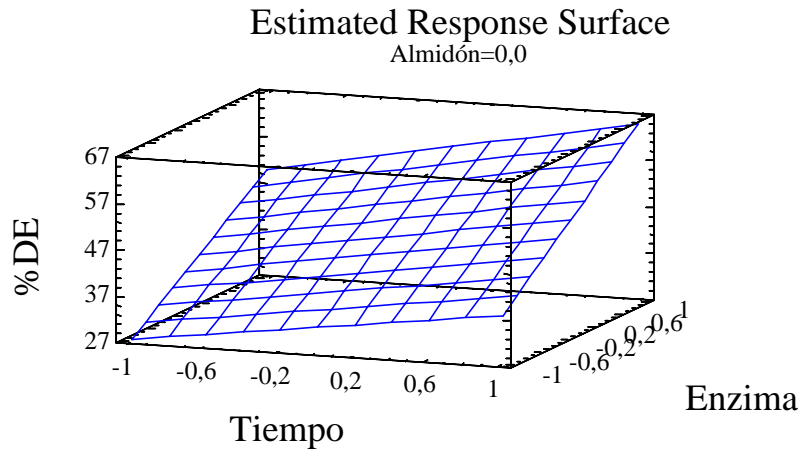
**Figura 11** Diagrama de Pareto de las variables independientes y el % DE



Para obtener un %DE entre 20 y 30 en la etapa de licuefacción el análisis estadístico sugirió que las mejores condiciones son 0,02% g de enzima/g de Almidón y un tiempo de reacción igual a 15 minutos, como se puede apreciar en la superficie de respuesta del diseño experimental (Figura 12), estos valores fueron después corroborados con el modelo cinético empírico desarrollado para esta fase del proceso.

El análisis del diseño de experimentos del numeral 3.3 se reporta en el anexo G.

**Figura 12** Superficie estimada de respuesta



### 3.4 PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL MODELO EMPÍRICO DEL PROCESO DE LICUEFACCIÓN

Los datos experimentales del seguimiento de la hidrólisis del almidón en la etapa de licuefacción fueron ajustados a la Ecuación 1-7, para esto fue necesario determinar los parámetros  $a$  y  $b$  para cada una de las concentraciones de almidón y enzima; el valor de  $a$  fue la concentración máxima de maltosa alcanzada y  $b$  el tiempo requerido para alcanzar la mitad de la concentración de  $a$ .

En la Tabla 2 se muestran los parámetros  $a$  y  $b$  a diferentes concentraciones de sustrato para una concentración de enzima de 0.02% g de enzima/ g de sustrato, observándose que el valor del parámetro  $b$  permanece relativamente constante, lo cual lo hace independiente de la concentración de sustrato inicial.

La acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa sobre el almidón previamente gelatinizado produce una concentración de maltosa similar a la de un jarabe de “alta” maltosa ( 65 – 70%).

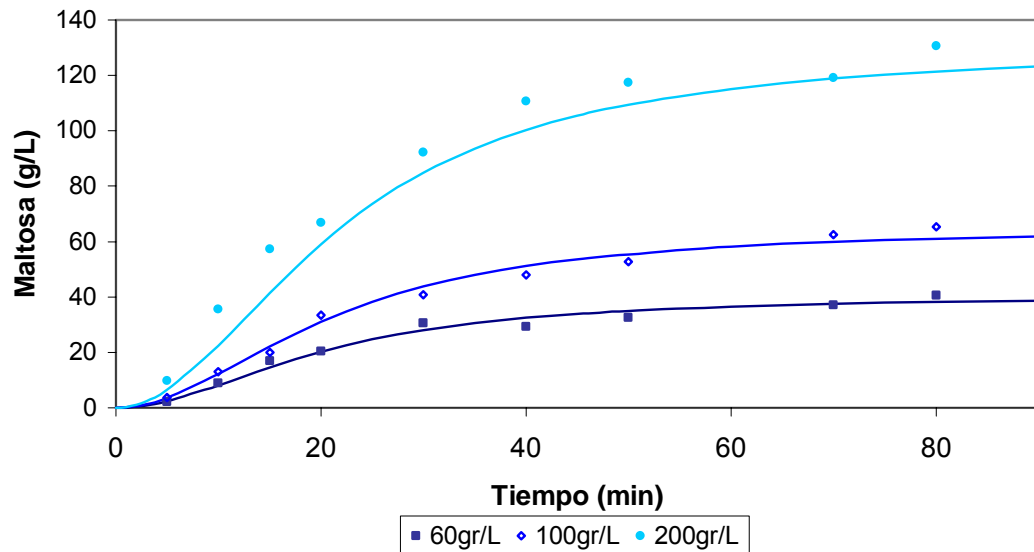
Comparando la información de la Tabla 2 con la del anexo G en donde se toma una concentración de enzima mayor, se obtiene una concentración de maltosa de una calidad comparable con la de un jarabe de “muy alta” maltosa ( 70 – 80%); el parámetro  $b$  es menor ya que el sistema se estabiliza a la mitad del tiempo empleado por la menor cantidad de enzima.

**Tabla 2** Constantes  $a$  y  $b$  para las diferentes concentraciones de almidón a 0,02% gE/gS

Concentración de Almidón g/L	60	100	200
$a$ (g/L)	40,568	65,231	130,589
$b$ (min)	20	21	22

Para los datos experimentales y las curvas ajustadas que describen el progreso de la hidrólisis, presentados en la Figura 13, se encontró un error relativo promedio de 7,47%, 6,07% 15.78% para 60, 100 y 200 g/L de sustrato, respectivamente.

**Figura 13** Modelo cinético empírico para la producción de maltosa en el proceso de licuefacción a diferentes concentraciones de almidón y 0,02% g de Enzima/g de Almidón



Una predicción del %DE para un tiempo de 15 minutos con el modelo empírico muestra que los valores de tiempo y cantidad de enzima de 0,02% gE/gS obtenidos en el diseño experimental garantizaron la hidrólisis requerida para la siguiente etapa del proceso.

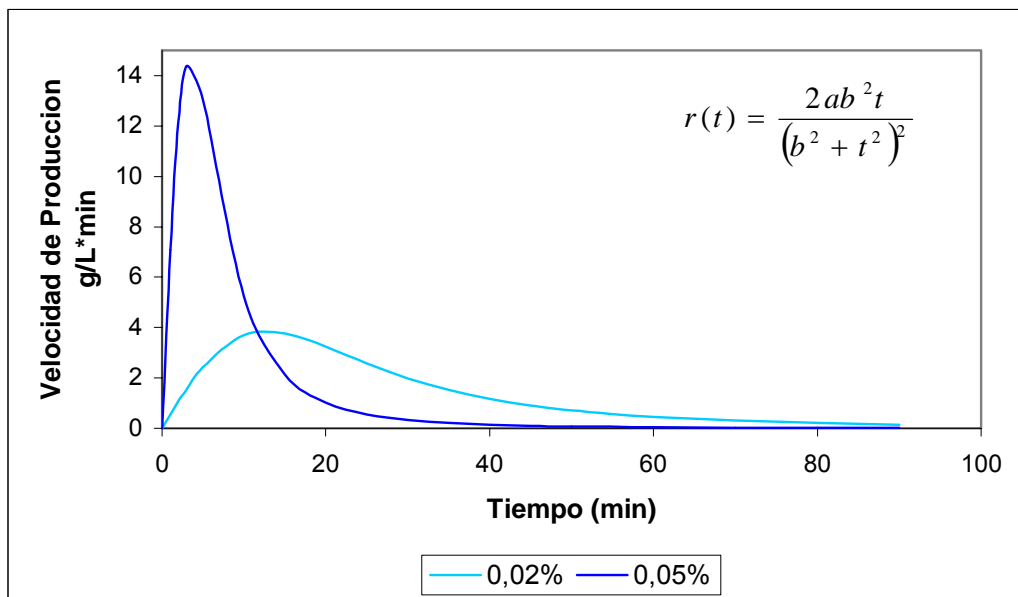
**Tabla 3** %DE predicho por el modelo para diferentes concentraciones de almidón y enzima con un tiempo de reacción de 15 minutos

Concentración de Almidón g/L	60	100	200
%DE Modelo Empírico 0,02% gE/gS	24,035	23,703	20,5
%DE Modelo Empírico 0,05% gE/gS	51,88	61,01	56,39

La tabla de valores para  $a$  y  $b$  y la gráfica del modelo cinético para 0,05% gE/gS se adjunta en el anexo G.

Para la producción de oligosacáridos teniendo como sustrato el almidón gelatinizado (sin previa hidrólisis), la cantidad de maltosa inicial es 0 y la velocidad de formación de producto presenta curvas descritas por la Ecuación 1-8 como las que se muestran en la Figura 14, donde el aumento en la velocidad de producción en los primeros minutos de reacción se debe a que los productos iniciales de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5 a 7 unidades de D-glucosa, los cuales utilizará después como sustrato para la producción de maltosa, glucosa y maltotriosa. El descenso en la curva de velocidad de producción indica una reducción del sustrato en el medio. A medida que aumenta la concentración de enzima la velocidad de formación de maltosa es mayor y el tiempo al cual se estabiliza disminuye, comprobando que concentraciones altas de enzima se utilizan cuando en un proceso es necesario disminuir el tiempo de reacción.

**Figura 14** Velocidad de producción de Maltosa calculada con el modelo empírico a diferentes concentraciones de enzima, para una concentración de almidón de 200g/L.



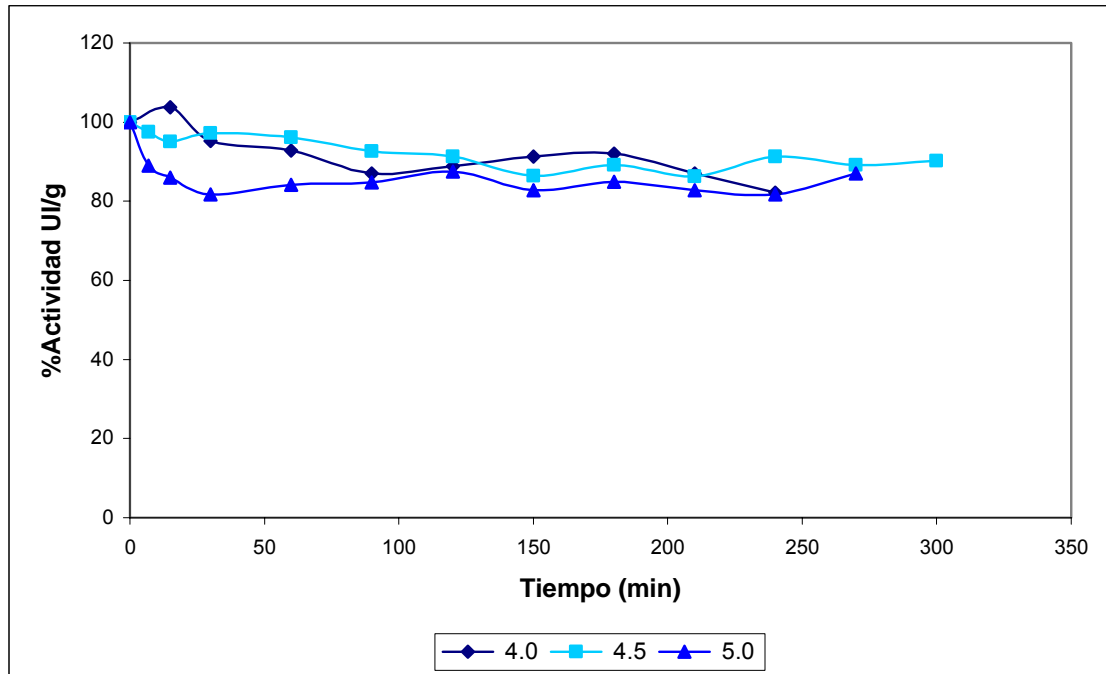
Las velocidades de producción de maltosa para concentraciones de almidón de 60 y 100 g/L se muestran en los anexos H e I, respectivamente.

### **3.5 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA AMG EN UN REACTOR DE MEMBRANA**

Al evaluar el paso de la enzima a través de la membrana de ultrafiltración la glucoamilasa no fue detectada en el permeado (según método descrito en el numeral 2.4.4), esto garantizó que la membrana fue completamente impermeable.

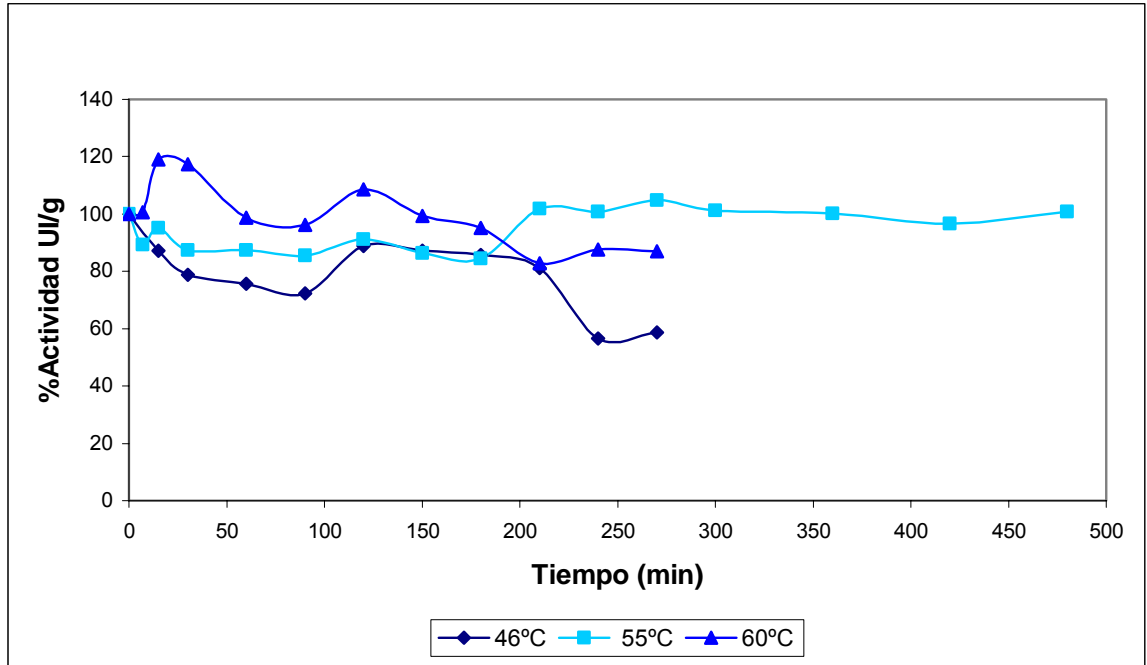
Teniendo en cuenta que para la enzima glucoamilasa el rango de pH en el cual su actividad es estable es de 3,5 – 5, a 55 °C, y que el valor reportado en la literatura es de 4,5, el rango tomado para los experimentos realizados fue entre 4,0 y 5,0 a una presión de 19 Psi. La actividad enzimática no presentó variaciones significativas con respecto al pH, pero se encontró que para un valor de 4,5 su estabilidad fue mayor (Figura 15).

**Figura 15** Efecto del pH sobre la actividad de la enzima AMG a la máxima presión de operación (19 Psi) y temperatura de 55°C



Para la glucoamilasa, según reporte del fabricante<sup>27</sup>, la actividad de la enzima aumenta con la temperatura encontrando su máximo en 75°C, pero su estabilidad disminuye notablemente para este valor; en los experimentos la temperatura fue variada entre 46 y 60 °C y la mayor estabilidad para un periodo de tiempo de 8 horas se encontró a 55°C (Figura 16) La curva a 60°C permite observar el fenómeno descrito anteriormente, un aumento de actividad en los primeros 30 minutos y luego un descenso que llega hasta el 83% del valor inicial después de 6 horas. La curva a 46°C presenta una disminución considerable en su porcentaje de actividad debido a que a bajas temperaturas no se logra superar la desnaturalización térmica y se presentan problemas de altas viscosidades generando una disminución en el flujo de permeado y el confinamiento de una gran cantidad de enzima dentro de la membrana de ultrafiltración.

**Figura 16** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima AMG a la máxima presión de operación (19 Psi) y pH 4,5.

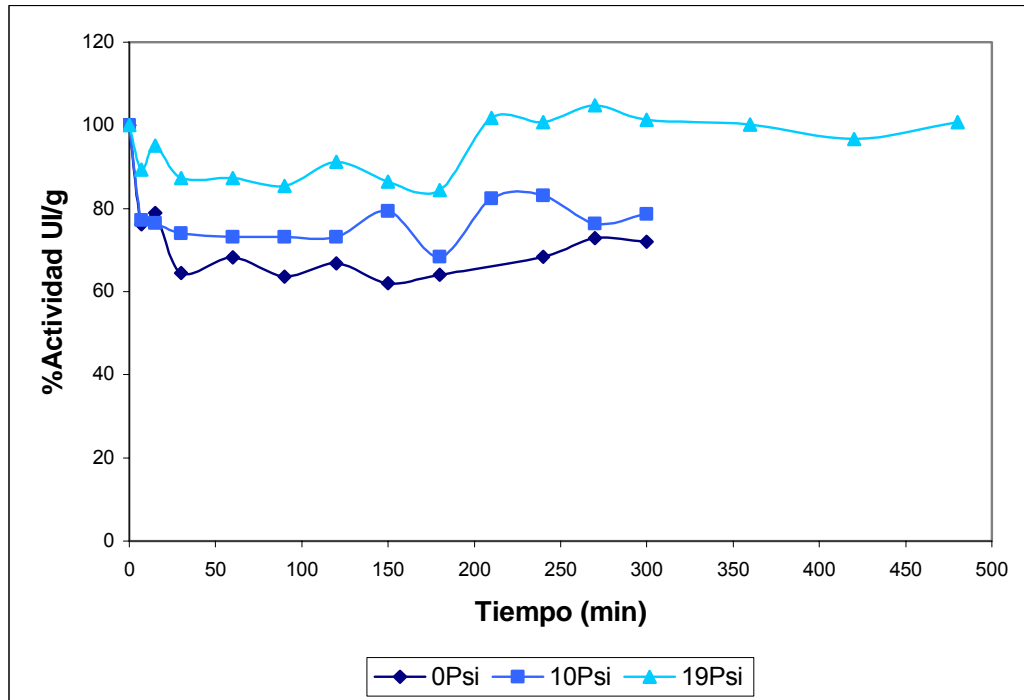


La enzima dentro de un reactor enzimático con membrana está expuesta a esfuerzos de corte que se analizaron para los efectos de desnaturalización.

Los resultados presentados en la Figura 17 muestran que a presiones bajas la actividad enzimática disminuye como consecuencia del confinamiento de la enzima en el ultrafiltro, debido a la baja velocidad tangencial, lo que produce un cambio de concentración en el retenido, por lo que la cantidad de AMG en esta corriente fue menor que la asumida. Este fenómeno se debe evitar en un proceso de hidrólisis ya que una acumulación de sustrato y enzima en el ultrafiltro generan un progresivo ensuciamiento del medio poroso.

La enzima no se desnaturalizó por el esfuerzo mecánico al que se sometió, como se observa en la Figura 17, después de un periodo de estabilización de tres horas la actividad permanece constante, presentando variaciones de  $\pm 4\%$  con respecto a la hallada con la muestra tomada directamente del reactor al inicio del experimento.

**Figura 17** Efecto de la presión sobre la actividad de la enzima AMG a una temperatura de 55°C y pH 4,5 donde presentó la mayor estabilidad.



### 3.6 PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA GLUCOAMILASA COMO ENZIMA SOLUBLE

Los parámetros  $K_m$  y  $V_{máx}$  fueron determinados linealizando las velocidades iniciales de reacción para cada sustrato; el comportamiento cinético en fase homogénea de la enzima glucoamilasa obedece al modelo propuesto por Michaelis-Menten, y los valores numéricos de sus constantes se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4** Parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  para la glucoamilasa como enzima soluble

$K_m$ (g/L)	$V_{max}$ (g glucosa/L* min)
6,55	344,82

El bajo valor de  $K_m$  indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato y el valor de  $V_{max}$  se relaciona con una alta reactividad del complejo enzima-sustrato (ES), es decir que el proceso transcurre a una velocidad lo suficientemente alta en la que la enzima presente se encuentra en la forma del complejo ES (enzima saturada por el sustrato) y por lo tanto la formación del producto alcanzará altas conversiones en un corto periodo de tiempo.

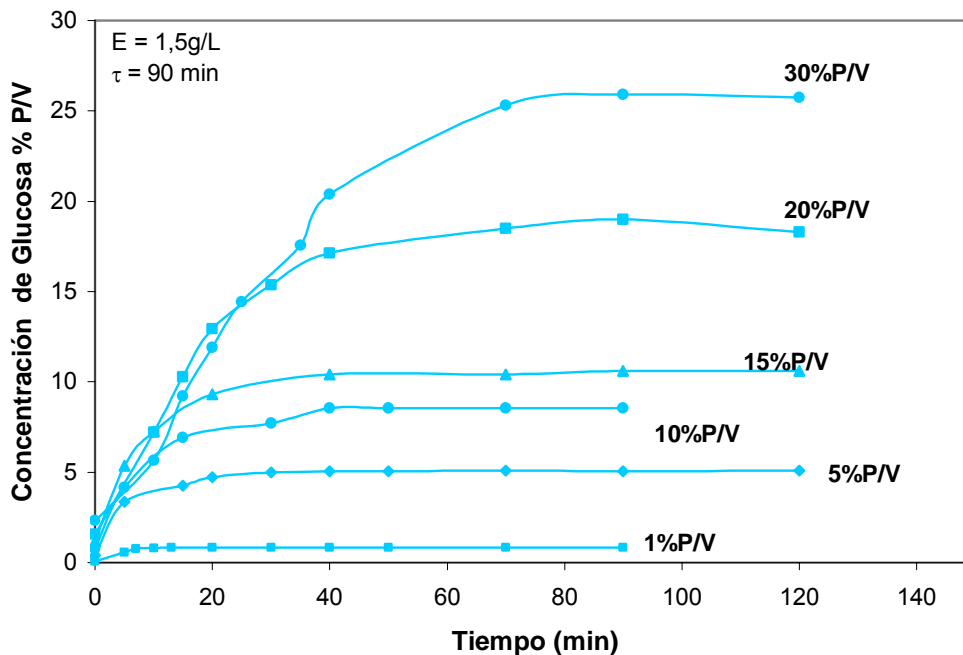
Estos valores representan una cinética intrínseca para enzima soluble en fase homogénea donde las restricciones por fenómenos de transferencia de masa y los fenómenos de partición no se evidencian.

### 3.7 PARÁMETROS CINÉTICOS DEL MODELO DE DESEMPEÑO DEL REACTOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA

El efecto de la concentración de sustrato sobre la concentración de glucosa en un reactor enzimático de membrana se aprecia en la Figura 18, observando un aumento en el tiempo requerido para alcanzar su estado estable a medida que la concentración de sustrato se incrementa.

Las velocidades de reacción  $r_G$  para cada sustrato fueron calculadas a partir de los datos de estado estable mostrados en la Figura 18 utilizando la ecuación 1.9. Para estimar  $K'_m$  y  $V'_{max}$ , las velocidades iniciales de reacción para cada una de las concentraciones de sustrato fueron linealizadas por el método de Lineweaver – Burk.

**Figura 18** Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de glucosa en un reactor enzimático con membrana.



En la Tabla 5 se mencionan los parámetros cinéticos aparentes obtenidos a diferentes concentraciones de enzima.

**Tabla 5** Parámetros cinéticos para el reactor EMR

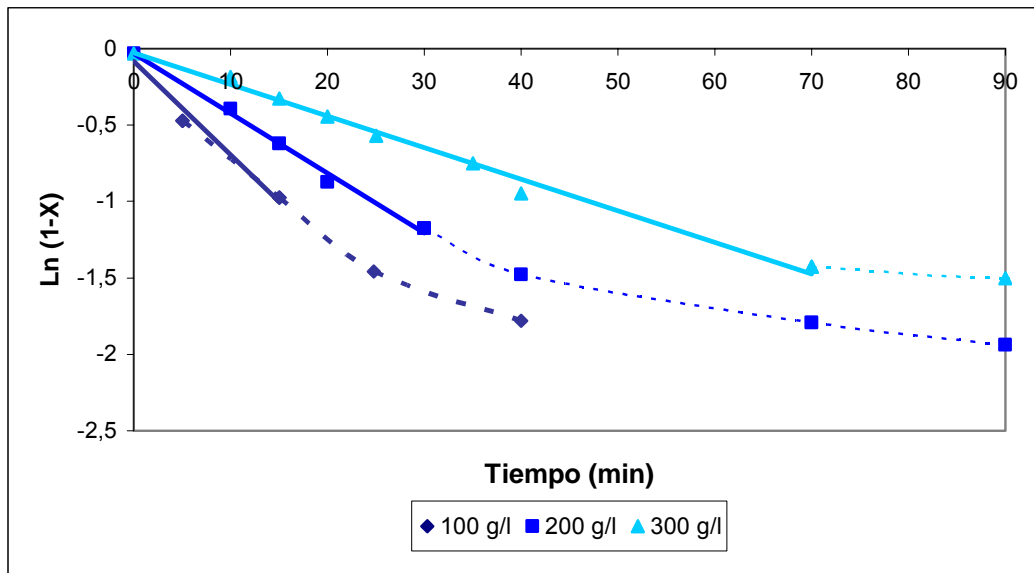
Parámetros cinéticos aparentes	Enzima (g/L)		
	1	1,5	2
V'm (g/L min)	8,70	4,29	5,878
K'm (g/L)	996,08	382,93	634,332
k2 (min <sup>-1</sup> )	8,70	2,86	2,939

Observando los valores de  $K'm$  (aparente) para la etapa de sacarificación en continuo, el cual determina la afinidad de la enzima por el sustrato de modo inverso; encontramos una gran diferencia comparada con la constante  $K_m$  (intrínseca) hallada para enzima soluble, este incremento refleja las restricciones difusionales externas e internas que se presentan en un reactor con membrana.

La constante  $K'm$  para la concentración de enzima de 1,5 g/L fue la que presentó el menor valor, por lo tanto este fue escogido para la producción de jarabes de glucosa en el reactor enzimático con membrana.

Al graficar  $\ln(1-X)$  vs. Tiempo(t) se obtuvo una relación lineal que indica que el reactor se encuentra operando bajo una cinética de primer orden pero sólo es aplicable durante el estado transitorio al inicio de la hidrólisis. Las curvas de la Figura 19 se realizaron con una concentración de enzima de 1,5 g/L y un tiempo de residencia de 1,5 horas; un aumento en la concentración de almidón genera una desviación de la cinética de primer orden en un tiempo mayor.

**Figura 19** Determinación del orden de reacción para un reactor de membrana

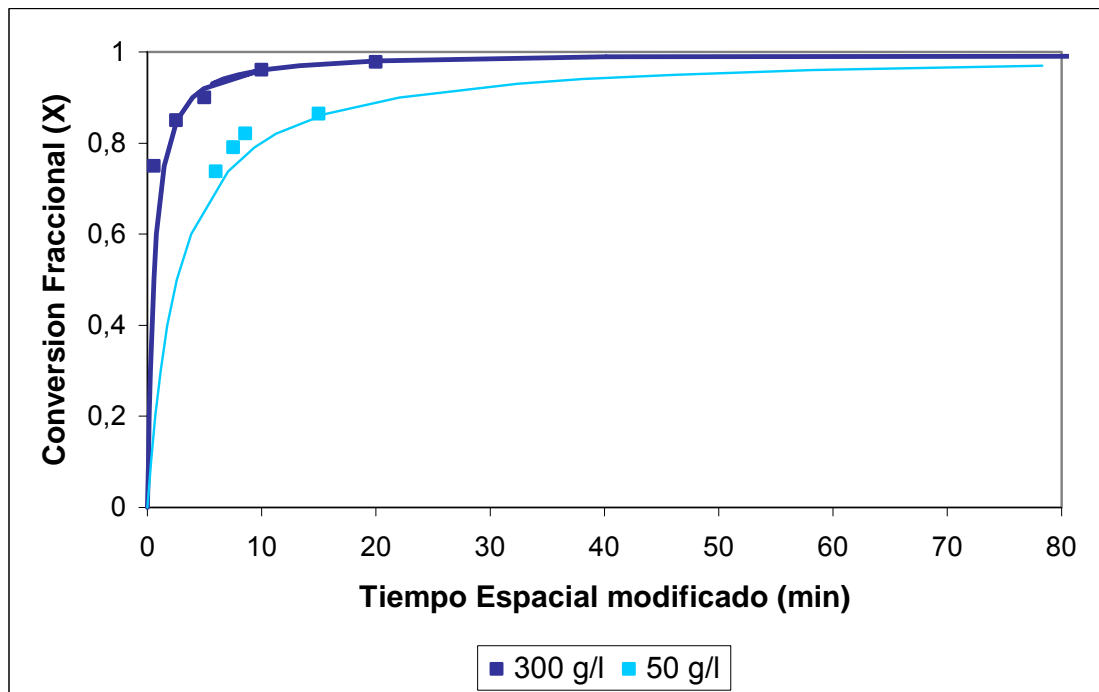


### 3.8 EVALUACIÓN DEL MODELO CINÉTICO

Los parámetros cinéticos determinados experimentalmente (Tabla 5) para una concentración de enzima de 1,5 g/L se reemplazaron en la Ecuación 1-11 para predecir el desempeño del reactor de sacarificación; las líneas de la Figura 20 representan la predicción del modelo para concentraciones de almidón de 50 y 300g/L, y los puntos los datos experimentales obtenidos después de alcanzar el estado estable en el reactor. El factor de correlación  $R^2$  para las diferentes concentraciones de almidón se presentan en la

Tabla 6, el cual logró mantenerse por encima de 0,85, dando un alto grado de confiabilidad y aceptación a las predicciones del modelo. Las gráficas del modelo para las concentraciones de almidón de 10, 100, 150 y 200 g/L con sus respectivos datos experimentales se reportan en el anexo J.

**Figura 20** Resultados experimentales y teóricos de desempeño para el reactor enzimático con membrana utilizado en la etapa de sacarificación



**Tabla 6** Factor de correlación para evaluar el modelo cinético del reactor de membrana a diferentes concentraciones de almidón

Concentración Almidón g/L	R <sup>2</sup>
10	0,982
50	0,8591
100	0,9739
150	0,9946
200	0,9828
300	0,9817

### 3.9 PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL MODELO EMPÍRICO DEL PROCESO DE SACARIFICACIÓN

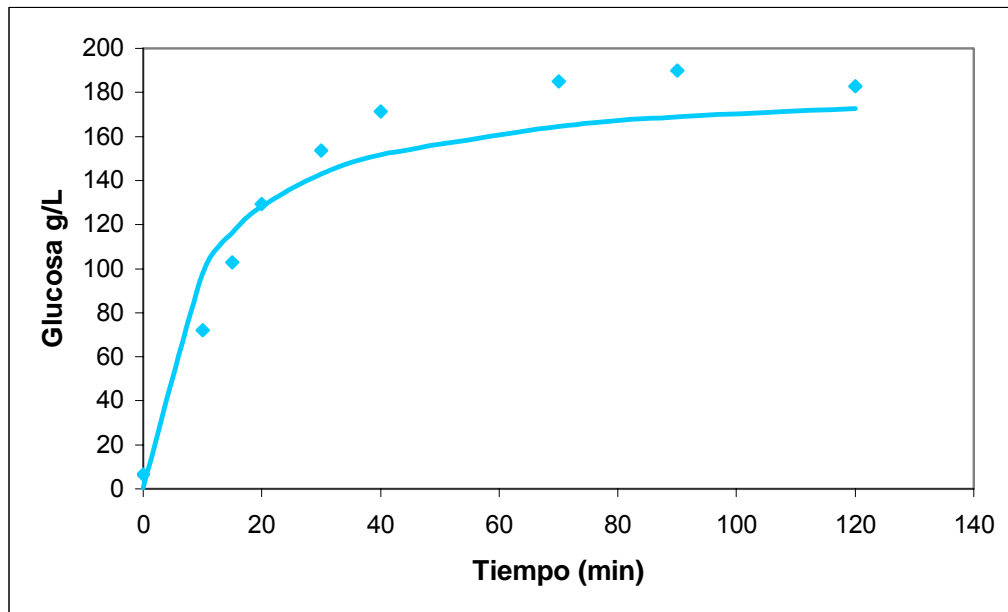
De la misma forma que para la etapa de licuefacción, los datos experimentales del seguimiento de la hidrólisis, tomando como referencia la glucosa, fueron ajustados a la ecuación que describe el progreso de la reacción (Ecuación 1-13); los parámetros  $a'$  y  $b'$  se determinaron para dos concentraciones de almidón 200 y 300g/L; el valor de  $a'$  fue la concentración máxima de glucosa alcanzada y  $b'$  el tiempo requerido para alcanzar la mitad de la concentración de  $a'$ .

**Tabla 7** Constantes  $a'$  y  $b'$  para concentraciones de almidón de 200 y 300g/L

Concentración de Almidón g/L	200	300
$a'$ (g/L)	185	255
$b'$ (min)	9	22

La Figura 21 muestra una curva para la formación de glucosa como una función del tiempo, los datos experimentales ( $\diamond$ ) y la curva ajustada (—) describen el progreso de la sacarificación para 200 g/L de sustrato (para 300g/L ver figura del anexo K).

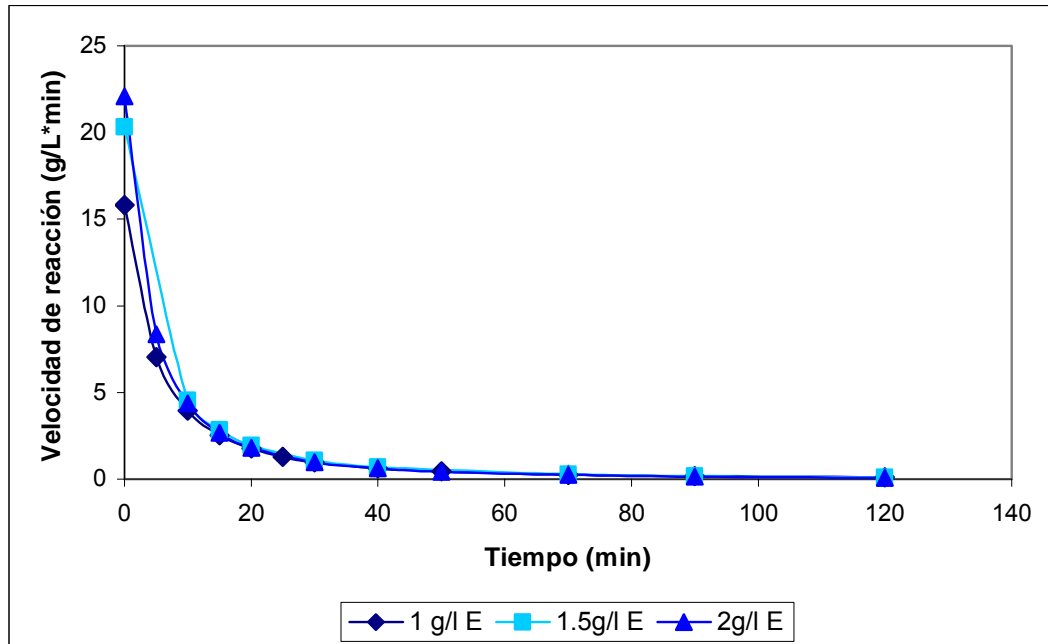
**Figura 21** Curva que describe la formación de glucosa como una función del tiempo (Concentración de sustrato 200 g/L; Concentración de AMG 1,5 g/L)



Respecto a la velocidad de formación del producto que se observa claramente en la Figura 22 es mayor al inicio de la reacción y este valor disminuye con el transcurrir del tiempo, comportamiento que es evidente debido a la disminución del sustrato en el sistema de reacción.

La disminución de sustrato en el medio ocasiona una reducción en la velocidad de producción de glucosa y el tiempo de estabilización para cada concentración de enzima fue casi el mismo, como se observa en la Figura 22, pero la mayor conversión se obtuvo con 1,5 g/L; las condiciones de trabajo para obtener las curvas de velocidad fueron 200 g/L de concentración de almidón, pH de 4,5 en el reactor de membrana.

**Figura 22** Velocidad de producción de glucosa calculada con el modelo empírico a diferentes concentraciones de glucoamilasa



### 3.10 PRODUCCIÓN EN CONTINUO DE JARABES DE GLUCOSA

Una vez realizada la parte experimental que aportó toda la información requerida para la escogencia de las variables más significativas, la cual se corroboró con los datos de la literatura para las mejores condiciones de operación, se propuso llevar el proceso a una producción de 8 litros por día y así producir Jarabes de Glucosa a la mayor productividad posible.

#### 3.10.1 Gelatinización del almidón

La suspensión de almidón al 20% P/V y pH de 4,7 bajo la acción del calor suministrado, inició una serie de cambios estructurales que sólo fueron aparentes hasta que se alcanzó la temperatura de gelatinización de 72°C, ésta

permitió apreciar el aumento de la solubilidad del almidón y la transparencia de la pasta transformando la solución inicial en un engrudo con una viscosidad de 70000 cp, un valor muy alto que presenta problemas para la transferencia de calor por la dificultad que existe para homogenizar la solución ya que la potencia requerida para agitar el engrudo aumenta. La transición del almidón durante el tiempo de reacción (30 min) ocurrió por la pérdida de la estructura organizada del gránulo a las condiciones de calor y humedad mencionadas anteriormente.

### **3.10.2 Licuefacción con $\alpha$ -amilasa**

Al agregar la enzima  $\alpha$ -amilasa al almidón gelatinizado y a las condiciones de licuefacción (T:55°C y pH:4,7) el efecto inmediato fue la disminución de la viscosidad hasta 35 cp como resultado de la acción aleatoria por parte de la enzima sobre los enlaces  $\alpha$ -(1→4) glucosídicos de la amilosa y de la amilopectina. Se realizó un seguimiento de la producción de azúcares reductores por el método de DNS durante el tiempo de la reacción (15 min) y se corroboran con los resultados obtenidos del diseño experimental y del modelo empírico, garantizando un %DE entre 20 y 30 al finalizar la etapa de licuefacción.

Al disminuir la temperatura del gelatinizado para acondicionarlo y poder adicionar la enzima  $\alpha$ -amilasa se observó que el almidón sufrió una leve retrogradación, fenómeno que se evidenciaba por la aparición de trozos de gel en la solución después de la etapa de licuefacción, esto indica que no todo el almidón fue hidrolizado.

La Tabla 8 muestra la validación de los resultados obtenidos en esta parte del proceso.

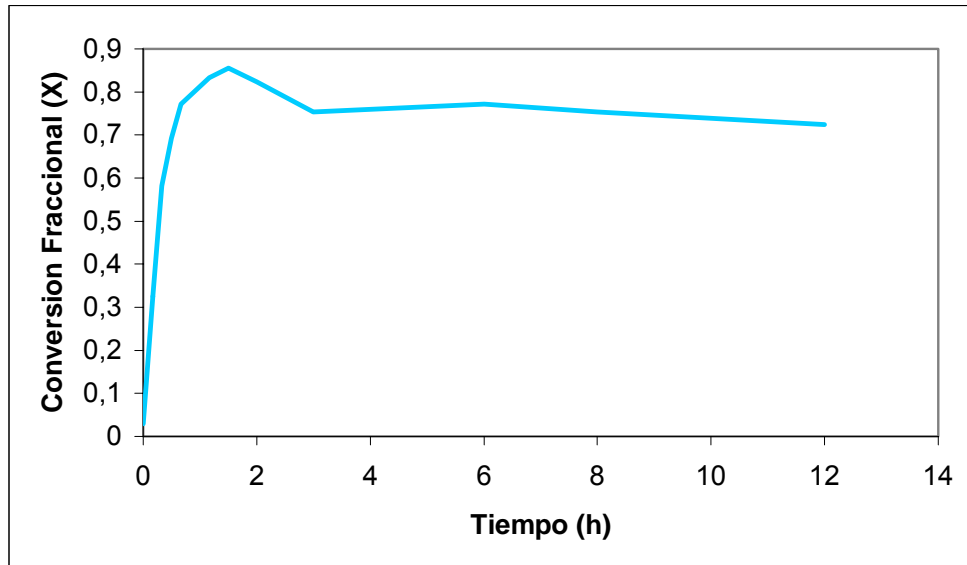
**Tabla 8** Porcentaje de Equivalente de Dextrosa experimental y predicho a partir de la ecuación 1-7 ( $a = 130,589 \text{ g/Ly } b = 22 \text{ min}$ ) para una concentración de almidón del 20%P/V y concentración de enzima 0,02% g E/g S

Tiempo (min)	%DE <sub>EXP</sub>	%DE <sub>PRE</sub>	%Error
2	-	0,535	-
5	2,851	3,201	12,28
7	7,265	5,983	17,65
10	13,748	11,115	19,15
13	15,326	16,751	9,30
15	22,874	20,499	10,38

### 3.10.3 Sacarificación con glucoamilasa utilizando un reactor con membrana de ultrafiltración

Para un tiempo de reacción de 90 min, una concentración de 200 g/L y una concentración de enzima igual a 1,5 g/l se realizó un seguimiento a la producción de jarabes durante 12 horas determinando la glucosa presente a la salida del reactor por el método de glucosa oxidasa. La conversión durante este periodo de tiempo presentó cambios, en las primeras dos horas de reacción alcanzó su mayor conversión de 82% con una productividad de 121,36 (g de glucosa/L\*h) y en su estabilización, alcanzada después de tres horas la conversión permaneció constante en 75% con una productividad de 106,56 (g de glucosa/L\*h) y un %ED de 77.17 hasta las doce horas totales de reacción (Figura 23). El flujo de permeado disminuyó y fue necesario aumentar la presión hasta el máximo valor reportado por el fabricante (19 Psi) para mantener el tiempo de residencia, esta disminución fue ocasionada por la formación de una capa de polarización por concentración en la superficie de la membrana y por el progresivo ensuciamiento del medio poroso lo que limita el desempeño del reactor.

**Figura 23** Conversión durante la hidrólisis continua del almidón (200 g/L almidón; 1,5 g/L AMG)



### 3.11 COSTOS DE OPERACIÓN

Los costos de operación para el proceso se muestran en detalle en la Tabla 9; se encuentran divididos en materia prima, insumos y servicios consumidos por kilogramo de jarabe producido.

El costo total de operación para un kilogramo de jarabe de glucosa es de \$2820,22, nada competitivo con un precio que oscila entre los \$1500 y \$ 1800 en el mercado nacional; un análisis de cada una de las variables que aumentan el valor del producto se expone a continuación.

En este proceso el 80% del costo total de operación se destina a servicios industriales, y de este un 93% se debe a la energía eléctrica, ésta es una de las desventajas de utilizar un sistema de calentamiento equipado con resistencias que requieren un alto consumo energético; para evitar este incremento desmesurado se recurre al vapor para el suministro de energía.

**Tabla 9** Consumo de materia prima, insumos y servicios por kilogramo de jarabe de glucosa producido

<b>Material</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad x Kg</b>	<b>Costo x Kg (\$)</b>
<b>Materia prima</b>			
Almidón de Yuca	<b>Kg</b>	0,188	433,962
<b>Insumos</b>			
Acetato de Sodio (CH <sub>3</sub> COONa)	<b>g</b>	0,928	9,747
Acido Acetico (CH <sub>3</sub> COOH)	<b>mL</b>	0,440	21,333
Acido Clorhidrico (HCl)	<b>mL</b>	1,085	41,226
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> )	<b>g</b>	0,024	0,142
Hidroxido de Sodio (NaOH)	<b>g</b>	0,534	1,848
Enzima $\alpha$ -amilasa	<b>g</b>	0,038	7,585
Enzima AMG	<b>g</b>	0,177	53,597
<b>Total Insumos</b>			135,478
<b>Servicios</b>			
Agua Enfriamiento	<b>L</b>	5	76,72
Agua de proceso	<b>L</b>	0,943	86,603
Potencia Total	<b>Kwh</b>	0,48	2087,45
<b>Total servicios</b>			2250,78

El porcentaje de equivalente de dextrosa (%DE) de los jarabes obtenidos es de 77.17% y la concentración de glucosa no supera los 175 g/L, estos jarabes tienen diferentes aplicaciones entre la que se destaca la de ser utilizado como materia prima para la producción de jarabes de fructosa, ya que este proyecto hace parte de un estudio para la producción de jarabes de alta fructosa a partir

del almidón de yuca; este proceso utiliza jarabes de glucosa con concentraciones mayores al 40% P/V; este requerimiento exige la evaporación del jarabe producido, por ser esta una de las operaciones más costosa en la industria es conveniente aumentar la concentración inicial de almidón.

## 4 CONCLUSIONES

El estudio de la cinética de licuefacción a partir de un modelo empírico en el que se representa el progreso de la concentración de maltosa y la velocidad de formación de ésta respecto al tiempo arroja un ajuste significativo con los datos experimentales obtenidos en la hidrólisis enzimática del almidón de yuca con la enzima  $\alpha$ -amilasa a una concentración de 0,02%gE/gS y tiempo de reacción de 15 min, prediciendo un %DE apropiado al final de esta etapa y corroborado con el diseño experimental.

Este modelo constituye un buen punto de partida para aquellos estudios cinéticos que involucran la despolimerización del almidón nativo, ya que estos sistemas tienen mecanismos de reacción difíciles de modelar.

La glucoamilasa es estable por 8 horas a 55°C en ausencia de sustratos o productos de hidrólisis. La pérdida de la actividad se redujo ya que este valor de temperatura ocasiona una baja desactivación térmica. Reducir esta temperatura no garantiza superar la desnaturalización ya que se incrementa la viscosidad y por lo tanto disminuye el flujo de permeado e impide el adecuado funcionamiento del reactor.

La evaluación del modelo cinético que rige el desempeño del reactor enzimático de membrana en la etapa de sacarificación predice satisfactoriamente para tiempos espaciales modificados de 8 minutos o menos. Por razones de economía del proceso el reactor debe ser operado a la mayor concentración posible de sustrato, la concentración más baja de enzima y el menor tiempo de residencia. Estos factores contribuyen a alcanzar tiempos espaciales relativamente bajos y así poder predecir el comportamiento del reactor enzimático con la mayor confiabilidad.

Las variables que más afectan la economía del proceso de producción en continuo de jarabes de glucosa son los altos requerimientos energéticos exigidos por el sistema de calentamiento empleado, la baja concentración de sustrato que involucra una operación de evaporación para la comercialización del jarabe y el bajo flujo de permeado en el reactor enzimático de membrana que disminuye el volumen de producción por minuto.

## 5 RECOMENDACIONES

El empleo de enzimas termoestables en las etapas de gelatinización y licuefacción con el fin de evitar los problemas ocasionados por altas viscosidades que se presentan a concentraciones mayores del 20% P/V.

El flujo de permeado en la etapa de sacarificación es otra variable que puede ser modificada con el fin de aumentar el volumen de producción por unidad de tiempo; este objetivo puede cumplirse si se retiran los sólidos que obstruyen la membrana de ultrafiltración, utilizando prefiltros de un tamaño de poro mayor capaces de retener el almidón no hidrolizado.

Para un posterior escalamiento a nivel industrial la disminución de los costos de operación es factible utilizando vapor para el suministro de energía y determinando la vida útil de la enzima AMG con fines de reutilización del catalizador.

Por ser la evaporación una operación costosa, es conveniente aumentar la concentración inicial de almidón a un 40% P/V.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1992. v.1, p 119 – 124.
2. LINDEN, G., Lorient D. Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Acribia. Zaragoza, España 1996. p. 297 – 298.
3. BRUCHMANN, Ernest. Bioquímica técnica. Química alimentaria de las fermentaciones y agrícola. Acribia. Zaragoza. 1980. p. 85 – 96
4. PRIMO, Eduardo. Química de los alimentos. Síntesis. Madrid. 1998. p. 112 – 124.
5. FERREMA, O., Química de los Alimentos. 2 ed. Acribia. Zaragoza. 2000. p. 228 – 240
6. WHISTLER, Roy. Et al. Starch: Chemistry and Technology. 2 ed. Academic press. USA. 1984. p 285 – 291.
7. SCRAGG, Alan. Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa. México. 2002. p. 101-123
8. WISEMAN, Alan. Handbook of enzyme biotechnology. 2 ed. Ellis Horwood Limited. England. 1985. p. 57-70

9. LOPEZ-MUNGÍA C., Agustín. Cinética enzimática básica. Departamento de alimentos. División de estudios de postgrado. Facultad de Química, UNAM. s.f. p. 31 – 35.
10. SÁNCHEZ, Alberto. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga , Armenia, Chile), cultivadas en la provincia Guanentá (Santander). Bucaramanga, 2002, 76p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
11. AGUDELO, Betty Janeth. Producción de jarabes glucosados mediante sacarificación enzimática utilizando un reactor con membranas. Medellín, 2002, 108p. Trabajo de grado (Ingeniera Química). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.
12. BOYER, D., LARDY, H., MYRBACK, K. The enzymes. 2 ed. Academic Press. London. 1960. v.4, p. 313 – 343.
13. SIMS, Kevin A. and CHERYAN, Munir. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. En: Biotechnology and Bioengineer. Vol. 39 (1992); p. 960 – 967.
14. BRIMACOMBE, J. S. Carbohydrate chemistry. John Wright and sons Ltd. Great Britain. 1975. v.7, p. 432 – 433
15. STRYER, Lubert. Bioquímica. 3 ed. Reventé. España.1998. v.1, p. 191-193.
16. MIRON, Bender. Catálisis and enzyme action. McGraw–Hill. New York. 1973. p. 2 – 35.

17. CHAPLIN, Martin and BUCKE, Christopher. Enzyme technology. Cambridge University Press. 1990. p. 34 – 35
18. ILLANES; Andrés. Biotecnología de Enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 1994. p. 103 – 193.
19. PAOLUCCI-JEANJEAN, D., BELLEVILLE, M. P., RIOS, G. M., and ZAKHIA, N. Kinetics of cassava starch hydrolysis with termamyl® enzyme. En: Biotechnology and Bioengineer. Vol. 68, N°1 (2000); p. 71 – 77.
20. GAOUAR, O., AYMARD, C., RIOS, G. M., and ZAKHIA, N. Enzymatic hydrolysis of cassava starch into maltose syrup in a continuous membrane reactor. En: J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 69 (1997); p. 367 – 375.
21. RAUSCH, Kent. Front end to backpipe: membrane technology in the starch processing industry. En: Starch. Vol 54 (2002); p. 273 – 284.
22. LOPEZ-ULBARRI, R. and HALL, G. M. Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. En: Enzyme Microbial Technology. Vol. 21 (1997); p. 398 – 404.
23. HOWELL, J. A., SANCHEZ, V. and R.W FIELD. Membranes in bioprocessing theory and applications. 1 ed. Blackie Academic and Professional. Great Britain. 1993. p .5 – 19
24. WISEMAN, Alan. Principios de biotecnología. Acribia. Zaragoza. 1986. p.229 – 230

25. RAUTENBACH, R. and ALBRECHT, R. Membrane processes. John Wiley and Sons Ltd. England. 1989. p.131– 155
26. FICHA TÉCNICA, Enzime Business. Fungamyl ® BG. Novo Nordisk. Folleto B. 697e-E. P. 1 – 3
27. FICHA TÉCNICA, Enzime Business. AMG para Panificación. Novo Nordisk. Folleto B 848c-E p. 1-3
28. ROJAS, Diego. et al. Evaluación de la eficiencia de una membrana de ultrafiltración en la producción de jarabe concentrado de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca. En: Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Vol.10 (2003); p.19 – 24.
29. PAOLUCCI-JEANJEAN, D., BELLEVILLE, M. P., and RIOS, G. M., A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor application to starch hydrolysis. En: J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 76 (2001); p. 273 – 278.

## BIBLIOGRAFÍA

AGUDELO, Betty Janeth. Producción de jarabes glucosados mediante sacarificación enzimática utilizando un reactor con membranas. Medellín, 2002, 108p. Trabajo de grado (Ingeniera Química). Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

BOYER, D., LARDY, H., MYRBACK, K. The enzymes. 2 ed. Academic Press. London. 1960. v.4, p. 313 – 343.

BRIMACOMBE, J. S. Carbohydrate chemistry. John Wright and sons Ltd. Great Britain. 1975. v.7, p. 432 – 433

BRUCHMANN, Ernest. Bioquímica técnica. Química alimentaria de las fermentaciones y agrícola. Acribia. Zaragoza. 1980. p. 85 – 96

CHAPLIN, Martin and BUCKE, Christopher. Enzyme technology. Cambridge University Press. 1990. p. 34 – 35

CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1992. v.1, p 119 – 124.

FERMEMA, O., Química de los Alimentos. 2 ed. Acribia. Zaragoza. 2000. p. 228 – 240

FICHA TÉCNICA, Enzime Business. Fungamyl® BG. Novo Nordisk. Folleto B. 697e-E. P. 1 – 3

FICHA TÉCNICA, Enzime Business. AMG para Panificación. Novo Nordisk. Folleto B 848c-E p. 1-3

GAOUAR, O., AYMARD, C., RIOS, G. M., and ZAKHIA, N. Enzymatic hydrolysis of cassava starch into maltose syrup in a continuous membrane reactor. En: J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 69 (1997); p. 367 – 375.

HOWELL, J. A., SANCHEZ, V. and R.W FIELD. Membranes in bioprocessing theory and applications. 1 ed. Blackie Academic and Professional. Great Britain. 1993. p .5 – 19

ILLANES, Andrés. Biotecnología de Enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 1994. p. 103 – 193.

LINDEN, G., Lorient D. Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Acribia. Zaragoza, España 1996. p. 297 – 298.

LOPEZ-MUNGÍA C., Agustín. Cinética enzimática básica. Departamento de alimentos. División de estudios de postgrado. Facultad de Química, UNAM. s.f. p. 31 – 35.

LOPEZ-ULBARRI, R. and HALL, G. M. Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. En: Enzyme Microbial Technology. Vol. 21 (1997); p. 398 – 404.

MIRON, Bender. Catálisis and enzyme action. McGraw–Hill. New York. 1973. p. 2 – 35.

PAOLUCCI-JEANJEAN, D., BELLEVILLE, M. P., and RIOS, G. M.,. A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor application to starch hydrolysis. En: J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 76 (2001); p. 273 – 278.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and ZAKHIA, N. Kinetics of cassava starch hydrolysis with termamyl® enzyme. En: Biotechnology and Bioengineer. Vol. 68, N°1 (2000); p. 71 – 77.

PRIMO, Eduardo. Química de los alimentos. Síntesis. Madrid. 1998. p. 112 – 124.

RAUSCH, Kent. Front end to backpipe: membrane technology in the starch processing industry. En: Starch. Vol 54 (2002); p. 273 – 284.

RAUTENBACH, R. and ALBRECHT, R. Membrane processes. John Wiley and Sons Ltd. England. 1989. p.131– 155

ROJAS, Diego. et al. Evaluación de la eficiencia de una membrana de ultrafiltración en la producción de jarabe concentrado de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca. En: Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Vol.10 (2003); p.19 – 24.

SÁNCHEZ, Alberto. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga , Armenia, Chile), cultivadas en la provincia Guanentá (Santander). Bucaramanga, 2002, 76p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

SCRAGG, Alan. Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa. México. 2002. p. 101-123

SIMS, Kevin A. and CHERYAN, Munir. Hydrolisis of liquefied corn starch in a membrane reactor. En: Biotechnology and Bioengineer. Vol. 39 (1992); p. 960 – 967.

STRYER, Lubert. Bioquímica. 3 ed. Reventé. España.1998. v.1, p. 191-193.

WHISTLER, Roy. Et al. Starch: Chemistry and Technology. 2 ed. Academic press. USA. 1984. p 285 – 291.

WISEMAN, Alan. Handbook of enzyme biotechnology. 2 ed. Ellis Horwood Limited. England. 1985. p. 57-70

WISEMAN, Alan. Principios de biotecnología. Acribia. Zaragoza. 1986. p.229 –  
230

## ANEXOS

### ANEXO A. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR EL MÉTODO DE GLUCOSA OXIDASA

En la determinación de la glucosa se utilizó el kit SERAPACK Plus, que trabaja según el mecanismo descrito en el numeral **2.1.2**. El procedimiento experimental se muestra a continuación:

REACTIVO	BLANCO	MUESTRA	ESTÁNDAR
Kit (mL)	2,0	2,0	2,0
Patrón (mL)	-	-	0,02
Muestra(mL)	-	0,02	-
Agua Desionizada (mL)	0,02	-	-

Se calibra el 0 de absorbancia con el blanco y se mide la absorbancia (500nm) de la muestra y del estándar. La concentración de glucosa (g/ L) se determina por la siguiente ecuación:

$$glucosa(g / L) = \frac{AbsM}{AbsE}$$

Donde:

$AbsM$  = Absorbancia de la muestra.

$AbsE$  = Absorbancia de la solución estándar.

## ANEXO B. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA $\alpha$ -AMILASA

La concentración de maltosa presente en las soluciones se determinó por la curva de calibración

$$Abs = 0,2431 * Maltosa (g/L) - 0,014$$

Para el cálculo de la actividad de la enzima alfa-amilasa se utilizó la siguiente ecuación

$$\text{Actividad de alfa - amilasa (UI/mg)} = \frac{m * V_T * 10^6}{W_E * PM * t}$$

Donde:

$m$	: Concentración de maltosa	$[gL^{-1}]$
$V_T$	: Volumen total de reacción	$[L]$
$W_E$	: Peso de enzima $\alpha$ -amilasa	$[g]$
$PM$	: Peso molecular de maltosa	$[gmol^{-1}]$
$t$	: Tiempo de reacción	$[min]$

Muestra	Maltosa g/L	Actividad UI/g
1	2,67	173723,3
2	2,84	184607,2
3	2,84	184607,2
<b>Promedio</b>	<b>2,78</b>	<b>180979,2</b>

## ANEXO C. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOAMILASA

Ecuación para calcular la actividad enzimática de la glucoamilasa

$$\text{Actividad de glucoamilasa (UI / mg)} = \frac{m * V_T * 10^6}{W_E * PM * t}$$

Donde:

$m$	: Concentración de glucosa	$[gL^{-1}]$
$V_T$	: Volumen total de reacción	$[L]$
$W_E$	: Peso de enzima glucoamilasa	$[g]$
$PM$	: Peso molecular de glucosa	$[gmol^{-1}]$
$t$	: Tiempo de reacción	$[min]$

Muestra	Glucosa g/L	Actividad UI/g
1	3,65	20284,58
2	3,81	21192,85
3	3,70	20587,34
<b>Promedio</b>	<b>3,72</b>	<b>20688,26</b>

**ANEXO D. DISEÑO EXPERIMENTAL MULTINIVEL PARA LA ETAPA DE LICUEFACCIÓN**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Enzima (gE/gA)</b>	<b>Almidón (g/L)</b>	<b>%DE 1</b>	<b>%DE 2</b>	<b>%DE 3</b>
-1	-1	0	25,789	24,769	25,279
-1	1	0	52,708	58,433	56,853
1	-1	0	35,722	37,736	36,125
1	1	0	66,663	59,417	63,04
1	-1	-1	42,266	38,922	40,594
1	1	-1	64,036	62,08	65,992
-1	-1	-1	32,199	37,581	34,89
-1	1	-1	43,933	51,565	52,961
1	-1	1	39,963	44,768	42,365
1	1	1	75,27	74,642	75,898
-1	1	1	58,153	46,963	52,558
-1	-1	1	28,856	28,958	29,059

**ANEXO E. TABLA DE ABSORBANCIA OBTENIDA PARA CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE MALTOSA**

<b><i>Concentración Maltosa (g/L)</i></b>	<b><i>Absorbancia (540 nm)</i></b>
0,1	0,008
0,2	0,038
0,3	0,056
0,5	0,113
0,8	0,178
0,9	0,198
1	0,235

**ANEXO F. ANÁLISIS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS REALIZADO EN EL PROGRAMA ESTADÍSTICO STATGRAPHICS PLUS 5.1**

Multiple Regression Analysis

-----  
 Dependent variable: %DE  
 -----

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	45,2112	1,1432	39,5478	0,0000
Tiempo	6,222	0,660029	9,42686	0,0000
Enzima	12,6479	0,660029	19,1626	0,0000
Almidón*Tiempo	1,98325	0,808367	2,4534	0,0202
Almidón*Enzima	2,30833	0,808367	2,85555	0,0077
Almidón*Almidón	3,3085	1,40013	2,36299	0,0248

-----  
 Analysis of Variance  
 -----

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	7462,42	5	1492,48	95,17	0,0000
Residual	470,489	30	15,683		
Total (Corr.)	7932,9	35			

R-squared = 94,0691 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 93,0807 percent  
 Standard Error of Est. = 3,96017  
 Mean absolute error = 2,896  
 Durbin-Watson statistic = 2,8227 (P=0,0047)  
 Lag 1 residual autocorrelation = -0,412632

The StatAdvisor

-----  
 The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between %DE and 5 independent variables. The equation of the fitted model is

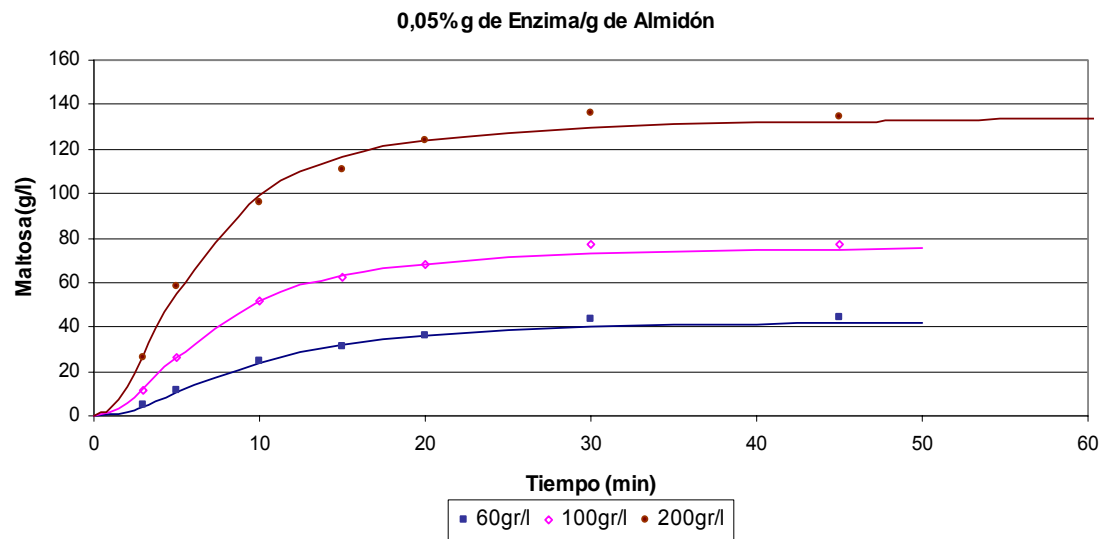
$$\%DE = 45,2112 + 6,222 * \text{Tiempo} + 12,6479 * \text{Enzima} + 1,98325 * \text{Almidón} * \text{Tiempo} + 2,30833 * \text{Almidón} * \text{Enzima} + 3,3085 * \text{Almidón} * \text{Almidón}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between the variables at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 94,0691% of the variability in %DE. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 93,0807%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 3,96017. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 2,896 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is less than 0.05, there is an indication of possible serial correlation. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern which can be seen.

In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0,0248, belonging to Almidón\*Almidón. Since the P-value is less than 0.05, that term is statistically significant at the 95% confidence level. Consequently, you probably don't want to remove any variables from the model.

**ANEXO G. MODELO EMPÍRICO PARA LA PRODUCCIÓN DE MALTOSA EN EL PROCESO DE LICUEFACCIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALMIDÓN**

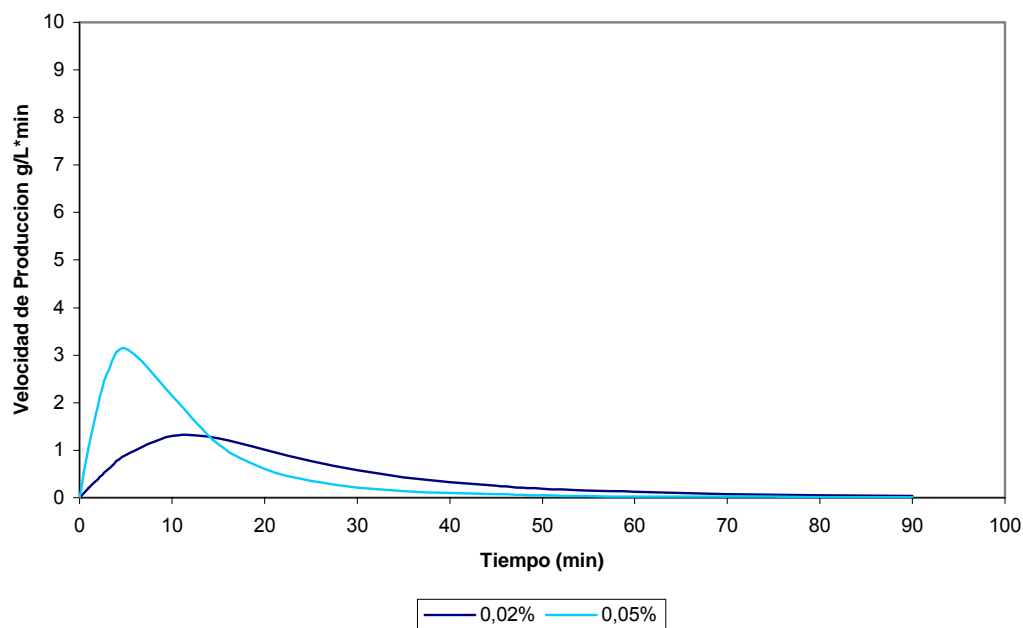


Ecuación utilizada para obtener las curvas del modelo empírico. Los valores de  $a$  y  $b$  se muestran en la tabla.

$$P(t) = \frac{a \cdot t^2}{b^2 + t^2}$$

Concentración de Almidón g/L	60	100	200
$a$ (g/L)	43,518	76,740	134,795
$b$ (min)	9	7	6

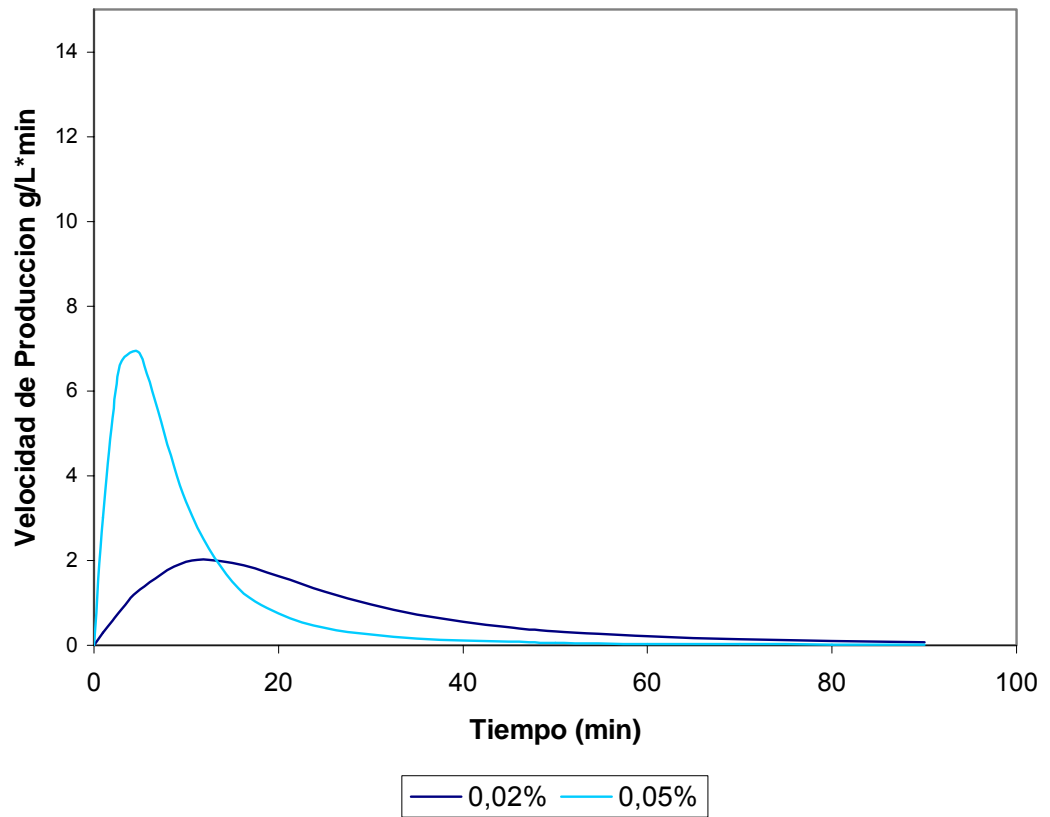
**ANEXO H. VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MALTOSA CALCULADA CON EL MODELO EMPÍRICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA, PARA UNA CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN DE 60 g/L.**



Ecuación utilizada para la curva velocidad de reacción. Los valores de a y b para la concentración de 0.02% g E/g S se reportan en la Tabla 2 y para 0.05% g E/g S en el anexo G.

$$r(t) = \frac{2ab^2t}{(b^2 + t^2)^2}$$

**ANEXO I. VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MALTOSA CALCULADA CON EL MODELO EMPÍRICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA, PARA UNA CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN DE 100 g/L.**

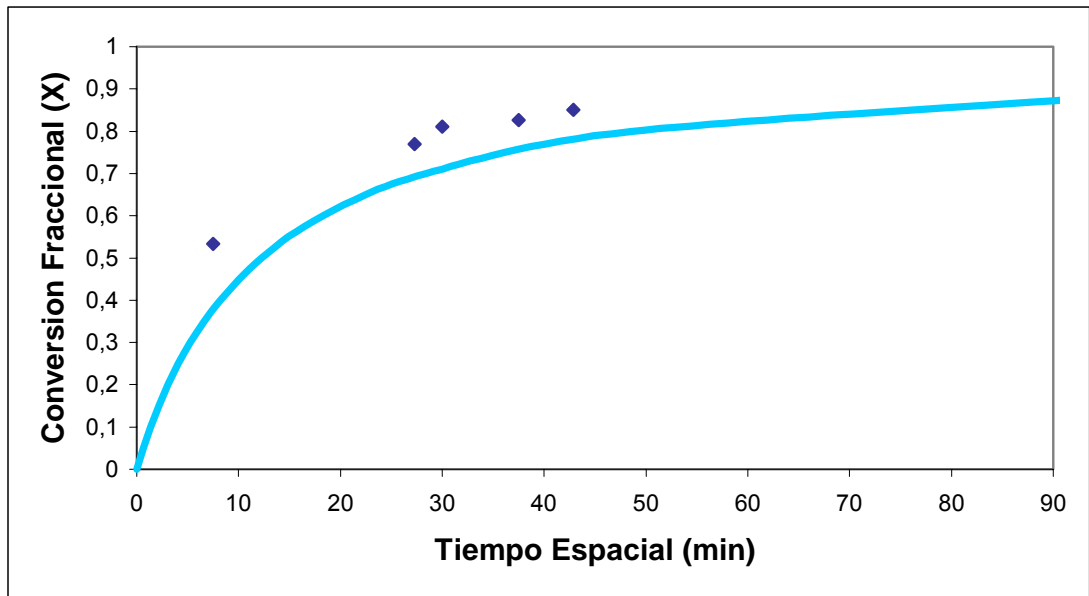


Ecuación utilizada para la curva velocidad de reacción. Los valores de a y b para la concentración de 0.02% g E/g S se reportan en la Tabla 2 y para 0.05% g E/g S en el anexo G.

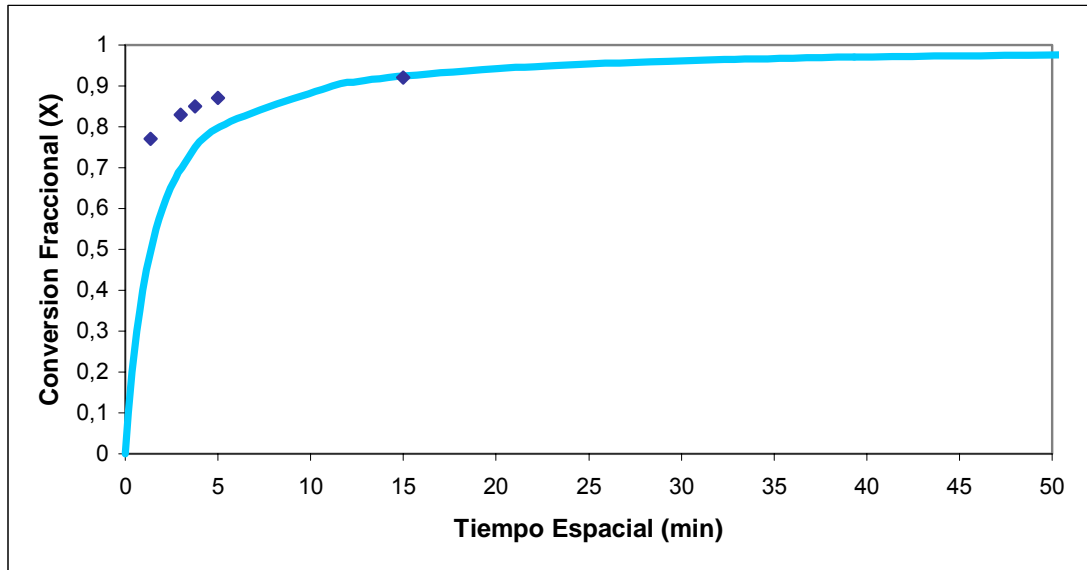
$$r(t) = \frac{2ab^2t}{(b^2 + t^2)^2}$$

**ANEXO J. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS DE DESEMPEÑO PARA EL REACTOR ENZIMÁTICO CON MEMBRANA UTILIZADO EN LA ETAPA DE SACARIFICACIÓN CON UNA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA 1,5 g/L**

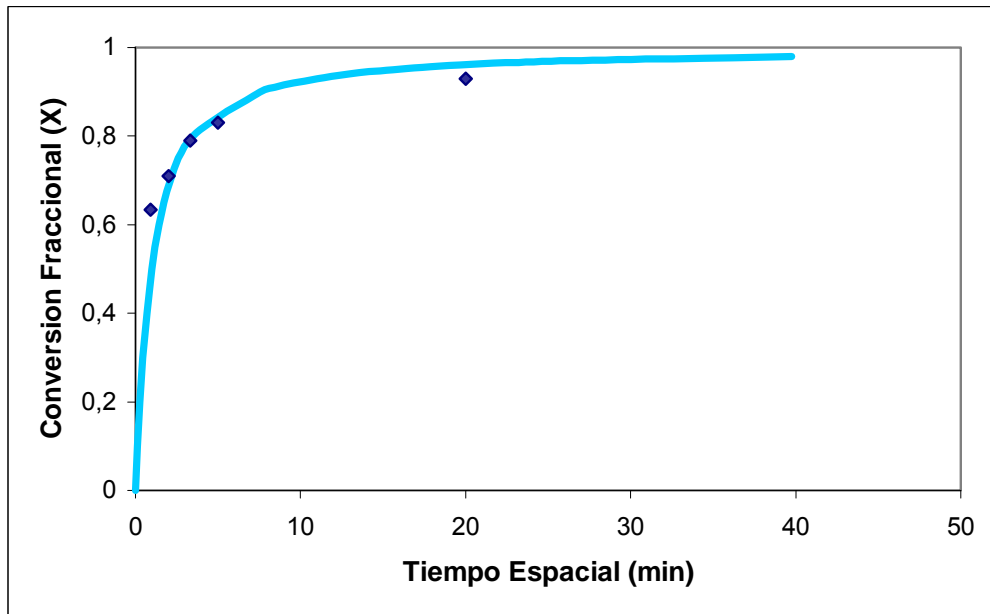
**Concentración de almidón 10 g/L**



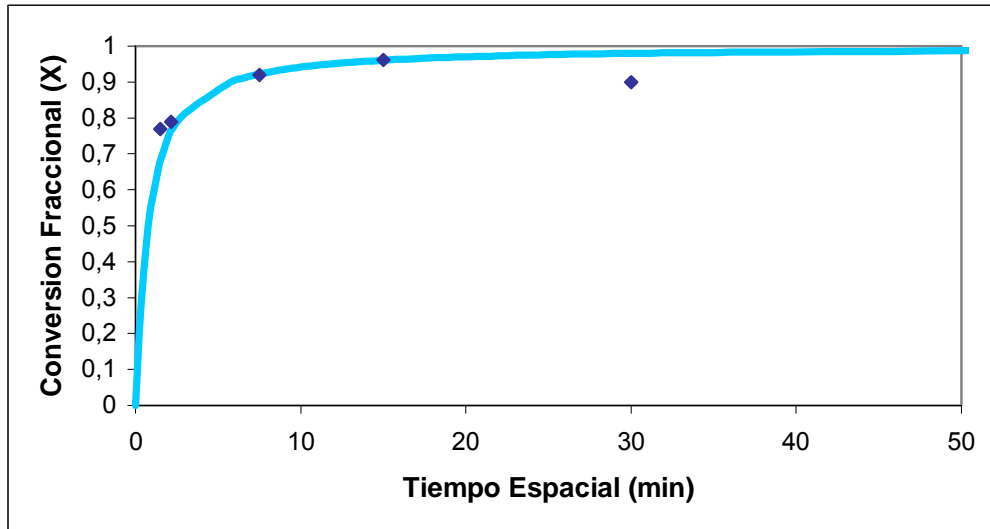
**Concentración de almidón 100 g/L**



**Concentración de almidón 150 g/L**



### Concentración de almidón 200 g/L



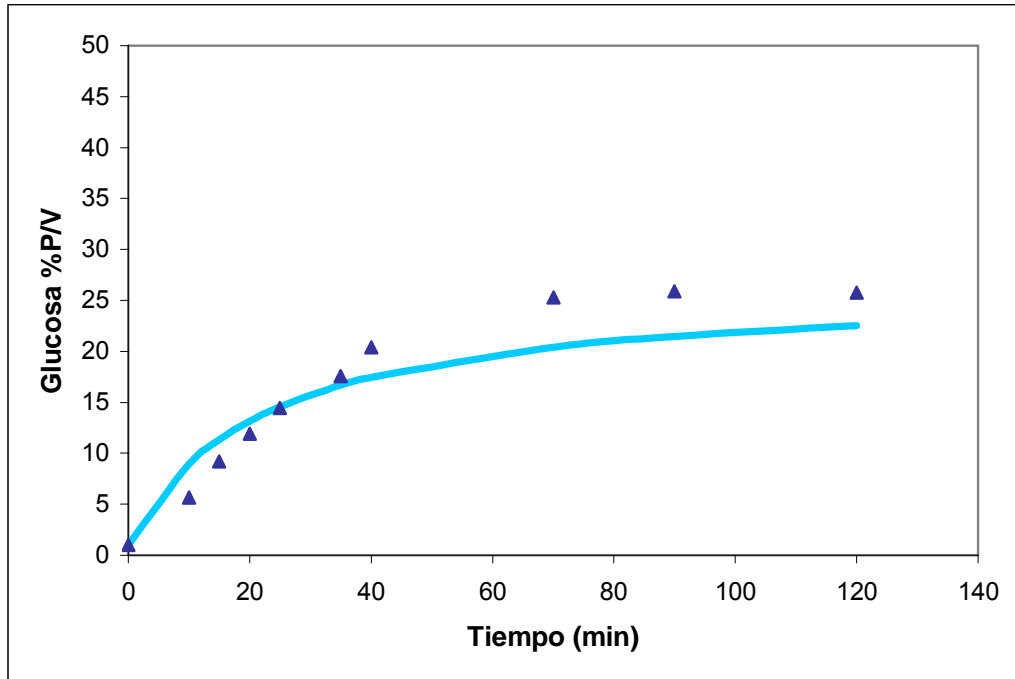
La ecuación que describe el modelo de desempeño del reactor para todas las gráficas que se encuentran en el anexo J es:

$$X + \frac{XK_m}{1.11S_0(1-X)} = \tau k_2$$

Las unidades para cada una de las variables se especifican en el numeral 1.1.5.3.

El valor de  $K_m$  es el  $K'_m$  reportado en la Tabla 5.

**ANEXO K. CURVA QUE DESCRIBE LA FORMACIÓN DE GLUCOSA COMO UNA FUNCIÓN DEL TIEMPO (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 300 g/L; CONCENTRACIÓN DE AMG 1,5 g/L)**



La línea representa el modelo empírico para la producción de glucosa dado por la siguiente ecuación.

$$G(t) = G_i + \frac{a't}{b'+t}$$

Los valores de  $a'$  y  $b'$  se reportaron en la Tabla 7.

