

OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD Y MÍNIMA
RETROGRADACIÓN A PARTIR DE ALMIDÓN INDUSTRIAL DE YUCA

Fabián Alfredo Carrascal Delgado

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico

Bucaramanga
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
2005

OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD Y MÍNIMA
RETROGRADACIÓN A PARTIR DE ALMIDÓN INDUSTRIAL DE YUCA

Fabián Alfredo Carrascal Delgado

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico

Directora del proyecto de grado
Dra. Martha Cecilia Daza Espinosa

Codirector del proyecto
Daniel Ricardo Molina, M Sc.

Bucaramanga
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA

2005

DEDICATORIA

A nuestros campesinos,
siempre fuertes y trabajadores,
sin temores y con muchos sueños,
que mostraron los pasos a seguir en el desarrollo de este trabajo.

A todos aquellos que sueñan, y soñamos, con otro mundo

Por que otro mundo es posible.

NUNCA NOS RENDIREMOS!...

Adelante, adelante, siempre presentes y consecuentes

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas,
a mis familiares,
a mis compañeros y amigos,
y a todos aquellos que han estado presentes en mi vida
y que han contribuido en mi desarrollo como persona.

Gracias a todos por creer en mí.

RESUMEN

Título

OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD Y MÍNIMA RETROGRADACIÓN A PARTIR DE ALMIDÓN INDUSTRIAL DE YUCA *

Autor

Fabián Alfredo Carrascal Delgado**

Palabras claves

Dextrinas, almidón, hidrólisis, amilasas

Descripción

Las dextrinas son almidones modificados que pueden obtenerse por tratamiento físico, químico o enzimático y que tienen un mayor valor económico que el almidón nativo. Las dextrinas tienen un peso molecular menor que el del almidón nativo, son hidrosolubles y se emplean principalmente en la fabricación de adhesivos debido a su baja viscosidad y a sus propiedades adhesivas. Las dextrinas pueden retrogradar, es decir re-organizarse en nuevos estados agregados en los que su solubilidad y sus propiedades adhesivas disminuyen.

En esta tesis de pre-grado en Química, se determinaron las variables más relevantes, a escala de laboratorio, en la obtención enzimática de dextrinas de baja retrogradación a partir de almidón industrial de yuca usando como catalizador, la enzima α -amilasa (Alfa-1,4-D-glucano glucanohidrolasa, (EC. 3.2.1.1.)). Los experimentos se realizaron usando como referencia los valores de pH = 4,7, temperatura 55°C y concentración de almidón [s] y de enzima [E], mencionados en la tesis de Sánchez, A. (2002); y valores para la variable tiempo (t) entre 5 a 40 minutos. La influencia de las variables [s], [E] y (t) sobre la producción de dextrinas se evaluó mediante un diseño factorial 2^3 (tamizado) con dos réplicas.

Los resultados obtenidos muestran que: a) Las variables más relevantes en la producción dextrinas a partir de almidón industrial de yuca, catalizada por la enzima α -amilasa son la [s], y el (t); b) El máximo rendimiento de producción de dextrinas fue del 92,5 al 94,5% p/v con [s] entre 6,00 y 6,37 % p/v, [E] de $1,75 \cdot 10^{-3}$ % p/v, y (t) entre 10 a 17 minutos, temperatura de 55°C y pH de 4,7; c) Las dextrinas obtenidas, almacenadas a 25°C no retrogradan antes de 12 días; y d) Las dextrinas obtenidas ,almacenadas a temperaturas inferiores a 8°C retrogradan antes de 2 horas.

* Tesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Jairo René Martínez Morales

ABSTRACT

Title

OBTAINING OF DEXTRINS OF HIGH SOLUBILITY AND MINIMUM RETROGRADATION FROM INDUSTRIAL STARCH OF YUCCA *

Author

Fabián Alfredo Carrascal Delgado **

Key words

Dextrins, Starch, Hidrolysis, Amilases

Description

The dextrins are modified starches that they can be obtained by physical, chemical or enzymatic treatment and that they have a bigger economic value than the native starch. The dextrins have a smaller molecular weight than that of the native starch, they are hydrosoluble and they are used mainly in the production of adhesives due to their low viscosity and to their adhesive properties. The dextrins can retrograde, that is to say re-organize in new states added in those that their solubility and their adhesive properties diminish.

In this pre-degree thesis in Chemistry, the most excellent variables were determined, to laboratory scale, in the enzymatic obtaining of dextrins of low retrogradation starting from industrial starch of yucca using as catalyst, the enzyme α -amilasa (Alpha-1,4-D-glucan glucanhydrolase, (EC. 3.2.1.1.)). The experiments were carried out using like reference the pH values = 4,7, temperature 55°C and concentration of starch [s] and of enzyme [E], mentioned in the thesis of Sánchez, A. (2002); and value for the variable time (t) among 5 to 40 minutes. The influence of the variables [s], [E] and (t) on the dextrins production it was evaluated by means of a factorial design 2^3 (sifted) with two replicas.

The obtained results show that: to) The most excellent variables in the production dextrins starting from industrial starch of yucca, hydrolised for the enzyme α -amilase they are the [s], and the (t); b) The maximum yield of dextrins production went from the 92,5 to 94,5% p/v with [s] between 6,00 and 6,37% p/v, [E] of 1,75*10⁻³% p/v, and (t) among 10 to 17 minutes, temperature of 55°C and pH of 4,7; c) The obtained dextrins, stored at 25°C doesn't retrograde before 12 days; and d) The obtained dextrins, stored to inferior temperatures at 8°C retrogrades before 2 hours.

* Thesis

** Faculty of Sciences, School of Chemistry, Director: Jairo René Martínez Morales

TABLA DE CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN	10
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
1 EL ALMIDÓN	12
1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA	13
1.2 GELATINIZACIÓN	14
1.3 RETROGRADACIÓN	15
1.4 HIDRÓLISIS PARCIAL DEL ALMIDÓN DE YUCA	17
1.4.1 <i>Hidrólisis enzimática</i>	18
2 DEXTRINAS	18
2.1 CLASIFICACIÓN	18
2.2 USOS DE LAS DEXTRINAS	20
2.3 REACCIONES DE LAS DEXTRINAS	21
3 TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA	22
3.1 ENZIMAS	22
3.1.1 <i>Amilasas</i>	23
3.1.2 <i>Desnaturalización de la enzima</i>	28

3.1.3	Actividad enzimática	28
4	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	31
4.1	MÉTODOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	31
4.2	DISEÑO FACTORIAL A DOS NIVELES	31
II.	METODOLOGÍA	33
1	OBTENCIÓN DE DEXTRINAS	33
1.1	OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD	33
1.1.1	Determinación de la concentración de dextrinas	33
1.2	DETERMINACIÓN DEL USO DE LA ENZIMA ALFA- 1,4 GLUCANO GLUCOSIDASA (EC 3.2.1.3.)	34
1.2.1	Determinación de la retrogradación de las dextrinas	34
2	DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO [S], CONCENTRACIÓN DE ENZIMA [E] Y TIEMPO DE REACCIÓN T SOBRE LA CONVERSIÓN DE ALMIDÓN EN DEXTRINAS	35
3	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES	37
3.1	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	38
III.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
1	OBTENCIÓN DE DEXTRINAS	39

1.1	OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD	39
1.2	DETERMINACIÓN DEL USO DE LA ENZIMA 1,4-ALFA- GLUCANO GLUCOSIDASA (EC. 3.2.1.3.)	40
2	DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO [S], CONCENTRACIÓN DE ENZIMA [E] Y TIEMPO DE REACCIÓN (T) SOBRE LA CONVERSIÓN DE ALMIDÓN EN DEXTRINAS	41
3	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES	47
3.1	VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DEL MODELO OBTENIDO	56
	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES	57
	BIBLIOGRAFÍA	58

INTRODUCCIÓN

Las guerras civiles han desgastado el poder adquisitivo de la población colombiana, profundizándose este fenómeno en las regiones agrarias, y de esta forma, afectando la producción primaria del país. Debido a esto, es necesario e imperativo realizar investigación que conduzca a mejorar la rentabilidad de los productos agrícolas.

En el departamento de Santander se producen varios productos agrícolas, entre ellos la yuca, y de este tubérculo podrían obtenerse productos con mayor valor agregado. Por esto, es necesario incrementar las investigaciones relacionadas con este tubérculo y determinar que productos podrían llegar a ser importantes en la industria y con ello contribuir al desarrollo agrario de la región. Este cultivo se adapta a las condiciones geográficas de nuestro departamento y es eficiente en la producción de almidón, por lo que puede usarse para obtener productos industriales, uno de estos las dextrinas.

Hay numerosas publicaciones (Yuan Yao, Jingmin Zhang, and Xiaolin Ding, 2003; Byoung-Wook Kong, Jung-In Kim, Myo-Jeong Kim, and Jae Cherl Kim, 2003; Lee Clark P and Antrim Richard L, 2001; y Marchal L. M. Jonkers J., De Gooijer CD. Tramper J., 1999) en la obtención de dextrinas a partir de almidón de maíz pero no a partir de almidón de yuca, como lo reporta la FAO¹.

Los almidones modificados y sus derivados, entre ellos las dextrinas, constituyen opciones tecnológicas atractivas para el sector industrial dada su funcionalidad, gran consumo y precio en el mercado^{2,3}. Las dextrinas son almidones modificados que pueden obtenerse por tratamiento físico, químico o enzimático y que tienen un mayor valor económico que el almidón nativo. Las dextrinas tienen un peso molecular menor que el del almidón nativo, son hidrosolubles y se emplean principalmente en la fabricación de adhesivos debido a su baja viscosidad, solubilidad en agua y a sus propiedades adhesivas. Las dextrinas pueden retrogradar, es decir re-organizarse en nuevos estados agregados en los que su solubilidad y sus propiedades adhesivas disminuyen.

En el mundo, los adhesivos para empaques representan el 39% del mercado total de adhesivos e incluyen los de base de agua, solubles al calor y goma-solvente. De estos, el 58% se basa en productos naturales (almidón y dextrinas), que son solubles en agua y dominan el mercado del papel y de cartón, con posibilidad de aplicaciones en el pegado de vidrio, madera y sobre hojalata. Estos productos tienen un mayor

valor agregado que los corrientes, en una proporción de 3: 5, frente a 1: 2 o 1: 4 que ofrecen los almidones en el mercado nacional⁴.

Las características físicas y químicas del almidón lo posicionan en los mejores lugares dentro de la industria alimenticia, textil, farmacéutica, papelería y de adhesivos. Esta última, además de explotar las propiedades cohesivas de los almidones, también aprovecha las características biodegradables, ausentes en aquellos pegantes obtenidos a partir de hidrocarburos aromáticos u otras sustancias tóxicas^{5,6}.

En Colombia, grupos de investigación asociados a instituciones como el Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo de la Yuca CLAYUCA, al Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT y al Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria y Tecnológica PRONATTA del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, entre otros, han desarrollado diferentes tecnologías para la obtención de dextrinas entre las que se destacan la obtención de dextrinas por vía seca mediante el uso de diferentes catalizadores^{2,7}, obtención de dextrinas mediante hidrólisis ácida^{5, 8} y obtención de dextrinas catalizada por medios enzimáticos (alfa-amilasa, proveniente de *Bacillus licheniformis*), donde fueron estudiadas las variables temperatura, pH, concentración de almidón, adición enzimática y cantidad de cofactor (iones Ca^{+2})⁹.

En la universidad Industrial de Santander (UIS) se han realizado investigaciones con la yuca, desarrollando en el laboratorio de investigación en Bioquímica y Biotecnología alternativas para su comercialización. Esta incluyen la producción de jarabes de alta fructosa y glucosa y la producción de etanol.

En esta tesis de pre-grado en Química, se determinaron las variables más relevantes en la obtención enzimática de dextrinas de baja retrogradación a partir de almidón industrial de yuca usando como catalizador, la enzima α -amilasa (Alfa-1,4-D-glucano glucanohidrolasa, (EC. 3.2.1.1.)). Los experimentos se realizaron usando como referencia los valores de pH = 4,7, temperatura 55°C y concentración de almidón [s] y de enzima [E], mencionados en la tesis de Sánchez, A. (2002); y valores para la variable tiempo (t) entre 5 a 40 minutos. La influencia de las variables [s], [E] y (t) sobre la producción de dextrinas se evaluó mediante un diseño factorial 2^3 (tamizado) con dos réplicas.

Los resultados obtenidos muestran que las variables más relevantes en la producción de dextrinas a partir de almidón industrial de yuca, catalizada por la enzima α -amilasa son la [s], y el (t); el máximo rendimiento de producción de dextrinas fue del 92,5 al 94,5% p/v con [s] entre 6,00 y 6,37 % p/v, [E] de $1,75 \cdot 10^{-3}$ % p/v, y (t) entre 10 a 17 minutos, temperatura de 55°C y pH de 4,7; las dextrinas obtenidas, almacenadas a 25°C no retrogradaron antes de 12 días; y las dextrinas obtenidas, almacenadas a temperaturas inferiores a 8°C retrogradaron antes de 2 horas.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 EL ALMIDÓN

El almidón es un polímero de α -D-glucosa, denominado glucano, de estructura semicristalina, constituye la más importante fuente de carbohidratos de los alimentos y se encuentra en los cereales, las patatas, la yuca, las legumbres y en otros vegetales¹⁰.

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas y proporciona entre el 70 y el 80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. La diferencia del almidón con respecto a los demás carbohidratos es que en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas (gránulos), densas e insolubles en agua y fáciles de extraer¹¹. Estos gránulos pueden ser dispersados en agua dando lugar a la formación de suspensiones de baja viscosidad que pueden ser fácilmente mezcladas y bombeadas, incluso a concentraciones mayores del 35% p/v. En la tabla 1 se muestran algunas propiedades del almidón de yuca.

La capacidad de formar soluciones viscosas (capacidad de formar geles) es alcanzada sólo cuando la suspensión de los gránulos es sometida a la acción del calor^{12, 13}.

Tabla 1: Propiedades generales del almidón de yuca

Propiedad	Especificación
Tamaño de gránulo (eje mayor, μm)	4 – 35
Amilosa (%)	17 – 20
Amilopectina (%)	80 – 83
Viscosidad Relativa	Alta
Aspecto de la Pasta	Clara
Tendencia a gelificar / Retrogradar	Media
Sabor	Insípido
Calor de combustión (kJ/g)	17,6
Solubilidad en agua, éter y alcohol (25°C)	Insoluble

La despolimerización del almidón, o hidrólisis, puede lograrse química o enzimáticamente. Entre los productos que se obtienen se encuentran los jarabes de D-glucosa^{14,15}, comúnmente denominados dextrosa, maltosa, oligosacáridos y dextrinas.

1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

El almidón es un polímero de D-glucosa, unidas entre sí por enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 6) y α -(1 $\rightarrow$ 4). Los gránulos de este glucano están compuestos de una mezcla de dos polisacáridos, de los cuales, uno es esencialmente lineal denominado amilosa y, el otro, es muy ramificado, llamado amilopectina^{11,16,17,18}. Las cadenas de amilosa y de amilopectina se asocian directamente por enlaces de hidrógeno entre los grupos alcoholícos o por medio de moléculas de agua. Con la excepción de los llamados almidones cerosos (del maíz) o glutinoso (del arroz), la mayoría de los almidones encontrados en la naturaleza están compuestos de una mezcla de amilosa y amilopectina.

La disposición espacial de las capas de los gránulos de almidón es parecida a las de una cebolla, puede ser visible fácilmente por un microscopio óptico o de electrones, con la diferencia de que dichas capas no pueden separarse entre sí, pero pueden destruirse por tratamientos hidrotérmicos o químicos para liberar amilosa y amilopectina^{12,16,19}.

La amilosa es una molécula lineal y flexible de 500 o más unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 4)²⁰. Sin embargo, hay moléculas de amilosa con 0,3% a 0,5% de sus enlaces glucosídicos de tipo α -(1 $\rightarrow$ 6); es decir, por cada 180 a 320 enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 4) se presenta un enlace α -(1 $\rightarrow$ 6)^{10,21}. La solubilidad de la amilosa, en agua, es del 50% al 75% del contenido total de ésta en el almidón de yuca.

La amilosa presenta una estructura tridimensional en forma de hélice debido al acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades de α -D-glucopiranosas con enlaces α -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos de las cadenas que forman una espiral con giro a la derecha. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno y es por tanto lipofílico, mientras que en el exterior están situados los grupos hidroxilos. Las moléculas de amilosa tienen pesos moleculares de alrededor de 10^6 Daltons, varían dependiendo de la fuente del almidón^{18,21}. El complejo de color azul formado entre el yodo y la amilosa es básico para su

determinación cualitativa. Se utilizan también métodos amperométricos y potenciométricos, suponiendo que la amilosa pura puede formar complejos con un 19% o 20% de yodo . La mayoría de los almidones contienen entre 15% y 30% de amilosa^{19,20,22} .

La amilopectina es un polímero de D-glucosa con un peso molecular de $1 \cdot 10^7$ a $5 \cdot 10^8$ Daltons, altamente ramificada con enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 4) y α -(1 $\rightarrow$ 6). Los puntos de ramificación debidos a los enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) se presentan cada 20 o 30 unidades de glucosa, además hay evidencias que pueden existir también algunas ramificaciones con enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 2) y α -(1 $\rightarrow$ 3)^{10,20} .

Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices, demostrado así por difracción de electrones y más recientemente por difracción de rayos-X. Es este tipo de empaquetamiento lo que forma las pequeñas áreas cristalinas, altamente densas, que alternan con las menos densas y amorfas de los almidones. Las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina y algunas pueden difundir a partir de gránulos parcialmente embebidos de agua . Por su estructura es mucho más estable en soluciones acuosas que la amilosa. La amilopectina no forma complejos con ácidos grasos o con alcoholes orgánicos y en contacto con el yodo produce un color rojo .

La amilopectina está presente en todos los almidones, constituyendo alrededor del 70% al 85% de éstos.

Algunos almidones están formados exclusivamente por amilopectina y se les conoce como almidones céreos, sin importar si contienen o no algún tipo de cera^{12,20} .

1.2 GELATINIZACIÓN

Proceso irreversible que ocurre después que una temperatura crítica es alcanzada y que consiste en el hinchamiento de los gránulos de almidón cuando este es calentado en suspensión acuosa produciendo el rompimiento de los enlaces de hidrógeno. Durante el proceso de calentamiento la suspensión de almidón aumenta su viscosidad y ocurre el proceso de gelatinización (cada tipo de almidón gelatiniza en un rango de temperatura definido; por eso, la medida de la temperatura de gelatinización es un parámetro importante en la caracterización del almidón)^{15, 23} .

Algunas moléculas cortas de amilosa se disuelven y se difunden fuera de los gránulos gelatinizados; mientras que las moléculas más largas de amilosa refuerzan la estructura de los gránulos gelatinizados. Estos cambios tienen lugar en un rango de temperatura que es determinado usando un microscopio de polarización equipado con un sistema de calentamiento y se reporta como el rango de temperatura de gelatinización; la mayoría de los almidones exhiben un rango de temperatura de gelatinización de 8 – 10°C. El calentamiento continuado de los gránulos de almidón con exceso de agua da lugar a un mayor hinchamiento, lixiviación adicional de componentes solubles (amilosa principalmente) y eventualmente, si se aplican fuerzas de cizalla, disrupción total de los gránulos. El exceso de agua hace que los gránulos de almidón alcancen un tamaño varias veces superior al original, si esta suspensión se agita moderadamente y se calienta, los gránulos de almidón embeben agua hasta que la mayor parte es absorbida por ellos forzándolos a hincharse, romperse fácilmente y desintegrarse por agitación, lo que resulta en una disminución de la viscosidad. Al enfriarse la suspensión, algunas moléculas de almidón se reasocian parcialmente para formar un precipitado o gel ^{12,13,20}.

La gelatinización se puede cuantificar por microscopía de escaneo de electrones, microscopía de luz polarizada, pérdida de la estructura de doble hélice (RMN), pérdida de la cristalinidad (difracción de rayos X), y calentamiento endotérmico (calorimetría de escaneo diferencial)²⁴.

1.3 RETROGRADACIÓN

Es el proceso de agregación y cristalización parcial de las moléculas de almidón gelatinizado que regresan a la condición original de baja solubilidad en agua fría, fenómeno causado por la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas lineales de amilosa, la amilopectina y la glucosa. Por ello, la cantidad de amilosa y la distribución de las longitudes de las cadenas de amilopectina son los dos parámetros estructurales más estudiados del almidón .

Se considera que la retrogradación ocurre en dos etapas, en la primera etapa, la rigidez y la cristalinidad de las geles de almidón se desarrolla rápidamente por la recristalización de la amilosa, proceso que ocurre durante las primeras 24 horas; y en la segunda etapa la cristalinidad se desarrolla lentamente por la amilopectina. La retrogradación del almidón y la naturaleza de los cristales formados depende del origen del almidón, el contenido de amilosa, la temperatura de depósito, y la presencia de otros ingredientes²⁵.

La retrogradación es un proceso que ocurre inicialmente durante el enfriamiento, después de la gelatinización o posterior a una reacción de hidrólisis, debido a la amilosa, y posteriormente, incrementando la temperatura aproximadamente entre 50 y 60 °C para acelerar el proceso de retrogradación de la amilopectina^{12,13,20,26}.

La retrogradación del almidón es la principal causa de deterioro de productos que lo contienen durante su depósito. Este proceso se acelera en forma proporcional a las longitudes de las cadenas externas primero de la amilosa y en segundo término de la amilopectina. La hidrólisis parcial del almidón tiene un efecto inhibitorio en todo el sistema con respecto a este tipo de reacción^{18,27}. Los factores que afectan la retrogradación del almidón son la estructura de la amilopectina^{28,29}, el contenido de amilosa^{30,31} y la presencia de componentes diferentes al almidón incluyendo proteínas^{32,33}, lípidos^{34,35,36,37} y oligosacáridos³⁸.

La retrogradación es un proceso dinámico que involucra la creación y destrucción de niveles de interacción molecular entre el almidón y las moléculas de agua. Durante la retrogradación, el almidón gelatinizado sufre transformaciones estructurales (por ejemplo, agregación o retrogradación de las cadenas) resultando en un cambio desde un estado inicial amorfo a un estado final más ordenado o cristalino^{39, 40}. Esas interacciones a nivel molecular tienen consecuencias como cambios moleculares en la movilidad del almidón y el agua, así como también cambios a nivel macroscópico, tales como cambios en la textura. Se ha sugerido que el proceso de retrogradación puede ser visto como una secuencia de tres pasos dependientes de la temperatura: mecanismo de nucleación, propagación y maduración⁴¹, diversos métodos han sido usados para estudiar la retrogradación del almidón y han sido revisados por Karim et al⁴², pero a pesar de la gran cantidad de estudios referentes a la gelatinización y retrogradación del almidón, un estudio completo acerca de la relación entre la estructura química del almidón y la cinética de la retrogradación aún no ha sido reportado y muchos aspectos no son todavía comprendidos a nivel molecular^{43,44}.

Algunos investigadores han concluido que cadenas lineales de amilosa o amilopectina con un valor mínimo de grado de polimerización de 6 a 9 es necesario para evitar la retrogradación⁴⁵, mientras que otros^{27, 46} indican que la hidrólisis parcial tiene efectos inhibitorios.

Estudios de la retrogradación del almidón mediante calorimetría de escaneo diferencial reportaron que el almidón retrograda más rápido a bajas temperaturas, lo cual indica que sigue un tipo de cinética específico a diferentes intervalos de temperatura^{47, 48}.

La resonancia magnética nuclear de pulsos (RMNP) es la principal técnica usada para estudios de retrogradación del almidón por ser una técnica rápida, reproducible, y no destructible, lo cual es importantes durante el monitoreo del proceso de retrogradación.

1.4 HIDRÓLISIS PARCIAL DEL ALMIDÓN DE YUCA

Las moléculas de almidón, como todos los polisacáridos, son hidrolizadas por la acción de los ácidos en caliente. Según el tiempo de reacción se obtiene el grado de hidrólisis deseado. El ácido se neutraliza y se recupera el producto tras lavado y desecación⁴⁹.

La destrucción controlada de las cadenas poliméricas o hidrólisis del almidón, a través de soluciones básicas, ácidas o catalizada por enzimas, da lugar a la formación progresiva de dextrinas y moléculas de maltosa y glucosa, mezcla que comúnmente se denomina como jarabe de D-glucosa y vienen comúnmente caracterizados por su “equivalente de dextrosa” (ED)^{12, 14, 49}, que esta definido como: el porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de los sólidos totales de oligosacáridos^{12, 14}.

$$ED = \frac{W_{gr}}{W_{st}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

W_{gr} : peso de glucosidos reductores presentes en el jarabe

W_{st} : peso de los sólidos totales presentes en el jarabe

Esta definición presenta sin embargo limitaciones pues, según el procedimiento tecnológico utilizado, dos productos de hidrólisis del almidón pueden tener composiciones muy diferentes teniendo globalmente el mismo DE^{14, 49}. Para evitar posibles confusiones con el término de jarabes de D-glucosa, se ha determinado que “jarabes de D-glucosa” significa que la concentración de la solución contiene como mínimo 1/3 de D-glucosa⁵⁰.

1.4.1 Hidrólisis enzimática

Los componentes principales del almidón se pueden hidrolizar utilizando amilasas como catalizadores. Estas amilasas se dividen en dos clases, formalmente conocidas como exo-enzimas y endo-enzimas⁵¹. Esta terminología es muy general, por lo tanto, es necesario precisar en la especificidad de cada enzima con respecto al tipo de unión glucosídica, esto es, la hidrólisis enzimática del almidón ocasionada por las hidrolasas α -(1→4) o por las hidrolasas α -(1→6)⁵².

La hidrólisis enzimática de los gránulos de almidón se afecta por la estructura del gránulo, el tipo de cristal, el tamaño del cristal, la relación amilosa/amilopectina y el peso molecular promedio de esta relación, la presencia de lípidos y proteínas, y condiciones de especificidad de reacción de la enzima⁵³.

2 DEXTRINAS

Las dextrinas o almidones modificados son almidones nativos que han sido sometidos a uno o más tratamientos físicos, químicos, o tratamientos enzimáticos que conllevan la desorganización granular, degradación polimérica, re-arreglos moleculares, oxidación, o adición de grupos químicos^{54,55,56}.

Todas las dextrinas pertenecen a un grupo grande y variado de polímeros de D-glucosa, desde las lineales, a través de estructuras ramificadas, hasta compuestos cíclicos⁵⁷. El extensivo uso comercial de las dextrinas fue originado desde su serendípico descubrimiento en 1821, cuando un incendio en Dublín, en una planta textilera, produjo un depósito de almidón de papa quemada, el almidón se convirtió en una sustancia de aspecto córneo, soluble en agua, que recibió el nombre de “cola inglesa”^{58,59}.

2.1 CLASIFICACIÓN

Las dextrinas, por los métodos generales usados en su preparación pueden clasificarse en cuatro grupos mayores; primero, las dextrinas obtenidas por la acción enzimática, particularmente por la acción de las amilasas sobre el almidón; segundo, las dextrinas cíclicas de Schardinger producidas por la acción de *Bacillus macerans* sobre los almidones; tercero, las dextrinas producidas por hidrólisis ácida en medio acuoso; y cuarto, las piro dextrinas, que comprenden

productos preparados por la acción del calor, o el calor y los ácidos sobre el almidón. Sobre las dextrinas cíclicas y las piro dextrinas, se conocen una gran cantidad de estudios, sobre todo en cuanto a las ciclo dextrinas se refiere, cuyo mayor potencial corresponde a la química farmacéutica.

Por otra parte, en cuanto a las piro dextrinas se refiere, se han propuesto métodos de formación y de dextrinificación, los cuales incluyen la acción de un intermediario: Levoglucosan. La clasificación correspondiente a estas dextrinas es la siguiente:

➤ **Dextrinas blancas.** Las dextrinas blancas se utilizan en el terminado de textiles, en la manufactura de mesas de plástico y especialmente como goma para pegar.

Se obtienen tratando el almidón con ácido a pH entre 1,5 y 6,0, a temperatura que puede variar entre 60 y 120 °C durante por lo menos 60 minutos. Dependiendo del pH de la solución de hidrólisis y del grado de hidrólisis producido por el calentamiento, se pueden producir dextrinas de mínima viscosidad.

A temperaturas bajas, la solubilidad en agua varía desde 0% hasta cerca de 90%; donde el factor más importante, aparte de la temperatura y la acidez de la solución, es el tiempo de hidrólisis .

➤ **Dextrinas amarillas.** En general, de cadenas lineales pequeñas, lo que atribuye a las dextrinas estabilidad en solución a altas concentraciones (70% p/v) y con ello la propiedad requerida para producir goma para papel, siempre que se produzca una película de pulido claro al secar. Sin embargo, para ciertas aplicaciones, la propiedad de retrogradación o set back es altamente requerida, y el grado de esta última tiene que ser controlado por las condiciones de preparación. En adhesivos para manufactura, es probablemente la propiedad más importante y más difícil cuantitativamente para reproducir.

El tratamiento del almidón seco con el solvente apropiado, como el ácido clorhídrico o el ácido cloro- acético, a una temperatura y por un tiempo mayor que para las dextrinas blancas (150 - 210 °C, 60 – 90 minutos), hace que primero ocurra una etapa de hidrólisis preliminar para producir pequeños fragmentos correspondientes a las dextrinas blancas. Como la temperatura es mayor que para las dextrinas blancas y la humedad mucho menor, los fragmentos parecen que se recombinan para dar un tipo de estructura ramificada de color amarillo. La viscosidad puede incrementarse durante la repolimerización, indicando un apreciable incremento en el tamaño molecular. El efecto neto es para reducir la

cantidad y la influencia de la porción lineal. El grado de repolimerización es muy importante debido a que este determina las propiedades de la solución .

➤ **Gomas británicas.** Son muy ramificadas y por ello, más estables en solución que las dextrinas blancas y de una viscosidad similar; generalmente, tienen peso molecular más bajo que las dextrinas amarillas. Este tipo de dextrina es producido con un mayor tiempo de calentamiento durante el proceso de la hidrólisis, con respecto a las dextrinas amarillas .

2.2 USOS DE LAS DEXTRINAS

En general, los mayores usos para las dextrinas, sean piro dextrinas o dextrinas enzimáticas, dependen de la habilidad de las soluciones acuosas para formar películas capaces de unir superficies similares o distintas. En total, el crudo de almidón produce películas más fuertes y, presenta mejor fuerza adhesiva. Las dextrinas a las cuales les falta la fuerza inherente de las películas de almidón nativo muchas veces tienen características esenciales en encuadernación y aplicaciones adhesivas, que no posee el almidón crudo. Su baja viscosidad relativa permite su uso en altas concentraciones, obteniéndose como resultado un secado más rápido en sus películas que las hechas por el almidón. La estabilidad de la solución en altas concentraciones es mucho mejor que la de su pariente, el almidón. En consecuencia, las dextrinas se usan para la producción de adhesivos, consiguiendo en estos últimos mejores propiedades que en los hechos con el almidón. La solubilidad de las dextrinas en agua fría es mayor que la del sustrato de partida y por esto se usan en aplicaciones que requieren una parcial o total solubilidad en la solución del pegamento ^{13,59,60,61,62,63,64} .

Los adhesivos industriales usan como base sintética dextrinas blancas, dextrinas amarillas y gomas británicas en la preparación de adhesivos líquidos y secos ^{13,65,66} . Esos productos son usados como apoyo de la costura y gomas para el pegado de los sobres y cartas, estampillas de correo, cajas de cartón y en muchas otras aplicaciones ¹ . Muchos de esos adhesivos contienen aditivos para modificar las propiedades de solución de la película de la dextrina. El Bórax (tetraborato de sodio) es uno de los aditivos más comunes usados con las dextrinas. Dependiendo del tipo de dextrina, la cantidad de Bórax puede llegar a ser hasta del 20% del peso molecular. La presencia de Bórax en este rango incrementa la viscosidad de la solución de dextrina, la estabiliza, y la hace más adhesiva ^{4, 13} .

Jarabes de azúcar, glicerol y otros compuestos polihidroxi son usados en adhesivos de dextrina para plastificar sus películas y reducir la tendencia de la película de llegar a ser quebradiza en baja humedad. La urea y la di-ciamida algunas veces son usadas para reducir la viscosidad de la solución de la dextrina o goma inglesa y para estabilizarla en contraste con la retrogradación o set back ^{13,67}.

Las dextrinas y las gomas británicas son usadas como espesantes para pastas de impresión de textiles, las cuales, consisten en soluciones acuosas de químicos y pigmentos. Las gomas británicas no solamente funcionan como espesantes de las pastas, también se utilizan para modificar sus propiedades reológicas, para que de esta manera fluyan más rápido hacia los rollos de impresión de gravados o, a través de las pantallas de impresión .

Las dextrinas solubles en agua fría son usadas como transportadoras de ingredientes activos, como lo son saborizantes de comidas, donde su baja viscosidad y solubilidad son de beneficio. Ellas, también son usadas como diluyentes.

La industria farmacéutica usa las dextrinas blancas como diluyentes de nutrientes de carbohidratos por fermentación cuando se requiere una baja cantidad de polisacáridos asimilables, en contraste a una pronta asimilación de estas como D-glucosa.

En los procesos de fundición se usan las dextrinas para que el material moldeado permanezca intacto durante el manejo.

2.3 REACCIONES DE LAS DEXTRINAS

Las dextrinas y el almidón en solución acuosa, al reaccionar con el agua, se hidrolizan a maltosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$, un disacárido y glucosa $C_6H_{12}O_6$, un monosacárido. Las dextrinas se pueden modificar químicamente para sustituir los grupos hidroxilos por cualquier otro grupo funcional.

3 TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

La catálisis biológica se reconoció y se describió por primera vez a finales del siglo XVIII, en estudios relacionados con la digestión de alimentos por secreciones del estómago, y la búsqueda continuó en el siglo XIX con exámenes de la conversión de almidón en azúcar por la saliva y varios extractos de plantas. A mediados del siglo, Louis Pasteur concluyó que la fermentación de azúcar a alcohol por levaduras es catalizada por “fermentos”. Él postuló que esos fermentos eran inseparables de la estructura de las células vivas. En 1897 Eduard Buchner descubrió que los extractos de fermentación (levaduras) pueden fermentar azúcar a alcohol, probando que la fermentación se promovía por moléculas que continuaban la función cuando se removían de las células. Frederick W. Kühne llamó a esas moléculas enzimas⁶⁸. Las enzimas han sido utilizadas por el hombre a lo largo de muchos años sin ser del todo aisladas. Los extractos enzimáticos de origen vegetal o de microorganismos se utilizaban con diferentes propósitos: procesos de fermentación, panificación y elaboración de alimentos y bebidas alcohólicas, por ejemplo.

Las referencias más antiguas al respecto se encuentran descritas en los poemas épicos griegos de “La Iliada” y “La Odisea”, que datan del siglo IX a. de c. En ellos se describe el uso que se hacía del cuajo de estómago de cordero y cabrito, los cuales contienen las mismas enzimas que el cuajo de ternera, para la elaboración del queso. La savia de higuera, con alto contenido en proteasas, se utilizaba con los mismos propósitos.

3.1 ENZIMAS

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas catalíticas –ARN-, todas las enzimas son proteínas. Sus actividades catalíticas dependen de la integridad de sus conformaciones proteínicas nativas. Si una enzima es desnaturalizada o disociada en sus unidades, los aminoácidos, su actividad catalítica es siempre destruida. Así, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas son esenciales para sus propiedades catalíticas.

Una enzima es, en la gran mayoría de los casos, una proteína de origen natural que cataliza reacciones biológicas o químicas con un cierto grado de especificidad; en su ausencia, la mayoría de las reacciones químicas tardarían mucho tiempo o simplemente no se efectuarían^{68,69}.

El centro activo es la región de la enzima en la que transcurre la catálisis, uniéndose a él el sustrato y los cofactores o coenzimas. Esta unión puede originar modificaciones estructurales tanto en la enzima como en el sustrato. Por especificidad de una enzima, se entiende como la capacidad de ésta para elegir, entre la multiplicidad de reacciones que puede sufrir un sustrato dado y una enzima determinada. Debido a esta selectividad, se diferencian las enzimas en forma característica de otros catalizadores químicos, tales como platino, níquel y óxido de hierro. La especificidad de la enzima depende de la estructura de la proteína y no de la naturaleza de la coenzima. En lo referente a la especificidad del sustrato, que depende también de la estructura de la proteína, debe distinguirse entre especificidad absoluta y especificidad relativa y carencia de especificidad.

Las enzimas que catalizan las hidrólisis de enlaces glucosídicos tienen aplicaciones industriales en la producción de jarabes de azúcar a partir de almidones, entre los que se encuentran los jarabes de D-glucosa. La producción de jarabes de glucosa a partir del almidón se realiza en dos pasos, primero la licuefacción del almidón y segundo la sacarificación, es decir, la formación de moléculas de D-glucosa^{70,71,72,73,74}. La licuefacción se realiza utilizando como catalizador la enzima β -amilasa o la enzima α -amilasa, y la sacarificación se realiza utilizando como catalizador a la enzima glucoamilasa, pollulanasa o también se pueden utilizar mezclas de estas enzimas.

3.1.1 Amilasas

El término amilasa ha sido usado para designar las reacciones de catálisis enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 4) de los polisacáridos, tales como los almidones, el glucógeno, o sus productos intermedios de degradación^{52,59,63}.

Las amilasas han sido divididas en dos grupos principales: endo-amilasas y exo-amilasas.

➤ **Endoamilasas.** Las endoamilasas catalizan las rupturas de los enlaces α -(1 $\rightarrow$ 4) aleatoriamente, aunque los enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) que constituyen los puntos de ramificación de las amilopectinas y glicógenos, permanezcan sin atacar. Esto produce una rápida disminución de la viscosidad y del peso molecular promedio del sustrato. Los productos primarios son oligosacáridos (dextrinas) que son posteriormente hidrolizados para producir maltosa, algo de glucosa, isomaltosa y productos de cadena ramificada de bajo peso molecular^{49,59,60,63,70,75,76,77,78}.

➤ **Alfa-1,4-D-glucano glucanohidrolasa (EC. 3.2.1.1).** Llamada así, originalmente, por la reducción del grupo hemiacetal liberado en la hidrólisis del almidón en la configuración óptica alfa. Conocida también como alfa-amilasa.

Las α -amilasas son producidas por muchas bacterias y hongos. Muchos organismos producen varias α -amilasas, entre ellos tenemos: ***Bacillus subtilis***, ***Bacillus cereus***, ***Bacillus amyloliquefaciens***, ***Bacillus coagulans***, ***Bacillus polymixa***, ***Micrococcus***, ***Pseudomonas***, ***Arthrobacter***, ***Escherichia***, ***Proteus***, etc.^{64,79}.

La saliva humana, el páncreas de porcino y microorganismos, especialmente los del género ***Aspergillus niger*** y ***Aspergillus orizae***, entre otros, son las principales fuentes productoras de ésta enzima^{20,74,78,80}.

Las condiciones de pH y temperatura en que ésta enzima tiene su mayor actividad, así como, la composición específica y el peso molecular (tabla 2) tienen ciertas variaciones que dependen de la fuente de donde se haya extraído.^{20,78,80,81}

Las α -amilasas constituyen un grupo homogéneo de proteínas bien caracterizado. Todas ellas son ligeramente ácidas, solubles en agua, de peso molecular cercano a 50.000 Daltons. Las α -amilasas difieren de las otras amilasas en diversos aspectos; por ejemplo, la fuerza con la cual ellas unen el calcio y, de aquí, su resistencia a la desnaturalización^{20,59,60,72,74,77,78,82,83,84,85,86}, éstos iones pueden proceder de sales como acetato de calcio, sulfato de calcio y cloruro de calcio, siendo esta última sal la más comúnmente utilizada. La remoción del calcio de la molécula de α -amilasa, reduce el rango de pH en el que la enzima es estable. El pH óptimo de actividad de la α -amilasa varía con la fuente de la enzima (tabla 3). Las α -amilasas de origen animal, sin embargo, requieren la adicción de iones cloruro para su activación, posiblemente también las α -amilasas bacteriales^{59,60,64}. La concentración apropiada de iones cloruro es cercana a 0,01M, concentraciones en exceso disminuyen la actividad de la α -amilasa salival.

Estas enzimas pueden ser inactivadas por calentamiento de sus soluciones en un baño de agua caliente por 5 minutos, excepto para la α -amilasa procedente de ***B. subtilis***, que requiere 15 minutos de calentamiento. Esta enzima es relativamente estable al calor.

Tabla 2: Peso molecular de α -amilasa extraída de diferentes microorganismos

Microorganismo	Peso molecular x 10 ³ Daltons
<i>Aspergillus oryzae</i>	51 – 52
<i>Aspergillus niger</i>	58 – 61
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	68
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49
<i>Bacillus subtilis</i>	24 – 100
<i>Thermomonospora curvata</i>	62

Tabla 3: Variación del pH óptimo para la actividad de la α -amilasa con la fuente de la enzima⁶¹

Origen de la enzima	Rango de pH óptimo	Rango de pH óptimo después de 20 horas de incubación (25°C)
Mamíferos	6,0 – 7,0	4,8 – 11
<i>B. subsilitis</i>	5,9 – 6,0	4,8 – 8,5
<i>A. oryzae</i>	4,8 – 5,8	5,5 – 8,5
Malta y cebada	4,7 – 5,4	4,9 – 9,1

➤ **Exoamilasas.** Son exclusivamente de origen vegetal o microbiano. Ellas son capaces de catalizar las reacciones hidrolíticas exclusivamente desde las posiciones no reductoras de los carbohidratos, catalizando uno a uno la hidrólisis de cada enlace glucosídico para producir solamente α -glucosa, o uno a uno cada enlace para producir maltosa. Las primeras enzimas son llamadas glucoamilasas o γ -amilasas, y las últimas β -amilasas. En ambos casos, la acción se detiene en el primer punto de ramificación, porque los enlaces α -(1→6) no son hidrolizados^{52,59,66}.

➤ **1,4-alfa- glucano glucosidasa (EC 3.2.1.3).** Conocida como glucoamilasa, esta enzima es una carbohidrasa que hidroliza almidón, glucógeno, malto – oligosacáridos, α -(1-4) oligosacáridos y compuestos similares casi completamente a D-glucosa. La glucoamilasa es capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos en ambos casos: fracciones lineales y ramificadas del almidón^{12,16,59,65,68}. La enzima es producida en grandes cantidades por diversas especies de hongos del género ***Aspergillus* y *Rhizopus*** y también ha sido encontrada en ciertos tejidos animales^{16,21}. La enzima presenta rangos de trabajo a pH que pueden variar entre 2,94 y 6,98, y a temperaturas que varían entre 15°C a 70°C.

Esta enzima requiere de la acción anticipada de α -amilasa para poder catalizar, con mayor eficiencia la hidrólisis de los enlaces α -(1→4) glucosídicos y producir jarabes de D-glucosa a gran escala^{14,51,52,87}.

La actividad de ésta enzima se ve inhibida por la presencia de eritritol y tris(hidroximetil)-metilamina en la mezcla. Cuando se hidroliza el almidón con glucoamilasa como catalizador, los polímeros que contienen enlaces α -(1→4)-glucosídicos se hidrolizan más rápidamente que los polímeros que contienen enlaces α -(1→6)-glucosídicos⁸⁸.

Las condiciones de pH y temperatura en que ésta enzima tiene su mayor actividad, así como la composición específica y el peso molecular, tienen ciertas variaciones que dependen de la fuente de donde se haya extraído. Debido al bajo grado de especificidad de ésta enzima, puede ser usada para catalizar la hidrólisis de los enlaces α -(1→3)-glucosídicos y α -(1→6)glucosídicos^{12,20,51,80}.

La velocidad de hidrólisis del almidón catalizada por ésta enzima, se incrementa en proporción directa con el peso molecular del sustrato, como se muestra en la figura 1.

La glucoamilasa puede ser encontrada en diferentes grados de pureza en el ámbito comercial. Tales enzimas son preparadas generalmente de origen fúngico y han sido obtenidas por procedimientos de extracción y purificadas por solventes. En la tabla 4 se recopilaron algunas propiedades generales para esta enzima.

Esta enzima actúa como una exo-enzima, cataliza de forma secuencial la hidrólisis de unidades sencillas de D-glucosa^{12,20,60,75,76,77}. La hidrólisis enzimática del almidón y del glucógeno comienza en la parte final no reductora de la cadena del

polímero y procede por la hidrólisis de residuos de D- glucosa, únicamente, por un mecanismo de multicadena. Cuando encuentra un punto ramificado en el polímero, la enzima es capaz de romper esos enlaces lentamente, exponiendo las unidades de enlaces terminales α -D-(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos, los cuales, son rápidamente hidrolizados por la enzima.

Figura 1: Efecto del sustrato sobre la actividad de la glucoamilasa²⁰

Condiciones de trabajo: Concentración de sustrato: 0,04% para todos los sustratos; concentración de enzima: $2,82 \times 10^{-7}$ M; pH: 5,15 y T°: 15°C.

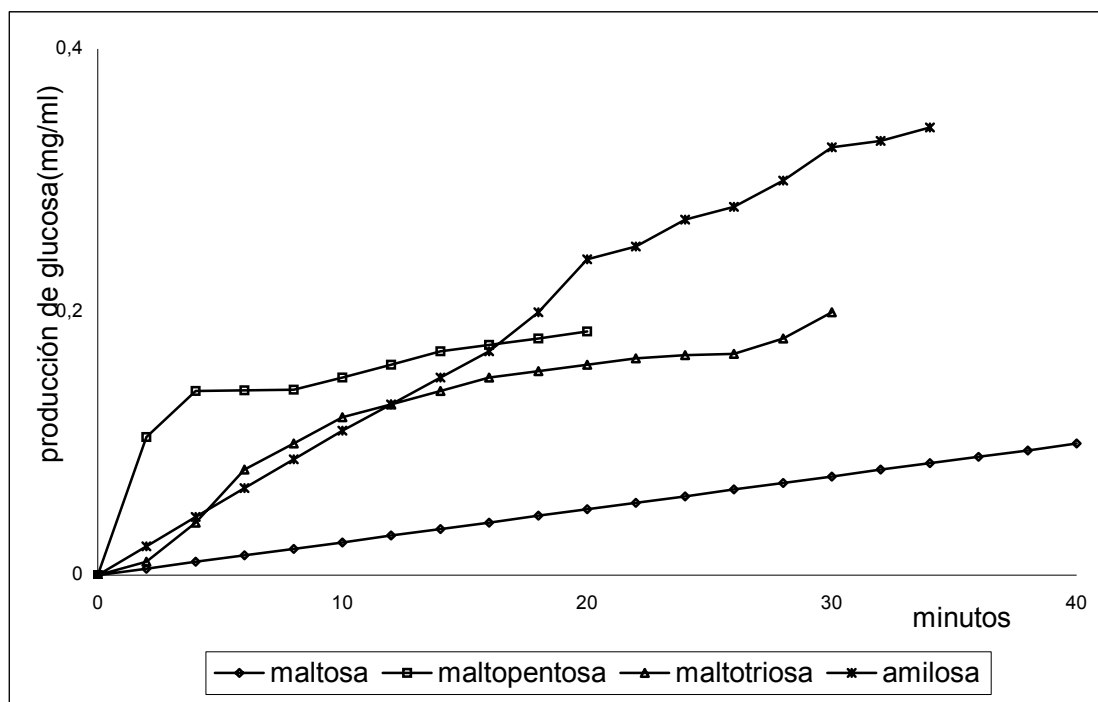


Tabla 4: Propiedades generales de la glucoamilasa

pH óptimo		4 a 4,5
El Ca^{+2} no protege a la enzima contra inactivación a altas temperaturas		
Sustrato	k_m de reacción	
Maltosa	$1,6 \text{ a } 6,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	
Amilosa	$0,057\% \text{ o } 4,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	
Amilopectina	$0,062\% \text{ o } 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	
Glucosa	No hay reacción	

3.1.2 Desnaturalización de la enzima

La desnaturalización de la enzima es el resultado de un cambio del ordenamiento espacial de la enzima de una estructura ordenada de la molécula nativa a una configuración tridimensional más desordenada. Durante la desnaturalización se rompen los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas y hay un incremento en la entropía o grado de desorden de la molécula con pérdida de su actividad. Las causas que pueden llevar a la desnaturalización pueden ser: altas temperaturas, variaciones de presión, congelamiento, fuerzas de superficie, rayos X, rayos ultravioleta, ultrasonido, extremos de pH, solventes orgánicos, enzimas proteolíticas, amidas y sus derivados .

3.1.3 Actividad enzimática

Generalmente, cuando se habla de cuantificación enzimática se hace referencia a la determinación de su actividad sobre el sustrato, y no propiamente a su cuantificación, proceso un poco difícil y dispendioso pues están implicados eventos como aislar y purificar la enzima; por esto, se prefiere medir el efecto catalítico que produce la enzima sobre una determinada reacción en la que participa. Las concentraciones del sustrato y de la coenzima deben estar por encima del nivel de saturación para que la velocidad de reacción sea solamente proporcional a la concentración del sustrato; además, se acostumbra a medir la velocidad de formación del producto y no la de desaparición del sustrato, por lo que este debe estar en concentraciones muy elevadas para asegurar la cinética de orden cero. Para poder realizarla, se deben tener en cuenta una serie de factores:

- La estequiometría global de la reacción
- Si hay necesidad de cofactores
- El valor de K_m para el sustrato
- pH y temperaturas óptimas para la enzima
- un método sencillo para determinar la desaparición de sustrato o la aparición de productos.

➤ **Unidad de actividad enzimática.** Una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima que está presente en un volumen definido de una mezcla, de reacción definida, incubada bajo rígidas condiciones de constantes controladas, que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto. La actividad enzimática se expresa en términos de unidades enzimáticas (U) por gramo de enzima. La actividad enzimática también se expresa en términos de nanomol por minuto (nmol/min) o picomol por minuto (pmol/min)

El sistema internacional tiene como unidad de actividad enzimática el katal (kat) que representa la transformación de 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad es grande pero se pueden obtener valores más fácilmente manejables expresando las actividades en microkatal (μkat), nanokatal (nkat) o picokatal (pkat).

$$1 \text{ katal} = 1 \text{ mol} / \text{s}$$

La pureza de una enzima se expresa en términos de su actividad específica que se define como el número de unidades enzimáticas (U) por miligramo de proteína.

Las actividades relativas de las enzimas puras pueden ser comparadas usando como referencia sus actividades molares. Esto se conoce también como el número de moléculas de sustrato transformados en un minuto por una molécula de enzima bajo condiciones óptimas.

➤ **Determinación de la actividad enzimática amilásica.** La determinación de la actividad amilásica siempre se basa en la habilidad que tiene la enzima para hidrolizar el almidón gelatinizado. El efecto de la acción amilolítica se manifiesta en tres formas principales:

- Un descenso en la viscosidad del almidón gelatinizado
- Pérdida en la facilidad que tiene de dar color azul con el yodo, debido a la producción de dextrinas
- Incremento en el número de grupos reductores del sistema

Entre los métodos de ensayo basados en las velocidades de la disminución de la viscosidad o en la formación de color azul con el yodo están:

1. Un método que mide el tiempo, en segundos, requerido para la gelatinización y subsiguiente licuefacción del almidón, dando valores de actividad en unidades de FNV (valor numérico de descenso);
2. La técnica del amilógrafo que mide la máxima viscosidad obtenida al calentar gradualmente el almidón (5 °C por minuto). Es el método viscosimétrico que mide

el tiempo necesario para reducir la velocidad del almidón, por medio de un viscosímetro de Ostwald; y

3. Medida cinética de la reacción de un extracto de enzima con una dextrina mediante la determinación de la coloración con yodo.

En general, los métodos mencionados son muy sensibles pero no miden el número de enlaces hidrolizados, y algunos de ellos requieren demasiado tiempo. El orden de la medida del grado de amilólisis cuantitativa se puede obtener con métodos que utilizan (a)ferrocianuro de potasio y soluciones cúpricas alcalinas, y (b)el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). El método del DNS se basa en la reducción que sufre este ácido por la presencia de grupos reductores en medio básico y la subsiguiente determinación colorimétrica del producto coloreado que se formó .

Si el sustrato o el producto son coloreados y absorben luz en el rango del visible del espectro electromagnético, la actividad enzimática se puede determinar fácilmente, ya que la velocidad de aparición o desaparición de un producto o sustrato que absorbe luz, puede seguirse con un espectrofotómetro.

Otro tipo de reacción esta determinado por aquellos sistemas donde los reactivos son incoloros y se logra el cambio de absorbancia mediante el producto de la primera reacción con un sistema anexo que hace que dicho producto se convierta en sustrato para la siguiente reacción, la cual contiene un cromógeno que es revelado al darse la reacción acoplada consiguiendo que la generación de color sea equivalente a la cantidad de sustrato formado (reacción colorimétrica).

Un modelo de reacción acoplado lo constituyen los sistemas de enzimas no coloreadas que requieren para su actividad de coenzimas quienes representan un patrón típico de absorción de luz en el rango U.V. (540 nm), estableciendo una relación equimolecular entre coenzima reducida y oxidada y la cantidad de sustrato transformado.

La capacidad reductora de la maltosa y sus homólogos altos poliméricos es 1,580 veces más grande que la de la D- Glucosa sobre las condiciones recomendadas; esto es, la capacidad reductora de 1,0 g de glucosa es igual a la de 0,794 g de D- maltosa.

4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La investigación científica es un proceso de aprendizaje dirigido. El objeto de los métodos estadísticos es hacer que ese proceso sea lo más eficiente posible⁸⁹.

4.1 MÉTODOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de la superficie de respuesta es un grupo de técnicas utilizadas en los estudios empíricos de las relaciones entre una o varias respuestas tales como: producción, índice de color o viscosidad por un lado y una serie de variables de control, como tiempo, temperatura, presión o concentración por el otro. Estas técnicas se han utilizado para contestar a preguntas de varios tipos, tales como las siguientes:

1. ¿Cómo, en una región de interés, un conjunto de K variables afecta a una respuesta determinada?
2. ¿Qué niveles, si es que hay alguno, de las variables de control, permitirán obtener una producción que satisfaga simultáneamente las especificaciones deseadas?
3. ¿Qué valores de las variables de control producirán un máximo en una respuesta específica y cómo es la superficie de respuesta en las inmediaciones de ese máximo?

4.2 DISEÑO FACTORIAL A DOS NIVELES

Todo investigador se enfrenta a dos difíciles tareas: descubrir y entender las complejas relaciones que puedan existir entre varias variables y, alcanzar este objetivo a pesar de que los datos estén contaminados con error experimental. Normalmente, es más eficiente estimar el efecto de varias variables simultáneamente.

Para realizar un diseño factorial general, el investigador selecciona un número fijo de “niveles” (o “versiones”) para cada una de un conjunto de variables (factores) y luego se hacen experimentos con todas las combinaciones posibles. Si hay l_1 niveles para la primera variable, l_2 para la segunda, y l_k para la k -ésima, el

conjunto de todas las $l_1 * l_2 * \dots * l_k$ condiciones de experimentos se llama diseño factorial $l_1 * l_2 * \dots * l_k$. Por ejemplo, un diseño factorial $2 * 3 * 5$ comprende $2 * 3 * 5$ experimentos elementales, y un diseño factorial $2 * 2 * 2 = 2^3$ comprende 8 experimentos elementales. Los diseños a dos niveles 2^k (k, número de factores) requieren relativamente pocos experimentos elementales por cada factor, y a pesar de que permiten explorar exhaustivamente una amplia región del espacio de los factores, pueden indicar tendencias y así determinar una dirección prometedora para futuros experimentos. Estos diseños son de gran utilidad en los primeros momentos de una investigación, donde suele ser aconsejable estudiar en un primer intento un gran número de variables (que puede o no incluir las variables importantes).

II. METODOLOGÍA

Para la obtención de dextrinas se utilizó almidón industrial de yuca distribuido por Industria del Maíz S. A⁹⁰.

En la obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación primero se determinaron las variables de mayor relevancia y, posteriormente, se obtuvieron las mejores condiciones.

1 OBTENCIÓN DE DEXTRINAS

La obtención de dextrinas se realizó por lotes, a escala de laboratorio (volumen 100 mL) y la validación de los resultados obtenidos también se hizo a escala de laboratorio (volumen 200 mL). Todos los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Las dextrinas se obtuvieron por hidrólisis parciales del almidón industrial de yuca con la enzima alfa-1,4-D-glucano glucanohidrolasa (EC. 3.2.1.1.), temperatura de 55 °C, pH= 4,7 y cloruro de calcio al 1 %p/v.

1.1 OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD

Para la obtención de dextrinas de alta solubilidad, se realizaron experimentos preliminares con el fin de seleccionar los valores para el tiempo de reacción. Estos experimentos se realizaron a concentraciones de almidón del 6% p/v, concentraciones constantes de la enzima α -amilasa (EC. 3.2.1.1.) del 0,03% p/p respecto al almidón⁹¹, y tiempos de reacción variables desde 5 hasta 40 minutos.

1.1.1 Determinación de la concentración de dextrinas

La concentración de dextrinas se determinó como la diferencia entre sólidos totales y azúcares menores en solución, expresados estos últimos como la concentración de maltosa en solución determinada por el método del DNS (ver anexo 1).

Los sólidos totales se obtuvieron evaporando las soluciones de dextrinas, previamente centrifugadas durante 15 minutos, en una mufla a temperaturas inferiores a 60 °C durante 14 horas.

1.2 DETERMINACIÓN DEL USO DE LA ENZIMA alfa- 1,4 glucano glucosidasa (EC 3.2.1.3.)

Para la obtención de dextrinas de mínima retrogradación, se realizaron experimentos preliminares para conocer estimativos del valor de su retrogradación y el posterior uso de la enzima gluco-amilasa (alfa-1,4- glucano glucosidasa, EC. 3.2.1.3). Estos experimentos se realizaron a concentraciones de almidón del 6% p/v, concentraciones constantes de la enzima α - amilasa (EC. 3.2.1.1.) 0,03% p/p respecto al almidón, tiempos de reacción de 15 minutos y agregando glucosa a las soluciones hidrolizadas.

Para obtener dextrinas de baja retrogradación se recomienda el uso de la enzima 1,4-alfa- glucano glucosidasa (EC. 3.2.1.3.); por tal razón, inicialmente se determinó el grado de retrogradación de las dextrinas (cambio en la concentración de glucosa).

1.2.1 Determinación de la retrogradación de las dextrinas

La retrogradación se midió como el cambio de concentración de glucosa. A estas soluciones se les adicionó glucosa, y se incubaron a 58°C con el fin de acelerar su retrogradación. La concentración de glucosa se determinó cada hora en un rango entre 1 y 4 horas^{55, 56}.

La concentración de glucosa fue determinada por el método colorimétrico de la glucosa oxidasa usando la ecuación 2 (ver anexo 2)

$$\text{Glucosa (g/L)} = \frac{\text{abs M}}{\text{abs E}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

abs M = Absorbancia de la muestra.

abs E = Absorbancia de la solución estándar.

2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO [s], CONCENTRACIÓN DE ENZIMA [E] Y TIEMPO DE REACCIÓN t SOBRE LA CONVERSIÓN DE ALMIDÓN EN DEXTRINAS

En la obtención de dextrinas se determinó la importancia de las variables concentración del almidón, concentración de la enzima α -amilasa, tiempo de reacción y las diferentes relaciones entre estas variables. Para esto, se tomaron como referencia los valores de las concentraciones del almidón y de la enzima α -amilasa y los valores de pH (pH= 4,7) y temperatura (T= 55°C) mencionados en la tesis de Sánchez A. realizada en el laboratorio de bioquímica de la UIS, mientras que el tiempo de reacción se determinó variándolo entre 5 y 40 minutos y evaluando la cantidad de dextrinas obtenidas.

Para evaluar la influencia de las variables [s], [E] y t sobre la conversión de almidón en dextrinas se realizó un diseño factorial de experimentos del tipo 2^3 (tamizado) ⁸⁹ con dos réplicas (tabla 5), con el que se obtuvo un modelo matemático de la forma:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n + \text{Interacciones} + b_mX^t \quad (\text{Ec. 3})$$

Los niveles máximo (+) y mínimo (-) de las variables independientes del proceso de hidrólisis enzimática y los niveles normalizados con la ecuación 4 se muestran en la tabla 6.

$$X = \frac{V - m}{M} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

X = Variable normalizada

V = Variable sin normalizar

m = Valor 0 de la variable sin normalizar

M = Diferencia entre el valor +1 y valor 0 de la variable sin normalizar

Tabla 5. Valores de las variables normalizadas para los experimentos de hidrólisis del almidón industrial de yuca catalizada por la α -amilasa

Bloque	Experimento	[s]	[E]	t
1	1	-1	1	-1
1	2	-1	-1	1
1	3	1	-1	1
1	4	1	1	-1
1	5	1	-1	-1
1	6	-1	1	1
1	7	-1	-1	-1
1	8	1	1	1
2	1	-1	1	-1
2	2	-1	-1	1
2	3	1	-1	1
2	4	1	1	-1
2	5	1	-1	-1
2	6	-1	1	1
2	7	-1	-1	-1
2	8	1	1	1
3	1	-1	1	-1
3	2	-1	-1	1
3	3	1	-1	1
3	4	1	1	-1
3	5	1	-1	-1
3	6	-1	1	1
3	7	-1	-1	-1
3	8	1	1	1

Tabla 6. Valores de niveles máximo (+), mínimo (-) y valores normalizados (según Ec. 4) de las variables independientes para la hidrólisis de almidón industrial de yuca catalizado por α -amilasa

Variable	Nivel				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
Concentración del almidón (%p/v)	5,29	5,50	6,00	6,50	6,707
Tiempo (min.)	9,29	12,00	17,00	22,00	24,07
Enzima (g) * 10^{-3}	1,21	1,37	1,73	2,10	2,25

La influencia de las variables independientes [s], [E] y t sobre la variable dependiente, concentración de dextrinas, se determinó con base en el análisis de los estadísticos R, F, P y los coeficientes b_n para cada una de las variables del modelo matemático encontrado.

3 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

La determinación de las mejores condiciones para obtener un alto rendimiento en la conversión de almidón industrial de yuca en dextrinas se hizo empleando un diseño ortogonal central y rotatable, con dos réplicas.

En este diseño se emplearon las variables [s] y t que mostraron el mayor grado de influencia en el análisis de las variables involucradas en el proceso de obtención de dextrinas (tamizado).

Con los datos obtenidos y utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0, se obtuvo un modelo matemático que, bajo las condiciones trabajadas, representa la concentración de dextrinas obtenidas.

Con este modelo y utilizando el mismo programa computacional se graficó la superficie de respuesta y la curva de nivel de las variables independientes sobre la variable dependiente.

La validación del modelo matemático se realizó con base en el análisis de los estadísticos R, F, P, y las gráficas de sus residuos.

3.1 VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para la validación experimental del modelo obtenido en la optimización de variables se realizaron experimentos con valores de $[s]$ y de t al azar, seleccionados directamente de las curvas de nivel, los resultados fueron evaluados con relación a los valores teóricos. Estos experimentos se realizaron a escala de laboratorio con volúmenes de reacción de 200 mL.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1 OBTENCIÓN DE DEXTRINAS

Para la obtención de dextrinas, primero se identificaron las variables y sus relaciones más sobresalientes; y después, se determinaron las mejores condiciones para su obtención.

Las dextrinas se obtuvieron realizando hidrólisis parcial del almidón industrial de yuca con la enzima alfa-1,4-D-glucano glucanohidrolasa (EC. 3.2.1.1.), temperatura de 55 °C, pH= 4,7 y cloruro de calcio al 1 %p/v. El %p/v de dextrinas fue evaluado como la diferencia del %p/v de los sólidos totales menos el %p/v de los azúcares reductores (expresados como maltosa).

1.1 OBTENCIÓN DE DEXTRINAS DE ALTA SOLUBILIDAD

Estos experimentos se realizaron para seleccionar los rangos de tiempo de reacción, teniendo en cuenta que no hay reportes en la literatura para el almidón de yuca, tabla 7.

Tabla 7. %p/v de dextrinas obtenidas variando los tiempos de reacción

Tiempo (min)	Experimento			Valor promedio	Desviación Estándar	%DS
	1	2	3			
5	2,238	2,045	2,158	2,147	0,097	4,500
10	4,620	4,472	4,528	4,540	0,075	1,652
15	5,480	5,244	5,452	5,392	0,128	2,374
20	5,195	4,945	5,052	5,064	0,125	2,468
25	3,809	3,929	3,908	3,882	0,064	1,649
30	3,299	3,421	3,552	3,424	0,126	3,680
35	3,167	2,948	2,948	3,021	0,132	4,385
40	2,083	1,891	1,942	1,972	0,099	5,020

%DS (%desviación estándar)= (desviación estándar / valor promedio)*100

De estos datos, se observa que en el rango de aproximadamente 10 a 20 minutos se obtuvieron los mayores %p/v (4,5 – 5,1%) de dextrinas a partir de almidón industrial de yuca y que para tiempos de 15 minutos se obtuvo la mayor concentración (5,4%).

A partir de estos resultados, se consideró como límites inferior y superior los valores de 12 a 22 minutos para el tiempo de reacción de la enzima α -amilasa (ver gráfica 7 anexo 3) y, la determinación del uso de la enzima 1,4- α -glucano glucosidasa (EC. 3.2.1.3.) se realizó a tiempos de reacción de 15 minutos por ser este valor en el que se obtuvo el mejor resultado.

1.2 DETERMINACIÓN DEL USO DE LA ENZIMA 1,4- α -glucano glucosidasa (EC. 3.2.1.3.)

La retrogradación se midió como la variación en la concentración de glucosa de las soluciones de dextrinas después de incubarlas a 58°C (tabla 8, ver gráfica 8 anexo 4) para acelerar su retrogradación. Con el procedimiento seguido no se detectó la retrogradación en las dextrinas obtenidas (almacenándolas a temperatura ambiente: 25 °C).

Por lo tanto, fue innecesario el tratamiento con la enzima glucoamilasa (1,4- α -glucano glucosidasa, EC 3.2.1.3.); teniendo en cuenta que, el uso de esta enzima, estaba inicialmente previsto para disminuir la retrogradación de las dextrinas.

Tabla 8. Concentración de glucosa en las soluciones de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca, tiempo de hidrólisis: 15 minutos

[glu] inicial	[glu] después de incubación (h)			
	1	2	3	4
249	247	241	256	261
593	591	586	601	589
864	871	863	862	873
1486	1471	1485	1490	1506

[glu]: concentración de glucosa, ppm

Sin embargo, almacenando las dextrinas obtenidas en el refrigerador (temperatura menor de 8°C) por tiempos menores a 2 horas, se pudo observar por inspección directa la formación de sólidos en suspensión, correspondientes a retrógrados de dextrinas.

Una posible explicación es que al disminuir la temperatura se afecta la estructura del agua y los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las dextrinas son reemplazados por puentes de hidrógeno entre dextrinas lo que contribuiría a formar agregados y a una disminución de la solubilidad.

2 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO [s], CONCENTRACIÓN DE ENZIMA [E] Y TIEMPO DE REACCIÓN (t) SOBRE LA CONVERSIÓN DE ALMIDÓN EN DEXTRINAS

Con este diseño experimental fue posible conocer las variables que más importancia presentan en la obtención de dextrinas.

En la tabla 9 se muestra el %p/v de los sólidos totales obtenidos, en la tabla 10 el %p/v de azúcares reductores expresados como maltosa y en la tabla 11 la respuesta evaluada, %p/v de dextrinas (diferencia entre el %p/v de sólidos totales menos el %p/v de los azúcares reductores expresados como maltosa).

Tabla 9. %p/v de los sólidos totales en las soluciones de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque			Valor promedio	Desviación Estándar	%DS
	1	2	3			
1	5,223	5,300	4,747	5,090	0,299	5,874
2	5,413	5,090	5,170	5,224	0,168	3,215
3	5,940	5,403	5,833	5,725	0,284	4,961
4	7,061	7,080	7,047	7,063	0,016	0,234
5	6,177	6,530	6,267	6,324	0,183	2,894
6	5,273	5,337	5,273	5,294	0,030	0,567
7	5,087	4,983	4,923	4,997	0,080	1,601
8	5,500	5,340	5,403	5,414	0,080	1,478

%DS (%desviación estándar) = (valor promedio / desviación estándar)*100

Tabla 10. %p/v de azúcares reductores (expresados como maltosa) en las soluciones de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque			Valor promedio	Desviación estándar	%DS
	1	2	3			
1	0,550	0,560	0,570	0,560	0,010	1,785
2	0,973	0,969	0,818	0,920	0,088	0,956
3	0,737	0,776	0,710	0,741	0,033	4,453
4	0,304	0,330	0,395	0,343	0,046	13,648
5	0,274	0,277	0,287	0,279	0,006	2,150
6	1,166	1,197	1,180	1,811	0,015	0,828
7	0,634	0,563	0,606	0,601	0,036	5,990
8	0,762	0,796	0,720	0,759	0,038	5,006

$\%DS (\%desviación\ estándar) = (valor\ promedio / desviación\ estándar) * 100$

En la tabla 9 se puede observar que el valor promedio de los %p/v de los sólidos totales en las soluciones de dextrinas está entre 4,997 y 6,324, con desviaciones estándar entre 0,080 y 0,299. Los porcentajes de desviaciones estándar son menores al 6% y pueden deberse, entre otros, a que estos compuestos (dextrinas y azúcares menores como glucosa y maltosa) son altamente higroscópicos; por ende, para disminuir esta variabilidad se debería utilizar una cámara con una baja humedad relativa para el enfriamiento de las muestras

La tabla 10 muestra los valores promedio de los %p/v de los azúcares reductores en las soluciones de dextrinas variando entre 0,210 y 0,801, presentándose de igual modo desviaciones estándar entre 0,010 y 0,124 y porcentajes de desviaciones estándar inferiores al 5%; sin embargo, en el experimento 4 se obtuvo un porcentaje de desviación estándar del 13%.

Tabla 11. Respuesta evaluada (%p/v de dextrinas): diferencia entre sólidos totales menos %p/v de azúcares reductores (como maltosa) de las soluciones de dextrinas obtenidas a partir de almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque		
	1	2	3
1	4,673	4,740	4,177
2	4,440	4,260	4,583
3	5,127	4,727	5,123
4	6,757	6,750	6,120
5	5,903	6,253	5,980
6	4,107	4,140	4,093
7	4,453	4,420	4,317
8	4,550	4,453	4,833

Con los datos obtenidos en la tabla 11 y utilizando el programa de computación STATGRAPHICS Plus 4.0⁹² que utiliza la metodología de mínimos cuadrados, consistente en un método matricial para calcular el coeficiente b_n que acompaña a cada variable de la ecuación 3, se halló un modelo matemático polinómico que representa la relación entre la variable dependiente (%p/v de dextrinas) y las 7 variables independientes ($[s]$, $[E]$, t , $[s]*[E]$, $[s]*t$, $[E]*t$ y $[s]*[E]*t$). Este modelo está descrito por la ecuación 5.

Modelo obtenido
(Ec. 5):

$$\%p/v \text{ de dextrinas} = 4,957 - 0,008*[E] + 0,590*[s] - 0,421*t + 0,037*[s]*[E] - 0,325*[s]*t - 0,166*t*[E] - 0,054*[E]*[s]*t$$

➤ **Análisis matemático.** A partir del valor absoluto de los coeficientes b_n que acompañan al modelo obtenido (Ec. 5) es posible decir que en este caso las variables independientes $[s]$ y t son las que contribuyen en mayor grado con el valor de la respuesta, concentración de dextrinas, seguidas por las variables también independientes $[s]*t$, $[E]*t$, $[s]*[E]*t$, $[s]*[E]$ y $[E]$, respectivamente. La variable $[E]$, o su interacción con las demás variables, contribuye en casi menos del 70% de lo que lo hacen las variables $[s]$ y t ; por ello, para la determinación de las mejores condiciones en la obtención de dextrinas se evaluaron las variables $[s]$ y t mientras que la variable $[E]$ se mantuvo constante en su mínimo valor, $1,37*10^{-3}$ g/100mL.

En las tablas 12, 13 y 14 se muestran los análisis de regresión múltiple, análisis de varianza y coeficientes estadísticos para el modelo obtenido.

Tabla 12. Análisis de regresión múltiple del modelo obtenido (Ec. 5)

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Valor P
constante	4,957	0,048	0,000
[s]	0,591	0,048	0,000
[E]	-0,008	0,048	0,860
[t]	-0,421	0,048	0,000
[s]*[E]	0,037	0,048	0,418
[s]*t	-0,324	0,048	0,000
[E]*t	-0,165	0,048	0,002
[s]*[E]*t	-0,054	0,048	0,247

El valor estadístico P determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables independientes sobre el modelo, esto es, un efecto con valor P menor a 0,10 y 0,01 es significativo para niveles de confianza del 95% y del 99% respectivamente (ver tabla 12) y por lo tanto se debe incluir en el modelo.

Tabla 13. Análisis de varianza del modelo obtenido (Ec. 5)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	15,919	7	2,274	47,180
Residual	0,772	16	0,048	-
total(Corr.)	16,691	23	-	-

Corr.: correlación

Tabla 14. Coeficiente estadístico F para el modelo descrito por la Ec. 5

Valor F			Ecuación 5	
Valor F de tablas _(7/16)				
F _(95%)	F _(99.9%)	F _(experimental)	% R ²	%Error
2,660	6,460	47,180	95,379	0,145

Al comparar los valores estadísticos F con grados de libertad de 7 y 16 (y para un nivel de confianza de 95 y 99,9% respectivamente) reportados en la literatura con el F obtenido para el modelo, se observa que el F del modelo es mayor en ambos casos y por lo tanto el modelo matemático es significativo para un nivel de confianza del 99,9%.

El factor estadístico R-cuadrado indica que el modelo con el ajuste realizado explica el 95,379% de la variabilidad con respecto a la respuesta, %p/v de dextrinas.

El error estándar del cálculo aproximado indica que la desviación estándar de los residuales es de 0,145.

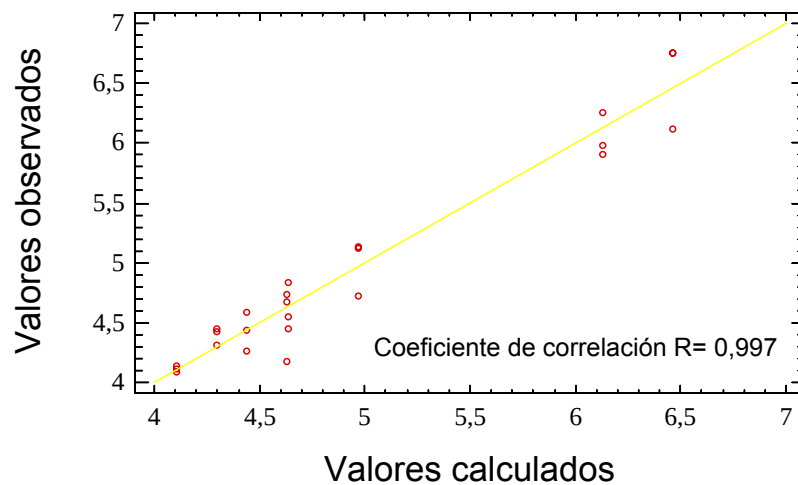
➤ **Análisis gráfico.** Además del análisis matemático es posible realizar un estudio gráfico de los resultados con el fin de comprender mejor los resultados obtenidos.

Para esto se hicieron las siguientes gráficas:

➤ **Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas Vs. %p/v de valores obtenidos experimentalmente.** La Gráfica 1 muestra los valores teóricos y experimentales a lo largo de la matriz de trabajo, en ella se evalúa la manera como se distribuyen los puntos a lo largo de una línea diagonal trazada, entre más

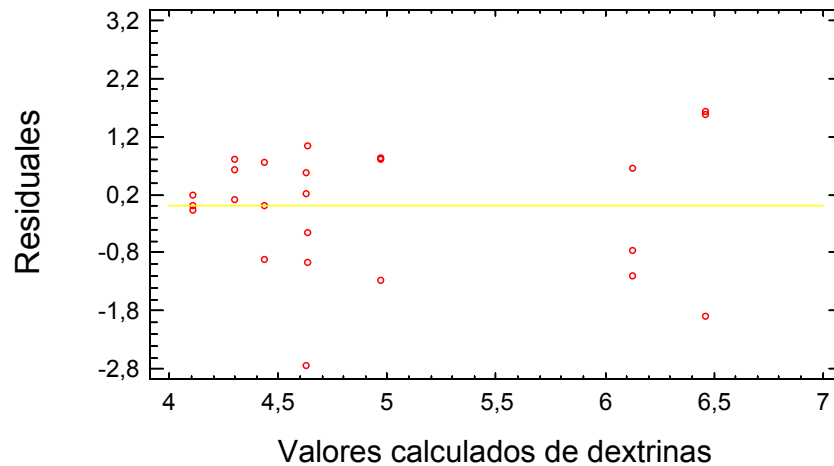
cercanos se encuentren estos puntos de esta línea más satisfactorio es el modelo obtenido.

Gráfica 1. %p/v de dextrinas calculadas mediante el modelo obtenido (Ec. 5) Vs. %p/v de valores obtenidos experimentalmente



➤ **Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas Vs. %p/v de dextrinas residuales.** La gráfica 2 muestra los valores de los residuales Vs. los valores teóricos de dextrinas. Esta gráfica es especialmente buena para evaluar la variabilidad de los cambios de los valores residuales con los cambios en los valores de la variable dependiente, %p/v de dextrinas. En este tipo de gráfica se determina si existe algún tipo de relación entre este par de variables, si no existe alguna relación, como en este caso, se considera que el modelo obtenido es satisfactorio para explicar el comportamiento de la variable dependiente.

Gráfica 2. Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas mediante el modelo obtenido (Ec. 5) Vs. residuales de dextrinas



3 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Con los datos obtenidos en el desarrollo del tamizado, se determinaron las condiciones para el desarrollo y la construcción de la superficie de respuesta de la manera en que se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones para el diseño de superficie de respuesta

Bloque	Experimento	[s]	T
1	1	0	$\sqrt{2}$
1	2	$-\sqrt{2}$	0
1	3	-1	-1
1	4	0	0
1	5	0	$-\sqrt{2}$
1	6	$\sqrt{2}$	0
1	7	1	1
1	8	1	-1
1	9	0	0
1	10	-1	1
2	1	0	$\sqrt{2}$
2	2	$-\sqrt{2}$	0
2	3	-1	-1
2	4	0	0
2	5	0	$-\sqrt{2}$
2	6	$\sqrt{2}$	0
2	7	1	1
2	8	1	-1
2	9	0	0
2	10	-1	1
3	1	0	$\sqrt{2}$
3	2	$-\sqrt{2}$	0
3	3	-1	-1
3	4	0	0
3	5	0	$-\sqrt{2}$
3	6	$\sqrt{2}$	0
3	7	1	1
3	8	1	-1
3	9	0	0
3	10	-1	1

La tabla 16 muestra el %p/v de los sólidos totales obtenidos, la tabla 17 el %p/v de azúcares reductores expresados como maltosa y la tabla 18 la respuesta evaluada, %p/v de dextrinas.

Tabla 16. %p/v de los sólidos totales en las soluciones de dextrinas obtenidas de

almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque			Valor Promedio	Desviación estándar	%DS
	1	2	3			
1	7,270	7,383	7,490	7,381	0,110	1,490
2	5,230	4,953	5,183	5,122	0,148	2,889
3	4,897	4,903	4,887	4,862	0,051	1,048
4	7,397	7,410	7,477	7,428	0,043	0,578
5	6,777	6,997	6,959	6,911	0,118	1,708
6	6,020	5,743	5,677	5,813	0,181	3,113
7	5,720	5,783	5,827	5,776	0,053	0,917
8	6,593	6,540	6,403	6,512	0,098	1,504
9	7,080	7,107	7,220	7,135	0,074	1,037
10	5,413	5,297	5,207	5,306	0,103	1,940

%DS (%desviación estándar)= (desviación estándar / valor promedio)*100

Tabla 17. %p/v de azúcares reductores expresados como gramos de maltosa en la solución de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque			Valor Promedio	Desviación estándar	%DS
	1	2	3			
1	0,947	0,970	0,980	0,965	0,016	1,658
2	0,513	0,55	0,567	0,543	0,027	4,972
3	0,523	0,573	0,603	0,566	0,040	0,714
4	0,713	0,747	0,760	0,740	0,024	3,243
5	0,477	0,413	0,452	0,447	0,032	7,204
6	0,217	0,237	0,207	0,220	0,015	6,818
7	0,747	0,717	0,833	0,765	0,060	7,843
8	0,257	0,303	0,300	0,286	0,025	8,741
9	0,770	0,703	0,780	0,751	0,041	5,459
10	0,780	0,750	0,823	0,784	0,037	4,693

%DS (%desviación estándar) = (valor promedio / desviación estándar)*100

De la tabla 16 se puede observar que el valor promedio de los %p/v de los sólidos totales en las soluciones de dextrinas entre 4,862 y 7,381, con desviaciones estándar entre 0,0530 y 0,181.

Las desviaciones estándar en este caso son menores del 3,2%. Lo que muestra una buena reproducibilidad en los resultados obtenidos.

Siguiendo un procedimiento similar al ejecutado para los resultados presentados en la tabla 17, podemos decir de la tabla 18 que el valor promedio de los %p/v de los azúcares reductores en las soluciones de dextrinas varía entre 0,286 y 0,965 y las desviaciones estándar varían entre 0,024 y 0,075.

Los %DS son aceptables, y en su varización deben considerarse factores, principalmente la precisión y la exactitud de los datos obtenidos en el espectrómetro.

Tabla 18. Respuesta evaluada (%p/v de dextrinas): diferencia sólidos totales menos cantidad de azúcares reductores como maltosa en las soluciones de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca

Experimento	Bloque		
	1	2	3
1	6,323	6,413	6,510
2	4,717	4,403	4,617
3	4,373	4,330	4,283
4	6,683	6,663	6,717
5	6,290	6,583	6,507
6	5,803	5,507	5,470
7	4,973	5,067	4,993
8	6,337	6,237	6,103
9	6,310	6,403	6,440
10	4,633	4,547	4,383

Con los datos reportados en la tabla 18, y utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4,0 se obtuvo el modelo matemático polinómico descrito por la ecuación 6, el cual corresponde a la representación matemática más adecuada para describir el comportamiento que relaciona la respuesta evaluada, %p/v de dextrinas y las variables independientes, concentración del sustrato y tiempo de reacción.

Modelo obtenido:
(Ec. 6)

$$\%p/v \text{ de dextrinas} = 6,487 + 0,835*[s] - 0,495*t - 0,700*[s]^2 - 0,238*[s]^3 + 0,240*t^3 - 0,765*[s]^2*t^2 - 0,352*[s]*t^3$$

➤ **Análisis matemático.** En las tablas 18, 19 y 20 se muestran los análisis de regresión múltiple, análisis de varianza y coeficientes estadísticos para el modelo matemático obtenido.

Tabla 19. Análisis de regresión múltiple del modelo obtenido (Ec. 6)

Parámetro	Estimado	Error estándar	Valor P
constante	6,487	0,040	0,000
[s]	0,835	0,090	0,000
T	-0,495	0,090	0,000
[s] ²	-0,700	0,065	0,000
[s] ³	-0,238	0,057	0,000
t ³	0,240	0,053	0,000
[s] ² * t ²	-0,765	0,053	0,000
[s]* t ³	-0,352	0,040	0,000

El valor estadístico P determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables independientes sobre el modelo, el valor del estadístico – P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 99% (ver tabla 19).

Tabla 20. Análisis de varianza del modelo obtenido (Ec. 6)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Factor F
Modelo	23,112	7	3,302	169,810
Residual	0,429	22	0,019	-
total(Corr.)	23,531	29	-	-

Corr.= correlación

Tabla 21. Coeficiente estadístico F para el modelo descrito por la Ec. 6

Valor F				
Valor F de tablas (7 / 22)			Ecuación 6	
F (95%)	F (99,9%)	F (experimental)	% R²	% Error
2,460	5,440	169,680	98,183	0,098

Al comparar los valores estadísticos F con grados de libertad de 7 y 22 (para un nivel de confianza de 95,0 y 99,9% respectivamente) reportados en la literatura con el F obtenido para el modelo, se observa que el F del modelo es mayor en ambos casos y por lo tanto el modelo matemático es significativo para un nivel de confianza del 99,9%.

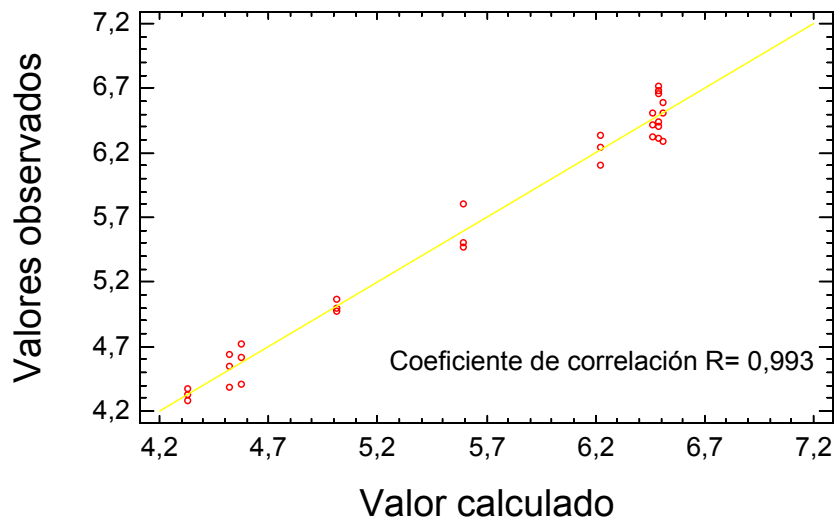
El factor estadístico R-cuadrado indica que el modelo con el ajuste realizado explica el 98,183% de la variabilidad con respecto a la respuesta, %p/v de dextrinas.

El error estándar del cálculo aproximado indica que la desviación estándar de los residuales es de 0,098.

➤ **Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas Vs. %p/v de valores obtenidos experimentalmente.** La gráfica 3 muestra los valores teóricos y experimentales a lo largo de la matriz de trabajo. Para esta gráfica, en

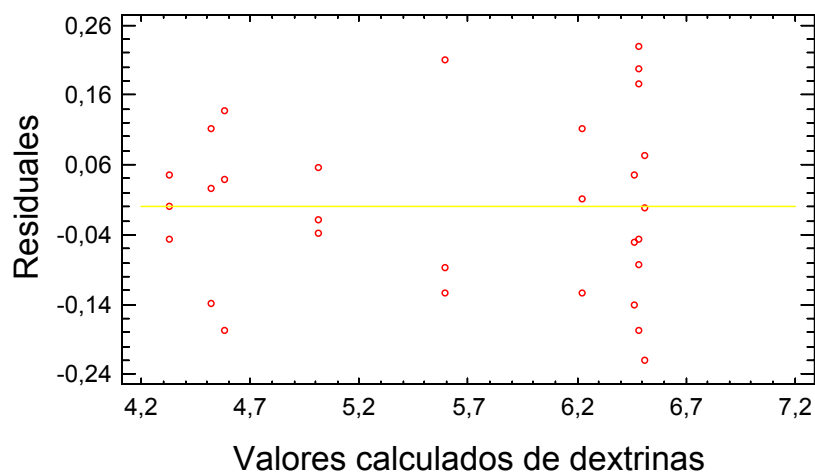
comparación con la gráfica 1, los valores se encuentran mucho más cerca de la diagonal; representado este valor por el coeficiente de correlación lineal, por lo que el modelo matemático obtenido (Ec. 6) es satisfactorio para explicar los resultados obtenidos.

Gráfica 3. Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas Vs. %p/v de valores obtenidos experimentalmente



➤ **Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas Vs. %p/v de dextrinas residuales.** Del análisis de la gráfica 4 se puede concluir que el modelo es adecuado para explicar el comportamiento de la variable dependiente teniendo en cuenta que no existe relación alguna entre los puntos correspondientes a las dos variables graficadas.

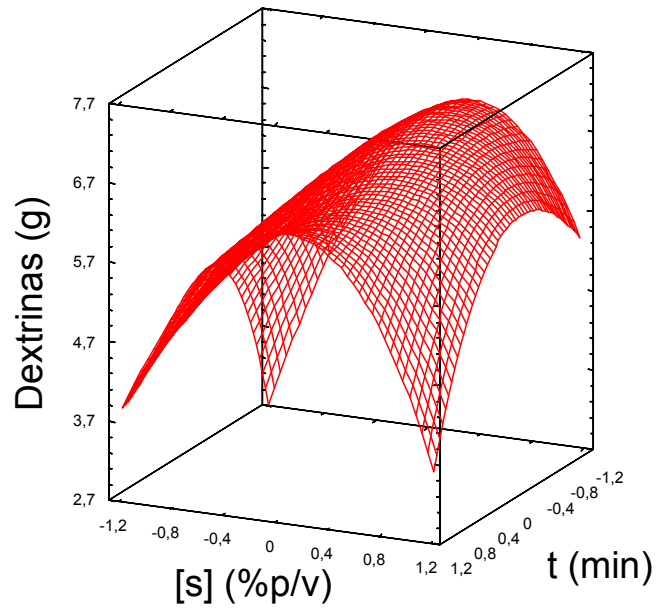
Gráfica 4. Gráfica de %p/v de dextrinas calculadas mediante el modelo obtenido (Ec. 6) Vs. %p/v de dextrinas residuales



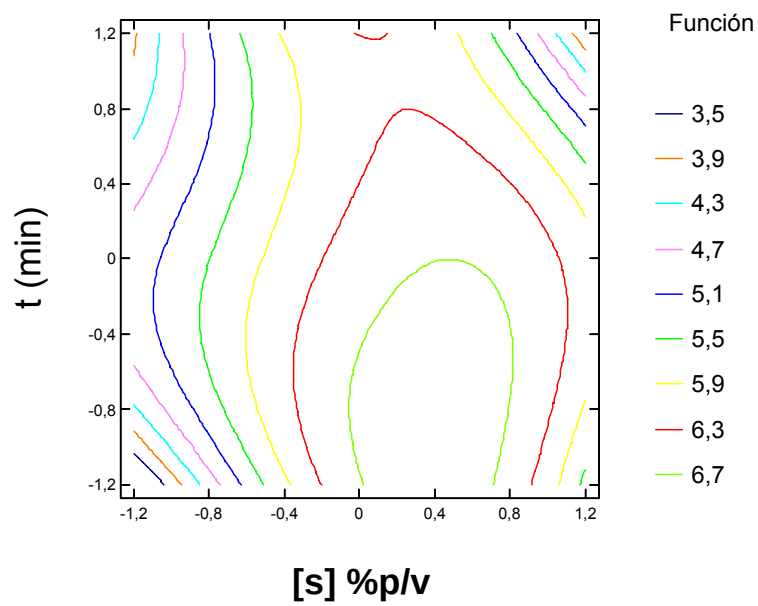
Una vez concluidos los análisis matemáticos y gráficos para el modelo obtenido, se procedió a la construcción gráfica del modelo matemático encontrado (figura-2).

Con el modelo gráfico de la ecuación 6 (Fig. 2) y con la ayuda del contorno de la superficie de respuesta (gráfica 5) es posible determinar por interpolación de datos los valores adecuados de las variables independientes [s] y t para obtener los mayores valores de dextrinas. Es necesario aclarar que los valores mostrados de las variables independientes en la superficie de respuesta como en el contorno de la superficie corresponden a los valores normalizados.

Fig. 2. Superficie de respuesta correspondiente al modelo matemático descrito por la ecuación 6



Gráfica 5. Contorno de la superficie de respuesta del modelo matemático descrito por la ecuación 6



3.1 VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DEL MODELO OBTENIDO

La validación del modelo descrito por la ecuación 6 se realizó con volúmenes de reacción de 200 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Validación del modelo descrito por la ecuación 6

Condiciones de reacción Dextrinas en solución					
Tiempo (min)	Conc. almidón (%p/v)	Experimental	Calculado	% Error absoluto	% Rendimiento de la reacción
12,000	6,000	6,367	6,700	4,970	95,030
14,300	6,000	6,300	6,730	6,430	93,611
12,000	6,250	6,400	6,900	7,240	92,754
14,300	6,250	6,500	6,933	6,250	93,754

Conc.:concentración

En esta tabla se observa que la cantidad de producto obtenido, dextrinas, aparece en cantidades mayores que la cantidad inicial de sustrato, el almidón, esto se explica teniendo en cuenta que por cada hidrólisis amilásica se obtiene una ganancia en peso de 18 g/mol.

Los datos de validación del modelo matemático no sobrepasan un porcentaje de error del 10% (ver tabla 22), lo que indica que el modelo se ajusta experimentalmente a la ecuación 6; que representa la influencia de las variables tiempo y concentración de almidón sobre producción de dextrinas.

Por inspección directa de las líneas de nivel de la gráfica 5, se observa que para obtener altos porcentajes de conversión ($\geq 90\%$) en el proceso de hidrólisis del almidón a dextrinas, se necesitan valores normalizados de tiempos de reacción desde -1,2 hasta 0 y de concentración de almidón en los intervalos de 0 a 0,75; que cuales corresponden a intervalos de tiempo de 10 a 17 minutos y a concentraciones de almidón del 6,00 al 6,37 % p/v.

CONCLUSIONES

- Las variables mas relevantes en la obtención de dextrinas a partir de almidón industrial de yuca, catalizada por la enzima α -amilasa son concentración de almidón y tiempo de reacción.
- El máximo rendimiento en la obtención de dextrinas (92,5 – 94,5%) se obtuvo con concentraciones de almidón entre 6,00 y 6,25 % p/v, concentración de α -amilasa de $1,75 \cdot 10^{-3}$ % p/v, tiempos de reacción de 12 a 15 minutos, temperatura de 55°C y pH de 4,7.
- Las dextrinas obtenidas, almacenadas a 25°C no retrogradaron antes de 12 días.
- Las dextrinas obtenidas, almacenadas a temperaturas inferiores a 8°C retrogradaron antes de 2 horas.

RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de la variedad de yuca sobre la obtención de dextrinas y sobre su retrogradación.
- Estudiar el efecto de la temperatura sobre la retrogradación de dextrinas obtenidas a partir de almidón de yuca.
- Estudiar la factibilidad del montaje de una planta productora de dextrinas obtenidas de almidón de yuca a escala planta piloto.
- Estudiar el efecto de concentraciones de almidón de yuca superiores al 10% p/v sobre la obtención y retrogradación de dextrinas.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Estudio del servicio de agroindustrias y gestión postcosecha del departamento de agricultura de la FAO. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9809/spot3.htm>.

² Johanna Aristizábal. Nueva tecnología para la producción de almidones modificados por vía seca. http://www.clayuca.org/clayucanet/produccion_dextrinas.htm.

³ Acosta M. P. y Salcedo M. C. 2004. Estudio de las aplicaciones industriales, potencial de mercado en Colombia y diseño de un producto a partir de pirodextrinas de yuca. Trabajo de grado realizado en CLAYUCA para optar el título de Ingeniero Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Cali, Colombia.

⁴ Científicos colombianos investigan usos alternativos de la yuca: <http://www.cci.org.co/publicaciones/Noticiero/noticiero%2042.doc>

⁵ Yamile Ramírez Calero. Posibilidad de uso de algunos almidones de raíces y tubérculos en la elaboración de adhesivos. <http://www.pronatta/proyectos/pdf/public/981411033>.

⁶ Ana Lucía Cortes Gavilanes. Aplicación de enzimas en producción industrial. <http://www.procesosvirtuales.com/documentos/archivos/DT-BT01-003.pdf>.

⁷ Rodríguez Álvarez, Claudia Carolina. 2002. Estudio de obtención de dextrinas de yuca para alimentos por ruta seca. Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia.

⁸ Alarcón M. , F. , Parga C. , G. L. , Rincón O. , J. C. 1989. Obtención de dextrinas a partir del almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). Universidad del Quindío, Facultad de Educación, Armenia, CO.

⁹ Díaz Alarcón Miguel Ángel. 2002. Estudio de la modificación vía enzimática de almidón de yuca para la obtención de maltodextrinas aplicables a productos alimenticios. Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia.

¹⁰ Alison M. Smith. 2001. The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules*, 2 (2), 335 –341.

¹¹ Asa Rindlav-Westling and Paul Gatenholm. 2003. Surface Composition and Morphology of Starch, Amylose, and Amylopectin Films. *Biomacromolecules*, 4 (1), 166 –172.

¹² Fermenta O. 2000. Química de los Alimentos. Zaragoza, España: ACRIBTA. p 228 – 240.

¹³ Whistler Roy L. 1964. Methods in carbohydrate chemistry: Starch. Vol. IV: Starch. London: Academic Press.

¹⁴ Linden G. , Lorient D. 1996. Bioquímica agroindustrial: Revalorización Alimentaria de la Producción Agrícola. Zaragoza: ACRIBTA. p. 297 – 298.

¹⁵ Cristina López, Ana Torrado, Pablo Fucinos, Nelson P. Guerra, and Lorenzo Pastrana. 2004. Enzymatic Hydrolysis of Chestnut Puree: Process Optimization Using Mixtures of α -Amylase and Glucoamylase. *J. Agric. Food Chem.* , 52 (10), 2907 –2914.

¹⁶ Jean-Luc Putaux, Sonia Molina-Boisseau, Thomas Momaour, and Alain Dufresne. 2003. Platelet Nanocrystals Resulting from the Disruption of Waxy Maize Starch Granules by Acid Hydrolysis. *Biomacromolecules*, 4 (5), 1198 –1202.

¹⁷ Handler White Smith. 1982. Principles of Biochemistry. USA: McGraw-Hill. p. 49 – 50.

¹⁸ Yuan Yao, Jingmin Zhang, and Xiaolin Ding. 2002. Structure-Retrogradation Relationship of Rice Starch in Purified Starches and Cooked Rice Grains: A Statistical Investigation. *J. Agric. Food Chem.* , 50 (25), 7420 –7425.

-
- ¹⁹ Robert D. Hancock and Bryon J. Tarbet. The other double helix-The fascinating chemistry of starch. 2000. Journal Chem. Ed. 77:88-992.
- ²⁰ Reed G. 1975. Enzymes in Food Processing. London: academic press. p 62 – 81.
- ²¹ Alarcon F. y Dominique D. 1998. Almidón Agrio de Yuca en Colombia: Producción y Recomendaciones. Tomo 1. Cali. p. 20.
- ²² Maciej Fiedorowicz and Gohar Chaczatryan. 2003. Effect of Illumination with the Visible Polarized and Nonpolarized Light on α -Amylolysis of Starches of Different Botanical Origin Agric. J. Food Chem. , 51 (26), 7815 -7819.
- ²³ Kenneth S. Lewen, Teri Paeschke, Joshua Reid, Paul Molitor, and Shelly J. Schmidt. 2003. Analysis of the Retrogradation of Low Starch Concentration Gels Using Differential Scanning Calorimetry, Rheology, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J. Agric. Food Chem. , 51 (8), 2348 –2358.
- ²⁴ Fisher, D. K.; Thompson, D. B.1997. Retrogradation of Maize Starch After Thermal Treatment Within and Above the Gelatinization Temperature Range. Cereal Chem., 74, 344-351.
- ²⁵ Tri Agus Siswoyo and Naofumi Morita. 2001. Influence of Acyl Chain Lengths in Mono- and Diacyl-sn-glycerophosphatidylcholine on Gelatinization and Retrogradation of Starch. J. Agric. Food Chem., 49 (10), 4688 -4693.
- ²⁶ Klucinec, J. D. ; Thompson, D. B. 2002. Amylopectin nature and amylose-to-amylopectin ratio as influences on the behavior of gels of dispersed starch. Cereal Chem. 79, 24-35.
- ²⁷ Yuan Yao, Jingmin Zhang, and Xiaolin Ding Klucinec. 2003. Partial α -Amylolysis Retards Starch Retrogradation in Rice Products. J. Agric. Food Chem. , 51 (14), 4066 -4071.

-
- ²⁸ Shi Y. C. ; Seib, P. A. 1992. The structure of 4 waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydr.* , 227, 131-145.
- ²⁹ Fredriksson, H. ; Silverio, J. ; Andersson, R. ; Eliasson, A. C. ; Aman, P. 1998. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydr. Polym.* 35, 119-134.
- ³⁰ Fan J. Marks, B. P. 1998. Retrogradation kinetics of rice flours as influenced by cultivar. *Cereal Chem.* 75, 153-155.
- ³¹ Sasaki, T. Yasui, T. ; Matsuki, J. 200. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. *Cereal Chem.* 77, 58-63.
- ³² Appelqvist I. A. M. ; Debet M. R. M. 1997. Starch-biopolymer interactions - A review. *Food Rev. Int.* 13, 163-224.
- ³³ Escarpa A. ; Gonzalez, M. C. ; Morales, M. D. ; Saura Calixto, F. 1997. An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. *Food Chem.* 60, 527-532.
- ³⁴ Biliaderis C. G. ; Tonogai J. R. 1991. Influence of lipids on the thermal and mechanical-properties of concentrated starch gels. *J. Agric. Food Chem.* 39, 833-840.
- ³⁵ Rao P. A. ; Nussinovitch, A. ; Chinachoti P. 1992. Effects of selected surfactants on amylopectin recrystallization and on recoverability of bread crumb during storage. *Cereal Chem.* 69, 613-618.
- ³⁶ Eliasson A. C. 1994. Interactions between starch and lipids studied by DSC. *Thermochim. Acta* 246, 343-356.
- ³⁷ Svensson E. ; Autio K. ; Eliasson A. C. 1998. The effect of sodium dodecyl sulfate on gelatinization and gelation properties of wheat and potato starches. *Food Hydrocolloids* 12, 151-158.

-
- ³⁸ Biliaderis C. G. ; Prokopowich D. J. 1994. Effect of polyhydroxy compounds on structure formation in waxy maize starch gels - a calorimetric study. *Carbohydr. Polym.* 23, 193-202.
- ³⁹ Gudmundsson M. 1994. Retrogradation of Starch and the Role of Its Components. *Thermochim. Acta* 246, 329-341.
- ⁴⁰ Parker R. ; Ring, S. G. 2001. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *J. Cereal Sci.* 34, 1-17.
- ⁴¹ Levine H. ; Slade, L. 1998. Non-Equilibrium Behavior of Small Carbohydrate-Water Systems. *Pure Appl. Chem.* 60, 1841.
- ⁴² Karim A. A. ; Norziah, M. H. ; Seow C. C. 2000. Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chem.* 71, 9-36.
- ⁴³ Appelqvist I. A. M. ; Martine R. M. D. 1997. Starch - Biopolymer Interactions - A Review. *Food Rev. Int.* , 13, 163-224.
- ⁴⁴ Kenneth S. Lewen, Teri Paeschke, Joshua Reid, Paul Molitor, and Shelly J. 2003. Analysis of the Retrogradation of Low Starch Concentration Gels Using Differential Scanning Calorimetry, Rheology, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* , 51 (8), 2348 –2358.
- ⁴⁵ Lu, S.; Chen, L. N.; Lii, C. Y. 1997. Correlations between the fine structure, physicochemical properties, and retrogradation of amylopectins from Taiwan rice varieties. *Cereal Chem.*, 74, 34-39.
- ⁴⁶ Wursch, P.; Gumy, D. 1994. Inhibition of amylopectin retrogradation by partial beta-amyolysis. *Carbohydr. Res.*, 256, 129-137.
- ⁴⁷ Gudmundsson M. 1994. Retrogradation of Starch and the Role of Its Components. *Thermochim.* , 246, 329-341.

-
- ⁴⁸ Parker, R., Biliaderis, C. G.; Zawistowski, J. Viscoelastic. 1990. Behavior of Aging Starch Gels: Effects of Concentration, Temperature, and Starch Hydrolysates on Network Properties. *Cereal Chem.* , 67, 240-246.
- ⁴⁹ Primo Eduardo. 1998. *Química de los Alimentos*. España: Síntesis. 1998. p 123 – 124.
- ⁵⁰ Pearson, David. 1997. *The Chemical Analysis of Foods*. 7^{ma} ed. Chemical Publishing. New York p. 1 – 572.
- ⁵¹ Schwimmer Sigmund. 1981. *Source Book of Enzymology*. U. S. A: The AVIPUBLISHING Company. p. 4, 114, 154 – 158, 174, 675.
- ⁵² Helena S. Azevedo, Francisco M. Gama, and Rui L. Reis. 2003. In Vitro Assessment of the Enzymatic Degradation of Several Starch Based Biomaterials. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1703 -1712.
- ⁵³ Byoung-Wook Kong, Jung-In Kim, Myo-Jeong Kim, and Jae Cherl Kim. 2003. Porcine Pancreatic -Amylase Hydrolysis of Native Starch Granules as a Function of Granule Surface Area. *Biotechnol. Prog.* , 19 (4), 1162 –1166.
- ⁵⁴ Alexander Laurentin, Marite Cardenas, Jenny Ruales, Elevina Perez, and Juscelino Tovar. 2003. Preparation of Indigestible Pyrodextrins from Different Starch Sources. *J. Agric. Food Chem.* , 51 (18), 5510 -5515.
- ⁵⁵ Lee Clark P (US); Antrim Richard L (US). 2001-09-07. Process for preparing dextrans. WO0164933.
- ⁵⁶ Lee Clark P (US); Antrim Richard L (US). 2001-11-29. Process for preparing dextrans. US2001046690.
- ⁵⁷ Whistler Roy L. 1967. *Methods In Carbohydrate Chemistry*. Volume II: Starch. London: Academic Press.

⁵⁸ Araque Pabon, Marilse; Salcedo Vergel, Hugo Roman. 1988. Fabricación de dextrina a partir de almidones de yuca y papa, para utilizar como aglomerante en arenas de moldeo. Tesis de grado Universidad Industrial de Santander.

⁵⁹ Corn Prod Refining Co. 1957-05-08. Improvements in or relating to the production of dispersions in starch. GB774549.

⁶⁰ Badino C. y Bonnet A. 1979. Obtención del alcohol etílico a partir de la yuca. Tesis de grado Universidad Industrial de Santander.

⁶¹ Fox P. F. 1991. Food enzymology. New York: Elsevier Applied Science.

⁶² Hernandez Escalante Humberto. 1987. Aislamiento y purificación de amilasa alfa y beta a partir de un extracto enzimático de Manihot Sculenta. Tesis de grado Universidad Industrial de Santander.

⁶³ Junes Mark M. at el. 1969. Química. México: Interamericana. 1969.

⁶⁴ Mueller Hans DR ING (CH). 1979-01-31. Process for the preparation of dextrose and dextrans from protein-containing starch raw materials. CH608830.

⁶⁵ Fitt Larry E (US); Pienkowski James J (US); Wallace Jack R (US) 1992-02-12. High-speed starch-based corrugating adhesive containing a carrier phase comprised of starch, modified starch or dextrin and polyvinyl alcohol. EP0470748.

⁶⁶ Bozich Jr Frank A (US). 1990-05-01. Method for producing high solids dextrin adhesives. US4921795.

⁶⁷ Fitt Larry E (US); Pienkowski James J (US); Wallace Jack R (US). 1992-02-12. High-speed starch-based corrugating adhesive containing a carrier phase comprised of starch, modified starch or dextrin and polyvinyl alcohol. EP0470748.

⁶⁸ Nelson, D. L. , Cox, M. M. . 2000. Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Third Edition, N. Y.

⁶⁹ Asté Mathieu. 1994. Valorisation du Manioc en Amérique Latine. Cali: CIAT. p 11, 12, 15 –19.

⁷⁰ Stuart Tipson R. 1974. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York: Academic Press. p 276 – 279, 285 – 293.

⁷¹ Sims Kevin A. and Cherian Munir. 1992. Hydrolysis of Liquefied Corn Starch in a Membrane Reactor. Biotechnology and Bioengineer 39: 960 – 967.

⁷² Ulibarri R. López and Hall G. M. 1997. Saccharification of Cassava Flour Starch in a Hollow-Fiber Membrane Reactor. 21:398 – 404.

⁷³ Akerberg Christina, Zacchi Guido, Torto Nelson y Gorton L. 2000. A Kinetic Model for Enzymatic Wheat Starch Saccharification. J. Chem. Tech. Biotechnol. 75: 306 – 314.

⁷⁴ Crueger Wulf, Crueger Anneliese. 1990. Biotechnology: Un Textbook of industrial Microbiology. USA: Sinaver Associates. p 191 – 198.

⁷⁵ Brimacombe J. S. 1976. Carbohydrate Chemistry. Vol. III. Great Britain: John Wright and sons Ltd. p 359 – 371.

⁷⁶ Brimacombe J. S. 1977. Carbohydrate Chemistry. Vol. IX. Great Britain: John Wright and sons Ltd. p 355 – 372.

⁷⁷ Whistler Roy L. , Smith Robert J. , Be Miller James N. y Wolfrom, M. L. 1964. Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. IV: Starch. New York: Academic press. p 335.

⁷⁸ Boyer D. , Lardy H. Myrback. 1960. The Enzymes. Vol. 4. London: Academic Press. p 313 – 368.

⁷⁹ Patcharin Raviyan, Juming Tang, and Barbara A. Rasco. 2003. Thermal Stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae* Entrapped in Polyacrylamide Gel. *J. Agric. Food Chem.* , 51 (18), 5462 –5466.

⁸⁰ Brimacombe J. S. 1973. *Carbohydrate Chemistry*. Vol. VI. Great Britain: John Wright and sons Ltd. p 430 – 440.

⁸¹ K. S. Atia, S. A. Ismail, M. B. El-Arnaouty, and A. M. Dessouki. 2003. Use of Co-Immobilized α -Amylase and Pullulanase in Reduction of Saccharification Time of Starch and Increase in Maltose Yield. *Biotechnol. Prog.* , 19 (3), 853 -857.

⁸² Wieland H. 1972. *Enzymes in Food Processing and Products*. New Jersey: Noyes Data Corporation. p 38 – 56.

⁸³ Bautista Fernando L. , Martínez Mercedes y Aracil José. 1999. Adsorption Equilibrium of α -amylase in Aqueous Solutions. *AIChE Journal* 45: 761 – 766.

⁸⁴ Marchal L. M. Jonkers J. , De Gooijer CD. Tramper J. 1999. The effect of process conditions on the α -amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch. An experimental – design approach. *Biotechnology and Bioengineer* 62: 348 – 357.

⁸⁵ Marchal L. , M. Van de Laar, A. M. J. , Goetheer E. , Schimmelpennink E. B. Bergsma, J. Beeftink, H. H. , Tramper, J. 1999. Effect of Temperature on the Saccharide Composition Obtained After α -Amylolysis of Starch. *Biotechnology and Bioengineer* 63: 344 – 355.

⁸⁶ Brimacombe J. S. 1975. *Carbohydrate Chemistry*. Vol. VII. Great Britain: John Wright and sons Ltd. 1975. p 432 – 433.

⁸⁷ Sanjeev Kumar and T. Satyanarayana. 2003. Purification and Kinetics of a Raw Starch-Hydrolyzing, Thermostable, and Neutral Glucoamylase of the Thermophilic Mold *Thermomucor indicae-seudaticae*. *Biotechnol. Prog.* , 19 (3), 936 -944.

⁸⁸ Plummer David T. 1981. Introducción a la Bioquímica Práctica. Bogotá: McGraw Hill. p 120 – 124, 232 – 234.

⁸⁹ Box P. , et al. 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona: Reverte.

⁹⁰ Almidón ALMIYUCA, Industria del Maíz. Cali, Colombia.

⁹¹ Sánchez López Alberto. 2002. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile) cultivadas en la provincia de Guanenta (Santander). Tesis de grado Universidad Industrial de Santander.

⁹² Nakamura Shoichiro. Análisis Numérico y Visualización Gráfica con MATLAB. Traducción de García, Roberto E. Prentice - HALL Hispanoamericana. México, 1997. p 476.

ANEXOS

Anexo 1

1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALTOSA

Para determinar la concentración de maltosa se realizó una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de maltosa.

Para esto, se prepararon soluciones de maltosa de 314,00, 401,92, 552,64, 690,80 y 879,20 ppm y se registraron sus absorbancias a una longitud de onda de 540 nm después de que se hicieron reaccionar con el DNS.

1.1 OBTENCIÓN DE LOS DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

En un tubo de ensayo con tapa se mezclaron 1 mL de solución de maltosa de concentración conocida con 1 mL del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Después de agitar la mezcla se dejó reaccionar en un termo reactor a 97°C durante 5 min. La reacción se detuvo enfriando el tubo de ensayo en un baño de agua hielo durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron 2 mL de agua des-ionizada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Para el blanco se utilizó el procedimiento anterior pero en lugar de solución de maltosa se adicionó agua des-ionizada.

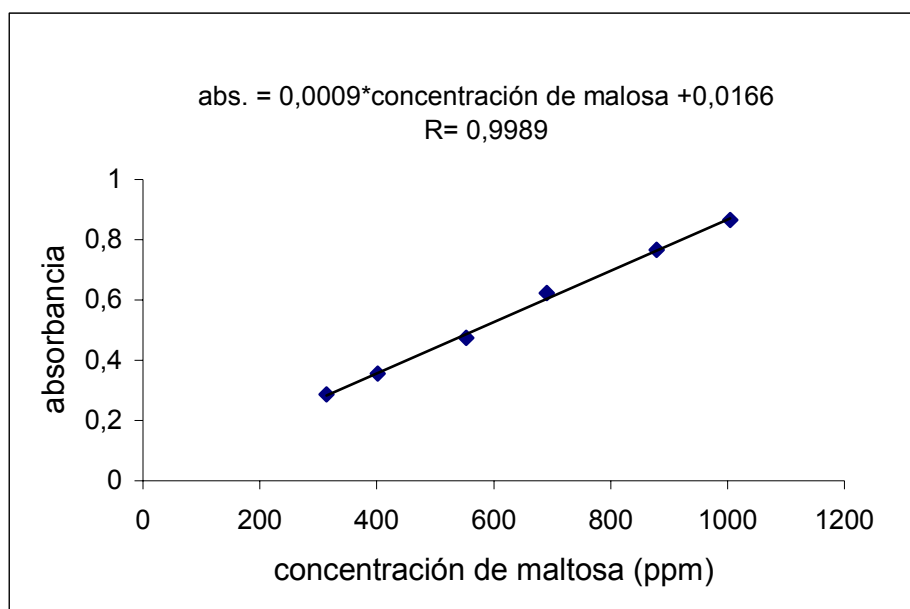
1.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

La tabla 23 muestra los datos de absorbancia de las soluciones de maltosa utilizadas en la construcción de la curva de calibración. El factor de correlación ($R=0,999$, ver gráfica 6) indica que en el intervalo de concentraciones de maltosa trabajado se cumple la ley de Beer.

Tabla 23. Absorbancia a 540 nm del complejo DNS-maltosa

Concentración de maltosa (ppm)	Absorbancia registrada
314,000	0,286
401,920	0,355
552,640	0,475
690,800	0,623
879,200	0,766
1004,800	0,865

Gráfica 6. Curva de concentración de maltosa en función de la absorbancia (540 nm)



abs.:absorbancia

2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ALFA- 1, 4- D- GLUCANO GLUCANOHIDROLASA (EC. 3.2.1.1)

La actividad enzimática de α -amilasa (alfa- 1,4- D- glucano glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1.) (de origen fúngico, Fungamyl® 2500BG⁹², Novo Nordisk), se determinó por el método propuesto por Wieland , con algunas modificaciones.

1. Se preparó una solución de almidón (s) en buffer de acetato de sodio (0,016 M, pH 4,7), cuya concentración final fue 10 mg de S/ mL.
2. El almidón se gelatinizó a 75 °C durante 15 min y se agregó cloruro de calcio al 1% p/v.
3. Se mezcló 1 mL de almidón gelatinizado con 1 mL de solución de enzima α -amilasa, de tal forma que la concentración final fue 0,3 % g de enzima/ g de S.
4. Esta mezcla fue incubada en un baño termostatado a 55 °C durante 5 min.
5. Seguidamente, se agregó a la mezcla 2 mL del reactivo DNS y se dejó reaccionar en un termo reactor a 97 °C durante 5 min.
6. La reacción se detuvo dejándola en un baño de agua hielo por 5 min. Posteriormente se agregaron 4 mL de agua des-ionizada y se dejó en reposo durante 5 min.
7. Se leyó la absorbancia a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior pero agregando agua des-ionizada en lugar de solución enzimática.
8. La cuantificación de la actividad enzimática se realizó determinando la concentración de grupos reductores, expresados como maltosa, por interpolación en la curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de maltosa. Para el cálculo de la actividad de la enzima alfa amilasa se utilizó la ecuación 7.

$$\text{Actividad de alfa - amilasa (UI / mg)} = \frac{m * V_T * 10^6}{W_E * PM * t} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

m: Concentración de maltosa (g/ L)
 V_T: Volumen total de reacción (L)
 W_E: Peso de enzima alfa-amilasa (g)
 PM: Peso molecular de maltosa (g/ mol)
 t: Tiempo de reacción (min.)

En la tabla 24 se presentan los valores de la actividad de la enzima α-amilasa, obtenidos empleando la ecuación 7.

Tabla 24. Actividad de la enzima α-amilasa

Sustrato	Actividad (UI/mg)
	238,00
Almidón industrial de yuca	235,00
	239,00
Valor promedio	237,33

El valor promedio de la actividad enzimática brinda un estimativo del rendimiento del proceso de catálisis enzimática sobre este tipo específico de variedad de almidón.

Los valores encontrados para la actividad enzimática son coincidentes con los reportados en la literatura bajo condiciones similares de reacción (pH, temperatura, relación enzima/almidón y cantidad de cofactor).

La actividad enzimática esta expresada en unidades internacionales (UI). Una UI se define como la cantidad de enzima (alfa- amilasa) necesaria para liberar 1 micromol de grupos reductores por minuto calculados como maltosa.

Anexo 2

En la determinación de la glucosa se utilizó el kit SERAPACK Plus. El procedimiento experimental se muestra a continuación:

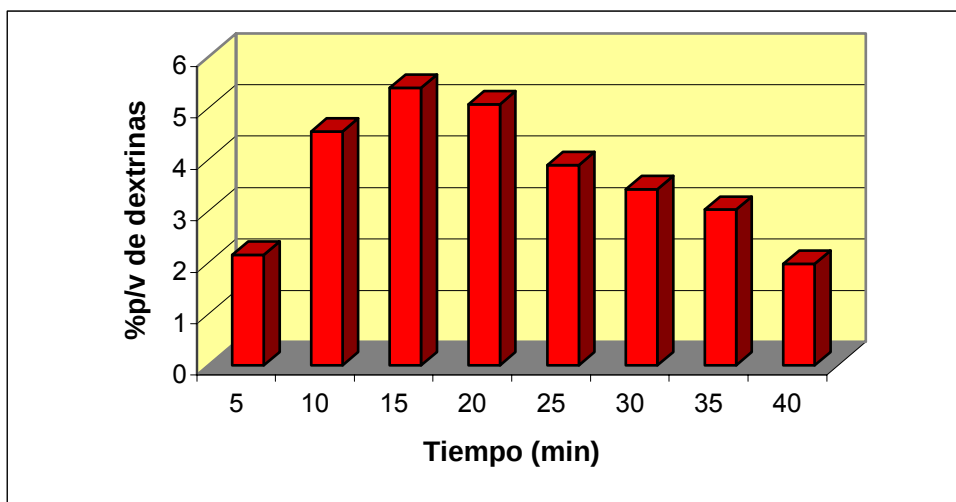
Tabla 25. Metodología seguida para la determinación de glucosa

	REACTIVO	BLANCO	MUESTRA	ESTÁNDAR
Kit (mL)	1,0	1,0	1,0	
Patrón (mL)	-	-	0,01	
Muestra (mL)	-	0,01	-	
Agua desionizada	0,01	-	-	

Se calibra el 0 de absorbancia con el blanco y se mide la absorbancia (500nm) de la muestra y del estándar.

Anexo 3

Gráfica 7. %p/v de dextrinas obtenidas a diferentes tiempos de reacción (ver tabla 7)



Anexo 4

Gráfica 8. Concentración de glucosa (%p/v) de las soluciones de dextrinas obtenidas de almidón industrial de yuca a tiempos de 1 a 4 horas, incubadas a temperatura de 58°C (ver tabla 8)

