

OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE MALTODEXTRINA POR
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA EN LA EMPRESA
PROMITEC SANTANDER S.A.

ERICK IVAN GONZALEZ QUINTERO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010

OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE MALTODEXTRINA POR
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA EN LA EMPRESA
PROMITEC SANTANDER S.A.

ERICK IVAN GONZALEZ QUINTERO

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

PhD. Ramiro Martínez Rey

Codirector

Ingeniero Químico. Johann Humberto Peñuela

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010

Para gloria y alabanza de Dios Todopoderoso.

A Ruth Quintero Rojas, Andrea León Martínez, Javier Jerez Jaimes, Jorge Luis Grosso y a todas las personas que apoyaron incondicionalmente mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a las personas que se mencionan a continuación y a todas aquellas que de una u otra forma participaron en la realización del presente trabajo.

A todo el equipo de trabajo de PROMITEC Santander S.A y en especial a los Ingenieros Johann Humberto Peñuela y Heidy Yojana González por compartir sus conocimientos y estar presentes en toda la ejecución del proyecto.

A Ivonne M Otero por sus enseñanzas y su hospitalidad

A todos mis profesores por su comprensión, buen genio y sus valiosas enseñanzas.

A mis amigos, compañeros y personitas especiales por hacer inolvidable la experiencia Universitaria.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. CONCEPTO TEÓRICO	3
1.1. Almidón de yuca.	3
1.2. Gelatinización.	4
1.3. Retrogradación.	4
1.4. Hidrolizados de almidón.	4
1.4.1. Jarabes de maltodextrina.	5
1.4.2. Jarabe de glucosa.	6
1.4.3. Usos de los jarabes.	6
1.5. Producción de jarabes edulcorantes para la industria de alimenticia.	7
1.6. Enzimas.	8
1.6.1. Especificidad enzimática.	9
1.6.2. Alfa-amilasas.	9
1.6.3. Enzimas termoestables de origen bacteriano.	10
1.6.4. Actividad enzimática.	10
1.6.5. Periodos de latencia y desactivación enzimática	11
1.7. Efecto de los parámetros ambientales.	12
1.7.1. Temperatura.	12
1.7.2. Potencial de Hidrógeno (pH).	12
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	13
2.1. Metodología.	13
2.2. Documentación y aseguramiento del conocimiento	13
2.3. Recepción de muestras de almidón	13
2.4. Preselección de proveedores.	13
2.4.1. Licuefacción con -amilasas no termoestables	14
2.5. Construcción de hipótesis.	15

	Pág.
2.6. Determinación de la influencia de las variables enzimas de licuefacción termoestables, métodos de aplicación y procedencia del almidón, sobre la viscosidad en la etapa de gelatinización y los sedimentos resultantes en los jarabes de maltodextrina.	15
2.7. Comprobación de hipótesis	17
2.8. Determinación de azúcares reductores (ED)	17
2.9. Incremento en la concentración de almidón y estandarización de resultados.	17
2.10. Desactivación enzimática.	18
2.11. Escalado de la investigación a planta de procesos semi-industrial.	18
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	20
3.1. Experimentos de preselección de almidones.	20
3.2. Determinación de la influencia de las variables enzimas de licuefacción termoestables, métodos de aplicación y procedencia del almidón, sobre la viscosidad en la etapa de gelatinización y los sedimentos resultantes en los jarabes de maltodextrina.	21
3.3. Incremento en la concentración de almidón y estandarización de resultados.	23
3.4. Desactivación enzimática	24
3.5. Escalado de la investigación a la planta de procesos semi-industrial.	25
4. CONCLUSIONES.	27
5. RECOMENDACIONES.	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29
7. ANEXOS	32

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1:	Propiedades generales del almidón de yuca	3
Tabla 2:	Carbohidratos típicos en los jarabes comerciales de maltodextrina.	5
Tabla 3:	Variables y sus niveles para obtener las condiciones apropiadas para la etapa de licuefacción.	15
Tabla 4:	Seguimiento del Equivalente de Dextrosa (ED) respecto al tiempo después de la desactivación vía química de la enzima termoestable, 20 minutos a 95°C y pH: 3.8.	24
Tabla 5:	Seguimiento del Equivalente de Dextrosa (ED) respecto al tiempo después de la desactivación vía química de la enzima termoestable, 40 minutos a 95°C y pH: 3.0.	25

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Esquema de producción de maltodextrina.	8
Figura 2: Diagrama de Pareto de las variables independientes y %Sedimentos	22
Figura 3: Seguimiento del ED vs tiempo(min) de reacción con enzimas termoestables, 0.58 kg de enzima /t de almidón, temperatura 95°C, pH: 5.3.	23
Figura 4: Curvas de Licuefacción desarrolladas en laboratorio y planta de procesos semi-industrial usando enzimas termoestables=0.58 kg/t almidón, concentración de sustrato=20%, Temperatura=95 °C, pH=5.3.	26
Figura 5: Curva de calibración Absorbancia (540 nm) vs Concentración de glucosa.	36
Figura 6: Principales efectos de las variables de estudio sobre el % de sedimentos	39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A: DIAGRAMA DE BLOQUE DE LOS PROCESOS MÁS RELEVANTES, IMPLEMENTADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA PARA LA TRANSFORMACIÓN DEL ALMIDÓN EN EDULCORANTES	32
ANEXO B: PLAN DE TRABAJO POR ACTIVIDADES A REALIZAR DURANTE LA PRÁCTICA LABORAL	33
ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y EQUIVALENTE DE DEXTROSA (DE), MÉTODO CON DNS	34
ANEXO D: DISEÑO EXPERIMENTAL MULTINIVEL PARA LA ETAPA DE LICUEFACCIÓN.	38
ANEXO E: ANÁLISIS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS REALIZADO EN EL PROGRAMA ESTADÍSTICO STATGRAPHICS PLUS 5.1.	39
ANEXO F: ED VS TIEMPO DE REACCIÓN. [%16] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE=0.58 kg/t DE ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3.	41
ANEXO G: ED VS TIEMPO DE REACCIÓN. [%20] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE=0.58 kg /kg ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3	42
ANEXO H: ED VS TIEMPO DE REACCIÓN. [%30] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE =0.58 kg /t DE ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3.	43
ANEXO I: SEGUIMIENTO DE LA REACCIÓN DE LICUEFACCIÓN DESARROLLADA EN LA PLANTA DE PROCESOS SEMI-INDUSTRIAL USANDO ENZIMA TERMOESTABLE CONCENTRACIÓN DE ENZIMA=0.58 kg/t DE ALMIDÓN, ALMIDÓN=20%, TEMPERATURA=95 °C, pH=5.3	44

RESUMEN

TÍTULO*:

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE MALTODEXTRINA POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA EN LA EMPRESA PROMITEC SANTANDER S.A.

González Quintero Erick Iván, Ramiro Martínez Rey**, Peñuela Johann Humberto***

Palabras claves: Enzimas termoestables, sedimentos, edulcorantes.

En este trabajo se realizó la investigación y aplicación de nuevos métodos y productos enzimáticos, con el objetivo de ejercer un mayor control de la viscosidad durante la etapa de gelatinización del almidón y la reducción de los sedimentos que impiden realizar de forma eficiente la etapa de filtración del producto, optimizando en forma general el proceso de obtención de jarabes de maltodextrinas obtenidos mediante hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

Inicialmente se realizó la calificación de proveedores de almidón yuca y se determinó mediante pruebas cualitativas, la influencia que ejercen las diferentes marcas nacionales y extranjeras sobre la manifestación de sedimentos en el producto final. Con base en los resultados se continuó la investigación con dos marcas nuevas, las cuales cumplieron con los estándares mínimos de calidad requeridos para el proceso.

Posteriormente se propuso un diseño experimental factorial multinivel para determinar la influencia de las variables termoestabilidad enzimática, métodos de aplicación enzimática y calidad del almidón sobre la viscosidad y el porcentaje de sedimentos presentes en las etapas de gelatinización y licuefacción respectivamente. Teniendo en cuenta los excelentes resultados y con base en los experimentos destacados se llevó a cabo un proceso de documentación, estandarización y escalado a planta de procesos semi-industrial.

Los beneficios generados al proceso a partir de la investigación fueron: la eliminación de los problemas de viscosidad en la etapa de gelatinización, la reducción de los sedimentos en un 98%, el incremento promedio en la velocidad de filtración y evaporación de 7 y 1.3 veces, respectivamente. Adicionalmente se incrementó la velocidad de calentamiento durante la gelatinización en 1.25 veces y se obtuvo un incremento del 7% (base seca) en la concentración final de los jarabes de maltodextrina.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, programa de Ingeniería Química,
Director: PhD. Ramiro Martínez Rey.

***Codirector: Johann Humberto Peñuela, Ingeniero Químico

ABSTRACT

TITTLE*:

OPTIMIZATION OF MALTODEXTRIN SYRUP PRODUCTION BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CASSAVA STARCH DEVELOPED IN PROMITEC SANTANDER S.A.

González Quintero Erick Iván, Ramiro Martínez Rey**, Peñuela Johann Humberto**

Key words: Thermo stable enzymes, sediments, sweeteners.

The research and application of new methods and enzymatic products were performed in order to exercise greater control of viscosity during starch gelatinization stage and reducing sediments that prevent the filtration stage, optimizing in general the maltodextrin syrups production process by means enzymatic hydrolysis of cassava starch.

Initially, the qualification of cassava starch suppliers was carried out and the influence of physicochemical properties in the generation of sediments in the final product was determined by qualitative tests. Based in the results, the research continued using two new starch brands, which fulfilled the minimum standard requirements of quality for the process.

Subsequently a factorial multilevel experimental design was suggested to determine the influence of enzymatic thermostability, methods of enzymatic application and starch quality on the viscosity and the percentage of produced sediments in the gelatinization and liquefaction stages respectively. Considering the excellent results and based in the outstanding experiments, a process of documentation, standardization and scaled to semi-industrial plant level was carried out.

The investigation generated the following benefits: elimination of the problems of high viscosity in the gelatinization stage, 98% sediments reduction, the average increase in the filtration and evaporation rates by 7 and 1,3 times respectively. Additionally the heating rate was increased during gelatinization by 1.25 times and an increase of 7% (dry basis) in the final concentration of maltodextrin syrups was obtained.

*Degree Project

** Physicochemical Faculty of Engineering, chemical Engineering Program, Principal: PhD. Ramiro Martinez Rey, Chemical Engineering.

***Secondary: Johann Humberto Peñuela, Engineering Program.

INTRODUCCIÓN

Promotora de Innovación en Biotecnología PROMITEC SANTANDER S.A. es una empresa dedicada a la fabricación y comercialización de edulcorantes obtenidos a partir de almidón yuca mediante métodos enzimáticos.

En forma general el proceso productivo consta de siete etapas que comprenden: cargue o suspensión del almidón, gelatinización, licuefacción, sacarificación, filtración, evaporación y envasado. Las reacciones de licuefacción y sacarificación del almidón pre-gelatinizado se realizan en reactores *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR) y con la ayuda de biocatalizadores o enzimas industriales alfa-amilasas y glucoamilasas respectivamente.

Pese a los grandes avances tecnológicos realizados por la compañía, en el proceso se presentan múltiples problemas generados a partir de la complicada reología de la suspensión de almidón durante la gelatinización y la manifestación de gran cantidad de impurezas en forma de sedimentos durante la reacción, lo cual dificulta e incrementa el tiempo en un 25% y los costos de purificación (por filtración) del producto.

La elevada viscosidad durante la gelatinización es un factor que impide realizar un mezclado eficiente y ocasiona amplios gradientes de temperatura perjudiciales para el producto localizado cerca al serpentín de calentamiento. Simultáneamente esto incrementa el consumo de vapor de caldera debido a la mala transferencia de calor y se sobrecargan los equipos incrementando el consumo energético debido al exceso de potencia requerido por el sistema de agitación para mover la masa viscosa. Este problema causa múltiples paradas durante la producción por sobrecargas en sistema.

Estos inconvenientes ocasionan que el proceso pierda eficiencia, se generen grandes pérdidas económicas en subproductos indeseados, altos consumos energéticos que generan sobrecostos, incremento en los esfuerzos del personal de trabajo y contaminación ambiental. Todo lo anterior impacta negativamente los costos de fabricación de los edulcorantes nAT-BIO®.

Durante la práctica realizó una investigación minuciosa destinada a la selección y calificación de proveedores de almidón. Se mejoró la eficiencia global del proceso mediante la modificación de la primera etapa del proceso y el uso de enzimas termoestables, es decir realizando las etapas de gelatinización y licuefacción simultáneamente. La viscosidad de la mezcla se redujo considerablemente facilitando la agitación e incrementando la transferencia de calor debido a la buena homogenización de la solución.

El escalado (a 1.000 litros) y la implementación de los resultados de la investigación en la planta de procesos semi-industrial concluyó satisfactoriamente. Se eliminaron los problemas con los sedimentos en un 98% y se obtuvo un incremento promedio en la velocidad de filtración y evaporación de 7 y 1,3 veces, respectivamente. Adicionalmente se incrementó la velocidad de calentamiento durante la gelatinización en 1,25 veces y se obtuvo un incremento del 7% en la concentración final de los jarabes de maltodextrina.

Los avances logrados durante la práctica tienen efectos positivos en la calidad del producto y en la disminución sustancial de los costos de producción de los edulcorantes maltodextrina, glucosa y fructosa nATBIO® en PROMITEC Santander S.A.

1. CONCEPTO TEÓRICO

En la producción de jarabes de maltodextrina por vía enzimática se requiere la comprensión de los procesos de transformación del almidón a nivel molecular y posteriormente de manera ingenieril efectuar cambios y generar las condiciones apropiadas que optimicen al máximo los recursos involucrados en la planta de procesamiento. Por lo tanto, es conveniente estudiar el almidón y su estructura química así como las características y ventajas que presentan nuevos productos enzimáticos disponibles en el mercado.

1.1. Almidón de yuca

El almidón es principales componentes de los tubérculos de yuca. Está formado por cadenas α -glucosídicas conocidas como amilosas y amilopectinas que a su vez están formadas únicamente por el monómero de D-glucosa.

La amilosa es un polisacárido lineal formado por unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,4 entre el primer átomo de carbono y el cuarto de la unidad siguiente de glucosa.

La amilopectina es otro D-glucano que se diferencia de la amilosa por la presencia de ramificaciones; sus cadenas principales son unidades de glucosa unidas por el enlace α -1,4 y cada 15 a 20 unidades de moléculas lineales de glucosa se presenta una ramificación en los enlaces α -1,6. El grado de polimerización (DP) es mucho mayor que en la amilosa, alcanzándose pesos moleculares del orden de 200 millones de Daltons. En la tabla 1 se reportan algunas propiedades del almidón de yuca¹.

Tabla 1: Propiedades generales del almidón de yuca

Propiedades	Especificación
Tamaño de Granulo (eje mayor, μ m)	4 - 35
Amilosa (%W)	17 - 20
Amilopectina (%W)	80 - 83
Temperatura de Gelatinización ($^{\circ}$ C)	52 - 65
Viscosidad Relativa	Alta
Claridad de la pasta	Clara
Tendencia a Gelificar/Retrodegradar	Media
Sabor	Insípido
Calor de combustión (KJ/g)	17.6

1.2. Gelatinización

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

1.3. Retrogradación

Se refiere a la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que las cadenas lineales se orientan y se atraen entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples grupos hidroxilos; este fenómeno depende de la concentración y masa molecular de la amilosa, de la temperatura del sistema y del pH. Las soluciones de amilopectina no se retrogradan¹.

1.4. Hidrolizados de almidón

La disposición espacial de las capas que componen los granos de almidón son similares a las de una cebolla, con la diferencia que dichas capas no se pueden separar entre sí, sin embargo estas son destruidas por tratamientos hidrotérmicos o químicos. Estos procesos en presencia de agua y temperatura hacen estallar o desintegrar los gránulos de almidón dejando libres y disponibles las cadenas de amilosa y amilopectina^{1,6}.

La destrucción controlada o hidrólisis de las cadenas poliméricas liberadas dan lugar a la progresiva formación de cadenas cortas llamados dextrinas, lo mismo que maltosas y otros azúcares mayores y también monosacáridos como la glucosa.

¹ SANCHEZ.L.A. Tesis de grado: Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile). cultivadas en la provincia guanenta (Santander). Bucaramanga, Colombia 2002. P 10-22

⁶ CARREÑO.M.Y, RUGELES.C.C. Tesis de grado: Estudio a escala piloto del proceso de obtención de jarabes de glucosados por hidrólisis enzimática de almidón de yuca. Bucaramanga Colombia, 2005. P 16-52.

Para caracterizar los productos obtenidos por hidrólisis de almidón se utiliza un parámetro que se denomina porcentaje de equivalente de dextrosa (%DE), el cual asigna un valor cuantitativo que depende del porcentaje en peso de azúcares reductores presentes en el jarabe respecto al total de de sólidos o peso seco de jarabe (Ecuación 1)^{1,3}.

$$ED = \frac{W_{gr}}{W_{ST}} * 100 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

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

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

1.4.1. Jarabes de maltodextrina.

Los hidrolizados de almidón con ED inferior a 20 se denominan maltodextrinas las cuales se componen de una mezcla de sacáridos, polisacáridos y oligosacáridos con amplias distribuciones de pesos moleculares².

La composición en los jarabes de maltodextrina comúnmente se asocia al ED (tabla 2).

Tabla 2: Composición típica en los jarabes comerciales de Maltodextrina².

Composición de los jarabes de maltodextrina (% en base seca)					
Carbohidrato	DP	5 DE	10 DE	15DE	20DE
glucosa	1	<1	<1	<1	<1
maltosa	2	1	3	6	8
malto triosa	3	2	4	7	9
maltotetraosa	4	2	4	5	7
Pentosas	5	2	4	5	8
hexosas	6	3	7	11	14
polisacáridos +7G	7+	90	78	66	53

¹ SANCHEZ.L.A. Tesis de grado: Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile). cultivadas en la provincia guanenta (Santander). Bucaramanga, Colombia 2002. P 10-22

² BEMILLER. J, WHISTLER. R. Starch Chemistry and Technology. Third edition. United States of America 2009. P 797-829

³ CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1996. P 297-298.

Cada grado de polimerización (DP) confiere propiedades típicas a los productos en los que se aplican los jarabes de maltodextrinas, por esta razón comercialmente en la industria alimenticia se fabrican diferentes jarabes para usos exclusivos en otros procesos.

1.4.2. Jarabe de glucosa

Los jarabes de glucosa por lo general son mezclas de oligosacáridos entre los cuales se destacan maltosas, dextrinas, D-glucosa y otros azúcares de cadena larga en menor proporción. Dependiendo del medio utilizado y condiciones de obtención se puede encontrar en el mercado jarabes con características y usos específicos. Es posible encontrar jarabes con diferente dulzor dependiendo del grado de hidrólisis al que se someta la materia prima, los jarabes que poseen concentraciones bajas de glucosa (<20%) son poco dulces en comparación con aquellos que se hidrolizan de forma compleja y la concentración de maltosa o glucosa son superiores al 90% de los hidratos de carbono totales. Actualmente la mayor parte de estos jarabes se obtienen a partir del almidón de maíz mediante hidrólisis ácida o ácida-enzimática³.

1.4.3. Usos de los jarabes.

En contraste con almidón nativo las dextrinas son compuestos hidrosolubles, tienen la habilidad de formar geles y retener el agua. Generalmente se usan en la industria alimenticia como modificadores de textura, bien sea en gelación, retención de agua o en sustitución de grasa. Presentan funcionalidad en aplicaciones que requieren agentes de volumen o relleno, aumentan la resistencia al endurecimiento, mejoran de la textura y cuerpo del producto, facilitan la formación de películas, actúan como retenedor de aroma y sabor, como barrera de oxígeno, en el aumento del brillo, en la dispersibilidad y solubilidad, así como en el control del punto de congelamiento y en la prevención de la cristalización.

³ CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1996. P 297-298

1.5. Producción de jarabes edulcorantes para la industria de alimenticia.

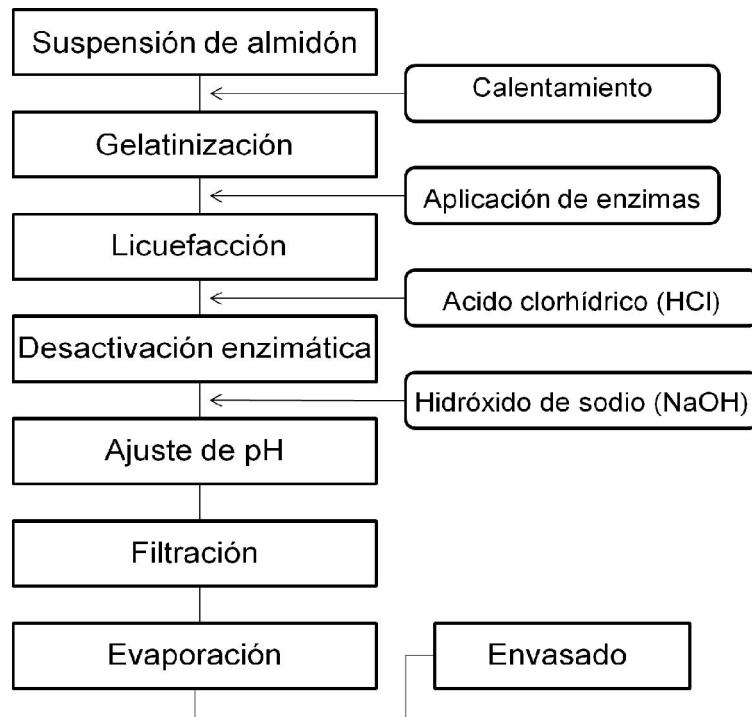
La industria de alimentos ha incrementado la producción de jarabes debido al auge y la aceptación de los edulcorantes calóricos y no calóricos; cuyo consumo mundial en los últimos años ha crecido vertiginosamente como consecuencia de calidad y demanda de productos en los que se aplican. Por otra parte las rigurosas exigencias mercantiles obligan a la obtención de jarabes altamente purificados, libres de coloración, impurezas y trazas extrañas, por tal razón los procesos que se llevan a cabo industrialmente se están enfocando en la producción de edulcorantes mediante métodos no agresivos que involucren catalizadores de origen biológico y no métodos tradicionales en los que se utilizan ácidos o bases fuertes. Cabe resaltar que los procesos de hidrólisis ácida prácticamente, han caído en desuso².

Los procesos implicados en la obtención de edulcorantes a partir de almidón varían dependiendo del avance tecnológico de la compañía en la que se realice, sin embargo una descripción general de los procesos más relevantes se presenta en el Anexo A².

En la empresa PROMITEC Santander se realiza un procedimiento similar al expuesto en el anexo A para la producción de maltodextrina (Figura 1), con la diferencia que durante la etapa de licuefacción se efectúan controles estrictos y minuciosos debido al amplio portafolio de productos que se ofrece a los clientes, es decir, que dependiendo de la aplicación a la que se destine el producto se requiere de un grado de polimerización diferente. Para lograr estas condiciones específicas se debe inactivar la enzima por métodos químicos en el lapso de tiempo establecido con anterioridad, los cuales dependen del grado de avance en el que se encuentre la reacción.

Las etapas de Sacarificación e Isomerización no se tienen en cuenta en el esquema anterior, pero vale la pena resaltar que son dos procesos que se efectúan a partir de una base de maltodextrina con ED superior a 20 mediante métodos enzimáticos similares a la licuefacción.

Figura 1: Esquema de producción de jarabe de maltodextrinas.



1.6. Enzimas

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas catalíticas *el Ácido Ribonucleico* (ARN) todas las enzimas son proteínas y su actividad catalítica depende de la integridad de las conformaciones proteínicas nativas. Si una enzima es desnaturalizada o dissociada en sus sub-unidades, los aminoácidos, su actividad catalítica es siempre destruida. Así, las estructuras primaria, secundaria y terciaria son esenciales para sus propiedades catalíticas⁴.

Las enzimas poseen centros activos que son las regiones donde transcurre la reacción o catálisis, a ellos se unen moléculas de sustrato y algunos cofactores y coenzimas que favorecen o impiden la reacción. Las uniones puede originar modificaciones estructurales tanto en la enzima como en el sustrato^{3,4}.

⁴ CARRASCAL. D. A. Tesis de grado: obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación a partir de almidón industrial de yuca. Bucaramanga, Colombia 2002. P 12-34

³ CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1996. P 297-298

1.6.1. Especificidad enzimática

Es la capacidad que posee la enzima para elegir entre la multiplicidad de reacciones que puede sufrir un sustrato. Debido a esta se diferencian las enzimas en forma característica de otros catalizadores químicos tales como el platino, níquel y óxidos de hierro. La especificidad de la enzima depende de la estructura de la proteína y no de la naturaleza de la coenzima, por lo tanto, debe distinguirse entre especificidad absoluta, especificidad relativa y la carencia de especificidad⁴.

1.6.2. -amilasas

El término amilasa se utiliza para designar las reacciones de catálisis enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de los enlaces glucosídicos $-(1,4)$ y $-(1,6)$ de los polisacáridos⁵.

La α -Amilasa es una endohidrolasa que actúa de manera aleatoria sobre los enlaces glucosídicos $-(1,4)$ de la amilosa y la amilopectina presente en el almidón. Los productos primarios de la reacción son dextrinas, las cuales, posteriormente se rompen para producir maltosa, algo de glucosa, isomaltosa y cadenas ramificadas de bajo peso molecular. Los enlaces $-(1,6)$ y los segmentos del polímero que forman hélices no son hidrolizados por esta.^{5, 4, 6,}

La α -Amilasa forma parte de un grupo de proteínas homogéneas y bien caracterizadas; son ligeramente ácidas, solubles en agua, tienen un peso molecular de alrededor de 50.000 Daltons y contiene un ión de calcio por mol de enzima, el cual influye no sólo sobre la actividad de la enzima sino también en el aumento de su estabilidad frente a los cambios de pH y temperatura.^{3, 4, 5}

³ CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1996. P 297-298

⁴ SCRAGG. A. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México, D.F. 2007. P 101-123

⁵ CARRASCAL. D. A. Tesis de grado: obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación a partir de almidón industrial de yuca. Bucaramanga, Colombia 2002. P 12-34

⁶ CARREÑO.M.Y, RUGELES.C.C. Tesis de grado: Estudio a escala piloto del proceso de obtención de jarabes de glucosados por hidrólisis enzimática de almidón de yuca. Bucaramanga Colombia, 2005. P 16-52.

También se conocen como enzimas licuantes ya que produce una rápida disminución de la viscosidad de las soluciones de almidón⁶.

1.6.3. Enzimas termoestables de origen bacteriano

De la mano con los avances tecnológicos en la aplicación enzimática las industrias dedicadas a la extracción y comercialización de las mismas, han realizado grandes hallazgos durante los últimos años. Dentro de las alternativas en innovación se encuentra una amplia gama de enzimas termoestables, las cuales poseen conformaciones protéicas más estables que otras, lo que permite trabajarlas en rangos de temperatura superiores a los tradicionales sin sufrir cambios drásticos ni perder su poder catalítico.

En comparación con las enzimas de origen fúngico que son inestables y sensibles a pequeñas variaciones de temperatura y pH, la mayoría de las enzimas de origen bacteriano son termoestables, por lo cual aseguran un proceso más confiable y económico para la transformación del almidón.

Entre otras ventajas se pueden destacar: mayores rendimientos de dextrosa, menos subproductos, mayor estabilidad frente a cambios drásticos de pH y temperatura, por lo tanto también brindan la posibilidad de aplicación durante cualquier instante de la etapa de gelatinización sin que se afecte su poder catalítico⁷.

1.6.4. Actividad enzimática.⁸

La actividad enzimática se expresa en términos de unidades enzimáticas internacionales (U) por gramo de enzima. Básicamente, una unidad enzimática de actividad es la cantidad de enzima que está presente en un volumen definido de una mezcla, de reacción definida, incubada bajo rígidas condiciones

⁶ CARREÑO.M.Y, RUGELES.C.C. Tesis de grado: Estudio a escala piloto del proceso de obtención de jarabes de glucosados por hidrólisis enzimática de almidón de yuca. Bucaramanga Colombia, 2005. P 16-52.

⁷ BRUCHMANN, ERNEST. Bioquímica técnica. Química alimentaria de las fermentaciones y agrícola. Acribia. Zaragoza 1980. P 85-96.

⁸ NOVOZYME®. BIOTIMES. The quarterly bioindustrial magazine from Novozymes. Folleto P 1-12.

⁹ PLUMMER, David T. Introducción a la bioquímica practica. 1^{ra} ed. McGraw Hill. Bogotá 1981. P 120-234

de constantes controladas, que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto. En algunos casos la unidad es muy grande y la actividad debe expresarse más adecuadamente en términos de nanomol por minuto (nmol/min) o picomol por minuto (pmol/min).

El SI tiene como unidad enzimática el katal (kat) que representa la transformación de un mol de sustrato por segundo.

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s} \qquad 1 \text{ U} = 1 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

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

Las actividades relativas de las enzimas puras pueden ser comparadas usando como referencia su actividad molar. Esto se conoce también como el número de moléculas de sustrato transformado en un minuto por una molécula de enzima bajo condiciones óptimas¹.

1.6.5. Periodos de latencia y desactivación enzimática

Las -amilasas pueden transformar el sustrato en producto durante prolongados espacios de tiempo (a condiciones mínimas de reacción) lo que significa que para obtener un producto que mantenga constantes las características de salida es necesario realizar la desactivación total y definitiva de la carga enzimática. Las enzimas termoestables pueden sufrir desactivación por vía química disminuyendo o incrementando pH. El efecto combinado de temperatura y pH en ocasiones resulta más conveniente.^{9 10 11}

¹ SANCHEZ.L.A. Tesis de grado: Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile). cultivadas en la provincia guanenta (Santander). Bucaramanga, Colombia 2002. P 10-22

¹⁰ PRIMO. EDUARDO. Química de los alimentos, síntesis. Madrid 1998. P 112-124.

¹¹ FERREMA. O. Química de los alimentos 2 ed. Acribia. Zaragoza, 2000. P 228-240

1.7. Efecto de los parámetros ambientales

1.7.1. Temperatura

Las reacciones catalizadas por enzimas aumentan su velocidad con un incremento en la temperatura, sin embargo, a este efecto se sobrepone la desnaturalización de las enzimas por su origen biológico.

Las temperaturas elevadas ocasionan el rompimiento los puentes débiles de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas a causa del aumento en la energía cinética de las moléculas. Se cree que la actividad biológica de las proteínas depende de su estructura terciaria específica, la cual se mantiene unida por los enlaces mencionados anteriormente. La pérdida de la estructura terciaria por efecto térmico se denomina desnaturalización y siempre va acompañada de la alteración de las funciones biológicas normales de la enzima. Generalmente la desnaturalización es irreversible.

Las enzimas termoestables pertenecen a un grupo de proteínas con estructuras primarias, secundarias y terciarias modificadas, unidas por enlaces químicos más fuertes que impiden la desorganización e incrementan su estabilidad.

1.7.2. Potencial de Hidrógeno (pH)

Las enzimas poseen grupos altamente ionizables que provocan cambios en el patrón de ionización de los grupos carboxilo y amino en las cadenas laterales de los aminoácidos, interrumpiendo el patrón de atracciones y repulsiones iónicas que contribuyen en la estructura terciaria de la enzima. Los efectos del pH se manifiestan como cambios en la velocidad máxima de reacción, en la afinidad de la enzima por el sustrato o en la alteración de la actividad enzimática.

Sin embargo, manipulando convenientemente el pH del medio, los grupos ionizables se convierten en grandes aliados a la hora de interrumpir las reacciones y obtener solamente los productos deseados sin que se presenten alteraciones a futuro en su composición.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se exponen las diferentes etapas que se llevaron a cabo durante la práctica empresarial, con el objetivo de solucionar los problemas que ocasionan al proceso la elevada viscosidad durante la etapa de gelatinización del almidón de yuca y la manifestación de gran cantidad de sedimentos durante la reacción, los cuales dificultan enormemente la filtración de los jarabes de maltodextrina elaborados en PROMITEC Santander S.A.

2.1. Metodología

La investigación y desarrollo del proyecto de optimización de la producción de maltodextrinas se realizó dentro de un marco de tiempo establecido en un plan de trabajo de cuatro meses (Anexo B).

2.2. Documentación y aseguramiento del conocimiento

Se realizó la búsqueda de material bibliográfico relacionado con el tema de estudio en medios físicos, documentos virtuales, audiovisuales y entrevistas al personal de trabajo perteneciente al área de producción. El aseguramiento del conocimiento se efectuó mediante informes semanales que se remitían al Ingeniero jefe de área.

2.3. Recepción de muestras de almidón

Con el fin de calificar diferentes proveedores de almidón de yuca se recibieron muestras provenientes de las Industrias: *Del Maíz, Química Aromática Andina (Q.A.A), Almidones UNO A, Cimpa, Celís y CIACOMEQ.*

2.4. Preselección de proveedores de almidón.

Para evaluar todas las muestras de almidón y determinar si existían diferencias significativas respecto a la aparición de sedimentos, fue necesario llevar a cabo experimentos de preselección en los que se variaron los sustratos o almidones y se mantuvieron constantes todos los parámetros contemplados en los manuales de operación de PROMITEC Santander S.A, asociados a la hidrólisis enzimática.

Los datos obtenidos durante los experimentos fueron contrastados con un experimento de control realizado con almidón de la industria de *De Sargo* como sustrato. La muestra representativa de almidón usada en el experimento fue extraída de los mismos lotes implementados en planta de procesos durante un día de operación normal.

El procedimiento para la obtención de maltodextrina se efectuó con base en documentos de transferencia y datos reportados en literatura.

2.4.1. Licuefacción con α -amilasas no termoestables

Inicialmente se realizó el análisis de las propiedades organolépticas de cada materia prima (olor, color y textura). Posteriormente se prepararon por separado en recipientes metálicos de 1 L de capacidad, 700 mL de suspensión de almidón al 16%P. El almidón previamente pesado se depositó en agua precalentada a 55°C y se realizó la homogenización de las soluciones mediante agitación magnética constante de 150rpm. Con la ayuda de un medidor de pH digital HANDYLAB pH11/Set se registró el valor de ingreso de cada materia prima y se ajustó dentro de un rango de 4.3 a 5.3 mediante la adición de HCL 5N o NaOH 5N dependiendo del valor inicial medido.

Por medio de una plancha de calentamiento BOECO MSH300 se programó un incremento de temperatura tipo rampa de 1.5°C/min. La correcta gelatinización de la suspensión de almidón se determinó mediante la observación de cambios en la viscosidad y el cambio en la apariencia visual de blanco lechoso a semitransparente a una temperatura de 70°C. A continuación, se disminuyó la temperatura (baño maría) hasta alcanzar 55°C y se agregó la enzima no termoestable a razón de 0.11kg de enzima/t de almidón. La carga enzimática fue activada previamente en 0.5mL de acetato de sodio (CH₃COONa). Los experimentos se mantuvieron bajo condiciones de reacción controladas a temperatura y agitación constantes por 1 hora. Posteriormente se tomaron 500mL de muestra y se dejaron en reposo por 24 horas. Finalmente se observó el porcentaje de sedimentos y se conceptualizó acerca de las ventajas y desventajas de cada marca de almidón.

2.5. Construcción de hipótesis

La observación detallada y el seguimiento de los procesos identificaron dos posibles causas que conllevaron a la formulación de la hipótesis “El almidón y enzimas son responsables de los problemas de viscosidad y sedimentos”.

2.6. Determinación de la influencia de las variables enzimas de licuefacción termoestables, métodos de aplicación y procedencia del almidón, sobre la viscosidad en la etapa de gelatinización y los sedimentos resultantes en los jarabes de maltodextrina

Se propuso un diseño de experimentos factorial multinivel 2×3^2 , en el que se evaluó la influencia de las variables enzimas termoestables, los métodos o posibilidades de uso eficiente para los biocatalizadores y la calidad del almidón de yuca sobre la viscosidad y porcentaje de sedimentos presente en el producto final. Las condiciones de reacción temperatura, carga enzimática y pH ideales para la hidrólisis de almidones (maíz), se tomaron de datos reportados en documentos de transferencia y fichas de aplicación suministrados por los proveedores de las enzimas.¹ Las variables y los niveles para cada experimento se reportan en la Tabla 3. Cada uno de los puntos de la matriz original se efectuó por duplicado, obteniéndose un total de 36 experimentos.

Tabla 3: Variables y sus niveles para obtener las condiciones apropiadas para la etapa de licuefacción

Variable	Nivel	-1	0	1
Almidón		De Sargo	Q.A.A	Del Maíz
Enzima		No termoestable	Termoestable	-
% Enzima al inicio de la gelatinización		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3

Para llevar a cabo la parte experimental se utilizó un reactor metálico de 1 Litro de capacidad, con un volumen de reacción de 700 mL, se aplicó calentamiento directo y agitación constante de 150rpm.

NIVELES DE APLICACIÓN ENZIMÁTICA

Los niveles de aplicación difieren en la cantidad porcentual de enzima que se agregó al inicio y al final de la etapa de gelatinización. La característica de termoestabilidad opuesta que poseen las enzimas sometidas a estudio, hizo necesario experimentar con tres niveles de aplicación que conllevaran a la determinación de los efectos que tiene la temperatura de gelatinización (70°C) sobre la actividad enzimática y paralelamente sobre el porcentaje de sedimentos finales.

Para la aplicación de la enzima termoestable se utilizaron 0.58 kg de enzima/t de almidón y se implementó un procedimiento en el cual no se refrigeró la suspensión de almidón gelatinizado desde 70°C hasta 55°C, por el contrario, se continuó calentamiento progresivo hasta alcanzar la temperatura óptima de trabajo sugerida en la ficha de aplicación (95°C).

- Nivel 1: La totalidad (100%) de la carga enzimática se agregó al final de la gelatinización a temperatura de 55°C para la enzima no termoestable y 95°C para la enzima termoestable.
- Nivel 2: Se agregó el 25% de la carga enzimática antes de gelatinizar y el 75% restante después de gelatinizar.
- Nivel 3: Se agregó la totalidad (100%) de la carga enzimática durante la etapa de suspensión del almidón en agua, segundos antes de iniciar el calentamiento de la etapa de gelatinización.

En el nivel intermedio (Nivel 2) los porcentajes de aplicación se escogieron teniendo en cuenta, uno de los objetivos principales: ejercer un control efectivo de la viscosidad durante la etapa de gelatinización sin afectar un porcentaje superior al 25% de la enzima no termoestable.

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

2.7. Comprobación de hipótesis

Posteriormente, los resultados obtenidos del diseño de experimentos se analizaron con ayuda del programa estadístico *Statgraphics plus 5.1*, mediante

el cual se corroboró la importancia de las variables sometidas a estudio y el grado de significancia de estas para ser llevadas a un proceso de estandarización y escalado (1.000 L) en la planta de procesos semi-industrial.

2.8. Determinación de azúcares reductores (ED técnica analítica)

La determinación de azúcares reductores se fundamenta en la reacción que ocurre entre éstos y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), la cual produce el compuesto 3-amino-5-nitrosalicilante, cuya absorbancia a 450 nm guarda una relación directamente proporcional a la concentración molar de los azúcares reductores, el procedimiento para la realización de la técnica analítica se expone en el anexo C.

2.9. Incremento en la concentración de almidón y estandarización de resultados

Debido a los buenos resultados observados en los experimentos realizados con la enzima termoestable y almidón Birkamidón al 16%P, se realizaron dos experimentos adicionales en los que se efectuó el procedimiento variando la concentración de sustrato inicial al 20 y 30%P.

Las etapas de gelatinización y licuefacción se realizaron simultáneamente. Posteriormente, se tomaron muestras y observó el nivel de sedimentos finales contrastándolos entre sí.

Con base en los resultados obtenidos de las anteriores pruebas, se realizaron tres experimentos de seguimiento en los que se evaluó el cambio en el ED respecto al tiempo durante la licuefacción con enzimas termoestables de las soluciones al 20%P de sustrato. Los procedimientos realizados en estos experimentos comparten las mismas especificaciones 0,58 kg de enzima/t de sustrato, pH 5,3 y temperatura 95°C (según proveedor para almidón de maíz)¹¹. Para observar el desarrollo de la reacción se tomaron periódicamente 5mL de solución cada 15 minutos hasta completar 90 minutos de reacción. Cada muestra se remitió al laboratorio de análisis Físicoquímico para la caracterización pertinente.

Los resultados fueron tabulados y se realizaron las curvas de avance de cada reacción que posteriormente se utilizaron como patrones en la etapa de escalado.

2.10. Desactivación enzimática

Una vez se establecieron las condiciones apropiadas para obtener el máximo rendimiento de las enzimas durante la licuefacción, se centró la atención en determinar el método de desactivación enzimático más efectivo, con el fin de mantener invariantes, respecto al tiempo, las propiedades fisicoquímicas de los jarabes de maltodextrina.

Tomando como punto de partida las condiciones reportadas por la ficha técnica, se ajustó el pH de la solución final a 3.8 y se mantuvo constante la temperatura en el reactor a 95°C durante 20 minutos. La comprobación se realizó mediante dos experimentos réplica, a los que se les monitoreó periódicamente el ED durante 144 horas. Con base en los resultados se hizo necesario rectificar el método mediante otro experimento en el que se somete el producto a condiciones más extremas: pH=3,0 a una temperatura constante de 95°C durante 40 minutos.

2.11. Escalado de la investigación a planta de procesos semi-industrial

Como parte de la estrategia de escalamiento a nivel semi-industrial de los experimentos de producción de maltodextrina, los días 24-26 de junio del 2009, se realizó la primera corrida experimental en planta utilizando como biocatalizador de la reacción, las enzimas termoestables.

Se realizó la producción de 100 kg de producto terminado a partir de aproximadamente 340 kg de jarabe base a 20 °Brix. La base fue obtenida por hidrólisis enzimática de una solución de almidón de yuca Birkamidon al 20% utilizando 0.58 kg/t de enzima termoestable.

La enzima se agregó en forma anticipada durante la suspensión del almidón, lo cual permitió llevar a cabo las etapas de gelatinización y licuefacción simultáneamente durante 60 minutos (95 °C y pH 5,3). A continuación se

efectuó el proceso de inactivación enzimática durante 40 minutos a 95 °C y pH=3.0.

Para determinar la curva de avance de reacción se llevó a cabo la toma de muestras en forma periódica y se les realizó la caracterización pertinente en el laboratorio.

Los datos recolectados fueron comparados con los seguimientos de los experimentos realizados a nivel de laboratorio, con el fin de corroborar los márgenes de confianza del trabajo investigativo.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este capítulo se expone las observaciones y los resultados de los experimentos y procedimientos realizados durante el desarrollo de la práctica empresarial.

3.1. Experimentos de preselección de almidones

Las pruebas de preselección se realizaron bajo un enfoque cualitativo en el cual se observó el comportamiento de cada uno de los almidones frente al proceso de hidrólisis enzimática. Los productos que presentaron desventajas respecto a la muestra de control no se llevaron a la siguiente etapa experimental.

Muestra de control. El almidón presentó textura granular fina, olor característico y color blanco opaco. El producto resultante de la hidrólisis enzimática presentó un color amarillo claro. Después de 24 horas en reposo se diferenciaron dos fases, los sedimentos pesados equivalentes al 75%V se precipitaron. El líquido sobrenadante no contenía partículas en suspensión.

CIACOMEQ. El almidón presentó textura granular arenosa al tacto, olor fuerte ácido y color amarillo claro. El producto resultante de la hidrólisis presentó un color amarillo oscuro y gran cantidad de sólidos en suspensión. La muestra no presentó buena sedimentación y el porcentaje final de sólidos suspendidos en fase dispersa equivalen al 88%V y se descartó anticipadamente por presentar características indeseadas superiores al control.

Birkamidón de Q.A.A. Se observó una textura muy fina similar a la fécula de maíz, color blanco brillante y olor característico agradable. El producto obtenido después de la hidrólisis enzimática no presentó coloración alguna, los sedimentos resultantes equivalen al 28%V, tienen aspecto claro, poco pesados y menos viscoso que los sedimentos de la muestra de control. Por lo tanto, se asumió una mínima dificultad en filtración, se dio un concepto positivo y fue la muestra que demostró tener la mejor calidad.

UNO A: Presentó una textura granular gruesa, con gran cantidad de materiales extraños incorporados arena, piedrecillas y trozos de madera. Olor fuerte ácido y color amarillo oscuro. La baja calidad de la muestra fue suficiente para prescindir de esta materia prima.

CIMPA: Es un almidón de yuca amarga, textura granular gruesa, difícil de homogenizar en la suspensión y color amarillo marrón. No presentó sedimentación, por lo tanto no cumplió con las condiciones mínimas de calidad requeridas en el proceso y se descartó de inmediato.

CELIS: Presentó textura fina y arenosa al tacto, color amarillo, olor característico y partículas desconocidas de color negro. El producto de la hidrólisis presentó el 72%V de sedimentos. Aunque los sedimentos fueron inferiores a los de la muestra de control, la apariencia del producto fue desagradable (color café). Se descartó por no poseer la calidad requerida.

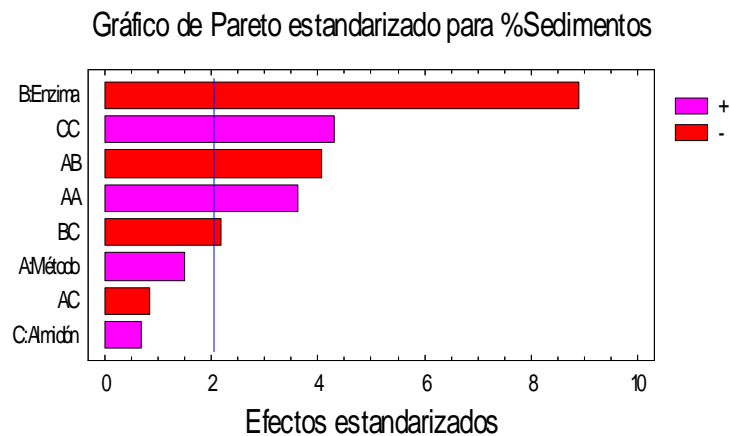
INDUSTRIAS DEL MAÍZ: Presentó una textura granular uniforme fina, color blanco brillante y olor característico agradable. El producto obtenido mediante la hidrólisis enzimática presentó una característica particular, a pesar de que el porcentaje de sedimentos fue del 80%V, estos se encontraban muy dispersos en toda la muestra, es decir, no presentó sedimentos pesados, coloración alguna ni aspecto desagradable. Esto llevó a la conclusión que los sedimentos suspendidos eran poco densos por lo que no se precipitaban. No fue posible comparar los resultados con la muestra control, sin embargo el almidón no se descartó en la preselección, debido a que el producto se dejó filtrar con relativa facilidad en el laboratorio mientras que el control no.

3.2. Determinación de la influencia de las variables enzimas de licuefacción termoestables, métodos de aplicación y procedencia del almidón, sobre la viscosidad en la etapa de gelatinización y los sedimentos resultantes en los jarabes de maltodextrina.

En el diagrama de Pareto (Figura 2) se muestra el efecto estimado de cada uno de los factores y sus interacciones sobre el porcentaje de sedimentos.

Donde: el método de aplicación enzimático (A), tipo de enzima (B) y marca de almidón (C). Se puede apreciar que las interacciones entre los factores (A) y (C), son insignificantes, en comparación con la influencia que tienen las enzimas (B) y las interacciones (CC),(AB),(BC) y (AA). En este caso los cinco efectos significativos que sobrepasan la línea vertical (Media), tienen un nivel de confianza del 95%.

Figura 2: Diagrama de Pareto de las variables independientes y % sedimentos



Para obtener un mínimo porcentaje de sedimentos durante la etapa de licuefacción el análisis estadístico sugirió que los productos más eficientes para la reacción son las enzimas termoestables y el almidón Birkamidón (Anexo E, Figura 6: Efectos principales). La demostración de la significancia que tienen las enzimas y su método de aplicación (AB) reportado en el diagrama anterior, cobra mayor fuerza al retomar resultados de experimentos anteriores en los que se hizo la observación: “Menor tiempo de gelatinización reduce el porcentaje de sedimentos en el producto final, debido a que se impide la retrogradación del almidón”. Por lo tanto el método de aplicación enzimático que mejores beneficios trajo al proceso y al producto fue la aplicación anticipada del 100% de la enzima termoestable. De modo que las etapas de gelatinización y licuefacción se efectuaron simultáneamente, la viscosidad de la suspensión de almidón se minimizó lo suficiente para facilitar la homogenización y permitir la buena transferencia de calor sin afectar el

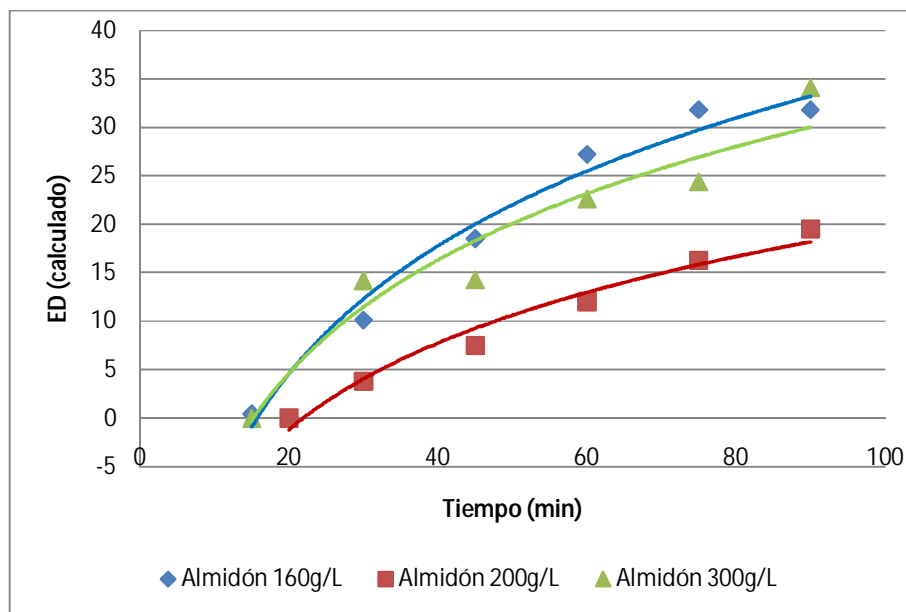
desempeño de la enzima. En este experimento se obtuvo el menor tiempo de gelatinización de todas las pruebas realizadas.

3.3. Incremento en la concentración de almidón y estandarización de resultados

El incremento en la concentración de almidón resultó exitoso para valores inferiores al 30%. El seguimiento de la reacción (Figura 3) confirma que se pueden obtener jarabes de maltodextrina con amplio rango de ED partiendo de suspensiones de almidón con concentraciones cercanas al 30%P. Sin embargo, los mejores resultados se observaron en los valores próximos al 20%P, debido a que los jarabes obtenidos fueron incoloros y estables respecto al tiempo. Los productos finales cuya concentración de maltodextrinas fue superior al 20%, sufrieron el fenómeno de retrogradación.

En la Figura 3 se contrastan los seguimientos del ED durante el tiempo de reacción para los tres experimentos. Las tablas de los datos recolectados se reportan en los Anexos F, G y H.

Figura 3: Seguimiento del ED vs tiempo(min) de reacción. Enzima termoestable. 0.58 kg de enzima /t almidón, Temperatura 95°C, pH: 5.3.



Los resultados anteriores brindan un informe detallado del avance de la reacción y el tiempo necesario para obtener jarabes de maltodextrina con ED entre 0 y 35, partiendo de suspensiones de almidón con concentraciones entre 16 y 30%P.

3.4. Desactivación enzimática

El método de desactivación enzimática sugerido por el proveedor no generó resultados positivos (Tabla 4). Durante el periodo de seguimiento del producto obtenido en el experimento se observó un incremento sustancial en el ED después de aplicar el método de desactivación de 20 minutos a 95°C y pH 3.8, lo indica que la enzima mantuvo algún tipo de actividad residual y continuó actuando sobre el sustrato.

En el experimento 2 se realizó la disminución del pH a 3.0 por un tiempo de 40 minutos y temperatura de 95°C. Este método resultó totalmente satisfactorio. El seguimiento del ED reveló que las propiedades del producto se mantuvieron sin cambio drástico después de 96 horas (Tabla 5). Las variaciones mínimas en los datos se asumen como error de medición.

Tabla 4: Seguimiento del Equivalente de Dextrosa (ED) respecto al tiempo después de la desactivación vía química de la enzima termoestable, 20 minutos a 95°C y pH: 3.8.

Tiempo (horas)	° Brix	ED (calculado)
Desactivación	22	9.1
0.6	24	8.8
24	24	15.9
48	24	17.6
144	24	17.7

Tabla 5: Seguimiento del Equivalente de Dextrosa (ED) respecto al tiempo después de la desactivación vía química de la enzima termoestable, 40 minutos a 95°C y pH: 3.0.

Tiempo (minutos)	° Brix	ED (calculado)
60	22	15.2
40 min después de desactivar	24	15.0
96 horas después de desactivar	24	14.1

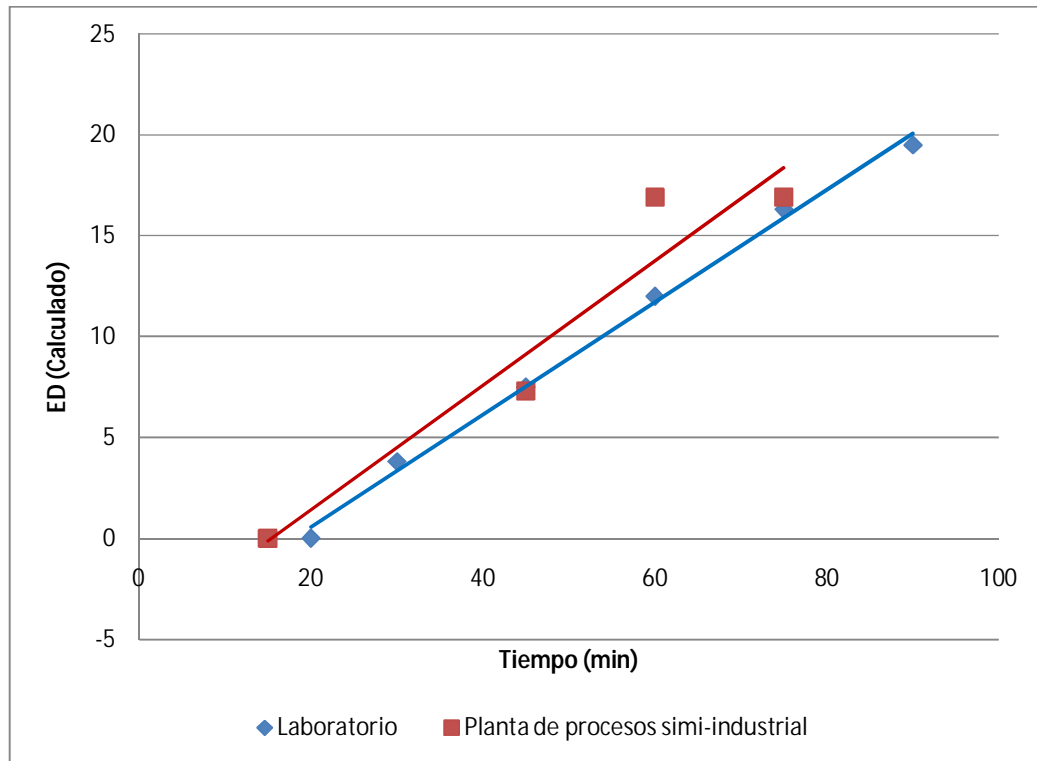
3.5. Escalado de la investigación a la planta de procesos semi-industrial

Como parte de la estrategia de escalamiento a nivel semi-industrial de los experimentos de producción de maltodextrina, el día 24 de Junio de 2009, se realizó satisfactoriamente la primera corrida en planta, utilizando como biocatalizadores de la reacción a las enzimas termoestables.

Dentro de las observaciones más importantes se destacaron la ausencia de sedimentos y el incremento en las velocidades de filtración y evaporación del producto en 7 y 1.3 veces respectivamente. Adicionalmente, se incrementó la velocidad de calentamiento durante la gelatinización en 1.25 veces y se aumentó la concentración de maltodextrinas presentes en los jarabes en un 7% (base seca) en comparación con las producciones en las que se utilizó la enzima no termoestable. Vale la pena destacar que no se observaron diferencias notables en las características organolépticas de los productos obtenidos.

En la Figura 4 se muestra el seguimiento de la reacción para un tiempo de 60 minutos. Los datos se corroboraron con los resultados obtenidos del diseño experimental y se encontró que las líneas de tendencia presentan un 95% de similitud.

Figura 4: Curvas de Licuefacción obtenidas a nivel de laboratorio y planta de procesos semi-industrial usando enzima termoestable=0.58 kg/t almidón, Almidón=20%P, Temperatura=95 °C y pH=5.3.



4. CONCLUSIONES

- El uso del diseño experimental factorial multinivel permitió establecer el efecto de cada una de las tres variables independientes (Enzimas, almidones y métodos de aplicación enzimática), sobre la cantidad de sedimentos resultantes en los jarabes de maltodextrina. Los parámetros estadísticos determinaron que la variable con mayor influencia fue el tipo enzima y en menor proporción las interacciones entre los métodos de aplicación, enzimas y almidones.
- Las enzimas de licuefacción termoestables presentan características y ventajas superiores a las enzimas tradicionales (no termoestables), entre estas se destacan: mayor conversión de sustrato a producto y baja formación de subproductos, control de la viscosidad en suspensiones de almidón gelatinizado y elevada estabilidad a temperaturas superiores a 70°C, lo que permite realizar las etapas de gelatinización y licuefacción simultáneamente. Además el producto cuenta gran respaldo, soporte técnico y economía.
- La implementación de las enzimas termoestables y el cambio de materia prima por almidón de yuca Birkamidón generó múltiples ventajas a toda la cadena productiva de los edulcorantes nATBIO® Promitec, de las cuales se destacan: la reducción en un 98% de los sedimentos que dificultaban la etapa de filtración, la eliminación de los problemas de viscosidad elevada durante la etapa gelatinización, el incremento del 7% en la concentración de producto terminado, la reducción en el consumo energético y en los tiempos de procesamiento en aproximadamente 8 horas.
- La investigación y desarrollo del proyecto de optimización de la producción de jarabes de maltodextrina, realizado en PROMITEC Santander S.A, cumplió satisfactoriamente con los objetivos principales y en los tiempos establecidos en el plan de trabajo.

5. RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar la actualización periódica y constante búsqueda de mejoras en los procesos productivos que se adelantan en PROMITEC Santander S.A. Los avances en biotecnología aplicada al campo de la producción alimenticia se encuentra en constante renovación y por lo tanto las mejoras se deben presentar de forma paulatina y eficiente.

Para la etapa posterior a la licuefacción se recomienda la evaluación de las ventajas y desventajas que traería la implementación de productos que mejoren la eficiencia de la reacción de sacarificación.

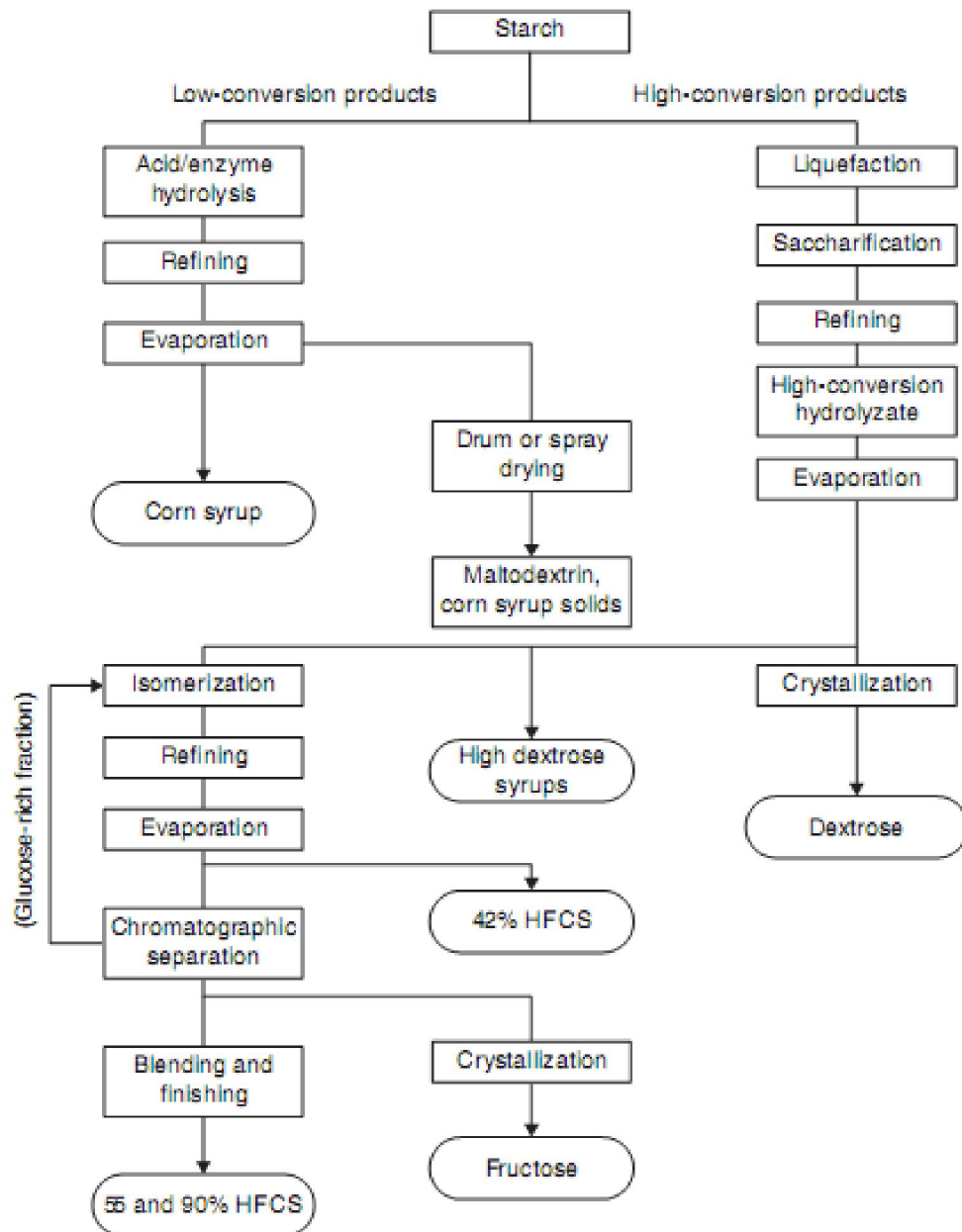
6. BIBLIOGRAFÍA

1. SANCHEZ.L.A. Tesis de grado: Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile). cultivadas en la provincia guanenta (Santander). Bucaramanga, Colombia 2002. P 10-22
2. BEMILLER. J, WHISTLER. R. Starch Chemistry and Technology. Third edition. United States of America 2009. P 797-829
3. CHEFTEL, Jean-Claude y CHEFTEL, Henri. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia. España. 1996. P 297-298.
4. SCRAGG. A. Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México, D.F. 2007. P 101-123
5. CARRASCAL. D. A. Tesis de grado: obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación a partir de almidón industrial de yuca. Bucaramanga, Colombia 2002. P 12-34
6. CARREÑO.M.Y, RUGELES.C.C. Tesis de grado: Estudio a escala piloto del proceso de obtención de jarabes de glucosados por hidrólisis enzimática de almidón de yuca. Bucaramanga Colombia, 2005. P 16-52.
7. BRUCHMANN, ERNEST. Bioquímica técnica. Química alimentaria de las fermentaciones y agrícola. Acribia. Zaragoza 1980. P 85-96.
8. NOVOZYME®. BIOTIMES. The quarterly bioindustrial magazine from Novozymes. Follett P 1-12.
9. PLUMMER, David T. Introducción a la bioquímica practica. 1^{ra} ed. McGraw Hill. Bogotá 1981. P 120-234
10. PRIMO. EDUARDO. Química de los alimentos, síntesis. Madrid 1998. P 112-124.
11. FERREMA. O. Química de los alimentos 2 ed. Acribia. Zaragoza, 2000. P 228-240
12. PALUCCI-JEANJEAN, D. BELLEVILLE, M. P. RIOS, G. M. and ZAKHIA, N. Kinetics of cassava starch hydrolysis with termamyl® enzyme. En: Biotechnology and Bioengineer. Vol. 68, N°1(2000); pag. 71-77

13. WISEMAN, Alan. Handbook of enzyme biotechnology. 2 ed. Ellis Horwood Limited. England. 1985. P, 57-70.
14. FICHA TÉCNICA, Enzyme Business. Fungamyl® BG. Novo Nordisk. Folleto B. 697e-E P, 1-3
15. EFFICIENT LIQUEFACTION OF STARCH, Enzyme Business. Liquozyme X. Novozyme® Folleto P, 1-9.
16. Aristizábal, J. Nueva tecnología para la producción de almidones modificados por vía seca. http://www.clayuca.org/clayucanet/produccion_dextrinas.htm.
17. 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.
18. Científicos colombianos investigan usos alternativos de la yuca: <http://www.cci.org.co/publicaciones/Noticiero/noticiero%2042.doc>
19. Ramírez Calero, Y. Posibilidad de uso de algunos almidones de raíces y tubérculos en la elaboración de adhesivos. <http://www.pronatta/proyectos/pdf/public/981411033>.
20. Cortes Gavilanes, A,L. Aplicación de enzimas en producción industrial. <http://www.procesosvirtuales.com/documentos/archivos/DT-BT01-003.pdf>.
21. Rodríguez Álvarez, C, C. 2002. Estudio de obtención de dextrinas de yuca para alimentos por ruta seca. Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia.
22. 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.
23. Gangloff C. (2001). Industrial Markets for starch and corn derived chemicals. Corn Annual

24. Marshall, L. Beeflink, R.(1999) Towards a Rational Design of commercial maltodextrins : A mechanistic Approach. Trends in Food Science and Technology. Vol(10). pag 345-355
25. Marshall, L. Jonkers, J. Francke G.T. Gooijer C.D. Tramper, J. (1999)The effect of process conditions on the a-amylolytic hydrolysis of Amilopectine potato starch : an experimental design approach Biotechnology. Bioeng. Vol (62) pag 348-357
26. Ahumada, C, P. Hoyos, L. Martínez, J. (1977). Obtención de glucosa por hidrólisis ácida de Almidón de Yuca. Universidad Nacional de Colombia. Ingeniería Química.
27. Meza, A. Muños, F.(1993) Hidrólisis enzimática de almidón de banano. Universidad Nacional de Colombia. Ingeniería Química
28. Ligt J. Modifies Food Starches: (1989) Why, Whar, Where and How. National Starch and Chemical Company
29. Página de internet de CIAT
30. Handler White Smith. 1982. Principles of Biochemistry. USA: McGraw-Hill. p.49 – 50.
31. 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.

ANEXO A: DIAGRAMA DE BLOQUE DE LOS PROCESOS MÁS RELEVANTES, IMPLEMENTADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA PARA LA TRANSFORMACIÓN DEL ALMIDÓN EN EDULCORANTES



Fuente: BEMILLER. J, WHISTLER. R. Starch Chemistry and Tecnology. Third edition. United States of America

ANEXO B: PLAN DE TRABAJO POR ACTIVIDADES A REALIZAR DURANTE LA PRÁCTICA LABORAL.

PLAN DE TRABAJO																	
Etapa	Actividades	Semanas															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Lectura de documentos de transferencia, búsqueda de información teórica y aseguramiento del conocimiento.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	Identificación y formulación de hipótesis acerca de los factores que influyen en la viscosidad y la aparición de sedimentos.		■	■	■	■	■										
3	Evaluación, calificación y seguimiento de proveedores de almidón de yuca y catalizadores enzimáticos.				■	■	■	■	■	■	■						
4	Diseño de experimentos, laboratorios de observación, pruebas cualitativas y cuantitativas para la evaluación de variables representativas y comprobación de hipótesis.				■	■	■	■	■	■	■	■					
5	Replica de experimentos y estandarización de resultados											■	■	■	■		
6	Seguimiento de muestras y ajuste del método de desactivación.											■	■	■	■	■	■
7	Escalado a nivel industrial.															■	■

ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y EQUIVALENTE DE DEXTROSA (DE), MÉTODO CON DNS.

REFERENCIAS

Manual de manejo del espectrofotómetro, GENESYS™ 10 Series Spectrophotometers.

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del reactivo DNS:

- Mezclar 4 g de NaOH y 7,5 g de tartrato de sodio y potasio en 125 ml de agua des ionizada (volumen de agua aproximado) y agitar hasta conseguir una solución homogénea.
- Agregar 2,5 g de DNS bajo calentamiento y agitar hasta completar la disolución.
- Aforar a 250 ml con agua des ionizada y almacenar a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.

2. Preparación de soluciones de glucosa estándar, grado analítico para construir la curva de calibración

- Preparar una solución de glucosa (utilizando glucosa grado analítico) de concentración 1000 ppm.
- Por dilución de ésta preparar cuatro soluciones, de concentraciones 200, 400, 600, y 800 ppm, respectivamente.

3. Toma de muestras

- Para obtener las muestras a analizar, se realiza primero una dilución de 1 ml del jarabe a determinar en 500 ml de agua.
- **NOTA 1:** Si las lecturas en el espectrofotómetro son cercanas a cero, ambiguas o dudosas, es recomendable cambiar el grado de dilución: 1 ml en 250ml, 1ml en 100ml o 1ml en 25ml, según convenga.

4. Preparación de las muestras patrón o muestras problema

- Para obtener los datos de la curva de calibración mezclar 1 ml de cada patrón de solución de glucosa con 1 ml de reactivo DNS en un tubo de ensayo con tapa. Es recomendable realizar replica para cada análisis, incluyendo el blanco.

- Dejar reaccionar en un baño con agua en ebullición por 5 minutos.
- Detener la reacción introduciendo los tubos de ensayo en un baño con agua helada (o en un criostato) por 10 minutos.
- Agregar 10 ml de agua des ionizada y dejar reposar durante 10 minutos.
- Medir su absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro como se explica en 7.4.
- Prepare el blanco depositando 1 ml de agua des ionizada en el tubo de ensayo en lugar de la solución de glucosa y seguir el procedimiento anterior.
- Las muestras problema se preparan con el mismo procedimiento

5. Utilización del espectrofotómetro para generar la curva de calibración de dextrosa en el equipo.

- Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de realizar las mediciones.
- Entrar al menú "Test" y luego al submenú "Curva estándar".
- Asignar un nombre al análisis (Glucosa estándar), seleccionar las unidades de las concentraciones, la longitud de onda (540nm), el numero de estándares, y verificar que el equipo este en modo estadístico para que genere la curva de calibración
- Entrar al submenú "correr estándares" e introducir los valores de las concentraciones de estos.
- Leer el blanco
- Medir estándares, introduciendo las muestras en orden ascendente de concentración, de esta manera la curva generada queda guardada en el equipo para futuras mediciones.

6. Utilización del espectrofotómetro para correr análisis de una muestra problema.

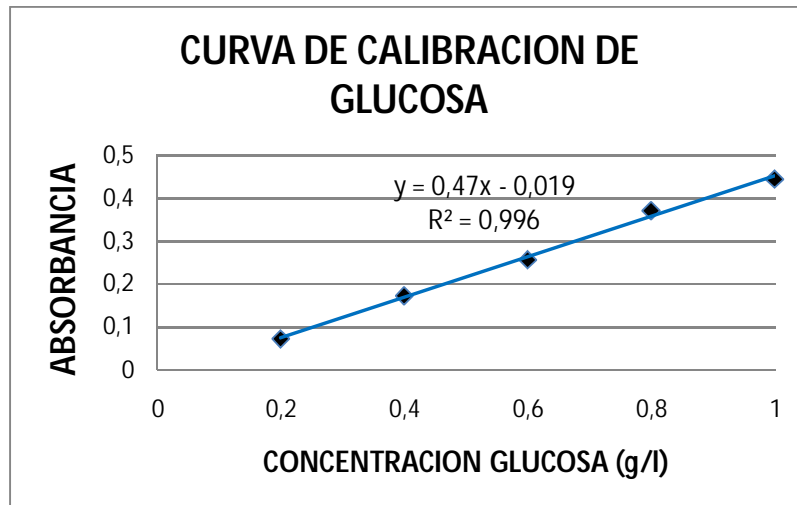
- Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de realizar las mediciones.
- Entrar al menú "Test" y luego al submenú "Curva estándar".

- Entrar a análisis almacenados, y seleccionar "Glucosa Estándar" (este es el nombre que previamente se le asigno a este análisis).
- Correr análisis, y medir blanco.
- Medir muestra.

Nota: El blanco y la muestra problema se preparan de la misma manera que los estándares, teniendo en cuenta que las muestras se deben diluir antes de que reaccionen con el DNS (se recomienda diluir 1ml de muestra en 500ml), para que las mediciones estén dentro del rango de la curva de calibración, en caso de que una muestra reporte absorbancias mayores a 1 diluir al volumen necesario para que las mediciones estén dentro del rango de la calibración y repetir la medición, esto se debe, a que a valores de absorbancia superiores a 1 la relación entre esta y la concentración no es lineal de acuerdo a la Ley de Beer.

7. Cálculos

Figura 5: Curva de calibración Absorbancia (540 nm) vs Concentración de glucosa.



8. Cálculo del equivalente de dextrosa:

- Realizar un promedio aritmético de los valores de absorbancia y concentración de la dilución (leídos en el espectrofotómetro).
- Determinar la concentración real de azúcares reductores en el jarabe a determinar; esto se realiza multiplicando la concentración de la dilución promedio calculada, por el grado de dilución al cual se llevo la muestra de jarabe a determinar. El grado de dilución está definido como la relación entre el volumen de aforo y el volumen de jarabe a determinar que se tomo para la dilución, por ejemplo 500ml/1ml.

$$\begin{aligned} & [\text{azúcares reduct. en el jarabe}] \\ & = [\text{azúcares reduct. dilucion}] \times \text{grado dilucion} \end{aligned}$$

- Determinar el equivalente de dextrosa; para ello son necesarios datos adicionales de grados Brix y densidad del jarabe a determinar.

$$\begin{aligned} \text{ED(calculado)} &= \frac{\text{gr glucidos reductores}}{\text{gr solidos totales}} \times 100 \\ &= \frac{[\text{real azúcares reduct. en el jarabe } (\frac{\text{g}}{\text{ml}})]}{\frac{^{\circ}\text{Bx}}{100} \times \text{jarabe}(\frac{\text{g}}{\text{ml}})} \times 100 \end{aligned}$$

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

Bloque	Método	Enzima	Almidón	%Sedimentos
1	0	1	-1	33
1	0	-1	1	83
1	1	1	0	1
1	1	-1	-1	100
1	1	-1	1	97
1	-1	1	1	40
1	-1	-1	1	80
1	0	1	1	15
1	0	-1	-1	25
1	-1	1	-1	33
1	0	1	0	4
1	1	1	-1	30
1	-1	-1	0	22
1	-1	-1	-1	80
1	-1	1	0	22
1	0	-1	0	28
1	1	1	1	15
1	1	-1	0	95
2	1	1	0	1
2	1	-1	-1	98
2	-1	1	0	22
2	1	-1	1	94
2	1	-1	0	92
2	0	-1	0	30
2	-1	-1	1	82
2	0	-1	1	82
2	0	1	0	4
2	-1	-1	-1	80
2	-1	-1	0	20
2	0	-1	-1	25
2	0	1	-1	33
2	1	1	1	15
2	1	1	-1	30
2	-1	1	-1	33
2	-1	1	1	40
2	0	1	1	10

ANEXO E: ANÁLISIS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS REALIZADO EN EL PROGRAMA ESTADÍSTICO STATGRAPHICS PLUS 5.1.

Resumen del análisis

Efectos estimados para %Sedimentos

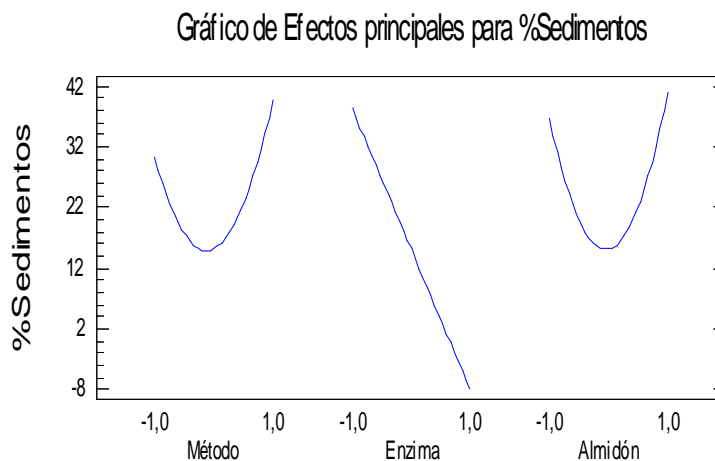
promedio = 15,1389 +/- 5,80705
A:Método = 9,5 +/- 6,36131
B:Enzima = -46,2222 +/- 5,19398
C:Almidón = 4,41667 +/- 6,36131
AA = 39,8333 +/- 11,0181
AB = -25,8333 +/- 6,36131
AC = -6,625 +/- 7,79098
BC = -13,9167 +/- 6,36131
CC = 47,5833 +/- 11,0181
bloque = -0,666667 +/- 5,19398

Los errores estándar están basados en un error total con 26 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones. También se muestra el error normal de cada uno de los efectos, el cual mide su error de muestreo.

Figura 6: Principales efectos de las variables de estudio sobre el % de sedimentos



Análisis de la Varianza para %Sedimentos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Método	541,5	1	541,5	2,23	0,1474
B:Enzima	19228,4	1	19228,4	79,20	0,0000
C:Almidón	117,042	1	117,042	0,48	0,4937
AA	3173,39	1	3173,39	13,07	0,0013
AB	4004,17	1	4004,17	16,49	0,0004
AC	175,563	1	175,563	0,72	0,4029
BC	1162,04	1	1162,04	4,79	0,0379
CC	4528,35	1	4528,35	18,65	0,0002
bloques	4,0	1	4,0	0,02	0,8989
Error Total	6312,73	26	242,797		
Total (corr.)	39247,2	35			

R-cuadrado = 83,9155 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 79,1497 por ciento

Error Estándar de Est. = 15,582

Error absoluto de la media = 10,5216

Estadístico Durbin-Watson = 2,14112 (P=0,2481)

Autocorrelación residual Lag 1 = -0,0821938

El StatAdvisor

La tabla de ANOVA divide la variabilidad en %Sedimentos en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. Después prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, 5 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo ajustado explica el 83,9155% de la variabilidad en %Sedimentos. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 79,1497%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 15,582. El error absoluto de la media (MAE) de 10,5216 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es superior a 0.05, no hay indicios de correlación de serie en los residuos.

ANEXO F: ED VS T DE REACCIÓN. [%16] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE= 0.58 kg/t ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3. (REPORTE DE LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO)

Tiempo (min)	° Brix	ED (calculado)
15	16	0.4
30	16	10.1
45	16	18.5
60	16	27.2
75	16	31.8
90	16	31.8

ANEXO G: ED VS T DE REACCIÓN. [%20] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE= 0.58 kg ENZIMA /t ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3. (REPORTE DE LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO).

Tiempo (minutos)	° Brix	ED (calculado)
20	20	-
30	20	3.8
45	20	7.5
60	20	12.0
75	20	16.3
90	20	19.5

ANEXO H: ED VS TIEMPO DE REACCIÓN. [%30] ALMIDÓN, ENZIMA TERMOESTABLE=0.58 kg /t DE ALMIDÓN, TEMPERATURA 95°C, pH: 5.3. (REPORTE DE LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO).

Tiempo (minutos)	° Brix	ED (calculado)
15	30	-
30	30	14.2
45	30	14.3
60	30	22.6
75	30	24.4
90	30	34.1

ANEXO I: SEGUIMIENTO DE LA REACCIÓN DE LICUEFACCIÓN DESARROLLADA EN PLANTA DE PROCESOS SEMI-INDUSTRIAL USANDO ENZIMA TERMOESTABLE=0.58 kg/t DE ALMIDÓN, ALMIDÓN=20%, TEMPERATURA=95 °C, pH=5.3.

Tiempo (min)	Brix	ED
15	20	0
45	20	7,3
60	20	16,9
Después de ajustar pH	20	16,9
Después de filtración	20	16,9