

OBTENCION DE GLUCOSA A PARTIR DE ALMIDON DE YUCA *Manihot sculenta*

OBTAINING GLUCOSE FROM YUCCA *Manihot sculenta* STARCH

INGRID MERA¹, JORGE CARRERA CATAÑO²

PALABRAS CLAVE:

Almidón, amilosa, amilopectina, hidrólisis enzimática, alfa amilasa, glucoamilasa y Glucosa.

KEY WORDS:

Starch, amylose, amilopectine, enzymatic hydrolysis, alpha-amylase, gluco-amylase, glucose.

RESUMEN

*Este proyecto consistió en la producción de glucosa a partir de almidón, utilizando la hidrólisis enzimática. Para ello se probaron muchas variables como enzimas obtenidas de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*, a diferentes temperaturas, pH y concentraciones de sustrato, y se estandarizo condiciones de proceso, permitiendo que sirvan como parámetro, para el diseño tanto del proceso como de los equipos necesarios para industrializar la producción de la glucosa, utilizando como sustrato el almidón de yuca producido en el Cauca. Esta hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) producido en el Departamento del Cauca por la Cooperativa de Rallanderos (COPRACAUCA), con enzimas comerciales alfa-amilasa BAN 480 de *Bacillus amyloliquefaciens* y amiloglucosidasa AMG 300 L de *Aspergillus niger*. Después de realizada la hidrólisis completa del almidón el jarabe se filtro para ser sometido a tratamiento térmico de 85 °C por 5 minutos, se concentro y cristalizó obteniendo un producto con un valor Dextrosa Equivalente (DE) de cercano a 90%*

ABSTRACT

*This project was going to production the glucose from starch, using the enzymatic hydrolysis. For it many variables like enzymes obtained from *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*, to different temperatures, pH and concentrations of substrate and giving to conditions*

Recibido para evaluación: Diciembre 10 de 2004. Aprobado para publicación: Febrero 15 de 2005.

1 Estudiante Ing. Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigación ASUBAGROIN

2 M.S.c Docente Biotecnología, Facultad Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Grupo de Investigación ASUBAGROIN.

Correspondencia: Jorge Carrera. e_mail: jorcarrera@unicauca.edu.co

standar for the process, allowing that serve like parameter, for the design the process as of the equipment necessary to industrialize the production of the glucose, using like substrate the starch of yucca produced in the Departamento del Cauca. This starch hydrolysis of yucca (*Manihot sculenta* Crantz) produced in the Department of the Cauca by the Cooperative of Rallanderos (COPRACAUCA), with commercial enzymes alpha-amylase BAN 480 of *Bacillus amyloliquefaciens* and amiloglucosidasa AMG 300 Ls of *Aspergillus Niger*. After made complete hydrolysis of the starch the syrup filter to have been put under heat treatment of 85 °C by 5 minutes, The concentrate was crystallized obtaining a product with an equivalent dextrose (DE) near to 90%

INTRODUCCION

La yuca (*Manihot sculenta*) es una planta originaria de la América tropical. Los principales países productores son Brasil, Zaire, Nigeria e Indonesia (1).

La yuca, uno de los productos tradicionales de la agricultura nacional, se convirtió en fuente básica del desarrollo económico y social en el norte del Cauca generando un perfil industrial que beneficia directamente a casi 28 mil e indirectamente a miles de personas más. Es así como en el norte del Cauca se encuentran 170 rallanderías con capacidad de procesamiento de 1.000 - 2.500 Kg. de yuca fresca/día. De 100 Kg. de yuca fresca, se producen 20 Kg. de almidón, 6.5 Kg. de afrecho (subproducto de mediana finura constituido por fibra y porciones de raíces) y 1.5 Kg. de mancha. Estos volúmenes de producción de almidón benefician al sector agrícola al dar un valor agregado a la yuca, pero al mismo se le puede dar un mayor valor si se lo somete a un proceso de transformación nivel 2, como el de la hidrólisis enzimática para la producción de glucosa. (2)

La hidrólisis del almidón se puede hacer por dos vías: ácida o enzimática. La hidrólisis ácida del almidón a glucosa es una técnica que tiene muchas desventajas: formación de productos no deseables y flexibilidad muy pobre (el producto final sólo se puede modificar cambiando el grado de hidrólisis), por último es necesaria que el equipo resista el ácido y las temperaturas requeridas durante el este proceso. La hidrólisis enzimática en los últimos 30 años ha desplazado la hidrólisis ácida, debido a que se dispone de nuevas enzimas. Hoy en día la mayor parte de la hidrólisis de almidón se realiza usando enzimas, ya que esta técnica presenta ventajas como: control de la formación de productos no deseables y mayor flexibilidad del producto.

La alfa-amilasa (Alfa 1,4-D- Glucan Glucano-hidrolasa) hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glu-

cosa en unión alfa-1,4. El ataque se hace en forma no selectiva (tipo endoenzima) sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5-7 unidades de glucosa, o un número múltiplo. La amiloglucosidasa (Alfa-1,4- D-Glucan glucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y alfa-1,6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima e Insumos

Materia prima: se utilizó el almidón de yuca producido en el Departamento del Cauca por la Cooperativa de Rallanderos (COPRACAUCA).

Enzimas: BAN 480 de Novo Nordisk, producido a partir de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*; AMG 300 L de Novo Nordisk, amiloglucosidasa obtenida de *Aspergillus niger*.

Equipos

Agitador magnético, balanza analítica, baño termostático, rotaevaporador, estufa, mufla, extractor Soxhlet, refractómetro, equipo Kjeldahl, nevera, espectrofotómetro.

Materiales y Reactivos

Micropipeta de 10 -100 mL, bureta graduada, erlenmeyers de 50, 100, 250 y 500 mL, papel filtro, pipetas volumétricas de 5, 10, 25 mL, soportes, balones volumétricos, vasos de precipitado, cápsulas de porcelana, campana de desecación, mortero y pilón, tips para micropipeta otros. Solución de yodo diluida (1:5), NaOH al 1% y 40%, HCl al 1%, solución de Fehling A, reactivo de Fehling B, indicador de azul de metileno al 1%, ácido sulfúrico 0.25N, NaOH 0.25N, soluciones

buffer de 4 y 7, papel indicador universal, almidón soluble, tampón acetato 0.1M, buffer, CaCl₂, NaCl, fosfato disódico, fosfato monosódico.

Métodos de Análisis

Determinación de humedad (Método según la A.O.A.C 14.003)

Determinación de ceniza (Método según A.O.A.C14.006)

Determinación de grasa (Método según A.O.A.C7.062)

Determinación de proteína (Método Kjeldhal según la A.O.A.C2.057)

Determinación de la fibra bruta (Método según AOAC 9.008)

Determinación de carbohidratos (Método de Diferencia) Relación amilosa/amilopectina (según el CIAT)

Procedimiento experimental

Caracterización de las enzimas

Para realizar la hidrólisis del almidón, la industria Novo Nordisk, productor de enzimas, suministro dos tipos de enzimas diferentes con las que se realizaron las pruebas de laboratorio. Cada enzima tiene rangos de funcionamiento óptimos.

En la caracterización de las enzimas utilizadas en la hidrólisis de almidón de yuca (BAN, AMG), se estudió el comportamiento de la actividad de las mismas con relación al pH y a la temperatura, siendo la actividad de cada enzima la variable respuesta al ensayo. De esta manera se encontraron las condiciones óptimas de las enzimas. (Artículo "CARACTERIZACION ENZIMATICA DE ALFA-AMILASA Y GLUCOAMILASA FUNGICA EN LA HIDRÓLISIS DE ALMIDON DE YUCA (*Manihot sculenta*). Grupo de Investigación Asubagroin, Universidad del Cauca. 2003.)

Cinética de las reacciones

Después de obtener las condiciones de pH y temperatura adecuadas de cada enzima, se determinó la cinética de la reacción de cada enzima para establecer los tiempos óptimos de cada reacción.

Cinética de la reacción con alfa-amilasa BAN 480 de *Bacillus amyloliquefaciens*

Se preparó una solución al 30% en peso de almidón de yuca, se agregó buffer fosfato 0.1 M hasta para ajustar el pH en un valor de 6.0; seguidamente, se agregó la

cantidad de la enzima α -amilasa requerida para la relación enzima/sustrato fuera del 0.1% en peso. Se ajustó la temperatura a 70 °C y se dejó reaccionar durante 150 min. conservando estables las variables anteriormente mencionadas. Se tomaron muestras en intervalos de 15 minutos y se determinó la concentración del almidón presente en la solución.

Cinética de la reacción con amiloglucosidasa AMG 300 L de *Aspergillus niger*

A la solución de almidón se le agregó, CaCl₂ y buffer fosfato 0.1 M hasta ajustar el pH e un valor de 6.0; seguidamente, se agregó la cantidad de la enzima β -amilasa requerida para la relación enzima/sustrato fuera del 0.1% en peso. Se ajustó la temperatura a 70 °C y se dejó reaccionar durante 120 min conservando estables las variables anteriormente mencionadas.

Posteriormente, se ajustó de nuevo el pH a 4.8 y manteniendo siempre la temperatura constante (65 °C), se agregó enzima glucoamilasa en una proporción enzima/sustrato de 0.25%. Se dejó reaccionar la mezcla durante 43 horas continuas tomando muestra durante intervalos determinados para establecer la producción de glucosa.

Desarrollo de la hidrólisis enzimática

Se preparó una muestra de almidón al 30 % en peso, se le agregó acetato de sodio buffer 0.1 M para ajustar el pH y la cantidad de enzima α -amilasa requerida para que la relación enzima/sustrato fuera la adecuada; se ajustó la temperatura y se dejó reaccionar durante el tiempo apropiado, conservando estables las variables anteriormente mencionadas.

Terminado el tiempo de reacción se inactivó la enzima con ácido clorhídrico 0.1 N llevando el pH hasta 3, garantizando también la precipitación de la proteína presente en la solución.

Posteriormente, se ajustó de nuevo el pH y la temperatura de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización de la glucoamilasa, se agregó esta enzima en la dosis óptima y se dejó reaccionar durante el tiempo necesario para una adecuada interacción entre enzima/sustrato. Se inactivó la enzima a 80 °C por 5 minutos.

Refinación cristalización y purificación

Luego de finalizada la reacción de hidrólisis completa del almidón con α -amilasa y glucoamilasa, el jarabe

obtenido se filtró en tres etapas manteniendo la temperatura a 50 °C; la primera se efectuó a vacío con filtro de diámetro de malla de 20 μ , la segunda a vacío con un filtro de 5 μ y tierra de diatomáceas y la tercera a vacío con un filtro de 5 μ y carbón activado.

El jarabe se sometió a tratamiento térmico cuyas condiciones fueron: 85 °C durante 10 minutos. Este procedimiento se realizó garantizando una agitación continua para evitar que el jarabe se quemara en la pared interior del recipiente de esterilización.

Inmediatamente terminado el tratamiento térmico, el jarabe se concentró en un rotaevaporador hasta lograr el 78% en peso de sólidos con vacío (92 mm Hg.) para alcanzar la ebullición del agua a 50°C, la cual es inferior a la temperatura máxima recomendada, 65 °C, para evitar las reacciones de pardeamiento del tipo Maillard.

El jarabe a 50 °C se colocó en un rotaevaporador, en un baño maría a 15 °C. De esta forma la temperatura se bajo de 50 °C hasta 20 °C, ésta se mantuvo durante 52 horas, en las cuales se mantuvo el jarabe en agitación, a 20 rpm. Seguidamente se bajo la temperatura del jarabe hasta 10 °C, por inmersión en un baño maría a 8 °C, con agitación a 20 rpm.

Finalizando este tiempo, parte de los sólidos presentes en la solución cristalizaron como dextrosa.

La cristalización se realizó lentamente con el fin de garantizar la formación de cristales de gran tamaño, los cuales son fáciles de separar de la solución residual. En el proceso industrial, la cantidad restante de solución se reprocesa y es fuente adicional de glucosa.

Para separar los cristales de la solución se utilizó el método de filtración. La purificación de los cristales se efectuó lavándolos con el 10% de agua destilada y desionizada respecto al peso de los sólidos cristalizados. Se realizó un secado posterior de los cristales hasta una humedad del 8.5% en peso que está por debajo de la humedad de equilibrio para este producto que es del 9.1%, aproximadamente (4).

Análisis del Producto Final

Para el análisis y caracterización del producto se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), por ser ésta una técnica que permite determinación directa y rápida de azúcares, incluyendo oligosacáridos, con una

mínima preparación de muestra y brindando una precisión igual a la de otras técnicas cromatográficas (cromatografías de: gas, papel, capa delgada, partición líquida, intercambio iónico y permeación con gel). El análisis fue hecho bajo las siguientes especificaciones:

Columns: Shodex AFpak AGO-494
Eluent: Acetonitrile - water (80/20)
Flow rate: 0.2mL/min. (Eluent)
0.4mL/min. (Reagent)
Detector: Shodex CL
Column temp.: 37deg-C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición del almidón de yuca

Según el análisis proximal el almidón de yuca (Cuadro 1.) utilizado como materia prima en la hidrólisis enzimática para producción de glucosa, posee una humedad por encima de la reportada como parámetro por el ICONTEC para almidones. Una humedad del 16.42%, aunque no afecta directamente el rendimiento del proceso planteado en este trabajo, es un riesgo en el almacenamiento del almidón, ya que se genera una actividad de agua (A_w) propicia para el ataque de microorganismos, que no sólo afecta la calidad de este, sino también la calidad del producto final por la acumulación de pirógenos (5).

Los contenidos de proteína, cenizas y fibra, también, se encuentran por encima de los parámetros establecidos por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas, señalando una falta de refinamiento del producto o fallas en

CUADRO 1. Análisis proximal almidón de yuca.

Variable	Porcentaje
Humedad	16.42 %
Proteína	1.63 %
Grasa	0.11 %
Ceniza	1.75 %
Almidón	77.35 %
Fibra	2.74 %
Amilosa	18 %
Amilopectina	82 %

el proceso de extracción. El contenido de amilosa en el almidón fue del 18 % valor superior a los normalmente señalados para la yuca por otros autores, quienes dan un rango entre 15 y 17% (6).

Caracterización de las enzimas

Según el artículo "CARACTERIZACION ENZIMATICA DE ALFA-AMILASA Y GLUCOAMILASA FUNGICA EN LA HIDRÓLISIS DE ALMIDON DE YUCA (*Manihot sculenta*). Grupo de Investigación Asubagroin, Universidad del Cauca 2003." Las condiciones óptimas de operación de las enzimas en la hidrólisis son:

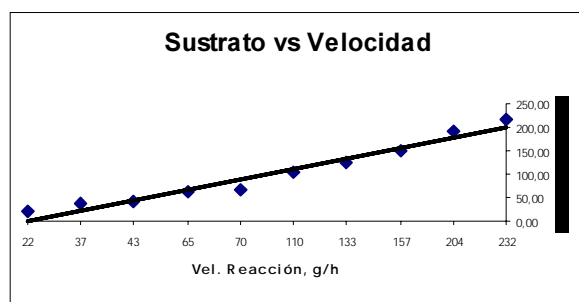
	á-amilasa	glucoamilasa
pH	6.0	5.5
Temperatura	70°C	60°C
Concentración	0.1%	0.25%
Enzima	(g enz./g sust.)	(g enz./g sust.)

3.3 Cinética de las reacciones

CUADRO 2. Cinética de la α -amilasa

Almidón (g/l)	Tiempo (min)	Diferido Tiempo (min)	Velocidad (g/h)
232	0	0	
204	15	15	218.40
157	30	15	193.53
133	45	15	148.13
110	60	15	125.67
70	75	15	105.33
65	90	15	65.67
43	105	15	62.13
37	120	15	40.53
22	135	15	35.53
21	150	15	20.60

GRÁFICO 1. Concentración sustrato vs. Velocidad

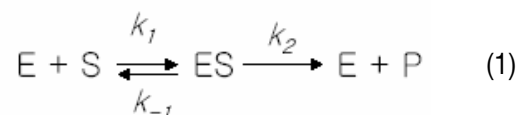


Cinética de la reacción con alfa-amilasa BAN 480 de *Bacillus amyloliquefaciens*

A continuación se presentan los datos obtenidos (Cuadro 2) y el comportamiento del sustrato durante la reacción (Gráfico 1).

Teniendo en cuenta el sustrato disponible en todo momento para la hidrólisis, se efectuó el análisis de la reacción de la hidrólisis siguiendo la teoría de Michaelis-Menten.

Para aplicar la teoría cinética de Michaelis-Menten es necesario presuponer que nada del producto se revierte al sustrato inicial.



Teniendo en cuenta que la velocidad catalítica es igual al producto de la concentración del complejo ES y k_2 ; la velocidad de formación de ES es igual al producto de E, S y k_1 ; la velocidad de descomposición de ES es igual al producto ES por la suma de k_2 y k_3 .

Bajo condiciones de estado estacionario, se igualan las expresiones y se obtiene:

$$[ES] = K_m [E] [S] \quad (2)$$

Donde,

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (3)$$

La velocidad máxima se obtiene cuando los centros de la enzima se encuentran saturados de sustrato.

$$V = V_{\max} \{ [S] / ([S] + [K_m]) \} \quad (4)$$

En este momento la expresión $\{ [S] / ([S] + [K_m]) \}$ se aproxima a 1. Del cuadro 2, se tiene que la velocidad máxima es aproximadamente:

$$V_{\max} \approx 218.77 \text{ g/h} \quad (3)$$

Si se tiene en cuenta que cuando $V_{\max} / 2$ se tiene

$$[S] = K_m \text{ entonces, } V = V_{\max} / 2 \approx 109.385 \text{ g/h} \quad (4)$$

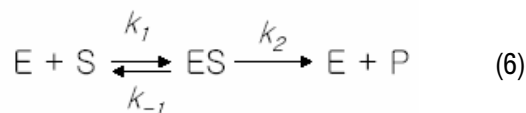
$$[S] = K_m \approx 96.4 \text{ g/l} \quad (5)$$

Se determinó entonces, que la reacción es de primer orden, donde la velocidad es exactamente proporcional a la concentración de un reaccionante. De acuerdo con esto, se estableció que tiempo de reacción adecuado es de dos horas para obtener una concentración de almidón remanente del 9.1% del almidón inicial.

Cinética de la reacción con amiloglucosidasa AMG 300 L de *Aspergillus niger*

Teniendo en cuenta que el sustrato disponible en todo momento para la hidrólisis, es la diferencia de los sólidos totales en la solución y la fracción de glucosa existente en un tiempo dado de reacción, se efectuó el análisis de la reacción de la hidrólisis siguiendo la teoría de Michaelis-Menten (Cuadro 3).

Para aplicar la teoría cinética de Michaelis-Menten es necesario presuponer que nada del producto se revierte al sustrato inicial.



Teniendo en cuenta que la velocidad catalítica es igual al producto de la concentración del complejo ES y k_2 ; la

velocidad de formación de ES es igual al producto de E, S y k_1 ; la velocidad de descomposición de ES es igual al producto ES por la suma de k_2 y k_3 .

Bajo condiciones de estado estacionario, se igualan las expresiones y se obtiene:

$$[ES] = K_m [E] [S] \quad (7)$$

Donde,

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (8)$$

La velocidad máxima se obtiene cuando los centros de la enzima se encuentran saturados de sustrato.

$$V = V_{m\acute{a}x} \{ [S] / ([S] + [K_m]) \} \quad (9)$$

En este momento la expresión $\{ [S] / ([S] + [K_m]) \}$ se aproxima a 1. Del cuadro 3, se tiene que la velocidad máxima es aproximadamente:

$$V_{m\acute{a}x} \approx 17.6 \text{ g / h} \quad (10)$$

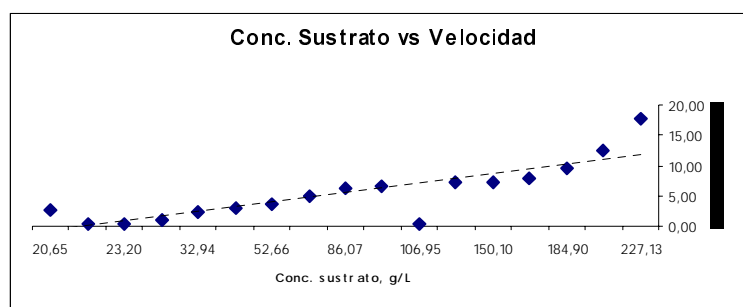
Si se tiene en cuenta que a $V_{m\acute{a}x} / 2$ la $[S] = K_m$ entonces,

$$V = V_{m\acute{a}x} / 2 \approx 8.8 \text{ g / h}$$

$$[S] = K_m \approx 160.4 \text{ g / l}$$

CUADRO 3. Cinética de la glucoamilasa

Tiempo (horas)	Glucosa (% en peso)	Maltosa (% en peso)	Maltosa (g/l)	Diferido Tiempo (horas)	Velocidad (g/h)
0	2,1	97,9	227,13		
1	9,7	90,3	209,50	1	17,63
3	20,3	79,7	184,90	2	12,30
5	28,6	71,4	165,65	2	9,63
7	35,3	64,7	150,10	2	7,77
10	44,7	55,3	128,30	3	7,27
13	53,9	46,1	106,95	3	7,11
16	54,5	45,5	105,56	3	0,46
19	62,9	37,1	86,07	3	6,50
22	70,8	29,2	67,74	3	6,11
25	77,3	22,7	52,66	3	5,03
28	82,1	17,9	41,53	3	3,71
31	85,8	14,2	32,94	3	2,86
34	88,6	11,4	26,45	3	2,17
37	90	10	23,20	3	1,08
40	90,6	9,4	21,81	3	0,46
43	91,1	8,9	20,65	3	0,39
46	91,7	5,3	12,30	3	2,78

GRÁFICO 2. Concentración sustrato vs. Velocidad reacción con glucoamilasa

Según la cinética realizada la reacción es de primer orden y el tiempo de reacción adecuado es de 40 horas para obtener una concentración de glucosa del 90.6% de los sólidos presentes en la solución. A partir de este momento el incremento en la producción de glucosa es muy bajo (menor del 2%) a costo de un gran periodo de tiempo de reacción adicional y bajo el riesgo de aparición de los indeseables productos de reversión.

Desarrollo de la Hidrólisis Enzimática

Al observar los resultados obtenidos en las caracterizaciones de cada una de las enzimas, se decidió realizar la dextrinización (reacción con la α -amilasa) y la hidrólisis (reacción con glucoamilasa) bajo las siguientes condiciones:

Reacción con la α -amilasa:

pH: 6.0

Temperatura: 70 °C

Concentración de enzima: 0.1% (g enz./g sust.)

Tiempo de reacción: 120 min.

Reacción con Glucoamilasa:

pH: 5.8

Temperatura: 65 °C

Concentración de enzima: 0.25% (g enz./g sust.)

Tiempo de reacción: 36 h.

La dextrinización y la hidrólisis del almidón se realizaron en un solo proceso.

A la solución de almidón al 30% en peso se le agregó, CaCl_2 y buffer fosfato 0.1 M hasta ajustar el pH en un valor de 6.0; seguidamente, se agregó la cantidad de la enzima α -amilasa requerida para la relación enzima/sustrato fuera del 0.1% en peso. Se ajustó la tempera-

tura a 70 °C y se dejó reaccionar durante 120 min conservando estables las variables anteriormente mencionadas. Terminado el tiempo de reacción se inactivó la enzima con ácido clorhídrico 0.1 N llevando el pH hasta 3, garantizando también la precipitación de la proteína presente en la solución.

Posteriormente, se ajustó de nuevo el pH a 4.8 y para mantenerlo se adicionó acetato de sodio buffer 0.1M y manteniendo siempre la temperatura constante, 65 °C, se agregó enzima glucoamilosa en una proporción enzima/sustrato de 0.25%.

Refinación cristalización y purificación del jarabe

Luego de finalizada la reacción de hidrólisis completa del almidón con α -amilasa y glucoamilasa, el jarabe obtenido se filtró en tres etapas manteniendo la temperatura a 50 °C; la primera se efectuó a vacío con filtro de diámetro de malla de 20 μ , la segunda a vacío con un filtro de 5 μ y tierra de diatomáceas y la tercera a vacío con un filtro de 5 μ y carbón activado. La cantidad de tierra de diatomáceas y carbón activado, utilizado correspondió al 10% de la solución a filtrar, para cada una de ellas.

El jarabe se sometió a un proceso de tratamiento térmico bajo las condiciones descritas anteriormente. Inmediatamente terminado el tratamiento térmico, el jarabe se concentró hasta lograr el 78% en peso de sólidos, según la metodología planteada.

El jarabe concentrado se sometió a enfriamiento para obtener la glucosa cristalizada. Finalizando el tiempo de cristalización, parte de los sólidos presentes en la solución cristalizaron como dextrosa (52.4 % en peso).

Por lo tanto, la cantidad cristalizada de glucosa es:

$$\begin{aligned} \text{Dext. crist.} &= 500 \text{ g soluc. X} \\ (23.2 \text{ g almidón/100 g soluc.}) \times 0.524 \\ &= 60.78 \text{ g glucosa} \end{aligned}$$

La cristalización se realizó lentamente con el fin de garantizar la formación de cristales de gran tamaño, los cuales son fáciles de separar de la solución residual.

Para separar los cristales de la solución se utilizó el método de filtración. La purificación de los cristales se efectuó lavándolos con el 10% de agua destilada y desionizada respecto al peso de los sólidos cristalizados, se realizó un secado posterior de los cristales hasta una humedad del 8.5% en peso que está por debajo de la humedad de equilibrio para este producto que es del 9.1%, aproximadamente.

La eficiencia del proceso es:

$$\begin{aligned} \text{Cant. Máx. glucosa} &= 500 \text{ g soluc. X (23.2 g gluc./100} \\ &\text{g soluc.)} \\ &= 116 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\text{Cant. Crist. Dextrosa} = 60.78 \text{ g glucosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia del Proceso} &= (\text{glucosa crist}) \times 100 / (\text{glucosa máx. crist.}) \\ &= 52.4\% \end{aligned}$$

ANÁLISIS DEL PRODUCTO FINAL

Para el análisis y caracterización del producto se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), por ser ésta una técnica que permite una determinación directa y rápida de azúcares, con una mínima preparación de muestra y brindando una precisión igual a la de otras técnicas. El análisis fue hecho en un laboratorio externo, bajo las siguientes especificaciones:

Columna	: Shodex AFpak AGO-494
Efluente	: Acetonitrilo - agua (80/20)
Flujo	: 0.2mL/min.
Detector	: Shodex CL
Temperatura	: 37deg-C

La glucosa que se utilizó como patrón de comparación tenía especificaciones:

Dextrosa equivalente	100.0%
Humedad	0.05%
Acidez (ml. NaOH 0.02N/5 g)	<0.30
Cenizas	0.06%
Metales pesados	<5 ppm.
Arsénico	0 ppm.
Cloruros	<180 ppm.
Sulfatos	<250 ppm.
Dextrina	Pasa Prueba
Almidón soluble	Pasa Prueba
Color	Pasa Prueba
Cuenta Estándar	<10 ufc/g
Hongos	<10 ufc/g
Levaduras	<10 ufc/g
Coliformes	<3 nmp/g
E. colli	Negativo
Salmonella	Negativo

Se realizó un análisis de glucosa por HPLC del jarabe de glucosa concentrado sin cristalizar. En el cual se muestra que el jarabe tiene una concentración del 76.36% de Glucosa. (Gráfico 3)

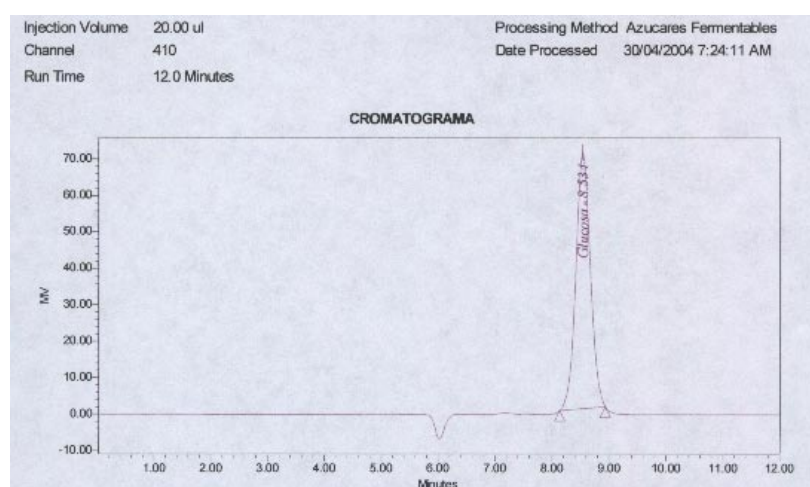
Según el reporte del cromatograma del análisis por HPLC hecho a la muestra final (gráfico 4) tiene una concentración de glucosa del 88.76 %.

El jarabe glucosa producto del proceso de hidrólisis de almidón de yuca, se concentró hasta el 78% en peso de sólidos, el cual contiene el 76.36% de glucosa.

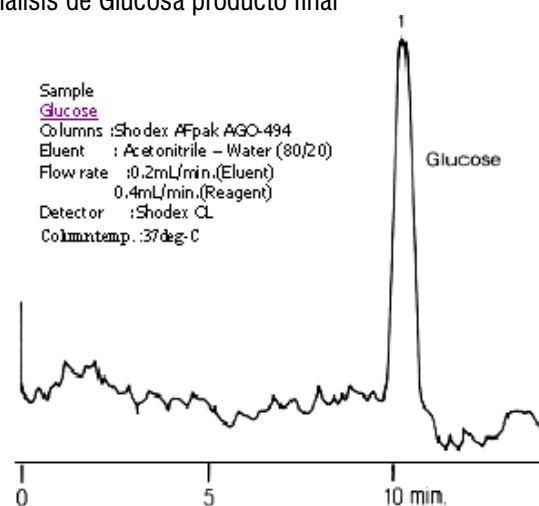
Después de la cristalización, el lavado y el secado, se obtuvo un producto de color blanco, con el 88.76% de DE. Si observamos los resultados la hidrólisis del almidón a glucosa con los parámetros establecidos es eficiente, la falla del proceso se encuentra en la etapa de cristalización y purificación de la glucosa, siendo necesario estandarizar las condiciones en que se realiza esta etapa.

CONCLUSIONES

Las condiciones de operación de las enzimas en los procesos están limitadas por las propiedades específicas de cada una de ellas, como también por las propiedades

GRÁFICO 3. Cromatograma del análisis de glucosa en jarabe de glucosa concentrado

Azúcares fermentables
Glucosa: 76.36%

GRÁFICO 4. Cromatograma análisis de Glucosa producto final

Azúcares fermentables
Glucosa: 88.76%

físicas y químicas del sustrato sobre el cual van a actuar. Las condiciones óptimas de trabajo de la enzima BAN 480L 1,4-alfa-D-glucan-hydrolase (alfa-amilasa) en la hidrólisis de almidón de yuca son: pH 6.0 y 70 °C de temperatura, mientras que para la enzima AMG 300L 1,4-alfa-D-glucan glucohidrolase (glucoamilasa) son: pH 4.8 y 65 °C.

Las reacciones contempladas en el proceso son de primer orden, donde la velocidad de la reacción es

exactamente proporcional a la concentración del reaccionante, en este caso el almidón y los disacáridos.

El tiempo de reacción adecuado para la dextrinación, es de dos horas para obtener una concentración de almidón remanente del 9.1% del almidón inicial. Pasado este tiempo la dextrinación del almidón es muy lento.

Para la sacarificación el tiempo de reacción adecuado

es de 40 horas para obtener una concentración de glucosa del 90.6% de los sólidos presentes en la solución. A partir de este momento el incremento en la producción de glucosa es muy bajo a costo de un gran periodo de tiempo de reacción adicional y bajo el riesgo de aparición de los indeseables productos de reversión.

Cuando se usa la glucoamilasa para hidrolizar altas concentraciones de dextrinas no se alcanza la conversión completa a glucosa, ya que la producción de glucosa decrece con el tiempo debido a las reacciones de reversión. No es posible, tampoco una conversión completa porque existe una fracción de maltosa que permanece en el jarabe.

El rendimiento del proceso de obtención de glucosa a partir de almidón de yuca fue del 40.72%, rendimiento bajo debido a la deficiente etapa de cristalización.

El almidón de yuca tiene un buen potencial para utilizarse en procesos de producción de glucosa y podría sustituir al almidón de maíz, pero es necesario continuar con la investigación en busca de mejorar las tecnologías empleadas en la producción de los derivados del almidón de yuca.

REFERENCIAS

- (1) Novo Nordisk. Product Sheet Termamyl 120 L, Fungamyl, AMG. Enzyme Business, Bagsvaerd, Denmark. 1997.
- (2) RIVIER, M. Almidón agrio de yuca en Colombia. CIAT - CIRAD - CETEC - UNIVALLE. Cali. 2001.
- (3) Carrera, Jorge, Módulos de Biotecnología. Enzimas industriales, Universidad del Cauca, Primer edición 2002.
- (4) Procedimientos estandarizados de Enzyme's Biotechnology, 1999.
- (5) Farmacopea USP 25, Páginas, año 2000.
- (6) Fennema, O. Química de los Alimentos. Acribia S.A., España. 1993.
- (7) Pozueta, L. Métodos Estadísticos. Ediciones UPC, España. 1994.
- (8) Rosendal, P. y Nielsen, B. Stability of Bacterial α -Amylase in the Starch Liquefaction Process. *Starch/Stärke*. Vol. 32, No. 11, Germany. 1979. 357-362.
- (9) Schenck, F. y Hebeda, R. Starch Hydrolysis Products. VCH, USA. 1994.
- (10) Starch Conversion Technology. G.M.A. Vanbeynum. Edit. Marcel Dekker Inc. New York, 1985.