

Producción de jarabes glucosados empleando un complejo enzimático en la hidrólisis de almidón contenido en harinas de yuca, sorgo y maíz

Glucose syrup production using an enzyme complex in the hydrolysis of starch in cassava flour, sorghum and corn

Maribel Casas S.*, Juan Ricardo Vélez Z.*‡, Alejandro Acosta C.†

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Existen diversos productos agrícolas con altos contenidos de almidón, como yuca, sorgo y maíz, que pueden ser destinados para la producción de jarabes glucosados.

OBJETIVO

Determinar la producción de jarabes glucosados empleando un complejo enzimático en la hidrólisis de almidón contenido en harinas de yuca, sorgo y maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las harinas fueron caracterizadas fisicoquímicamente determinándose el peso seco, humedad, fibra, ceniza, proteína, densidad aparente, almidón, temperatura de gelatinización y pH. La hidrólisis se realizó en dos etapas; en la etapa inicial (licuefacción) se empleó la enzima Termamyl[®] 120 L (pH 5,4, 80°C, 8 µL enzima/g almidón), para la segunda etapa (sacarificación) se empleó la enzima G-zyme[®] 480 (pH 4,3, 60°C, con dos niveles de concentración 1,5 a 5 µL/g y con el software estadístico Design Expert 7,0 se determinaron los tratamientos para encontrar la mejor relación enzima-sustrato que optimizará el porcentaje de conversión, mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM).

RESULTADOS

Los tiempos de licuado y sacarificado para yuca y maíz fueron de 30 y 60 min, y para sorgo de 40 y 80 min. Los porcentajes de conversión obtenidos experimentalmente a partir de los modelos (RSM) fueron de 98,40%, 96,52% y 91,04% con una productividad (g azúcares reductores/L.min) de 2,70, 1,69 y 1,04 para yuca, sorgo y maíz, respectivamente.

CONCLUSIÓN

El tiempo de hidrólisis total en las tres harinas fue igual o inferior a 2 h, se obtuvieron porcentajes de conversión para yuca, sorgo y maíz del 98,4%, 96,52% y 91,04% respectivamente, se demuestra la efectividad de las enzimas empleadas y mediante el modelo RMS se obtiene la optimización del porcentaje de conversión.

PALABRAS CLAVES

Almidón, glucoamilasa, jarabes glucosados, pululanasa, superficie de respuesta.

*Estudiantes de Microbiología Industrial y Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Asesor de Trabajo de Grado, Ingeniero Químico, Magister en Biotecnología, Docente - Investigador Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Contacto: juanrickk@hotmail.com | Recepción: 04-01-2014. Aceptación: 06-03-2014.

ABSTRACT

INTRODUCTION

There are several agricultural products with high starch content such as cassava, sorghum and corn, which may be used for glucose syrup production.

OBJECTIVE

To determine glucose syrup production using an enzyme complex in the hydrolysis of starch in cassava flour, sorghum and corn.

MATERIALS AND METHODS

The samples were physicochemically characterized to determine dry weight, moisture, fiber, ash, protein, bulk density, starch gelatinization temperature and pH. The hydrolysis was carried out in two stages: Termamy[®] 120 L enzyme (pH 5.4, 80°C, 8 µL enzyme/g starch) was employed in the initial stage (liquefaction); G-zyme[®] 480 (pH 4.3, 60°C) was in the second stage (saccharification), and the statistical software Design Expert 7.0 was used to determine the best enzyme-substrate ratio to optimize the conversion rate, by applying response surface methodology (RSM).

RESULTS

Liquefaction and saccharification times for cassava and corn were 30 and 60 minutes, and for sorghum, 40 and 80 minutes respectively. The conversion rates obtained experimentally from models (RSM) were 98.40%, 96.52% and 91.04% with productivity (g reducing sugars/L.min) of 2.70, 1.69 and 1.04 for cassava, sorghum and corn, respectively.

CONCLUSIONS

The total time of hydrolysis of all three flours evaluated was equal to or less than 2 hours. Conversion rates for cassava, sorghum and corn, which were obtained through MRS model, were 98.4%, 96.52% and 91.04% respectively. In addition, the effectiveness of the enzymes used was demonstrated.

KEY WORDS

Starch, glucoamylase, glucose syrups, pullulanase, response surface.

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años, muchos investigadores han enfocado algunos estudios hacia el uso y aprovechamiento de fuentes ricas en almidón, (polímero que contiene amilosa: unidades de glucosa ensambladas por enlaces alfa 1-4 y amilopectina: unidades de glucosa ensambladas por enlaces alfa 1-4 con ramificaciones en alfa 1-6),¹ de donde se obtienen azúcares que pueden reemplazar la sacarosa en diversos productos de la industria alimentaria; el almidón además de servir de reserva para las plantas también es fuente de carbohidratos para los seres humanos y se destina aproximadamente en el sector industrial en un 75% (industria textil, farmacéutica y cosmética, papelera, adhesivos, entre otras) y en el sector alimentario en un 25% (industria alimentaria y de edulcorantes como producción de maltodextrinas, dextrosa, fructosa y jarabes glucosados, entre otros).²

En Colombia, se cultivan diversas plantas con un contenido alto de almidón como la batata, el arroz, el trigo, la papa, el plátano, la yuca, el sorgo y el maíz, entre otros, que van en concordancia con el desarrollo agroindustrial de la región andina y del país. Para el presente trabajo se eligieron tres de estas materias primas que fueron la yuca, el sorgo y el maíz, para realizar un proceso de hidrólisis enzimática a jarabes glucosados.

La yuca presenta un porcentaje de almidón del 64% al 87% aproximadamente, localizándose en todas las regiones tanto en zonas bajas y desérticas como la Guajira, así como en las altas y lluviosas, región andina; su producción es cerca de 2 millones de toneladas de raíces en el año y en el Caribe se produce el 50% del total nacional. Para el periodo 2000-2009 se presentó un área sembrada de 1'810.923 hectáreas para un total de producción de 19'071.957 toneladas;³ respecto al sorgo, este presenta un porcentaje de almidón del 53% al 84% aproximadamente, su cosecha se encuentra principalmente en: Atlántico, Cesar, Cundinamarca, Huila, Tolima y Valle donde las cosechas deben oscilar entre 180.000 y 300.000 plantas por hectárea con tasas de siembra que varían entre 12 y 18 Kg/Ha.⁴

El maíz presenta un porcentaje de almidón del 66% al 76% aproximadamente y se encuentra principalmente en: Valle del Cauca, Tolima-Huila, Sur del Cesar y Santander, Llanos Orientales y la región del

Caribe Húmedo, en los departamentos de Córdoba y Sucre, ocupando la segunda de mayor extensión con 538.569 hectáreas en 2004 produciendo cerca de 1.8 millones de toneladas, en el 2012 se obtuvo un área sembrada en 22 departamentos del país de 211.967 hectáreas de maíz amarillo y 156.217 hectáreas de maíz blanco.⁵

Gracias a la implementación del tratado de libre comercio, estos sustratos llegan a bajos precios compitiendo con el producto nacional, un uso alternativo de alto valor agregado para estos sustratos, son los jarabes de glucosa.

El jarabe glucosado es uno de los productos con mayor aplicación en la industria alimentaria y biotecnológica, con característica acuosa, viscosa, ligeramente dulce, incolora o translúcida, concentrada y clarificada de sacáridos, es fuente de carbohidratos, nutritivo, previene la cristalización del azúcar, retiene la humedad y confiere viscosidad a otros productos; su proceso de obtención es mediante la hidrólisis de almidón, por ácidos y/o enzimas;⁶ la hidrólisis enzimática presenta varias ventajas como: la selectividad (las enzimas son específicas para un determinado enlace, no es frecuente la aparición de productos de degradación), se mantiene el valor nutritivo (no hay degradación de los componentes separados), condiciones moderadas de temperatura y pH, no se genera corrosión, el consumo de enzima es bajo, no requiere el empleo de agentes químicos, y aunque el tiempo de reacción sea mayor que en procesos como la hidrólisis ácida, los rendimientos son cercanos al 100%.^{7,8}

La hidrólisis enzimática se realiza en dos etapas: licuefacción y sacarificación; la primera se lleva a cabo con una alfa amilasa, en nuestro caso Termamyl® 120 L de la empresa Novozymes,⁹ extraída de *Bacillus licheniformis* con una actividad de 120 KNU/g, el almidón es fragmentado en unidades de menor tamaño como la glucosa, maltosa y dextrinas (polímeros de tamaño corto que consisten en uniones de moléculas de D-glucosa por enlaces glucosídicos alfa 1-4 o alfa 1-6), usualmente se emplean concentraciones de almidón del 30% al 40% (P/V);¹⁰ las dextrinas son cuantificadas por métodos como HPLC y Miller.^{11,12}

En la segunda etapa se emplea el complejo enzimático G-zyme® 480 con una actividad de 380 GAU/g fabricado por Genencor,¹³ tiene la capacidad de hidrolizar almidones y está compuesto por tres enzimas, la glucoamilasa y proteasa extraída de

Aspergillus niger y pululanasa de *Bacillus licheniformis*, las cuales permiten hidrolizar las dextrinas de forma simultánea; la pululanasa rompe las ramificaciones o los enlaces alfa 1-6 y la glucoamilasa actúa rompiendo los enlaces alfa 1-4 y 1-6, aunque este último tipo de enlace es de forma más lenta, liberando unidades de glucosa que se cuantifican por el método enzimático de la glucosa oxidasa - peroxidasa (GOD - POD) y los azúcares reductores por el método Miller.¹⁴⁻¹⁶ El uso combinado de pululanasa y glucoamilasa aumenta el rendimiento de glucosa hasta por encima del 94%,¹⁷ finalmente mediante algunas etapas de purificación se obtiene el jarabe glucosado. En este trabajo se evaluó la mejor relación enzima/sustrato en la etapa de sacarificación mediante el uso del complejo enzimático G-zyme® 480, empleando un diseño estadístico de superficie de respuesta y como variables de respuesta la productividad y el porcentaje de conversión a jarabe glucosado para harinas de yuca, sorgo y maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las materias primas empleadas en el trabajo son las harinas de yuca, sorgo y maíz; la primera fue producida en la región de Urabá (Antioquia), en el municipio de Mutatá, la cáscara fue eliminada antes de la molienda; el sorgo rojo en grano y el maíz blanco retrillado fueron adquiridos en almacenes comercializadores de alimentos balanceados para animales en Medellín; los granos de sorgo y de maíz se tamizaron (tamiz estándar N°8; 2,36 mm, ASTM E-11) de forma artesanal para eliminar impurezas y granos en mal estado, posteriormente se realizó una molienda seca para obtener las harinas que luego fueron tamizadas (tamiz estándar N°50; 0,3 µm ASTM E-11), obteniendo partículas menores de 0,3 µm, garantizando el mismo tamaño de partícula para la harina empleada en la hidrólisis. Las harinas se almacenaron en bolsas de papel kraft en un lugar limpio y seco, a temperatura ambiente para conservar su calidad y facilitar su manejo.

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

Se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas de las materias primas, tales como: peso seco y humedad,¹⁸ fibra,¹⁹⁻²⁰ ceniza,²¹ proteína mediante el

método Kjeldahl,²² densidad aparente,²³ contenido de almidón (mediante hidrólisis ácida),²⁴ temperatura de gelatinización,^{19,20} pH;^{19-20,25} todas las mediciones se hicieron por duplicado.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA G-ZYME® 480

Se determinó siguiendo el método reportado por Villada y Genencor¹²⁻²⁶ con algunas modificaciones.

Se utilizó almidón de papa, Merck grado analítico, las concentraciones empleadas fueron 10, 20 y 30 g/L; enzima G-zyme® 480 0,01% (v/v); la solución en que se diluyó fue buffer acetato de sodio 0,1M, pH 4,3 y la neutralización realizada con hidróxido de sodio 3M; temperatura 62°C ± 2, 140 rpm ± 1 rpm y 6 min el tiempo de hidrólisis, cada tratamiento se hizo por duplicado.

Inicialmente, el almidón fue disuelto por completo en el buffer a 80°C para después realizar la hidrólisis; el producto de la hidrólisis cuantificado fue glucosa, mediante el método de la glucosa oxidasa (GOD POD).

CÁLCULO DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE G-ZYME® 480

- El valor teórico de la actividad enzimática según la ficha técnica de la enzima es: 380 GAU/g.
- Actividad experimental.

$$\text{GAU} = \frac{\text{g. glucosa}}{\text{g. almidón}} = 0,4328$$

- Actividad enzimática experimental=

$$\frac{\text{GAU}}{\text{g. enzima}} = \frac{0,4328}{(0,1 \text{ l} * 0,0113 \text{ g de enzima})} = 383,01 \text{ GAU/g}$$

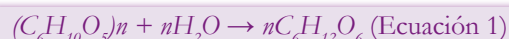
GAU= Cantidad de enzima que libera 1 g de azúcares reductores calculados, glucosa por hora a partir de almidón soluble.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LICUEFACCIÓN (ENZIMA TERMAMYL® 120 L)

Se realizó la licuefacción de las tres harinas, bajo las condiciones óptimas reportadas por el fabricante de la enzima Termamyl® 120 L (Novozymes) (pH 5,4 ± 0,1, temperatura de 80°C ± 2) y la concentración de

enzima 8 µL/g de almidón, añadida antes de alcanzar la temperatura,²⁷ concentración de harina 100 g/L y un tiempo total de 70 min, tomando muestras cada 10 min, al tomar cada muestra se inactivó la enzima añadiendo NaOH 1M y refrigerando a 4°C, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 4 min; finalmente se determinaron azúcares reductores mediante el método Miller.¹¹

La conversión del almidón a glucosa se basa en la siguiente ecuación:



Teóricamente 1 g de almidón completamente hidrolizado produce 1,111 g de glucosa.

En cada harina se realizó por triplicado la medición inicial de la concentración de azúcares reductores, para determinar su porcentaje respecto al almidón y restar este valor del porcentaje de conversión final; también se determinó por triplicado la concentración final de azúcares reductores para la licuefacción.

El porcentaje de conversión se determina mediante el cociente obtenido de dividir: azúcares reductores en una muestra antes o después de hidrolizarla/ almidón contenido en esa muestra.

SACARIFICACIÓN (ENZIMA G-ZYME® 480) Y DETERMINACIÓN DE LA MEJOR RELACIÓN ENZIMA-SUSTRATO MEDIANTE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Las concentraciones empleadas de sustrato para las tres harinas se basaron en el contenido de almidón, es decir la variable sustrato se refiere a la concentración de almidón y no a la cantidad de harina pesada; para la harina de yuca y sorgo; los dos niveles para el sustrato fueron de 80 a 200 g/L y para la enzima de 1,5 a 5 µL/g con un tiempo de hidrólisis de 60 y 80 min, respectivamente; para la harina de maíz los dos niveles empleados fueron sustrato de 40 a 140 g/L y enzima de 1,5 a 5 µL/g con tiempo de hidrólisis de 60 min; para las tres harinas se tomaron muestras cada 10 min y se inactivó la enzima de igual forma que en la licuefacción, el pH de la sacarificación fue 4,3 ± 0,1, temperatura 60°C ± 2 y 140 rpm ± 1; las condiciones de pH y temperatura se encuentran en el rango óptimo reportado por el fabricante de la enzima, Genencor. Finalmente, se determinaron azúcares reductores mediante el método Miller.¹¹

PRODUCTIVIDAD DE LA ENZIMA G-ZYME® 480 EN LOS LICUADOS DE YUCA, SORGO Y MAÍZ DE ACUERDO AL MODELO DE LA METODOLOGÍA DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)

Según el modelo obtenido en cada superficie de respuesta, se hizo una verificación de éste para los tratamientos que optimizarían el porcentaje de conversión; se tomaron muestras cada 10 min, inactivándose la enzima de igual forma que en la licuefacción; finalmente se determinaron azúcares reductores mediante el método de Miller.¹¹

La velocidad se determinó tomando las pendientes al graficar 3 ó 4 mediciones lineales en el tiempo, obtenidas de los tratamientos de interés.

La velocidad de reacción para la conversión del almidón y la productividad están expresadas en las mismas unidades [(gramos de azúcares reductores/(L.min))], para este trabajo aplican indistintamente, aunque con la productividad se hace referencia específicamente a la obtenida de las mejores condiciones que arrojó el modelo de la RSM y que fueron verificados experimentalmente para el proceso de sacarificación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Determinación del tiempo de licuefacción (enzima Termamyl® 120 L). Para determinar el tiempo óptimo de conversión de la enzima en el cual no se presentaban diferencias estadísticamente significativas; con los porcentajes de conversión de cada harina se realizó una prueba t Student para muestras relacionadas, las mediciones en cada tiempo cumplen con la normalidad e independencia (datos no mostrados) con intervalos de confianza al 95%.

Diseño experimental para determinar la mejor relación enzima G-zyyme® 480/sustrato para las tres harinas. El método empleado fue la metodología de superficie de respuesta (RSM) de composición central rotatable²⁸ con cinco puntos centrales, cuatro axiales y cuatro factoriales, para dos factores (concentración de sustrato en g de almidón/L y enzima en µL/g de almidón) siendo un total de trece tratamientos por cada tipo de harina, estos tratamientos fueron generados usando el software estadístico Stat-Easy Design Expert versión 7,0 de prueba.

Los niveles de sustrato para la harina de yuca y sorgo fueron de 80 a 200 g/L y enzima de 1,5 a 5 µL/g;

para la harina de maíz los niveles de sustrato y enzima fueron de 40 a 140 g/L y 1,5 a 5 µL/g, respectivamente.

Las variables respuestas son porcentajes de conversión y velocidad (g/L.min).

Productividad de la enzima G-zyyme® 480 en los licuados de yuca, sorgo y maíz de acuerdo al modelo de la metodología de la superficie de respuesta (RSM).

Para estimar la productividad de los tratamientos que optimizarían el porcentaje de conversión se empleó la herramienta predictiva del software Design Expert 7,0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS HARINAS

En término general las mediciones obtenidas en la **Tabla 1** coinciden con rangos reportados por la literatura: 80% a 87,4% de almidón en yuca, 55% a 75% en sorgo y 72% a 73% en maíz,^{3,5,30,33,38} para este caso es de mayor importancia el contenido de almidón, ya que es la materia prima de los jarabes de glucosa.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA G-ZYME® 480

En la **Figura 1**, se muestra la actividad de la enzima expresada en GAU, donde se obtuvo un valor de 0,433 g glucosa/g almidón, con el cual se determinó la actividad enzimática (383,01 GAU/g) teniendo en cuenta el tiempo de hidrólisis y la cantidad de enzima.

La actividad enzimática se asemeja a la teórica reportada por Genencor (380 GAU/g) con un error del 0,8%, esto indicó que la enzima usada se encontraba en las condiciones óptimas para la hidrólisis.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LICUEFACCIÓN (ENZIMA TERMAMYL® 120)

La **Tabla 2** y **Figura 2**, indican los tiempos a partir de los cuales ya no se presenta un rendimiento significativo en la hidrólisis del almidón, debido a que alcanzó la cantidad máxima de hidrólisis que puede realizar la alfa amilasa, que generó dextrinas u oligosacáridos; en la **Figura 2**, se observa la fase estacionaria del proceso del licuado.

Se calcularon los intervalos de confianza para los valores promedio donde se estabilizó el proceso, es decir, a partir de los 30 min para la yuca y el maíz, y para el sorgo a partir de los 40 min hasta los 70 min en las condiciones

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las harinas.

Característica	Yuca		Sorgo		Maíz	
	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
Peso seco %	87,77	0,003	89,28	0,03	90,38	0,042
Humedad %	12,23	0,003	10,72	0,03	9,62	0,042
Fibra %	0,27	0,13	10,75	0,97	10,15	0,22
Ceniza %	0,17	0,11	1,76	0,012	1,15	0,17
Proteína %	0,34	0,03	8,46	0,8	9,28	0,9
Densidad aparente (g/mL)	0,53	0,01	0,49	0,002	0,44	0,01
AR totales/1,111 ≈ almidón (%)	89,35	2,68	81,04	3,48	77,64	3,04
Temperatura gelatinización °C	65	2	65	2	70	2
*Amilosa/amilopectina %	42-58	-	25-75	5	30-70	5
pH	4,7	0,1	6,21	0,1	6,29	0,1

\bar{X} = media. DE = Desviación estándar. *Tomado y modificado de:²⁹⁻³³ Los demás valores se obtuvieron experimentalmente.

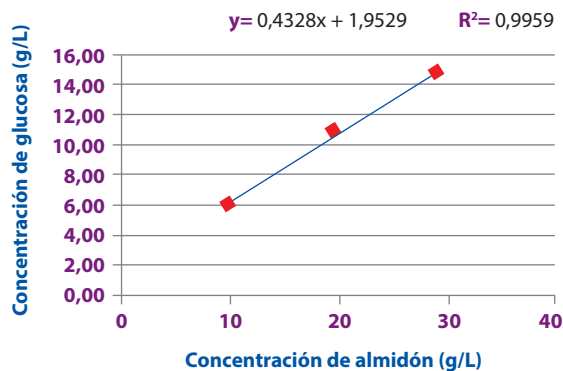


Figura 1. Glucosa obtenida en función de la concentración de almidón

de la enzima en el presente trabajo; estos tiempos coinciden con el encontrado por Zambrano,³⁴ en almidón de batata, los cuales también fueron de 30 min; el porcentaje de conversión está calculado con base en los azúcares reductores como producto y como base total de sustrato el almidón contenido en cada tipo de harina.

El tiempo de licuefacción en el sorgo en comparación con las otras dos harinas es mayor, seguido del maíz y la yuca; esto se atribuyó a su mayor contenido de amilopectina, ya que afecta de manera directa el tiempo de hidrólisis y el porcentaje de conversión, porque la alfa amilasa no actúa sobre los enlaces alfa 1-6 de las

ramificaciones haciendo el proceso más lento y menos productivo.¹⁰ La mayor hidrólisis se presentó en la yuca, luego el maíz y finalmente el sorgo, con un porcentaje de amilopectina del 58%, 70% y 77%, respectivamente, en relación al contenido de almidón (Tabla 1); el porcentaje de conversión en esta etapa es inversamente proporcional al contenido de amilopectina (Tabla 2).

SACARIFICACIÓN (ENZIMA G-ZYME® 480)

El tiempo de sacarificación es mayor para el sorgo (80 min y en las otras dos harinas 60 min) debido a que en su licuado quedaron gran cantidad de enlaces alfa 1-6 (amilopectina), que no fueron hidrolizados por la enzima alfa amilasa (Termamyl® 120 L), pero deberán ser clivados por la pululanasa; aunque este factor no

Tabla 2. Porcentajes de azúcares reductores iniciales de las harinas, promedio de porcentaje conversión y tiempo de licuefacción.

Harina	% Promedio AR ± % DE	Promedio % de conversión (IC 95%)	Tiempo de licuado (min)
Yuca	0,07 ± 0,005	58,71 ≤ 59,79 ≤ 60,87	30
Sorgo	1,67 ± 0,43	32,72 ≤ 37,21 ≤ 41,69	40
Maíz	1,40 ± 0,16	47,31 ≤ 50,10 ≤ 52,89	30

AR: Azúcares reductores. DE: Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza.

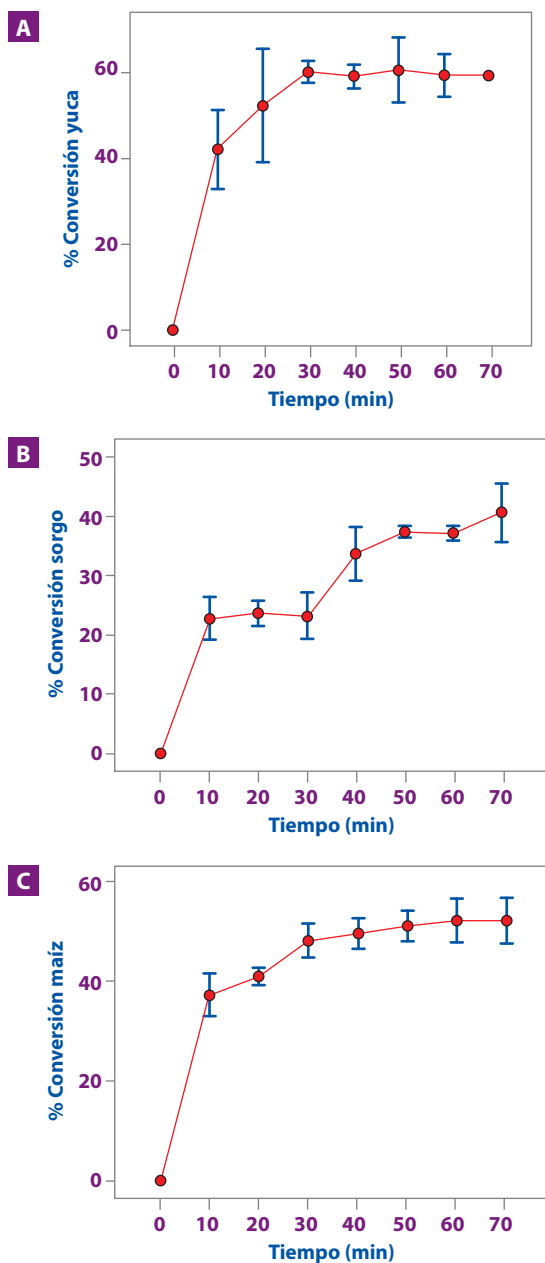


Figura 2. Porcentaje promedio de conversión con intervalos de confianza al 95% para la licuefacción con la enzima Termamyl® 120 L. **A.** Yuca. **B.** Sorgo. **C.** Maíz.

afectó su porcentaje de conversión, solo aumento el tiempo de hidrólisis; mientras que la yuca y el maíz poseen un contenido de amilopectina menor, por ello su menor tiempo de sacarificación; 60 min en el proceso de sacarificación en harina de yuca también es reportado por Pérez *et al.* (2008).³⁵

Según el coeficiente de determinación ajustado (Tabla 3), la enzima y el sustrato explican un 80%, 95%, y 85% del porcentaje de conversión para la yuca, el sorgo y el maíz. Estos valores son aceptables según Joglekar *et al.*,³⁶ que consideran bueno un R^2 de al menos 0,8, mientras que Henika RG (1982)³⁷ considera bueno, mínimo un valor de 0,85; teniendo en cuenta los valores del coeficiente de determinación ajustado, los modelos son adecuados para predecir la respuesta.

Para la elección del tipo de modelo (cuadrático, lineal, 2FI, cúbico) para el porcentaje de conversión y de velocidad arrojados por el software, según la suma de cuadrados tipo I, se eligen aquellos cuyo valor $P < 0,05$, valores P tolerables al encontrarse por debajo del valor de referencia, lo que representa un 95% de confiabilidad.³⁵

En todos los modelos según el Anova de la RSM se incluyeron los factores que fueron estadísticamente significativos, pero conservando la jerarquía.

Los modelos de porcentaje de conversión del sorgo y del maíz presentan un buen ajuste de los parámetros, en el caso de la yuca el ajuste es un poco más bajo, sin embargo los tres modelos son adecuados para predecir la conversión en cualquier punto de la región explorada y todos se ajustaron a un polinomio de segundo orden (Tabla 3, Tabla 4 y Figura 3).

Al emplear la herramienta de optimización del Software Design Expert, se hizo la predicción y verificación de los tratamientos que optimizarían la máxima conversión, obteniéndose errores de 2,99%, 2,67% y 1,61% para yuca, sorgo y maíz, respectivamente (Tabla 5). Como los porcentajes de error son bajos, esto indicó que los modelos son aceptables para predecir porcentajes de conversión en las condiciones de concentración de enzima y sustrato.

Es importante tener en cuenta que según la Ecuación (1), los porcentajes de conversión pueden llegar a ser 111,1% en caso de que fuera hidrolizado a glucosa un 100% del almidón.

PRODUCTIVIDAD DE LA ENZIMA G-ZYME® 480 EN LOS LICUADOS DE YUCA, SORGO Y MAÍZ DE ACUERDO AL MODELO DE LA METODOLOGÍA DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)

En cuanto a los modelos de las velocidades todos fueron significativos, para la yuca el modelo se ajustó a un polinomio de segundo orden y para el sorgo y el maíz el modelo se ajustó a un polinomio de primer orden; en los tres se observó la tendencia del aumen-

Tabla 3. Resultado del Anova de la RSM para los porcentajes de conversión y velocidad de sacarificación complejo G-zyme® 480.

Parámetro	Anova para porcentajes conversión			Anova para velocidades		
	Yuca	Sorgo	Maíz	Yuca	Sorgo	Maíz
Desv. Estándar	2,87	2,79	4,55	0,30	0,37	0,23
Media	92,52	84,57	81,03	1,46	1,44	0,75
C.V %	3,11	3,3	5,61	20,28	26,01	31,12
R-cuadrado	0,87	0,97	0,90	0,91	0,69	0,88
R-c ajustado	0,80	0,95	0,85	0,86	0,62	0,83
R-c predictorio	0,52	0,91	0,69	0,52	0,44	0,76

Parámetro	Valores P del Anova para el porcentaje de conversión			Valores P del Anova para la velocidad de las tres harinas		
	Yuca	Sorgo	Maíz	Yuca	Sorgo	Maíz
Source	Prob >F	Prob >F	Prob >F	Prob >F	Prob >F	Prob >F
Model	0,0014	<0,0001	0,0004	0,0003	0,0030	0,0002
A-Sustrato	0,3014	0,9282	0,4859	0,0005	0,0214	0,0006
B-Enzima	0,0016	0,0001	0,0001	0,0010	0,0045	0,0004
AB	0,7190	0,0313	0,8479	0,0119	--	0,0308
A^2	0,0016	<0,0001	0,0478	0,1113	--	--
B^2	0,0128	<0,0001	0,0018	0,0114	--	--
Lack of Fit	0,3178	0,5849	0,4897	0,0235	0,2829	0,6568

Tabla 4. Ecuaciones para predecir porcentaje de conversión y velocidad con el complejo enzimático G-zyme 480.

Harina	Ecuación de porcentaje de conversión	Ecuación de velocidad de la enzima (g/L.min)
Yuca	$\% \text{ Conversión} = + 51,81832 + (0,37773 * \text{Sustrato}) + (10,10766 * \text{Enzima}) - (1,41587E-003 * \text{Sustrato}^2) - (1,13620 * \text{Enzima}^2)$	$\text{Velocidad} = + 0,15044 - (4,98271E-003 * \text{Sustrato}) + (0,43394 * \text{Enzima}) + (4,57143E-003 * \text{Sustrato} * \text{Enzima}) - (0,11897 * \text{Enzima}^2)$
Sorgo	$\% \text{ Conversión} = +6,98001 + (0,58439 * \text{Sustrato}) + (26,60821 * \text{Enzima}) + (0,035690 * \text{Sustrato} * \text{Enzima}) - (2,50688E-003 * \text{Sustrato}^2) - (4,19829 * \text{Enzima}^2)$	$\text{Velocidad} = - 0,30738 + (6,00429E-003 * \text{Sustrato}) + (0,27408 * \text{Enzima})$
Maíz	$\% \text{ Conversión} = +29,01435 + (0,26644 * \text{Sustrato}) + (23,31086 * \text{Enzima}) - (1,61077E-003 * \text{Sustrato}^2) - (2,58792 * \text{Enzima}^2)$	$\text{Velocidad} = + 0,14130 - (2,54241E-003 * \text{Sustrato}) - (0,049013 * \text{Enzima}) + (3,40000E-003 * \text{Sustrato} * \text{Enzima})$

Sustrato (g/L). Enzima (µL/g).

to de la velocidad a medida que aumentó el sustrato y la enzima (Tabla 4 y Figura 3).

Las velocidades que se obtuvieron empleando los modelos que maximizaban el porcentaje de conversión arrojados en el software, fueron verificadas obteniéndose errores del 4,25%, 6,29% y

6,12% para yuca, sorgo y maíz respectivamente lo que demuestra la bondad de la predicción (Tabla 5). Como los porcentajes de error son bajos se indica que estos modelos son aceptables para predecir las velocidades en las condiciones de concentración de enzima y sustrato.

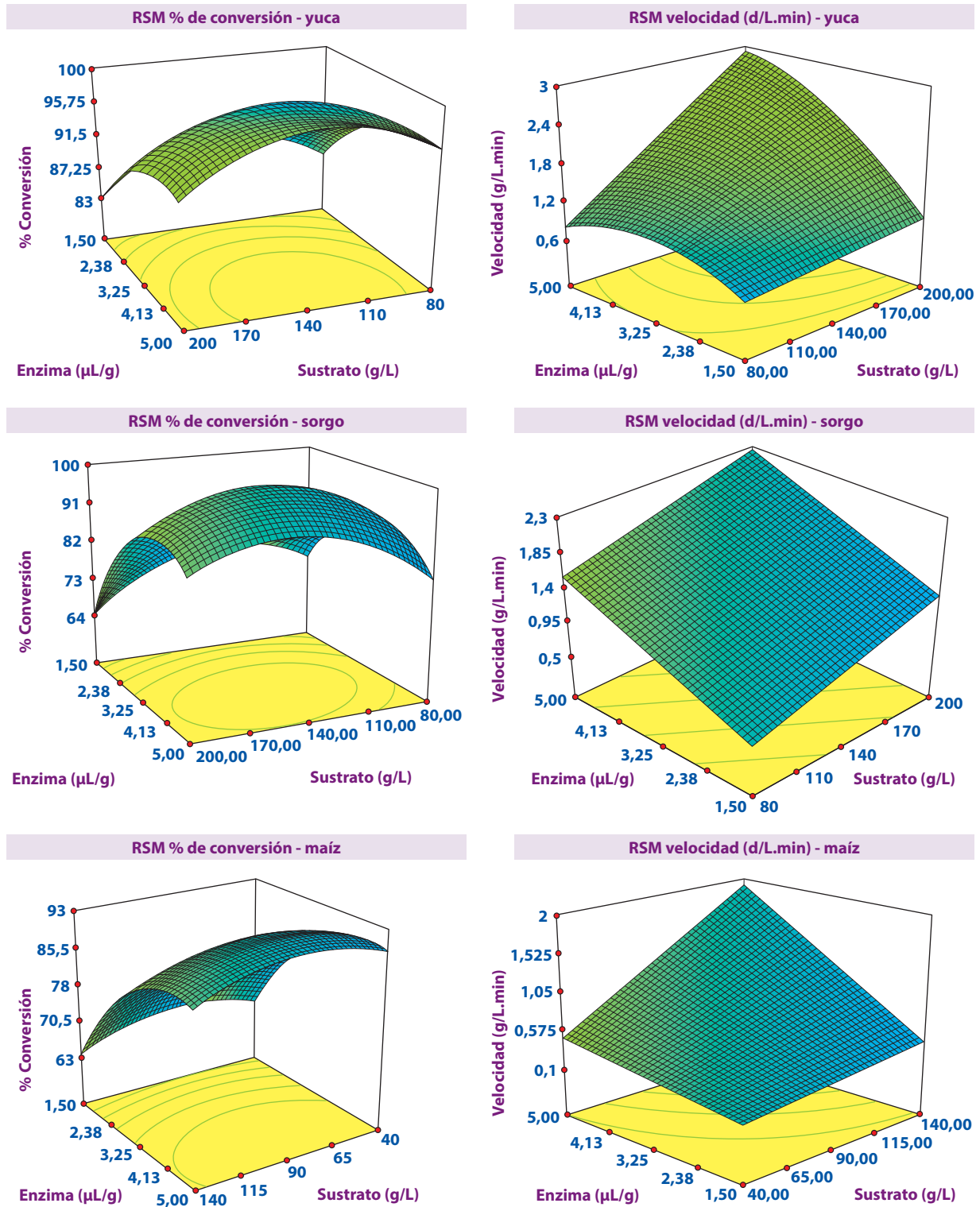


Figura 3. Perfiles de las superficies de respuesta correspondiente al porcentaje de conversión y velocidad de hidrólisis de oligosacáridos en azúcares reductores.

Tabla 5. Predicción de los tratamientos que optimizan el porcentaje de conversión en la sacarificación y sus respectivas verificaciones.

Tratamientos que optimizan el porcentaje de conversión				
Harina	Enzima (µl/g)	Sustrato (g/L)	%Conversión esperada	Velocidad esperada (g/L.min)
Yuca	4,45	186,21	95,54	2,59
Sorgo	3,78	143,43	99,17	1,59
Maíz	4,5	82,66	92,53	0,98
Verificación experimental de los tratamientos				
Harina	Enzima (µl/g)	Sustrato (g/L)	%Conversión esperada	Velocidad esperada (g/L.min)
Yuca	4,45	186,21	98,40	2,70
Sorgo	3,78	143,43	96,52	1,69
Maíz	4,5	82,66	91,04	1,04
Porcentaje de error				
Harina	Porcentaje de conversión		Velocidad	
Yuca	2,99		4,25	
Sorgo	2,67		6,29	
Maíz	1,61		6,12	

CONCLUSIONES

- Los tiempos de licuefacción de las tres harinas no superaron los 40 min debido a la eficiencia del proceso de hidrólisis, siendo menor la yuca y el maíz.
- Las relaciones enzima-sustrato permiten optimizar el porcentaje de conversión en función de los rangos de la cantidad de enzima y sustrato, reduciendo costos y tiempo en el proceso de hidrólisis.
- El tiempo de hidrólisis en la sacarificación es mayor cuando el contenido de amilopectina es elevado; para este trabajo el almidón de sorgo tiene un mayor contenido de amilopectina.
- El proceso de hidrólisis fue eficiente puesto que el tiempo requerido para la producción de jarabes glucosados empleando las tres harinas fue igual o inferior a 2 h obteniéndose porcentajes de conversión por encima del 90%.
- En las verificaciones de los modelos de porcentaje de conversión y de productividad no se presentaron errores altos, indicando que estos modelos representan aceptablemente la influencia de las variables concentración de enzima y sustrato a los tiempos indicados en cada harina, sobre el porcentaje de conversión y productividad en yuca, sorgo y maíz.

- Este trabajo además de demostrar las ventajas del proceso de hidrólisis empleando estas dos enzimas, permitió optimizarlo, identificando para la sacarificación las condiciones más relevantes de los factores, como la concentración de sustrato y enzima, que están estrechamente relacionadas para obtener una máxima conversión y una alta productividad; estos son resultados de gran valor para un adecuado diseño en un escalado industrial de una planta de producción de jarabes glucosados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación Biotransformación de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia por su colaboración permanente, por el soporte académico, logístico y económico.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado con los recursos del Grupo de Investigación Biotransformación de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia y con recursos propios de los investigadores.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Saldoval ZE.** Técnicas aplicadas al estudio de anatomía vegetal. México: Instituto de biología. Universidad Autónoma de México. 2005; 122.
2. **Codipsa (s.f).** Recuperado el 20 de 12 de 2013, de Almidón de Mandioca. Disponible en: http://www.codipsa.com.py/aplicaciones_del_almidón.php
3. **Aguilera Días M.** La yuca en el caribe colombiano: de cultivo ancestral a agroindustrial. 2012. Recuperado el 08 de 01 de 2013. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/dtser_158.pdf
4. **Fenalle FN.** El cultivo del sorgo. Historia e importancia. Bogotá: Banco Agrario de Colombia. 2010.
5. **Bustamante RJ.** Boletín de prensa. Encuesta nacional agropecuaria ENA. 2012. Bogotá: Dane. 2013.

6. **ICONTEC.** Industrias alimentarias de jarabe de glucosa. NTC 610. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá. 2001.
7. **Guadix A, Guadix EM, Páez-Dueñas MP, González-Tello PY.** Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. España: Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 2000.
8. **Dagnino EP, Roggero Luque FS, Morales WG, Chamorro ER, Felissia FE, Areac MC, et al.** Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional. Facultad regional resistencia. 2012.
9. **Product data sheet.** Termamyl® 120 L, Denmark, Nozymes. 2005.
10. **Industrial enzymes.** Structure, function and applications, Julio Polaina, Andrew MacCabe, Springer. 2007; 23-6.
11. **Miller GL.** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry 1959; 31:426-8.
12. **Villada Pinilla WA.** Determinación experimental de las condiciones de operación para el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de yuca nativa de la región amazónica en la ciudad de Leticia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2010.
13. **Safety data sheet.** G-zyme® 480 Ethanol, Genencor a Danisco Division. 2007.
14. **Carrera E.** Producción y aplicación de enzimas industriales. Ciencias Agropecuarias. 2003; 1:9-15.
15. **Gacesa P, Hubble J.** Tecnología de las enzimas. Acribia. Zaragoza. España. 1990.
16. **Illanes A.** Biotecnología de enzimas. Ediciones Universitarias. Universidad Católica de Valparaíso. 1994.
17. **Crabb WD, Mitchinson C.** Enzymes involved in the processing of starch to sugars. Trends Biotechnol. 1997; 15:349-52.
18. **ICONTEC.** Alimentos para animales. Yuca integral seca para consumo animal. NTC 3528. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá. 2002.
19. **Aristizábal J, Sánchez T.** Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007.
20. **Grace M.** Análisis de la yuca. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1977.
21. **AOAC.** Ash of flour. Association of Analytical Chemists International (AOAC). 7 ed. MD, Estados Unidos de América. 2000.
22. **ICONTEC.** Abonos y fertilizantes. Determinación de nitrógeno total. NTC 370. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá. 1997.
23. **Smith RJ.** Characterization and analysis of starches. In Whistler, R.L. & Paschall, E. Starch: Chemistry and Technology. Vol II. Industrial Aspects. New York, Academia Press. 1967; 593.
24. **Marija B, Tasić, Budimir V, Konstantinović, Miodrag L, Lazić, et al.** The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. Biochemical Engineering Journal. 2009; 43:208-11.
25. **ISI.** Determination of pH in starch and syrup. ISI 26-5e. In: Laboratory methods. Science Park, Aarhus, Dinamarca, International Starch Institute (ISI). 1999. Disponible en <http://www.starch.dk/isi/methods/index.htm>
26. **Genencor.** Method Number. C100C-00 Fungal Glucoamylase, GAU/g Activity. 2007.
27. **Raúl CA.** Evaluación de la eficiencia fermentativa de diversas variedades de sorgo para la producción de etanol carburante. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biotecnología. 2007.
28. **Montgomery DC.** Métodos de superficie de respuesta y otros enfoques para la optimización de procesos. En diseño y análisis de experimentos, 2ª edición editorial Limusa Wiley. México D.F. 2008. p. 427-510.
29. **Tejeda BL, Rivera A, Rosales J, Tejeda L, Tordecilla E.** Hidrólisis del almidón de yuca (*Manihot sculenta*) y de ñame (*Discorea rotundata*) para producir jarabes glucosados. Revista RECITELA, Colombia, 2011; 11:130.
30. **Colección FAO.** Alimentación y nutrición. El sorgo y el mijo en la nutrición humana, No. 27, 1995.
31. **Ring SH, Akingbala JO, Rooney LW.** Variation in amylose content among sorghums. In LW Rooney, DS Murty, eds, International symposium on sorghum grain quality, ICRISAT, Patancheru, India, 1982. p. 269-79.
32. **Boyer CD, Shannon JC.** Carbohydrates of the kernel. In: Corn: Chemistry and Technology. SA Watson, PE Ramstad (eds). AACC. St. Paul, MN. USA. 1987; 253-72.
33. **FAO.** Food and nutrition. Corn in human nutrition, Series No. 25, Rome, 1992.
34. **Zambrano Bedón GD.** Estudio técnico-económico para la obtención de alcohol a partir del camote (*Ipomoea batata*). Quito: Universidad Central del Ecuador. 2013;12.
35. **Rojas Pérez LC, Caicedo Mesa LA, Aguilar Arias JL.** Evaluación de la sacarificación de yuca mediante el proceso convencional y el proceso low-energy, para su posterior determinación de la cinética de reacción. Tecnológicas. 2008; 21:87-90.
36. **Joglekar AM, May AT.** Product excellence through design of experiments. Cereal Foods World. 1987; 32:857-68.
37. **Henika RG.** Use of response surface methodology in sensory evaluation. Food Technol. 1982; 36(1): 96-101.
38. **Hernández R, Joan et al.** Simultaneous Saccharification and Fermentation of Highly Digestible Variety of Grain Sorghum for Ethanol Production, American Society of Agricultural and Biological Engineers, paper number 076037, 2007.