

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

**Producción enzimática de Glucosa por fermentación aeróbica del almidón de
cuatro especies de tubérculos con α -amilasa de *Bacillus licheniformis*
aislado de Géiseres de Calientes, Candarave-Tacna.**

TESIS

Presentada por:

Bach. ARIADNA ZATYURI ZÚÑIGA LLANOS

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO-MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 241 Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica con Resolución de Facultad N° 7988-2014-FACI-UN/JBG ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: "Producción enzimática de Glucosa por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de Géiseres de Calientes, Candarave-Tachna" el mismo conformado por:

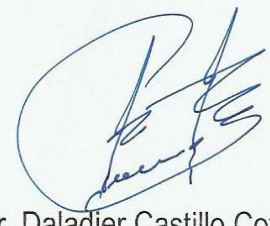
PRESIDENTE : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
SECRETARIO : MsC. Daladier Miguel Castillo Cotrina
VOCAL : MsC. Angela Choque Miranda


Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día viernes 19 de Diciembre del 2014, presentado por la señorita Bachiller ARIADNA ZATYURI ZÚÑIGA LLANOS, de la Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual, se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de bueno con la nota de dieciseis (16).

Para ratificar lo detallado, firman:


Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
PRESIDENTE


Mgr. Daladier Castillo Cotrina
SECRETARIO


MsC. Angela Choque Miranda
VOCAL

DEDICATORIA

A mis padres Manuel e Hilda que en este andar por la vida influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida. A mi maestro Roberto Castellanos Cabrera, persona lúcida y fiel defensor del conocimiento científico.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Prof. Alfredo Quispe quien con su ayuda desinteresada me ayudó en la realización del presente trabajo en el ámbito de la bromatología.

Al Dr. Mario Esparza Mantilla biólogo de profesión y de corazón, cuyos consejos e ideas me ayudaron a la investigación en el ámbito de la biotecnología.

Al grupo GIBEX (Grupo de Investigación de Biotecnología en Extremófilos) al cual tengo gusto de conformar y quienes me han apoyado hasta la fecha en el maravilloso mundo de la biología.

A Cristina Isabel Ferrer Villena, quien me ha apoyado constantemente en este trabajo.

A Arístides Choquehuanca, a quien agradezco por su apoyo intelectual en el área estadística.

A Roberto Karlos Gutierrez Gutierrez, quien siempre confió en mí y me apoyó psicológica, biológica y físicamente durante la realización de este trabajo.

A Nesstor Pilco Ferreto, a quien debo profunda gratitud porque me instó a no desistir de seguir investigando.

CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACION.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
CONTENIDO.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1 Planteamiento del problema.....	06
1.2 Hipótesis.....	07
1.3 Justificación.....	07
1.4 Objetivos.....	10
1.4.1 Objetivo general.....	10
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
1.5 Marco teórico.....	12
1.5.1 Microorganismos de los géiseres y su aplicación biotecnológica.....	12
1.5.2 Fermentación aeróbica del almidón.....	14
1.5.3 El almidón.....	14
1.5.4 Amilasas.....	39
1.5.5 Glucosa.....	84
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
2.1 Material biológico.....	91
2.2 Métodos.....	91
2.2.1. Diseño de experimentos y tratamiento estadístico.....	91
2.2.2. Variables de experimentación.....	92

2.2.3. Diseño de la investigación.....	92
2.2.4. Obtención de materia prima.....	93
2.2.5. Obtención de almidón.....	93
2.2.6. Caracterización fisicoquímica del almidón	94
2.2.7. Características de la enzima alfa-amilasa obtenida de <i>Bacillus licheniformis</i> aislada de géiseres de Candarave.....	99
2.2.8. Producción enzimática de glucosa.....	100
2.2.9. Determinación de dextrosa equivalente (DE).....	103
2.2.10. Procedimiento experimental.....	104
III. RESULTADOS	105
3.1. Obtención de almidón.....	105
3.2. Caracterización fisicoquímica del almidón.....	106
3.3. Producción enzimática de glucosa	107
3.3.1 Producción enzimática de glucosa a partir de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	107
3.3.2 Análisis de varianza de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica a partir de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	109
3.3.3 Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	117
3.3.4 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica a partir de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	119

3.3.5 Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	127
3.3.6 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica a partir de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	129
3.3.7 Producción enzimática de glucosa en equivalentes Dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>).....	134
3.3.8 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica a partir de almidón de arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>).....	136
3.3.9 Diferencias producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de papa (<i>S. tuberosum</i>), camote (<i>I. batatas</i>), yuca (<i>M. esculenta</i>) y arracacha (<i>A. xanthorrhiza</i>) en función al tiempo de reacción.....	138
3.3.10 Análisis de varianza factorial de la diferencia de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica de almidón de papa, camote, yuca y arracacha.....	139
IV. DISCUSIÓN.....	144
V. CONCLUSIONES.....	151
VI. RECOMENDACIONES.....	153
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
VIII. ANEXOS.....	167

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química promedio de los almidones comerciales.....	20
Tabla 2: Contenido de amilosa, amilopectina y su grado de polimerización promedio de almidones de distintas fuentes botánicas.....	26
Tabla 3: Composición de las principales fuentes de comerciales de Almidón.....	32
Tabla 4: Parámetros cinéticos de la α -amilasa de mayor interés en la Industria.....	41
Tabla 5: Condiciones para purificación de enzimas y organismo utilizado. .	83
Tabla 6: Resultados de rendimiento de producción de almidón por cada 500 gramos de sustratos.....	105
Tabla 7: Resultados de la caracterización fisicoquímica de los sustratos de almidón.....	106
Tabla 8: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	108
Tabla 9: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	110
Tabla 10: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	111
Tabla 11: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	112
Tabla 12: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	114

Tabla 13: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis del almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	115
Tabla 14: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	118
Tabla 15: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	120
Tabla 16: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	121
Tabla 17: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	122
Tabla 18: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	124
Tabla 19: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	125
Tabla 20: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	128
Tabla 21: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	130
Tabla 22: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	131

Tabla 23: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato en la hidrólisis del almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	132
Tabla 24: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de almidón arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>).....	135
Tabla 25: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>).....	137
Tabla 26: Diferencias de producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de papa, camote, yuca y arracacha en función al tiempo de reacción.....	138
Tabla 27: Análisis de varianza factorial para el equivalente dextrosa de almidón de papa (<i>S. tuberosum</i>), camote (<i>I. batatas</i>), yuca (<i>M. esculenta</i>) y arracacha (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	140
Tabla 28: Prueba de múltiples rangos para el equivalente dextrosa de almidón de papa (<i>S. tuberosum</i>), camote (<i>I. batatas</i>), yuca (<i>M. esculenta</i>) y Arracacha (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Micrografía de gránulos de almidón de diversas fuentes	17
Figura 2: Estructura química de amilosa y amilopectina.....	25
Figura 3: Proceso de gelatinización del almidón.....	28
Figura 4: Cruz de malta presente en los gránulos de almidón de papa.....	31
Figura 5: Equivalente dextrosa estimado en relación a la concentración de sustrato en la hidrolisis enzimática de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	113
Figura 6: Equivalente dextrosa estimado en relación al tiempo de reacción en la hidrolisis enzimática de almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	116
Figura 7: Equivalente dextrosa estimado en relación a la concentración de sustrato en la hidrolisis enzimática de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	123
Figura 8: Equivalente dextrosa estimado en relación al tiempo de reacción en la hidrolisis enzimática de almidón de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	126
Figura 9: Equivalente dextrosa estimada en relación a la concentración de sustrato en la hidrolisis enzimática de almidón de camote (<i>Ipomoea batatas</i>)	133

Figura 10: Diferencias de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón a partir de almidones de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).....143

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Obtención de almidón.....	167
Anexo 2: Determinación de azúcares reductores por método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	168

RESUMEN

La glucosa es un derivado de la hidrólisis controlada del almidón, el cual posee un poder reductor expresado en términos de equivalentes de dextrosa (ED), menor al 20 %. Comercialmente se clasifican en base a su contenido de ED, siendo las más demandadas aquellas que presentan un contenido de ED de 5; 10; 15 y 20 %. La glucosa presenta propiedades fisicoquímicas y funcionales lo que lo ha convertido en uno de los aditivos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, como agente controlador de dulzor y reacciones de oscurecimiento y dar cuerpo y textura. La glucosa se obtiene mediante procesos de hidrólisis acida, enzimática o mixta, del almidón de maíz principalmente, aunque es posible obtenerla a partir de cualquier materia prima que almacene almidón, lo cual dependerá de la disponibilidad y precio de dichas materias primas en cada país. El objetivo del presente trabajo fue determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de géiseres de Calientes, Candarave – Tacna.

La glucosa fue obtenida por hidrólisis enzimática de almidones de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Primeramente se realizó un diseño experimental de múltiple factor completamente al azar con dos factores, el factor concentración de sustrato (almidón) en cinco 5 niveles: 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 % p/v y el factor tiempo en 6 niveles: 10; 20; 30; 40,50 y 60 minutos, para un total de 90 unidades experimentales para cada sustrato de almidón. Segundo se realizó un diseño experimental de múltiple factor completamente al azar con dos factores: el factor tipo sustrato en 4 niveles como la papa, camote, arracacha y yuca; y el factor tiempo en 6 niveles: 10; 20; 30; 40; 50 y 60 minutos con tres repeticiones, para un total de 72 unidades experimentales. Inicialmente, en la etapa de licuefacción, la glucosa fue obtenida por medio de hidrólisis enzimática del almidón utilizando la enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de los géiseres de Calientes, Candarave – Tacna, purificada en sulfato de amonio al 60 % la cual fue donada por el Mgr. Castellanos Cabrera del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

En el desarrollo del proceso, el equivalente dextrosa (ED) obtenido por licuefacción del almidón de papa fue mayor en la concentración de 3 % p/v, ya que el ED estimado en relación a la concentración fue de 1,588 unidades; en el almidón de yuca fue mayor en la concentración de 1 % p/v ya que el ED estimado en relación a la concentración fue de 2,254 unidades; en el almidón de camote fue mayor en la concentración de 3 % p/v ya que el ED estimado en relación a la concentración fue de 4,628 unidades y en el almidón de arracacha se encontró que ninguno de los factores tanto concentración de sustrato como tiempo de reacción tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa. No fue posible estimar el equivalente dextrosa (ED) en relación a la concentración de sustrato en la licuefacción del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) debido a la insuficiencia de tratamientos.

Palabras claves: Almidón, hidrólisis enzimática, amilasa

ABSTRACT

Glucose is a derivative of the controlled hydrolysis of starch, which has a reducing power expressed in terms of dextrose equivalent (DE) below 20 %. Commercially are classified based on their content of ED, the most demanded those presenting content ED 5; 10; 15 and 20 %. Glucose has physicochemical and functional properties what has become one of the most widely used in food, pharmaceutical, as controlling agent sweetness and browning reactions and give body and texture additives. Glucose is obtained by acid processes, enzymatic hydrolysis or mixed, mainly corn starch, although it can be obtained from any raw material that stores starch, which depend on the availability and price of these commodities in each country. The aim of this study was to determine the enzymatic production of glucose by aerobic fermentation of starch from tubers four species of α -amylase from *Bacillus licheniformis* isolated from geysers Calientes, Candarave - Tacna.

Glucose was obtained by enzymatic hydrolysis of starch from potato (*Solanum tuberosum*), sweet potato (*Ipomoea batatas*), cassava (*Manihot esculenta*) and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). First, a multi-factor experimental design completely randomized with two factors, the factor concentration of substrate (starch) on May 5 levels was performed: 1; 1,5; 2; 2,5 and 3 % w/v and the time factor into 6 levels 10 , 20, 30, 40,50 and 60 minutes, for a total of 90 experimental units for each starch substrate. Second experimental design was performed multiple factor completely randomized with two factors, the type substrates factor 4 levels: potato, sweet potato, cassava and arracacha and time factor into 6 levels: 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes with three replicates for a total of 72 experimental units. Initially, in the liquefaction stage, glucose was obtained through enzymatic hydrolysis of starch using the enzyme α -amylase from *Bacillus licheniformis* isolated geysers Hot, Candarave - Tacna, purified in ammonium sulfate 60 % which was donated by Mgr. Castellanos Cabrera Laboratory of Biochemistry and Nutrition, National University Jorge Basadre Grohmann.

In the development process, dextrose equivalent (DE) was obtained from potato starch liquefaction was higher in the concentration of 3 % w/v as the ED estimated in relation to the concentration units was 1,588; cassava starch was higher in the concentration of 1 % w/v since the estimated ED in relation to the concentration units was 2,254; in sweetpotato starch was higher in the concentration of 3 % w/v as the ED estimated in relation to the concentration was 4,628 units and starch arracacha was found that none of both factors, substrate concentration and time reaction, have effect on enzyme glucose production expressed as dextrose equivalents. It was not possible to estimate the dextrose equivalent (DE) relative to the substrate concentration in starch liquefaction arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) due to treatment failure.

Keywords: Starch, enzymatic hydrolysis, amylase.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento de requerimientos energéticos y la contaminación atmosférica causada por los gases de combustión, ha permitido aperturar la búsqueda de nuevas fuentes de energía, seguras, eficaces y accesibles. Para este fin, la producción de biocombustibles a partir de diferentes fuentes agrícolas, como subproductos agroindustriales, materias vegetales, entre otros, ha comenzado recientemente. Los biocombustibles pueden ser producidos por diferentes tipos de sustratos, entre ellos, el almidón que se encuentra en tubérculos, como la yuca (*Manihot esculenta*), el camote (*Ipomoea batatas*), la papa (*Solanum tuberosum*) y la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), plantas con alto contenido de almidón, considerado un recurso barato, abundante y renovable para la producción de jarabes de glucosa fermentables y dextrinas.

Por otra parte, se produce fácilmente en zonas tropicales y subtropicales, principalmente en Asia, América del Sur y Sur-África. Para la obtención de glucosa a partir de almidón de yuca, camote, papa y arracacha, una relación de amilosa/amilopectina de 18 / 82 % es hidrolizado por un complejo enzimático amilolítico. Estos procesos convencionales se llevan a cabo en tres pasos: gelatinización, licuación y

sacarificación. La gelatinización es un importante paso en el que los granos de almidón se calientan con el exceso de agua para aumentar la región amorfa amilopectina y la accesibilidad a la enzima.

Por otro lado, la licuefacción se lleva a cabo por amilasas que hidrolizan el enlace químico α (1-4) de almidón, la producción de dextrina, maltosa, maltotriosa y maltopentosas con un equivalente de dextrosa (ED) por debajo de 30 unidades. Este procesamiento permite que la enzima dé una rápida reducción de la viscosidad de la solución de almidón. Las enzimas amilolíticas se pueden obtener de diferentes fuentes, entre éstos, podemos encontrar enzimas bacterianas de *Bacillus licheniformis* las cuales son adecuadas para la licuefacción, porque este paso se lleva a cabo a altas temperaturas (80-110 °C). Finalmente, el proceso de sacarificación de almidón parcialmente hidrolizado se lleva a cabo a temperaturas más bajas (60-70 °C). En este caso la enzima utilizada es glucoamilasa (amiloglucosidasa) obtenida de especies de hongos como *Aspergillus niger* o *Rhizopus* sp. Esta enzima hidroliza los enlaces químicos α (1-4) y α (1-6), para obtener productos tales como maltosa o jarabes de D-glucosa con ED alrededor de 40 y 96 respectivamente.

Estas enzimas amilolíticas comúnmente se utilizan en soluciones solubles y pueden ser susceptibles a la inhibición de ambos sustratos y/o

productos de reacción. Por esta razón, la identificación y optimización de las condiciones de reacción que afectan a la actividad enzimática podrían mejorar la viabilidad económica y tecnológica de este bioproceso. Entre estas diferentes condiciones son: temperatura, pH, tiempo de reacción, la concentración de enzima, la viscosidad, las tasas de mezcla, la fuerza iónica, la concentración de calcio, etc. Además, el almidón nativo es poco soluble en agua y resistente a la hidrólisis en condiciones suaves. Por esta razón, es necesario llevar a cabo proceso hidrotérmico para la gelatinización. Sin embargo, un alto requerimiento energético para este proceso aumenta los costos de producción económica de hidrólisis del almidón.

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído).

La glucosa es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. En terminología de la industria alimentaria suele denominarse dextrosa el cual es un término procedente de “glucosa dextrorrotatoria” a este compuesto.

La yuca, papa, arracacha y camote son productos tradicionales de la agricultura nacional, las cuales poseen cantidades de almidón variable; haciendo posible que sean usados como fuente de producción de glucosa y otros azúcares dándole así un valor agregado si se lo somete a un proceso de transformación nivel 2, como el de la hidrólisis enzimática para la producción de glucosa (Rivier, 2001).

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 proceso. Además de obtenerse una mezcla de glucosa, fructosa y oligosacáridos en diferentes proporciones, con composición y poder edulcorante variables (Benjumea & Correa, 2001).

Para la producción de glucosa vía enzimática es preciso hacer uso de enzimas como la α -amilasa α (1,4)-D-Glucan glucano-hidrolasa, la cual hidroliza los enlaces glucosídicos α (1,4) de los polisacáridos que poseen tres o más unidades de D-glucosa en unión α (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 α (1,4)-D-Glucan (glucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos α (1,4) y α (1,6) de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena (Carrera, 2002). Las α -amilasas bacterianas, y en especial aquellas provenientes de bacterias del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, han encontrado una amplia aplicación en procesos industriales gracias a sus rangos de temperatura óptima (25- 90 °C), resistencia a pH extremos (1,0-11,5) y altos niveles de expresión (Pandey et al., 2000).

1.1 Planteamiento del Problema

La mayor parte de la producción de tubérculos en América, se vende como producto fresco sin valor agregado; a diferencia de lo que se da en Asia donde se utiliza en la elaboración de diversos productos, como fideos, pastas y en industrias no alimenticias (FAO, 2001). El desarrollar un mejor uso para los tubérculos es una opción para incrementar significativamente su explotación comercial en el continente americano y por ende en el Perú.

Este trabajo se planteó para incentivar el uso de diferentes sustratos para la producción de glucosa ya que es de suma importancia buscar alternativas que den solución al desaprovechamiento continuo de los cultivos de tubérculos y raíces y demás especies por desconocimiento de sus bondades, en la aplicación en el desarrollo de nuevos productos para uso industrial. Por tanto se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuál es la producción enzimática de glucosa con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de géiseres de Calientes, Candarave-Tacna por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos?

1.2 Hipótesis

Se obtienen producciones enzimáticas de glucosa iguales o mayores a las que se reportan en otros trabajos con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de géiseres de Calientes, Candarave-Tacna por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos.

1.3 Justificación

La producción de glucosa se está convirtiendo en una alternativa viable desde el punto de vista económico. Es por esto que nace la necesidad de desarrollar proyectos que contribuyan con el progreso de éstos en una región que posee tantos recursos naturales disponibles como la nuestra. Un paso en la dirección correcta para optimizar la producción de glucosa sería encontrar nuevas fuentes enzimáticas con las cuales se obtenga mayores cantidades del mismo mediante hidrólisis enzimática, así mismo este proceso es muy importante por ejemplo en la industria alimentaria por los efectos fisicoquímicos u organolépticos que produce, tales como la disminución de la viscosidad, la mejora de la filtrabilidad, disminución de la tendencia a la cristalización, clarificación y estabilización de los líquidos con vistas a su

conservación, insolubilización de macromoléculas por formación de coágulos, la mejora en la fermentabilidad, mejora de la estabilidad bacteriológica, corrección de las deficiencias enzimáticas de origen natural, mejora de la textura y las características organolépticas, aumento del poder edulcorante y otros (Wiseman, 1991).

En tanto que 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.

Varias especies de plantas los cuales son cultivados por pequeños y medianos agricultores, constituye en muchas regiones la principal fuente de ingresos, de empleo rural, de oferta de alimento a sus pobladores, y también es un producto de exportación en la población latina y para uso farmacológico (Cabra & Sánchez, 1997).

El cultivo de tubérculos y raíces presentan una productividad potencial para la fabricación de harinas. Un ejemplo maíz y el trigo con su productividad potencial de harina y almidón superior a la de cereales comúnmente utilizados con este propósito (Rodríguez, 2003). Con respecto a nuestro país, el Perú, las familias urbanas consumen una mayor proporción de alimentos importados que provienen de vegetales y animales no oriundos de la región andina. Algunos de estos alimentos foráneos desde hace mucho tiempo han sido introducidos e incorporados en los sistemas de producción del Perú, otros son importados anualmente de otros centros de producción en el mundo. En el pasado factores de orden histórico y en la actualidad de orden tecnológico, económico y cultural llevan al desaprovechamiento de nuestros recursos.

Varios cultivos tradicionales se han visto muy afectados en los últimos años en el mercado internacional, por lo que urge encontrar reemplazos. Una buena opción es la industrialización de estos tubérculos (papa, camote, camote y arracacha) a través de procesos como los que plantea este estudio, para convertirlo en un producto de valor agregado.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos con α -amilasa de ***Bacillus licheniformis*** aislado de los géiseres de Calientes, Candarave-Tacna.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de papa (***Solanum tuberosum***).
- Determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de camote (***Ipomoea batatas***).
- Determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de arracacha (***Arracacia xanthorrhiza***).

- Determinar la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de yuca (***Manihot esculenta***).
- Determinar diferencias de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón a partir de almidones de papa (***Solanum tuberosum***), camote (***Ipomoea batatas***), yuca (***Manihot esculenta***) y arracacha (***Arracacia xanthorrhiza***).

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Microorganismos de géiseres y su aplicación biotecnológica

Las bacterias termófilas aisladas de géiseres tienen en su genoma capacidad para ser inducidas en la producción de enzimas tales como: Proteasas que degradan proteínas, celulasas que degradan celulosa, principal componente de la pared de la célula vegetal; xilanasas y hemicelulasas que degradan componentes de la pared vegetal y se utilizan en la obtención de productos panificados y de jugo de frutas; lipasas que degradan ácidos grasos, aceites y otras grasas.

Debido a que muchos procesos industriales requieren altas o bajas temperaturas o pH ácidos o alcalinos, los extremófilos se han convertido para las industrias en atractivas fuentes de biocatalizadores (enzimas) estables a condiciones extremas, por ejemplo, en la industria de los detergentes y jabones para la ropa de uso hogareño se utilizan biocatalizadores que quitan las manchas a baja temperatura, mientras que en tratamientos de esterilización

de ropa de quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas. La industria del cuero y las pieles requiere enzimas que degraden proteínas de la piel de los animales en condiciones de alta salinidad o minerales.

Las amilasas se utilizan en la industria alimenticia para degradar el almidón de los cereales a azúcares más simples.

Las enzimas microbianas que se producen en mayor cantidad son proteasas, utilizadas como aditivos en los detergentes para lavar ropa. También los detergentes contienen amilasas, lipasas, reductasas y otras. Muchas de estas enzimas son producidas a partir de bacterias alcalófilas, especialmente de *Bacillus licheniformis*. Estas enzimas tienen pH óptimo entre 8 y 10, así permanecen activas al pH alcalino de las soluciones de los detergentes.

1.5.2. Fermentación aeróbica del almidón

La fermentación del almidón es un proceso natural, conducido bajo una capa de agua sobrenadante. Los microorganismos que realizan la fermentación provienen del medio ambiente y del agua utilizada (Cereda et al., 1987).

El proceso fermentativo obviamente altera los granos del almidón confiriendo al producto fermentado características peculiares. Además del sabor y aroma, las modificaciones que ocurren durante la fermentación alteran sus características físicas y químicas y reológicas (Nakamura et al., 1976; Cárdenas & Buckle, 1980; Cereda, 1983a; Cereda, 1985; Camargo et al., 1988; Asquieri, 1990).

1.5.3. El almidón

a) Definición

El almidón es un polisacárido que se encuentra en forma granular, en las semillas, raíces, tubérculos y tallos de las plantas, en las que constituye su principal forma de reserva energética que es utilizada durante los periodos de dormancia o latencia, germinación y

crecimiento (Sivack & Preiss, 1998). Es un biopolímero que ha constituido una parte importante en la dieta del hombre desde tiempos prehistóricos y desde el punto de vista comercial, es el polisacárido más abundante e importante después de la celulosa (Biliaderis, 1991). El tamaño de los gránulos varía de 2 a 100 μm y su forma puede ser redonda, ovalada, poligonal, lenticular e irregular (Figura 1).

Los gránulos de almidón son extraídos por medios físicos para su utilización en diversas industrias, entre las que destaca la industria alimentaria, debido a las propiedades funcionales que imparte a los productos donde se adiciona. La técnica para su preparación se conocía ya en el antiguo Egipto, quienes lo utilizaban especialmente para dar resistencia al papiro, y como apresto de tejidos. Actualmente la industria alimentaria es un gran consumidor, al ser el más barato de los materiales gelificantes (Bello et al., 2000).

La propiedad más importante que tiene el almidón es su capacidad para producir pastas viscosas cuando se disuelve en agua caliente. El almidón y sus derivados son ampliamente utilizados en la manufactura de una gran variedad de alimentos, fármacos, pegamentos, textiles, papel, empaques y material de construcción (García et al., 2000b; Shamekh et al., 2002). Estudios recientes sugieren que los almidones pueden ser utilizados en la elaboración de películas comestibles, debido a sus características de barrera a ciertos gases como el oxígeno (O₂), el bióxido de carbono (CO₂), el vapor de agua y el etileno, barrera a aceites y aromas; y a que pueden prolongar la vida útil de productos altamente perecederos como los frutos, conservando sus propiedades sensoriales (Krochta & De Mulder, 1997; Shahidi et al., 1999; Halley et al., 2001; Shaw et al., 2002; Rindlav & Gatenholm, 2003).



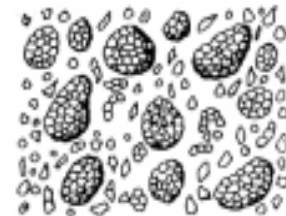
Trigo



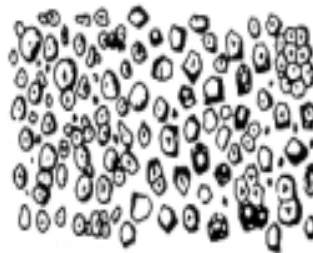
Centeno



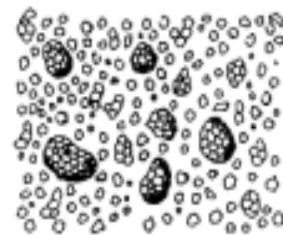
Cebada



Avena



Maiz



Arroz



Papa



Tapioca

Figura 1: Micrografía de gránulos de almidón de diversas fuentes

Fuente: Badui, 200

b) Formación del gránulo

En la formación del gránulo, la planta deposita el almidón en capas concéntricas sucesivas y superpuestas alrededor de un núcleo central denominado "hilium", formando así un gránulo compacto. Cuando están al alcance moléculas adyacentes de amilosa y algunas ramificaciones de amilopectina se asocian a través de puentes de hidrógeno en forma paralela, formando paquetes cristalinos orientados radialmente llamados micelas (Tester et al., 2001). Estas micelas mantienen unido al gránulo, permitiendo su hinchamiento en agua caliente y la solubilización de moléculas individuales de almidón, sin rompimiento del gránulo. Estas áreas micelares altamente cristalinas y orientadas explican la capacidad de los gránulos sin gelatinizar para rotar el plano de la luz polarizada, produciendo una cruz característica de interferencia, llamada "cruz de malta" (Hsu et al., 2000).

c) Composición química

La composición química de los almidones comerciales depende de la fuente y del proceso de obtención y purificación, y de las condiciones de almacenamiento (Beynum & Roels, 1985). Los gránulos de almidón contienen entre 6 a 16 % de humedad y pequeñas cantidades de proteínas, lípidos, fósforo y trazas de materiales inorgánicos (Tabla 1). El máximo contenido de humedad sugerida para un almacenamiento seguro en los almidones es de 13 %, dado que un contenido mayor de humedad puede ocasionar un daño microbiano y por tanto el deterioro en la calidad del polímero (Moorthy, 2002).

Los almidones de tubérculos como la papa, camote y tapioca contienen pequeñas cantidades de sustancias grasas (< 0,1 %), en comparación con los almidones provenientes de cereales como el maíz, trigo, arroz y sorgo, cuyo contenido de lípidos oscila entre 0,6 a 0,8 %.

La presencia de los lípidos modifica las propiedades reológicas y reprime el poder de hinchamiento y solubilidad de los almidones. También son responsables de la opacidad de las dispersiones de almidón, así como de su rancidez, la cual puede producirse durante el almacenamiento de los granos y/o del almidón (Beynum & Roels, 1985; Hsu et al., 2000).

Tabla 1: Composición química promedio de almidones comerciales.

Fuente	Humedad %	Lípidos %	Proteínas %	Fosforo %	Cenizas %
Maíz	13	0,60	0,35	0,015	0,10
Papa	19	0,05	0,06	0,080	0,40
Trigo	14	0,80	0,40	0,060	0,15
Tapioca	13	0,10	0,10	0,010	0,20
Maíz ceroso	13	0,20	0,25	0,007	0,07
Sorgo	13	0,70	0,30	-	0,08
Arroz	-	0,80	0,45	0,100	0,50
Camote	13	-	-	-	0,10

1: Contenido de humedad a una humedad relativa del 65 %.

2: Contenido de proteína calculado en base al porcentaje de nitrógeno 6,25.

Fuente: Beynum & Roels, 1985; Hsu et al., 2000.

También los almidones de tubérculos contienen pequeñas cantidades de proteína (< 0,1 %) en comparación con los almidones de cereales, los cuales contienen de 0,3 a 0,5 %, estas pueden conferir al almidón un aroma y sabor a harina así como capacidad espumante. Cerca del 10 % de las proteínas asociadas al almidón, se encuentran en la superficie del gránulo y pueden ser fácilmente extraídas con agua o soluciones salinas. Estas proteínas pueden afectar la carga superficial del gránulo, lo cual afecta directamente la velocidad de hidratación, velocidad de hinchamiento, así como en la gelatinización del mismo (Beynum & Roels, 1985). Entre las proteínas que pueden estar asociadas a la superficie del gránulo, están la α -amilasa, las cuales resultan de gran importancia, ya que por su poder hidrolítico afectan las propiedades reológicas, tales como la viscosidad de la dispersión del almidón. Por ello es importante eliminarlas en los lavados durante el procesamiento de este polímero (Moorthy, 2002).

Adicionalmente los almidones comerciales contienen cantidades traza de materiales inorgánicos entre los que destaca el fósforo, el cual se encuentra principalmente como fosfolípidos en los almidones de cereales, mientras que en el almidón de papa el fósforo se encuentra en forma de grupos fosfato, esterificados al C-6 de los residuos de glucosa en la molécula de amilopectina. La frecuencia de grupos fosfato en el almidón de papa oscila de 1 grupo fosfato por cada 200 a 400 unidades de glucosa, lo que confiere al gránulo una carga superficial negativa que imparte propiedades de un polielectrolito cuando el almidón es dispersado en soluciones acuosas. Es por ello que los gránulos de almidón de papa presentan un rápido hinchamiento del gránulo y por ende, un fuerte aumento de la viscosidad de las dispersiones, en comparación con almidones de cereales (Whistler, 1984; Beynum & Roels, 1985; Moorthy, 2002).

d) Estructura química

Químicamente el almidón es un homopolisacárido formado por moléculas de D-glucosa unidas una a otra a través del oxígeno del C-1, unión que se conoce como enlace glucosídico y puede ser α (1,4) o α (1,6), dependiendo de si la unión es entre el C-1 de una molécula de glucosa y el C-4 o el C-6 de la siguiente molécula de glucosa, respectivamente. El enlace glucosídico es estable en condiciones alcalinas pero puede hidrolizarse en condiciones ácidas o por acción enzimática. El residuo de glucosa que se encuentra al final de la cadena polimérica presenta un grupo aldehído que actúa como grupo reductor razón por la cual se le conoce como extremo reductor de la molécula (Beynum & Roels, 1985).

Estructuralmente el almidón está constituido por una mezcla de amilosa y de amilopectina, cuya proporción y grado de polimerización varía de acuerdo a la fuente botánica (Figura 2). La amilosa es un polisacárido constituido por largas cadenas lineales dispuestas en

forma helicoidal, en las que todas las moléculas de glucosa se encuentran unidas por enlaces α (1-4), y cada seis residuos de glucosa forman una vuelta en torno al eje de simetría de la molécula (Figura 2). El grado de polimerización de la amilosa depende tanto de la fuente de obtención como de su estado de madurez, y se encuentra comprendido entre 250 y 6000 unidades de glucosa, lo que arroja pesos moleculares de hasta 1 millón de daltones (Tabla 2) (Beynum & Roels, 1985). La amilosa forma complejos de color azul con el yodo. Para que se desarrolle perfectamente la coloración azul intenso del complejo amilosa-iodo se requiere un mínimo de 40 residuos de glucosa, las cadenas muy cortas de amilosa produce un complejo de color rojo en lugar de azul característico. Esta propiedad es utilizada para la identificación de almidones que contienen amilosa (Badui, 2001).

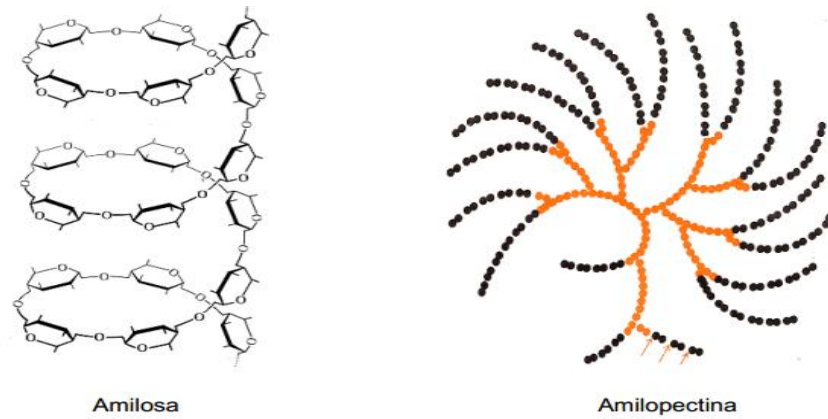


Figura 2: Estructura química de amilosa y amilopectina

Fuente: Badui, 2001

Por su parte, la amilopectina es un polisacárido formado por unidades de glucosa y presenta una estructura altamente ramificada, el grado de polimerización de cada una de estas ramas va de 10 a 60 residuos de glucosa y se encuentran localizadas a una distancia media de 10 a 15 unidades lineales de glucosa. La distribución y el tamaño de estas ramificaciones varían de acuerdo a la fuente botánica de la cual procede (Figura 2). Las uniones entre los residuos de glucosa en las porciones lineales son enlaces glucosídicos α (1-4), mientras que en los puntos de ramificación los residuos de glucosa se encuentran

unidos por enlaces glucosídicos α (1-6), los cuales alcanzan una proporción superior al 5 % del total de uniones en la molécula de amilopectina. La amilopectina constituye una de las mayores moléculas en la naturaleza, alcanza grados de polimerización superiores a 2, 000,000 de unidades de glucosa y pesos moleculares del orden de los 200, 000,000 de Daltones. (Beynum & Roels, 1985).

Tabla 2: Contenido de amilosa, amilopectina y su grado de polimerización promedio de almidones de distintas fuentes botánicas.

Fuente de Almidón	Amilosa %	Amilopectina %	GPP* amilosa	GPP* amilopectina
Maíz	28	72	800	2,000.000
Papa	21	79	3000	2,200.000
Trigo	28	72	800	2,000.000
Tapioca	17	83		2,250.000
Sorgo	28	72		
Arroz	17	83		
Sagú	27	73		
Arrurruz	20	80		
Amilomaíz	50-80	20-50		

***GPP: Grado de polimerización promedio.**

Fuente: Beynum & Roels, 1985.

e) Propiedades del Almidón

Entre las propiedades que presenta el almidón están principalmente la gelatinización, la retrogradación, birrefringencia y difracción de rayos X. Estos fenómenos pueden ayudar a explicar la estabilidad del biopolímero y por tanto sugerir sus adecuadas aplicaciones (Biliaderis, 1991).

- **Gelatinización**

La gelatinización del almidón es un proceso en el cual se pasa de un estado ordenado (estructura cristalina) a un estado desordenado donde se absorbe calor; es decir, la gelatinización transforma a los gránulos insolubles en una solución de sus moléculas constituyentes (amilosa y amilopectina) en forma individual (Figura 3). Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría; sin embargo, al aplicar calor se hidratan e hinchan rápidamente hasta formar pastas viscosas. Este hinchamiento de los gránulos de almidón es reversible hasta una cierta temperatura conocida como temperatura de gelatinización, la cual

es característica de cada tipo de almidón y corresponde a la temperatura a la cual se alcanza el máximo de viscosidad y se pierde la birrefringencia (Beynum & Roels, 1985; Biliaderis, 1991).

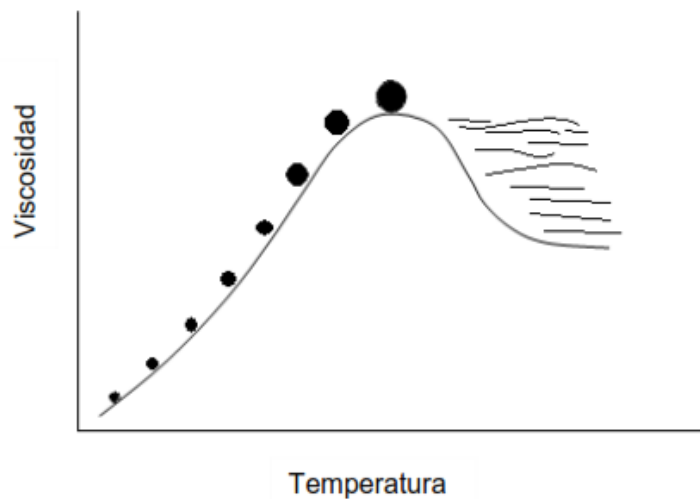


Figura 3: Proceso de gelatinización del almidón

Fuente: Badui, 2001.

Entre los factores que determinan el proceso de gelatinización destacan la relación y el contenido de amilosa y amilopectina, su grado de polimerización, así como el tamaño del gránulo de almidón. La relación en el contenido de amilosa y amilopectina es de suma importancia para la obtención de geles con buenas propiedades

mecánicas, de solubilidad y de baja degradabilidad (Biliaderis, 1991).

Son preferibles los almidones ricos en amilosa debido a que pueden formar geles con buenas propiedades mecánicas y con alta resistencia a la degradación química o enzimática; sin embargo, estos almidones tienen la desventaja de ser poco solubles, formar sistemas opacos y presentan tendencia a retrogradar, debido a su alto contenido de amilosa (Beynum & Roels, 1985; Biliaderis, 1991).

- **Retrogradación**

La retrogradación es un proceso que implica insolubilización y precipitación espontánea de las moléculas de amilosa principalmente. Ello debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente e interaccionan entre sí a través de sus múltiples grupos hidroxilos, por medio de puentes de hidrógeno. Cada almidón tiene una tendencia diferente a la retrogradación, la cual está íntimamente relacionada a su contenido de amilosa, ya que la amilopectina es

más difícil que la desarrolle, debido a que sus ramificaciones impiden la formación de puentes de hidrógeno con moléculas adyacentes (Beynum & Roels, 1985; Badui, 2001).

- **Birrefringencia**

La birrefringencia indica la capacidad que tienen los gránulos de almidón para refractar la luz en dos direcciones, es decir, tienen dos índices de refracción, por lo que cuando se irradian con luz polarizada desarrollan la típica “cruz de malta” (Figura 4) (Jiménez et al., 2007). Este proceso se debe a que dentro del gránulo se localizan zonas cristalinas de moléculas de amilopectina y amilosa ordenadas paralelamente a través de puentes de hidrógeno, así como zonas amorfas formadas principalmente por la amilosa, las cuales no tienen posibilidad de asociarse entre sí o con las moléculas de amilopectina (Beynum & Roels 1985; Biliaderis, 1991).

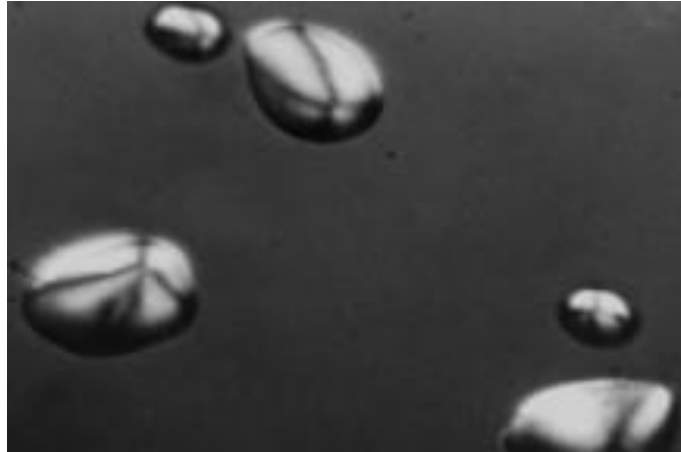


Figura 4: Cruz de malta presente en los gránulos de almidón de papa

Fuente: Jiménez, Salazar, & Ramos, 2007

f) Fuentes de almidón

Las principales fuentes comerciales de almidón son: semillas o granos de cereales (maíz, trigo, sorgo y arroz), tubérculos (papa), raíces (tapioca y camote) y el tallo de la palma de sagú (Bello et al., 2000). La composición de estas materias primas, varía de acuerdo a factores tales como la edad, el suelo, la variedad y el clima, entre otros (Tabla 3).

Actualmente el 75 % de la producción mundial de almidón se obtiene a partir del maíz, lo cual obedece a su relativo bajo costo y a su gran disponibilidad (Baynum & Roels 1985).

Tabla 3: Composición de las principales fuentes de comerciales de almidón.

Fuente	Almidón 1 %(BH)	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Diámetro del gránulo (μm)	Almidón 2 % (BS)
Maíz	60	16	9	4,0	15	71
Papa	18	78	2	0,1	33	82
Trigo	64	14	13	2,0	15	74
Tapioca	26	6	1	0,3	20	77
Maíz ceroso	57	20	11	5,0	15	71
Sorgo	63	16	9	3,0	15	75
Arroz	78	12	8	0,5	5	89
Camote	23	68	1,5	0,3	15	72
Arrurruz	25	70	-	-	30	83

1: Porcentaje expresado en base húmeda.

2: Porcentaje expresado en base húmeda

Fuente: Beynum & Roels,1985.

Los almidones generalmente contienen del 17 – 27 % de amilosa y el resto de amilopectina. Algunos cereales como el maíz, el arroz y el trigo, presentan variedades de almidones céreos, los cuales están constituidos principalmente por amilopectina, pero también existen otras variedades que tienen hasta un 90 % de amilosa (Beynum & Roels, 1985).

g) Usos del almidón

El almidón nativo se obtiene por procesos conocidos como de molienda húmeda o de molienda seca, sus aplicaciones en el área de alimentos se encuentran muy restringidas debido a la baja estabilidad de sus suspensiones y geles, dichas aplicaciones están centradas en explotar sus relativamente bajas propiedades funcionales como agente gelificante y espesante. Es por ello que, para incrementar las propiedades funcionales del almidón, se ha recurrido a la realización de algunos cambios físicos, químicos o enzimáticos en su molécula, ampliando de esta forma la gama de productos con características específicas

encaminadas a cubrir una gran variedad de aplicaciones en diversos campos de las industrias alimentaria y farmacéutica (Rocha et al., 2005).

Una manera fácil y rápida para obtener carbohidratos con propiedades funcionales específicas es a través de la hidrólisis del almidón. El equivalente de dextrosa (ED) es una medida del grado de hidrólisis de la molécula de almidón, y se define como el contenido de azúcar reductores directos (ARD), expresado en por ciento de glucosa en una base seca. Dependiendo del grado de hidrólisis de la molécula de almidón se puede obtener toda una gama de productos que, de acuerdo con su contenido de ED, se clasifican en maltodextrinas y jarabes; las maltodextrinas presentan un $ED < 20$, y los jarabes tienen un $ED \geq 20$ (McPherson & Seib, 1997).

h) Hidrólisis del almidón

Entre las hidrólisis del almidón, la modificación enzimática son las más valiosas, no en tanto, es posible obtener algunos tipos de almidón por hidrólisis química

(ácida). Las ventajas de la hidrólisis enzimática en comparación con la hidrólisis ácida:

- La neutralización de una hidrólisis ácida produce cantidades significativas de sal, en cuanto que en una hidrólisis enzimática, las cantidades minerales son mínimas, permitiendo el uso de resinas trocadoras de iones para remover las sales formadas y obtener siropes de conductancia leve.
- En la hidrólisis enzimática, el volumen de cal activada usada para remover compuestos coloridos y compuestos responsables de olores y sabores indeseables es menor.
- Simplificación de la línea de producción, con reactores unitarios de licuefacción, sacarificación y decoloración.
- Ahorro de energía, pues una licuefacción ácida tradicional, en procesos por batelada, exige comienzo

bajo presión con altas temperaturas. Una licuefacción enzimática de harina de mandioca puede ser realizada a una temperatura de 85 °C por unos minutos.

- La hidrólisis enzimática posibilita la fabricación de una completa gama de hidrolizados, con una misma línea de equipamientos.
- A pesar de todas esas ventajas, los costos elevados de líneas de procesamiento enzimático y de las enzimas son factores restrictivos para el uso de esta tecnología (Surmely, 1996).

i) Hidrólisis enzimática del almidón

La hidrólisis enzimática del almidón nativo puede ser considerada como una de las técnicas para modificar almidón nativo por reducción de su peso molecular promedio. Los productos de la conversión enzimática del almidón van desde glucosa hasta dextrinas de alto peso molecular.

En adición a la disminución del tamaño de la molécula y la viscosidad de la dispersión de almidón, el proceso de hidrólisis puede también modificar otras características de las dispersiones de almidón. Las α -amilasas son ampliamente usadas para la depolimerización de almidones en la preparación de maltodextrinas. La susceptibilidad de los gránulos del almidón depende de su origen botánico (Madhusudhan & Tharanathan, 1995), de la fuente de α -amilasa (Planchot et al., 1995) y si el almidón está realmente disperso, en parte gelatinizado o suspendido como gránulos intactos. En general, gránulos de almidón de cereales son mucho más rápidamente hidrolizados por α -amilasa que los almidones de papa, lo cual es ampliamente atribuido a su alta estructura cristalina (Gallant et al., 1992). La gelatinización es uno de los procedimientos aplicados para incrementar la susceptibilidad de almidones de cereales y tubérculos a la amilosis, ha sido mostrado que gránulos de almidón crudo hidrolizan más lento que el almidón pre gelatinizado (Lauro, 2000).

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría. El agua, cuando penetra a las áreas amorfas del gránulo, forman enlaces de hidrógeno con los grupos hidróxilos libres de la molécula de almidón. Estos enlaces son fuerzas débiles, más el número de enlaces en el gránulo es tan alto que impide su disolución (Swinkels, 1985). Por tanto, los gránulos de almidón se hinchan levemente en agua fría (10 a 15 % de diámetro), más el hinchamiento es irreversible por secamiento. Cuando la temperatura de la suspensión es mayor que la fuerza de los enlaces de hidrogeno, el gránulo de almidón comienza a hincharse irreversiblemente y ocurre la gelificación. La gelificación ocurre con la formación de enlaces entre las moléculas de agua y grupos hidroxilos, liberados por la entrada de agua (Thiebault & Colonna, 1988). La gelificación del almidón es el primer paso para el proceso de hidrólisis, pues las enzimas atacan más lentamente el almidón granular.

1.5.4. Amilasas

La α -amilasa (E.C. 3.2.1.1, α (1-4) glucan-glucanohidrolasa), es llamada de esta forma debido a que los productos de la hidrólisis adoptan la configuración (α) en el átomo de carbono anomérico; cataliza la hidrólisis aleatoria de los enlaces glucosídicos α (1-4) del interior del sustrato. Además de hidrolizar el almidón, también actúa sobre las moléculas de glucógeno, las fracciones de amilosa y amilopectina, así como otras dextrinas (Whitaker, 1994). Esta enzima es producida por una amplia variedad de organismos y está presente en mamíferos, plantas y microorganismos.

Las α -amilasas son estables generalmente en intervalo de pH de 5,5 a 8,0, pero existen excepciones hacia ambos lados de la escala, principalmente entre las enzimas de origen microbiano. Por ejemplo, la α -amilasa de *Bacillus* sp. 11-1S, presenta pH óptimo de 2,0, mientras que el pH óptimo de la α -amilasa de *Bacillus* No A-40-2, es de 10,5. El amplio intervalo de pH en la actividad de las α -amilasas individuales, es un indicativo de su

adaptabilidad a las circunstancias cambiantes del medio ambiente (Janecek & Balaz ,1992).

Por otra parte, la mayoría de las α -amilasas presentan actividad óptima a temperaturas comprendidas entre 50 y 60 °C, pero también se han reportado temperaturas de máxima actividad a 25 °C para la α -amilasa de *Fusarium oxysporum*, mientras que la mayor temperatura de actividad óptima la presenta hasta el momento la α -amilasa de *B. liqueniformis* CUMC 305, la cual es de 90 °C (Janecek & Balaz, 1992).

Otra característica importante que distingue a los diferentes tipos de α -amilasas estudiadas es la correspondiente a los productos finales derivados de la hidrólisis del almidón. Estos productos pueden diferir tanto en tamaño como en configuración y en proporción de cada uno de ellos con respecto al total. Por un lado, esta enzima es capaz de hidrolizar completamente la molécula de amilosa hasta unidades de glucosa y maltosa, mientras que la molécula de amilopectina solo es hidrolizada

parcialmente quedando como productos residuales moléculas de oligosacáridos integrados por 2 a 7 unidades de glucosa dependiendo de la fuente de obtención a la α -amilasa utilizada (Tabla 4) (Atkinson & Mavituna, 1991).

Tabla 4: Parámetros cinéticos de la α -amilasa de mayor interés en la industria.

Fuente	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Punto isoeléctrico	PM* (g/mol)	Productos finales
Malta de Cebada	5-6	50-60	5,75	60,000	G2,G4 y G5
Páncreas Porcino	6-7	40-50	5,2-5,6	45,000	G2 y G3
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5-5,5	40-50	-	51,000	G2 y G3
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	5,9	70	5,2	49,000	G5,G6 y G7
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,7-9,0	90	5,2	62,000	G2,G3 y G5
<i>Bacillus subtilis</i>	6,8	60	-	41,000	G2,G4 y G6

*PM: Peso molecular. G2, G3, G5, G6 y G7 corresponden a unidades de maltosa, maltotriosa, maltohexosa y maltoheptaosa, respectivamente

Fuente: Atkinson & Mavituna, 1991.

a) Enzima amilasa: acción y clasificación

Las amilasas son enzimas las cuales hidrolizan moléculas de almidón dando como productos dextrinas y polímeros compuestos progresivamente por unidades de glucosa (Asgher, et al., 2006). Esta familia de enzimas hidrolíticas está compuesta por proteínas catalíticas: α -amilasa, β -amilasa; glucoamilasa; isoamilasa. Se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetales, donde juegan un rol muy importante en la degradación del almidón en la germinación de las semillas; en tejidos animales, cumpliendo una misión digestiva; y en diversas especies de microorganismos como hongos y bacterias (Tripathi, Leggio & Mansfeld, 2007).

Como bien es conocido las cadenas de almidón están compuestas por dos grandes sub-cadenas, amilosa y amilopectina. La alfa-amilasa se caracteriza por atacar los enlaces 1,4- α -glicosídicos en el centro la cadena de los polisacáridos, por lo que se la

conoce como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligosacáridos.

La enzima α -amilasa en su accionar degrada la amilosa en maltosa y pequeños compuestos de glucosa. Sin embargo, esta enzima solo es capaz de degradar parcialmente la amilopectina y el glucógeno debido a que no es capaz de desdoblar los enlaces glicosídicos 1,6 encontrados en los puntos de ramificación de la cadena del polisacárido. Por otro lado, la β -amilasa, presente en plantas y bacterias, también cumple la función de degradar los enlaces α -1,4-glicosídicos pero comienza su acción por el extremo libre no reductor del almidón, liberando maltosa al igual que la enzima α -amilasa. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite. La pululanasa o isoamilasa, también perteneciente a la esta familia, hidroliza los enlaces 1,6- α -glicosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. Si existe un

acompañamiento general del complejo de las amilasas se puede lograr efectiva una degradación total del almidón (Carrillo, 2003).

En cuanto a la nomenclatura de las enzimas de la familia amilasa, mundialmente se reconoce a la comisión enzimológica (E.C.) quien es el encargado de identificar a todas y cada una de las enzimas existentes. Este instituto reconoce la enzima α -amilasa como E.C.3.2.1.1. Su nombre sistemático es α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa. Otros nombres comunes en el comercio y el ámbito científico son glucogenasa y endoamilasa. Estas se caracterizan en llevar a cabo la reacción de endohidrólisis que se sitúa de los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen 3 o más enlaces 1,4- α -D-glucosídicos. Los grupos reducidos son liberados en una configuración α . Este término α , está relacionado con la configuración anomérica inicial de los grupos de azúcares liberados (IUBMB, Enzyme Nomenclature, 2008).

b) α -amilasa bacteriana (EC 3.2.1.1)

La α -amilasa hidroliza los enlaces glucosídicos internos dando lugar a productos de bajo peso molecular, solubles y menos viscosos, cuya ruptura está limitada por la presencia de los enlaces glucosídicos α -1,6 en los puntos de ramificación de la molécula del almidón nativo (amilopectina). Los productos de hidrólisis tienen configuración α en la glucosa del extremo reductor. Se piensa que la enzima actúa por la acción combinada de los grupos carboxilo e histidina del centro activo. Las α -amilasas obtenidas de *Bacillus subtilis* tienen un ión calcio fuertemente ligado por molécula, que es necesario para la actividad del enzima y que lo estabiliza en gran medida frente al calentamiento. Se utiliza como enzima soluble en tratamientos de dos horas a 85 °C y pH 5,5 - 7 como una alternativa a la utilización de ácido clorhídrico que produce excesivos compuestos coloreados y la formación de productos de reversión. Debido a que los almidones de patata y de cereales cerosos no pueden tratarse

por gelatinización, se les somete a un proceso en dos etapas, en el que se añade una segunda dosis de enzima y se continúa el tratamiento hasta lograr el contenido deseado de glucosa (Wiseman, 1985).

La enzima β -amilasa es reconocida en la comisión enzimológica como E.C.3.2.1.2., su nombre sistemático corresponde al de 1,4- α -D-glucan maltohidrolasa. Su función es actuar en la reacción de hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos del almidón con inversión en la configuración del carbono pasándolo de la configuración α a la β ; así como de remover las unidades de maltosa continuas presentes en los terminales no reductores de la cadena polisacárida. Los grupos sulfhidrilos son esenciales para la actividad, por lo que la enzima se inactiva por oxidación, por los metales pesados y sus sales. Su producto es β -maltosa (Carrera, 2003). La α -amilasa ha sido descrita como una proteína abundante la cual se puede encontrar en grandes cantidades tanto en

tejidos de almacenamiento de almidón y órganos de plantas (Oliveira et al., 2005). Muchos cereales contienen también la enzima β -amilasa y α -amilasa aunque esta última en concentraciones menores, tan solo ocupa aproximadamente 30 % de contenido total de proteínas sintetizadas durante la germinación. Estas dos amilasas pueden ser distinguidas una de otra, mediante el punto de inactivación que presentan a un pH determinado. La enzima α -amilasa es inactivada a un pH en el rango de 4,8 – 5,0. Mientras que a este mismo rango la β -amilasa es estable. La enzima E.C.3.2.1.2, es inactivada en un pH alrededor de 6,0 – 7,0 y en caso recíproco las α -amilasa son estables bajo estas condiciones (Olusanjo, Ngachi & Ihuoma, 2006).

Otra enzima perteneciente a esta peculiar familia es la glucoamilasa también reconocida como amiloglucosidasa. En la nomenclatura internacional está identificada como E.C.3.2.1.3, y su nombre sistemático es 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa.

Su función es actuar en la reacción de hidrólisis en cadenas de polisacáridos operando en los enlaces 1,4- α -D-glucosa que están de manera residual después de haberse expuesto la cadena a la acción de α y β -amilasa (IUBMB, Enzyme Nomenclature, 2008). El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia claramente de la alfa y beta amilasas. La enzima también produce pequeñas cantidades de oligosacáridos. La sacarificación del almidón puede alcanzar hasta 96 % de dextrosa. La acción de la enzima causa inversión de la configuración, produciendo β -glucosa. Las glucoamilasas son inactivas sobre almidón nativo. Su actividad es máxima entre pH 4 y 5,5, y temperatura alrededor de 55-65 °C. La tasa de reacción cae rápidamente a medida que disminuye el tamaño de la molécula de sustrato, siendo máxima sobre almidones previamente sometidos a licuefacción (Carrera, 2003).

c) Amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3)

Las amiloglucosidasas (glucoamilasa, α -amilasa o α (1-4) glucohidrolasa) catalizan la etapa de hidrólisis de los enlaces α (1-4) del almidón y los oligosacáridos, liberando moléculas de β -glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena. Los enlaces ramificados α (1-4) también se hidrolizan, pero mucho más lentamente, formándose un jarabe de glucosa, un contenido de glucosa del 95 al 97 % en peso y de un 30 a un 5 % de oligosacáridos grandes. La enzima es capaz de hidrolizar también, aunque lentamente, los enlaces α (1-3). La glucosa formada se utiliza como jarabe o se cristaliza para obtener glucosa pura sólida. La amiloglucosidasa se usa a gran escala en la industria de procesamiento del almidón en tanques discontinuos a 55-60 °C y pH de 4,5 y con períodos de incubación de 48-92 horas, para transformar las dextrinas formadas por la α -amilasa en glucosa. El calcio la estabiliza frente a la desnaturalización por el calor o los álcalis, y la hidrólisis puede llevarse a cabo fácilmente añadiendo

la enzima soluble al almidón una vez que la α -amilasa ha realizado del 15 al 30 % de la hidrólisis posible (Wiseman, 1985).

Una ventaja particular en el uso de enzimas en lugar de HCl para la hidrólisis del almidón es que puede utilizarse una materia prima menos pura, ya que las proteínas contaminantes no se hidrolizan hasta aminoácidos, que podrían dar lugar a reacciones de pardeamiento. Después de la sacarificación con amiloglucosidasa, el jarabe resultante se filtra para eliminar proteínas y grasas y se purifica con columnas de carbón activo seguido de otras con resinas de intercambio iónico (Wiseman, 1985).

La glucoamilasa es un enzima extracelular producido por diversas especies de *Aspergillus* o *Rhizopus*. La amiloglucosidasa de *Rhizopus* puede separarse en isoenzimas con propiedades semejantes a los isoenzimas de *A. niger*. La enzima es una

glicoproteína que contiene manosa, glucosa, galactosa y ácido urónico, y tiene un pH óptimo de 4,3-4,5. Una de sus desventajas es su relativa falta de actividad frente a los enlaces α (1,6), lo que hace necesario el uso de grandes dosis o de grandes períodos de incubación para lograr el grado de hidrólisis deseado. Por tanto, se ha propuesto el uso combinado de amiloglucosidasa y la enzima desramificante pululanasa, logrando aumentos del contenido de dextrosa del 1 al 2 %, a pesar de llevar a cabo la reacción a pH 5,5 - 6,0, en el que la amiloglucosidasa es menos activa (Wiseman, 1985).

El resto de la cadena del polisacárido es atacado por la enzima isoamilasa o pululasa, reconocida oficialmente como E.C. 3.2.1.68. Participa en la reacción de hidrólisis de polisacáridos específicamente en los enlaces 1,6- α -D-glucosídicos; su nombre sistemático es glucógeno α (1,6) glucoanhidrolasa. Su actuar es directamente sobre la amilopectina, glucógeno y dextrinas, pero es incapaz

de hidrolizar el pululano y la α -dextrina limite. Su misión es participar en la reacción de hidrólisis de ramificación que contengan enlaces α (1,6) glucosídicos por lo que también se le conoce como enzimas desramificadora. Su nombre sistemático es glucógeno 1,6- α -D-glucanohidrolasa (IUBMB, Enzyme Nomenclature, 2008). El único producto de reacción es maltosa. La temperatura óptima está alrededor de 45 °C y el pH entre 4 y 5.

d) Usos y aplicación de las enzimas

Las enzimas vuelven los procesos eficientes y menos costosos, en muchos casos, a que tienen un alto grado de especificidad y adaptabilidad (suaves condiciones de trabajo). Además, lograr más material procesado con el mismo equipo y menos consumo de energía también ahorra costos. Al utilizar enzimas en la industria alimentaria nos ofrece la ventaja de

- Reducir viscosidad (hidrólisis).
- Mejorar extracciones (degradación de pectina).
- Hacer bioconversiones (glucosa a fructosa).
- Causar separaciones (separación del suero en queso).
- Sustitución de ingredientes y coadyuvantes en procesos.
- Ahorro con procesos más eficientes obteniendo menos subproductos indeseados y mayor capacidad de planta con un incremento de rendimiento de producto.
- Ganancia: mejora propiedades deseables obteniendo un producto único (jarabe de alta concentración de fructosa) (Mundo Alimentario, 2008).

Las enzimas amilasas por su capacidad hidrolítica han tenido gran significancia en las últimas décadas en diversas industrias que han visto una mejor manera de optimizar sus procesos aplicando técnicas biotecnológica extensivas basadas en

enzimas. Industrias como la panadería, repostería, alimentaria, textilera, cervecera, papel, azucarera entre muchas más han visto en estas proteínas una gran oportunidad de comercio. Las amilasas ocupan cerca de un 25 % en el mercado enzimático llegando a sustituir completamente procesos de hidrólisis química en la industria del almidón. La termoestabilidad de esta enzima, industrialmente, ha hecho que las amilasas tengan gran aplicabilidad en diversos procesos (Asgher et al., 2006).

e) Procesos industriales que aplican enzimas

- **Industria del almidón y del azúcar**

Dependiendo de las enzimas utilizadas, a partir del almidón se pueden obtener jarabes de diferente composición y propiedades físicas. Los jarabes se utilizan en una variedad de alimentos tales como gaseosas, dulces, productos horneados, helados, salsas, alimentos para bebés, frutas enlatadas, conservas.

Hay tres etapas básicas en la conversión enzimática del almidón: licuefacción, sacarificación e isomerización (Carrera, 2003).

- **Productos lácteos**

La aplicación de enzimas en el procesamiento de leche está bien establecida, por el uso del cuajo (quimosina) en la producción de queso, que tal vez representa el empleo más antiguo de enzimas en alimentos. Otras enzimas que participan en la producción de quesos son las lipasas presentes en la leche, las cuales hidrolizan el componente graso, proporcionando cambios característicos en el sabor. Para algunos quesos se pueden aumentar las lipasas naturales, añadiendo enzima extra. Por otra parte, también se recomienda agregar enzimas exógenas de tipo proteolítico para acelerar el proceso de maduración de algunos quesos (Carrera, 2003).

- **Molineros y panadería**

El uso de enzimas en estas industrias se debe principalmente a la deficiencia en el trigo y en la harina, de las enzimas naturalmente presentes. El contenido de α -amilasa de la harina depende de las condiciones de crecimiento y de cosecha. En climas húmedos la tendencia será a tener alta actividad de α -amilasa debido a germinación de los granos, en tanto que en climas secos el nivel de α -amilasa será bajo debido a la escasa germinación. Esto conlleva a grandes diferencias en el contenido de amilasa de diferentes lotes de harina (Carrera, 2003).

- **Transformación del almidón**

Los procesos encaminados a la producción de edulcorantes están basados en la degradación del almidón y han sido empleados durante muchos años, aunque originalmente se llevaba a cabo mediante hidrólisis catalizada por ácidos. Durante el curso del desarrollo y la expansión de la

transformación industrial del almidón, se ha producido un cambio de la catálisis acida por el uso de enzimas. La elevada especificidad de estas reacciones enzimáticas, acopladas con la gran actividad de las preparaciones disponibles, ha permitido directamente el que pueda ser incrementada y además la formación de derivados indeseables se ha minimizado. De todas las aplicaciones a escala industrial, la más afortunada es la producción de jarabe de maíz con fructosa elevada (HFCS).

El propósito de este proceso es obtener un material de poder edulcorante semejante a la sacarosa a partir de una materia prima de bajo precio (almidón de maíz) (Carrera, 2003).

- **Productoras de jugos de frutas**

Las primeras enzimas empleadas en las industrias de jugos de frutas fueron las enzimas pécticas para la clarificación del jugo de manzana.

Actualmente las enzimas pécticas se usan en el procesamiento de muchas otras frutas, junto con amilasas y celulasas. Durante el procesamiento de los jugos cuando se desintegran los tejidos vegetales, parte de la pectina, que es un componente estructural de las frutas, pasa a la solución, parte se satura con el jugo y parte permanece en las paredes celulares. Las enzimas pécticas se usan para facilitar el prensado, la extracción del jugo y la clarificación ayudando a la separación del precipitado floculante (Carrera, 2003).

- **Fermentación alcohólica**

El almidón proveniente de maíz, patatas, cebada, yuca y otras fuentes debe someterse a un tratamiento previo con hidrolasas, con objeto de producir su licuación y sacarificación, antes de hacerlo fermentar mediante levaduras u otros organismos para obtener alcohol utilizable. Estas enzimas son α y β amilasas y amiloglucosidasas,

que pueden agregarse en forma de malta (cebada germinada), aunque este proceso es caro. La malta no sólo contiene α y β amilasas sino también enzimas que degradan los enlaces α (1,6) de las dextrinas límite. Recientemente se han añadido enzimas bacterianas para suplementar las enzimas endógenas asociadas con el almidón. Por ejemplo, en los procesos discontinuos americanos para la producción de alcohol para bebidas, la adición de α -amilasa bacteriana durante la cocción para hidrolizar parcialmente el almidón gelatinizado representa una ventaja, puesto que reduce la viscosidad de la mezcla facilitando su agitación y mezclado. Posteriormente, la mezcla se enfría y después se añade α -amilasa bacteriana para continuar la hidrólisis, que se completa mediante la adición de amiloglucosidasa. Después se inoculan en la mezcla levaduras, de forma que continúe la sacarificación y fermentación simultáneamente hasta el agotamiento de la dextrosa, y se destila

el alcohol. La producción comercial de alcohol industrial, destinado a usarse como carburante en motores de combustión interna se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, particularmente en Brasil, que lo obtiene de la fermentación de la caña de azúcar o de la yuca. También se ha propuesto el empleo de células inmovilizadas. Se ha obtenido etanol a partir de melazas de caña diluidas, no estériles, durante medio año (Wiseman, 1985).

- **Industria Cervecera**

La cebada se utiliza tradicionalmente para la fabricación de bebidas alcohólicas como la cerveza. En su producción se deben considerar dos operaciones distintas: la maltería y la cervecería. La preparación de la malta se logra por germinación de la cebada, durante la cual se incrementa el contenido de α -amilasa. Las enzimas α y β amilasas naturalmente presentes en el grano actúan sobre el almidón produciendo

dextrinas y maltosa, que sirven como sustratos para la fermentación posterior. La sacarosa es hidrolizada por la enzima invertasa la cual queda dividida en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas podrían ser asimiladas de forma glucolítica. También las enzimas cumplen la función de transportar la maltosa y la maltotriosa a las células de las levaduras para posteriormente ser convertidas en glucosa por la maltasa (Campbell, 2007).

Otra aplicación patentada recientemente en industrias inglesas consiste en el uso de la enzima α -acetolactato descarboxilasa, aislada de *Enterobacter aerogenes*. Esta proteína es capaz de desintegrar o eliminar el α -acetolactato y α -acetohidroxi-butirato de la cerveza recién fermentada en 24 horas a 10 °C para de este modo conseguir niveles de diacetilo y 2,3-Pentanodiona por debajo de los umbrales permitidos para productos de este tipo. Se

consigue con ello grandes ahorros (Castañe, & Damm, 2007).

Hay muchas enzimas disponibles comercialmente para el proceso cervecero, pero todas ellas caen en tres categorías: proteasas, amilasas y glucanasas. La acción de estas enzimas durante las primeras etapas consiste en mejorar la licuefacción del almidón, regular el contenido de azúcar y nitrógeno, mejorar la extracción, facilitar la filtración y controlar la turbidez. En la filtración del mosto reducción de las gomas y de la viscosidad. En la ebullición, control de la turbidez, eliminación final del almidón. En esta etapa se inactivan las enzimas. Durante la fermentación y maduración la adición de enzimas sirve para controlar la turbidez (Carrera, 2003).

- **Procesamiento de carne**

Las enzimas importantes para ablandar carne son proteasas de origen vegetal o de microorganismos (*Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*). Las enzimas se inyectan antes del sacrificio al animal o se trata la carne con las enzimas antes de cocerla, con lo que se logra un franco ablandamiento sin provocar una proteólisis importante (Carrera, 2003).

- **Industrias de grasas y aceites**

El uso de enzimas en las industrias de aceites y grasas es muy bajo, aunque se encuentran disponibles enzimas que pueden resolver algunos problemas, por ejemplo minimizar los subproductos indeseables. Las enzimas también se pueden usar para producir aceites y grasas novedosas. Las lipasas específicas pueden seleccionar los ácidos grasos de algunas posiciones del triglicérido, para incorporar determinados ácidos grasos, sin cambiar los de

otras posiciones. De tal manera que es posible modificar por interesterificación el contenido de ácidos grasos, o por transesterificación lograr el reordenamiento de algunos de ellos. Por ejemplo la mantequilla de cacao se requiere en la producción de chocolate y con frecuencia la disponibilidad y el costo fluctúan ampliamente. Sin embargo, aceites como el de palma son baratos y se encuentra buen abastecimiento.

Lo que se plantea es modificar el aceite de palma por reacción con ácido esteárico mediante interesterificación enzimática. La grasa resultante tiene propiedades similares a la mantequilla de cacao (Carrera, 2003).

f) Producción y sustrato

Las células microbianas , son la fuente usual de enzimas para uso industrial excepto para algunos enzimas provenientes de animales y plantas utilizados tradicionalmente como las proteasas de la papaína, ficina y bromelaína, que se utilizan para el

ablandamiento de la carne, y la quimosina, empleada en la manufactura del queso. La inmensa mayoría de los enzimas microbianos se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 20 % de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiados como fuente de enzimas (Wiseman, 1985).

Tradicionalmente se han obtenido pocas enzimas de origen animal (lipasa pancreática y tripsina) debido a que éstas pueden ser reemplazadas por otras similares derivadas de microorganismos. Sin embargo, los sustitutos microbianos, aunque catalíticamente eficaces, presentan sutiles diferencias en sus propiedades que pueden ser cruciales en el proceso de su aplicación. Los recientes avances en este campo han permitido la adaptación de las técnicas del ADN recombinante para posibilitar que ciertos genes de mamíferos sean clonados en las bacterias o

levaduras idóneas, facilitando así la producción de enzimas originariamente de animales por medio de la tecnología convencional de la fermentación (Carrera, 2003).

Las plantas también han sido fuente tradicional de un cierto número de enzimas. A partir del látex producido por la papaya, higuera, piña y, en menor grado, otras especies se ha aislado sobre todo, cistein-proteinasas. Estas plantas tienen la ventaja de que su látex es fácil de obtener, principalmente a partir de los frutos y utilizando mano de obra no cualificada (Carrera, 2003).

Las enzimas microbianas son más útiles que los derivados de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen, y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, baratos, de forma regular y de calidad uniforme, ocasionalmente mediante cultivo de superficie o usualmente mediante técnicas de

fermentación aeróbica de cultivos profundos, técnica muy utilizada en la producción de antibióticos. Además los enzimas microbianos son en general más estables que los homólogos de las plantas o animales, y su proceso de producción es más fácil y seguro que el seguido con plantas y animales. La manipulación genética y ambiental para incrementar el rendimiento, o la actividad enzimática de las células haciendo a éste de interés constitutivo (Gacesa & Hubble, 1990). Estas técnicas son especialmente importantes en el caso de la actividad o estabilidad de la enzima que sea la etapa limitante en conversiones multienzimas, cuando haya que eliminar los controles de regulación normales en la síntesis de la enzima deseada, cuando se desea reducir o eliminar la inhibición por el substrato o el producto, mecanismo este último para prevenir la sobreproducción del producto de una vía metabólica, o para obtener algunas otras características favorables (Wiseman, 1985).

Generalmente el objetivo es maximizar la velocidad de formación del enzima y la concentración de enzima en las células o en el caldo de fermentación para minimizar los costos de producción de la enzima. Lo ideal es combinar de forma óptima la cepa seleccionada de microorganismo, las condiciones de recuperación y fermentación y el equipo más apropiado en buenas condiciones de trabajo. Usualmente, las células crecen sumergidas, en fermentadores bien agitados y aireados, aunque un número significativo de enzimas importantes industrialmente se obtienen en fermentadores sólidos o semisólidos, entre los que se incluyen la lactasa, la α -amilasa y una proteasa de *A. oryzae*, la pectinasa, una proteasa de *A. niger*, la α -amilasa de *Rhizopus*, y el cuajo de *Mucor pusillus* (Wiseman, 1985).

Las plantas superiores no son generalmente fuentes satisfactorias de enzimas para usos clínicos e industriales, y acumulan productos de desecho en las vacuolas. Estos compuestos son frecuentemente

inhibidores enzimáticos y/o toxinas, particularmente cuando se oxidan al contacto con el aire. Estos desechos, muchos de los cuales son fenoles, se liberan al romperse la célula, contaminando y frecuentemente inactivando cualquier enzima extraído (Wiseman, 1985).

Las hidrolasas son ampliamente utilizadas en los procesos industriales. Dentro de ellas podemos encontrar las enzimas α -amilasa, β -amilasa como las más comunes para las síntesis del almidón produciendo productos de bajo peso molécula. Estas enzimas son producidas, especialmente α -amilasa, por gran diversidad de microorganismos, producen amilasas muchos hongos del suelo así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* entre otras (Wiseman, 1985).

El principal género que está siendo tratado para la producción de dicha enzima es *Bacillus*. Las especies registradas como productoras de enzima en

este género son *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Bacillus amyloliquefaciens* quienes son aplicados en procesos industriales para alimentos, textiles, fermentación, papelería entre otros (Zoe, 2005).

También otros géneros han sido reportados en proyectos de investigación. El género *Aspergillus* produce una amplia variedad de enzimas extracelulares entre las cuales además de estar las amilasas se puede identificar las proteasas de *Aspergillus* y *Rizhopus* las cuales se están identificando como grandes productores de enzimas (Salas & Rodríguez , 2005).

La inducción de amilasa tipo α requiere un sustrato que contenga enlaces α -1,4 glucosídicos, además de maltosa, dextrina y almidón. La glucosa, así como es el producto final de la hidrólisis, tiene la posibilidad de reprimir la síntesis de enzima como un mecanismo conocido como represión catabolítica. Sin

embargo, se ha encontrado que algunos microorganismos en distintos sustratos que tienen como fuente de carbono a los carbohidratos no inducen la producción de amilasas (Nahas & Waldemarin, 2002), este hecho contrasta con los registrados en artículos de investigación y compañías dedicadas a la producción de enzimas donde la fuente de producción de las proteínas son microorganismos (Salas & Rodríguez, 2005).

La producción industrial ha desarrollado técnicas de aprovechamiento de recursos o residuos de producción de diversas industrias con el objeto de adquirir enzimas utilizando sustratos de bajo costo, así como los desechos agrícolas. En años recientes, se ha presentado un incremento en el esfuerzo y la aplicación eficiente del bagazo de caña de azúcar como medio de producción. Este es un subproducto agroindustrial de extensa cadenas celulósicas. Esta es una importante fuente de carbono que ha sido empleada en los últimos años para la producción de

enzimas y a su vez la fermentación de azúcares para la elaboración de etanol. Se ha identificado que el microorganismo óptimo para reproducirse en este medio y sintetizar α -amilasa es *Bacillus subtilis* (Rajagopalan & Krishnan, 2007). Los medios de cultivo han facilitado para los microorganismos el desarrollo de enzimas con propiedades físico-químicas muy deseables. La producción de α -amilasa puede darse en medio sumergido o en estado sólido o por procedimientos de fermentación. La concentración de metabolitos para el crecimiento de los agentes microbiales es importante. Influye directamente la composición del medio así como las fuentes de carbono, de nitrógeno y el contenido de sales inorgánicas (Djekrif-Dakhmouche et al., 2005).

En cuanto a términos de aplicabilidad industrial, es necesario estudiar la producción de enzimas y analizar el factor de termoestabilidad, ya que se ha demostrado que la temperatura está ligada directamente a la velocidad de reacción de la enzima,

menor viscosidad en el sustrato y disminución de la contaminación microbiana. Los microorganismos apropiados para la producción de enzimas deben tener ciertas propiedades como rapidez de crecimiento, adaptación a nutrientes relativamente baratos y sin necesidad de inductores. Además, se debe obtener un alto rendimiento de enzima, de forma que sea fácil aislarlo, purificarlo y concentrarlo sin que se produzca la formación concomitante de metabolitos tóxicos o inmunogénicos (Wiseman, 1985).

También puede ser una estrategia útil la de seleccionar cepas que hiperproduzcan enzimas a partir de organismos genéticamente modificados OMG que no tengan necesidad de inductores debido a que sus centros represores están inactivos, a que tienen una baja represión por los catabolitos, a que sufren retroinhibición o a que tienen enzimas relativamente resistentes a la inhibición por el producto final. De hecho, a pesar de los enormes avances obtenidos recientemente en el campo de la

ingeniería genética, las técnicas clásicas de selección de enzimas son todavía muy productivas, particularmente cuando se estudian ambientes nuevos y/o exóticos, para buscar células microbianas que desarrollen enzimas con propiedades excepcionales. Entre ellos destacan los enzimas clorantes obtenidos a partir de microorganismos marinos, y una enzima que produce un nuevo azúcar, la isomatulosa, de forma muy productiva a partir de una bacteria patógena del ruibarbo. Muy recientemente se han hecho descubrimientos más excepcionales si cabe, por ejemplo, los microorganismos que crecen a unos 250 °C en fuentes volcánicas en aguas marinas profundas que poseen enzimas extremadamente estables al calor, o un microorganismo del intestino de un gusano que perfora la madera, que es capaz de degradar la celulosa y de fijar el nitrógeno (Wiseman, 1985).

En resumen, la mayoría de las enzimas empleadas comúnmente en la industria son de origen microbiano y se producen por fermentación sumergida aerobia convencional, permite un mayor control de las condiciones de crecimiento que la fermentación en estado sólido. Se sabe mucho acerca de la selección de cepas de organismos y condiciones de cultivo, aunque menos sobre la regulación de la síntesis, degradación y secreción de la enzima por el organismo productor. Estas enzimas son con frecuencia extracelulares, lo que facilita su aislamiento y purificación (Wiseman, 1985).

El proceso de conversión de almidón gelatinizado a un jarabe glucosado generalmente está representado en 2 etapas: licuefacción y sacarificación. La licuefacción se presenta cuando se emplea la enzima α -amilasa (durante o después de gelatinizar el almidón), cortando las cadenas de los polímeros amilosa y amilopectina en cadenas de tamaño regular, dando como resultado dextrinas,

maltosa, maltotriosa y maltopentosa. Para la producción de glucosa, se requiere de una segunda etapa consecutiva a la licuefacción denominada sacarificación, adicionando la enzima amiloglucosidasa (AMG) dando como principal producto la glucosa. Algunas de las enzimas encargadas de la hidrólisis del almidón tenemos:

- **α -amilasa**

La α -amilasa, también conocida como α -1,4 glucanohidrolasa; EC 3.2.1.1 es una glucanasa endoactiva que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces α -(1,4) glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina excepto en las proximidades de los puntos de ramificación (Van Der & Marc, 2002).

Así mismo se reportó que la velocidad de hidrólisis es más lenta en los enlaces cercanos a los puntos de ramificación. La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa,

maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por 4 o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces α (1,6) provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original (Suckling, 1990).

Los productos obtenidos en mayor concentración son maltosa, maltotriosa y maltopentosa, hidrolizando completamente la maltohexosa (Cheetham, 1991).

El peso molecular reportado para la α -amilasa proveniente de *Bacillus Licheniformis* se encuentra alrededor de los 60 kDa (Cheetham P., 1991; Viara et al., 2001; Damodara et al., 2005; Fitter et al., 2001).

- **Pululanasa**

También conocida como pululan- α -glucanohidrolasa, EC: 3.2.1.41 hidroliza los enlaces glucosídicos α (1,6) en el pululan y tiene como producto principal la maltotriosa y maltosa e hidroliza el almidón para dar como producto principal maltosa (Adinarayana et al., 2006). Esta es usada como enzima complementaria para la hidrólisis de amilopectina junto con la α -amilasa. Existen dos tipos de pululanases. La pululanasa de tipo I únicamente hidroliza los enlaces α (1,6) del pululan (Nakamura et al., 1976), y la pululanasa de tipo II que hidrolizan los enlaces α -1,6 en el pululan como también los enlaces α (1,4) de otros polisacáridos. Las pululanases tienen un peso molecular que fluctúa entre 70 y 110 kDa (Adinarayana et al., 2006; Nakamura et al., 1976; Kim et al., 1993).

- **Amiloglucosidasa AMG**

Conocida como glucoamilasa o amiloglucosidasa EC 3.2.1.3 es empleada en la producción de jarabes glucosados, ya que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces α (1,4) de extremos no reductores de polisacáridos para la formación de glucosa. Esta enzima también posee la capacidad de hidrolizar enlaces α (1,6) a más baja velocidad, pudiéndose completar la hidrólisis de almidón con la combinación de las tres enzimas α -amilasa, pululanasa y AMG de manera completa. El peso molecular de la AMG puede variar dependiendo de su fuente. Existen dos tipos de AMG, tipo I y II. Las AMG tipo II tienden a tener un peso molecular mayor a los 100 kDa. Las AMG tipo 1 poseen pesos moleculares cercanos a 60 kDa (Sebnem et al., 2001). El peso molecular de las AMG fúngicas también depende de la fuente. Para AMG formadas a partir de *Aspergillus niger*, su peso molecular se encuentra entre 60 y 70 kDa (Fogarty et al., 1983; Paszczvdski et al.,

1982; Freedberg et al., 1975; Sutthirak et al., 2005).

g) Propiedades de las enzimas

Mouranche (1985), citó algunas condiciones para que las enzimas puedan ser empleadas con máximo desempeño:

- **Especificidad:** para cada fase de reacción, la necesidad de un tipo de enzima.
- **Optimización de pH:** todas las enzimas son sensibles a variaciones del cambio de pH del medio. Existe un pH óptimo para lo cual la actividad enzimática es máxima, puede ser básico o ácido en función de la enzima.
- **Optimización de temperatura:** como para el pH, las enzimas tienen un rango de temperatura en el cual la actividad enzimática es máxima. En general, es preferible utilizar enzimas que soporten altas

temperaturas para permitir el aumento de la cinética de reacción y proteger el medio contra eventuales contaminaciones microbianas.

- **Unidad de actividad enzimática:** la unidad internacional de actividad enzimática, o katal (kat), fue definido como una cantidad de enzima que transforma un Mol de sustrato por segundo, en condiciones de experimentación estándares. Para una unidad menor se usa la cantidad de enzima que transforma 1 μ Mol de sustrato por minuto. A pesar de esta normalización internacional, cada fabricante de enzima define las propias unidades en condiciones experimentales particulares.

h) Purificación de enzimas

En general, las enzimas comerciales se encuentran formando parte un complejo de mezclas de actividades, formando parte de agregados moleculares, proteínas inertes, ácidos nucleicos, polisacáridos o lípidos. Para estudiar una en particular, es necesario un proceso de

purificación. Por muchos años, enzimas a partir de *Aspergillus niger* y *Bacillus licheniformis* han sido sujetas a estudio con el fin de entender sus propiedades, procesos de síntesis, secreción y producción. Sus propiedades catalíticas específicas han sido deducidas a través de la purificación y separación mediante técnicas de cromatografía líquida de proteínas y caracterizadas con electroforesis. La siguiente tabla resume la metodología y el organismo usado en la purificación para cada enzima (Cruz, 2012).

Tabla 5: Condiciones para purificación de enzimas y organismo utilizado.

α-amilasa				
Buffer	MW(kDa)	pH	Columna	Organismo
(50 Mm Tris) y 50 mM Tris, 2M NaCl)	~62	8	Q-Sepharose	<i>E. coli</i>
0,01 M fosfato de sodio	28	6,4	Carboximetil Celulosa	<i>B. Licheniformis</i>
0,025 M Tris-HCl	58	7,3	Sephadex G-100	<i>B. Licheniformis</i>
30 mM fosfato de sodio -NaCl		6		<i>B. Licheniformis</i>
20 mM fosfato	58	6,8	Starch-Sepharose	<i>B. Licheniformis</i>
Pululanasa				
Buffer	MW(kDa)	pH	Columna	Organismo
fosfato, 50 Mm	106	6	DAE-Cellulose	<i>Bacillus sp.</i>
0,01 M fosfato-0,1 M	92	8	Sephadex G-200	<i>Bacillus sp.</i>
50 mM Tris-HCl	120	8	DEAE - MonoQ	<i>Bacillus sp.</i>
NaCl 0,5 M	81,1	8,1	Hiload Q-Sepharose	<i>Bacillus subtilis</i>
AMG-Amiloglucosidasa				
Buffer	MW(kDa)	pH	Columna	Organismo
0,02 M Acetato de sodio	63	4,5	CM-BIO-GEL A	<i>A. niger</i>
citrato/fosfato	57-63	6	Acrylamide	<i>A. niger</i>
20 Mm Acetato de sodio-0,3-0,5 M de NaCl	77	4,5	Q-Sepharose	<i>A. niger</i>
100 mM Acetato de sodio		6	Filtron tangential Ultrafiltration	<i>A. niger</i>
Acetato de Sodio		4,5	Sephadex G-25	<i>A. niger</i>

Fuente: Cruz, 2012.

1.5.5. Glucosa

a) Propiedades funcionales

Dependiendo del contenido de equivalente dextrosa (ED), la glucosa es usada en la industria de alimentos y productos farmacéuticos ya que nos brinda los siguientes beneficios: mejoran el cuerpo y la textura, no imparten gusto harinoso, controlan el dulzor y la higroscopicidad, reducen la cristalización, control del oscurecimiento no enzimático, no enmascara sabores, incrementan la solubilidad en el agua fría, control del punto de congelación y la osmolalidad, son excelentes agentes tableteadores, vehículos o acarreadores (GPC, 1996).

b) Características de la glucosa

- **Características físicas**

La característica física de toda forma de glucosa es su propiedad incolora. El peso molecular de la glucosa es 180,18.

- **Características químicas**

El nombre químico para la glucosa es 6-(hidroximetil) oxano-2, 3, 4,5-tetrol. La composición química de la glucosa es seis átomos de carbono, 12 átomos de hidrógeno y seis átomos de oxígeno, lo que constituye una molécula de azúcar, y su fórmula es $C_6H_{12}O_6$. La glucosa es un azúcar simple monosacárido. Enlaces de alta energía hacen que la molécula de glucosa permanezca unida hasta que el enlace se rompa y libere energía.

c) Aplicaciones de la glucosa

La glucosa tiene una gran variedad de aplicaciones, principalmente en la industria alimenticia y farmacéutica donde funcionan como: agentes estabilizantes, espesantes, extensores, reemplazadores de grasas y aceites en aderezos para ensaladas, margarinas y postres congelados, agentes encapsulantes o vehículos para procesos de secado por aspersion de pigmentos naturales,

aceites esenciales, sabores, etc., ayudan a controlar la textura, la higroscopicidad y la densidad en algunos alimentos (Shamek et al., 2002).

Recientemente se han utilizado soluciones concentradas como alimento para personas que presentan falla renal crónica, cirrosis hepática, trastornos en el metabolismo de aminoácidos y en aquellas condiciones dietéticas especiales que requieren de alimentos de alto aporte energético, pero de poco volumen de fluido y bajo contenido de electrolitos (DEIA., 2010).

d) Fuentes de obtención

Comercialmente la glucosa es producida mediante la hidrólisis controlada del almidón y corresponde al almidón de maíz ser la principal materia prima utilizada en la producción industrial de estos insumos a nivel mundial (Abraham et al., 2001).

Sin embargo, la glucosa también ha sido obtenida a partir de almidones de papa (Absar et al., 2009; Delgado et al., 2009; Guerra et al., 2012), trigo (McPherson & Seib., 1997), yuca (Rocha et al., 2005; Khatoon et al., 2009), sorgo, arroz (Wang & Wang.,2000; Khatoon et al., 2009), amaranto (Guzmán & Paredes.,1995), plátano (Bello et al., 2002), así como de tubérculos de malanga (*Colocasia esculenta*)(Antonio et al., 2009) y de chayote (*Sechium edule*) (Jiménez et al., 2007). En el mercado existe glucosa de maíz, papa y arroz; cada una de las cuales tendrá propiedades muy particulares debido a las diferencias inherentes en la composición y estructura química del almidón de partida (Wang, 2000; 2001). A nivel mundial, la fuente de almidón para la producción industrial dependerá de la disponibilidad y precio de las materias primas producidas en cada país (Jing et al., 2011).

e) Métodos de obtención

En la industria la glucosa se obtiene a partir del almidón de maíz principalmente, la hidrólisis de éste polímero puede realizarse por métodos químicos (mediante el uso de ácidos tales como el clorhídrico o el sulfúrico), por métodos enzimáticos (mediante el uso de enzimas amilolíticas), o bien, mediante una combinación de ambos métodos (Lumdubwong & Seib, 2001). La hidrólisis ácida es un proceso en el cual la molécula de almidón es cortada al azar, lo cual produce una mezcla no controlada de moléculas con diferentes pesos moleculares. La hidrólisis enzimática del almidón ha reemplazado gradualmente los procesos de hidrólisis ácidas debido a las ventajas que presenta, entre ellas se tienen (Wang., 2000, 2001).

- Condiciones de hidrólisis más suaves (temperatura, presión, pH).
- Mayor precisión y control en su realización.
- Menor cantidad de subproductos.
- Mayor especificidad.

- Mayor control en el grado de hidrólisis deseado.
- No se obtienen materiales coloridos ni de sabor amargo.
- Eliminación de las etapas de refinamiento para eliminación de cenizas y materiales coloridos.

El proceso de elaboración de glucosa se inicia con la preparación de una dispersión de almidón, la cual es calentada a ebullición durante 5 minutos, a fin de provocar la gelatinización del almidón; es decir, disolver los gránulos, dispersar sus constituyentes amilosa y amilopectina y de esta forma, facilitar la acción de las enzimas amilolíticas empleadas durante la siguiente etapa del proceso que comprende la hidrólisis del almidón, operación que debe realizarse bajo condiciones de proceso muy controladas, como son: la temperatura, el pH, la concentración de enzima, la concentración de sustrato y el tiempo de reacción; a fin de obtener glucosa con el ED deseado.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis establecido, la reacción se suspende por inactivación de la enzima, actividad que se realiza por calentamiento a ebullición de la mezcla de reacción cuando la enzima utilizada es termolábil o bien, por modificación del pH mediante el uso de HCl cuando la enzima utilizada es termo resistente. El producto de la reacción es posteriormente centrifugado y filtrado para eliminar partículas sólidas en suspensión, y el licor obtenido es pasado a través de columnas de carbón activado, previo a la etapa de concentración y su posterior secado por aspersion y empaclado (Guzmán & Paredes., 1995).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Biológico

Tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*)

2.2. Métodos

2.2.1. Diseño de experimentos y tratamiento estadístico de los datos

El diseño experimental se realizó bajo la metodología Salcedo et al., 2009. Se hicieron ciertas modificaciones a la metodología. Primeramente se realizó un diseño experimental de múltiple factor completamente al azar con dos factores, el factor concentración de sustrato (almidón) en cinco 5 niveles: 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 % p/v y el factor tiempo en 6 niveles: 10, 20, 30, 40,50 y 60 minutos con tres repeticiones, para un total de 90 unidades experimentales para cada sustrato de almidón.

Segundo, se realizó un diseño experimental de múltiple factor completamente al azar con dos factores, tipo sustratos de en 4 niveles: papa, camote, arracacha y yuca y el factor

tiempo en 6 niveles: 10; 20; 30; 40; 50 y 60 minutos con tres repeticiones, para un total de 72 unidades experimentales. En ambos casos los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

2.2.2. Variables de experimentación

• Variables Independientes

- ✓ Concentración de sustrato de almidón (% p/v)
- ✓ Tiempo (min)
- ✓ Tipo de sustrato

• Variable Dependiente

- ✓ Producción enzimática de glucosa
 - Indicador: Equivalente dextrosa

2.2.3. Diseño de la investigación

Se usó un diseño experimental – transversal.

2.2.4. Obtención de materia prima

Las materias primas empleadas fueron papa (***Solanum tuberosum***), camote (***Ipomoea batatas***), yuca (***Manihot esculenta***), arracacha (***Arracacia xanthorrhiza***) las cuales fueron obtenidas por seleccionamiento aleatorio en puestos de verduras del Mercado Grau del departamento de Tacna; teniendo como carácter de exclusión: presencia de tejido necrótico y daños.

No se consideró el tamaño como factor de exclusión.

2.2.5. Obtención de almidón

La extracción se realizó utilizando el método Carver (Carver, 1937). Se aplicó ese método por su facilidad y volumen a procesar. Inicialmente se procedió al lavado de sustrato con agua potable para eliminar las impurezas, se retiró la epidermis con el fin de dejar la pulpa expuesta para el rallado, que se hizo con ayuda de un rallador manual el cual permitió liberar los gránulos de almidón contenidos en las células del parénquima, a la masa obtenida se le adicionó agua potable en una cantidad suficiente para facilitar el proceso de tamizado, que se realizó en un lienzo de tela de nylon, el cual

permitió sólo el paso de la lechada. La sedimentación se realizó en matraces de 500 ml por 24 horas, se retiró el agua sobrenadante y la mancha quedó en la superficie. Luego, el almidón se resuspendió en agua con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de impurezas (4 – 5 horas). El secado del almidón se realizó en estufa por 24 horas.

Además, se midió el rendimiento de extracción de almidón, el cual se expresó en gramos del almidón extraído / Kilogramos de sustrato fresco, para lo que hubo la necesidad de pesar el sustrato antes y después del pelado, y del secado para establecer parámetros de rendimiento.

2.2.6. Caracterización físico-química del almidón

El análisis físico químico se realizó empleando la metodología de la AOAC (1990) para la determinación del porcentaje de humedad, cenizas, proteínas, fibra bruta. Las muestras se analizaron por triplicado.

a) Determinación de humedad

Siguiendo los procedimientos de la AOAC (1990). La determinación de humedad se dio mediante la pérdida de peso de la muestra al ser secada a temperaturas de 105-110 °C hasta peso constante. Se utilizó una balanza analítica OHAUS Discovery con sensibilidad de $\pm 0,001$ g en donde se pesaron 5 g de la muestra de almidón en charolas de aluminio previamente lavadas, secadas y puestas a peso constante en un desecador, para obtener una mayor exactitud y posteriormente se colocaron en la estufa de secado GEMMY modelo IN-010 (25 L) a 110 °C, para esto fue necesario registrar los pesos cada hora y dejar la muestra en el desecador por 30 minutos, hasta obtener el peso constante de la muestra (aproximadamente 4 horas).

Cálculos:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{Ph - Ps}{Ph} \times 100$$

Dónde:

Ph = peso de la muestra húmeda (g)

Ps = peso de la muestra seca (g)

Valor de referencia: El porcentaje de humedad no debe exceder el 20 %

b) Determinación de cenizas

Este método analítico proporciona una estimación del material mineral presente en la muestra de almidón incluyendo metales, sales y trazas de elementos; se utiliza la pérdida gravimétrica por calentamiento. Se pesó 1 g de almidón en un crisol de porcelana previamente lavado, secado y tarado, la muestra se colocó a incinerar en la mufla marca LINDBERG a 550 °C durante tres horas y media, finalizado este tiempo se dejó enfriar en un desecador hasta peso constante y se registraron los pesos (AOAC, 2000).

Cálculos:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

Donde

A= peso del crisol con cenizas (g)

B= peso del crisol vacío (g)

C= peso de la muestra (g)

c) Determinación de proteínas

El cálculo de proteínas se determinó con el método colorimétrico de Bradford 1976, que resulta ser uno de los métodos más sensibles (1-100 μg) y estable hasta 1 hora. Para esta determinación se empleó un colorante cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico origina un color pardo y que al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína origina un color azul intenso el cual puede ser medido con facilidad. Para este estudio se utilizó una disolución de albúmina sérica de bovino, con una concentración de 1 mg/mL. El reactivo de Bradford se preparó con 100 mL de etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) al 95 %, 200 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85 % y 350 mg de reactivo colorante Comassie Blue G-250. El buffer de trabajo de Bradford se elaboró con 425 mL de agua destilada, 15 mL de etanol al 95 %, 30 mL de H_3PO_4 al 85 % y 30 mL solución del reactivo de Bradford.

La curva patrón de BSA se preparó en un rango de 0 hasta 20 μg de la solución de proteína, se adicionó el buffer experimental hasta obtener un volumen final de 100 μL en

cada tubo. Se agregó 1 mL del reactivo de Bradford y se dejó reaccionar 5 minutos para leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. La muestra problema se hizo en una solución al 1 % de almidón, el agua se calentó durante 10 minutos a 55 °C, esto para que se efectuara la solución debido a que el almidón es poco soluble en agua a temperatura ambiente.

d) Determinación de fibra

Esta prueba permitió determinar con relativa facilidad la presencia de pequeñas cantidades de fibra en el almidón. La presencia de cualquier indicio de fibra, u otra impureza son determinadas por medio de una hidrólisis ácida moderada del residuo de la muestra. Se colocaron a hervir 2-3 g de almidón durante una hora, en 100 mL de ácido clorhídrico al 0,4 %, enseguida se filtró el líquido en un crisol filtrante previamente pesado y provisto de papel filtro, se lavó el residuo con agua caliente y se puso a secar a 105-110 °C hasta peso constante (AOAC, 1984).

Cálculos.

$$\%Fibra = \frac{(P2-P1) \times 100}{Pm}$$

Dónde:

P1 = peso de crisol vacío (g).

P2 = peso de crisol vacío con la muestra después del secado (g).

Pm = peso de la muestra analizada (g).

2.2.7. Características de la enzima alfa-amilasa obtenida de *Bacillus licheniformis* aislada de géiseres de Calientes, Candarave-Tacna.

Se utilizó la enzima α -amilasa obtenida de *Bacillus licheniformis*., aislada de géiseres de Calientes-Candarave que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos ramificados, purificada en sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ al 60 %, donado por el Mgr. Castellanos Cabrera del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann así mismo la cepa *Bacillus licheniformis* fue certificada por MACROGEN en el mes de Febrero del 2014.

La enzima donada α -amilasa de *Bacillus licheniformis* presenta una actividad óptima a una temperatura de 50 °C a un pH de 7.

2.2.8. Producción enzimática de glucosa

a) Hidrólisis y licuefacción de Almidón

La hidrólisis de almidón se realizó sobre los sustratos de almidón de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) siguiendo la metodología de Salcedo et al (2009).

En la licuefacción, se utilizó la α -amilasa ya mencionada para la obtención de glucosa del almidón de los diferentes sustratos.

La glucosa producida fue determinada como azúcar reductor y reportado en términos de equivalentes de dextrosa utilizando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), por espacio de 10 minutos durante 1 hora.

b) Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática en el almidón, se empleó el método colorimétrico del DNS (color amarillo) que se basa en la reducción del ácido 3-amino 5-nitrosalicílico. Esta reducción produce una coloración que se hace más intensa (color naranja) a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores; este cambio de color es evidente por medio de la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro en la zona de 540 a 575 nm (Miller, 1959).

Para la preparación de ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS) se depositaron 600 mL de agua en un vaso de precipitado de 1 L y se adicionaron 10 g de hidróxido de sodio (NaOH) disolviéndolo mediante agitación continua en una plancha magnética a temperatura ambiente. Posterior a esto se recubrió el vaso de precipitado con papel aluminio y se agregaron cuidadosamente 10 g de DNS y 0,5 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3). Se completó con agua destilada

a 1 L en un matraz aforado y almacenó en un frasco oscuro.

Para la preparación de los estándares de glucosa y muestra problema, la curva de calibración se elaboró a partir de una solución stock de glucosa al 1 % (10 mg/mL) con la cual se prepararon soluciones a diferentes concentraciones que fueron de 0,2 a 6 mg/mL. Se colocaron tubos de ensayo en una gradilla cubierta con papel aluminio para evitar el paso de la luz, les fueron añadidos 3 mL del DNS previamente preparado y 3 mL de la solución reactiva, seguido a esto se pusieron a las mezclas a baño maría hasta ebullición durante 15 minutos para permitir la reacción. Rápidamente les fueron añadidos 1 mL de tartrato de sodio y potasio 40 % (p/v) a cada tubo para estabilizar el color producido, se colocaron en una charola con agua a temperatura ambiente para enfriarlos y poder leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 575 nm.

El blanco fue preparado con agua destilada y para la muestra problema se hizo una solución de cada uno de los almidones al 1 %.

2.2.9. Determinación de equivalente dextrosa (ED)

Los almidones pueden transformarse en muchos productos mediante la hidrólisis con ácido o enzimas. A los productos finales se asigna un valor describiendo el equivalente de dextrosa (ED) que son los azúcares reductores expresados como dextrosa.

Los productos con valores DE desde 20 hasta 91 por lo regular se denominan Jarabes y de 92 a 99 se llaman 'Azúcares Totales'. El equivalente de dextrosa se estimó mediante la ecuación según Benavides (1983), expresados en la siguiente fórmula

$$DE = (AR / M) * 100$$

Dónde: AR es la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra, expresados como gramos de glucosa y M es el peso de la muestra seca en gramos.

2.2.10. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental se realizó utilizando la metodología de Salcedo et al., (2009). Se hicieron ciertas modificaciones a la metodología con el objeto de economizar material ya que algunos de los materiales se encontraban escasos. Entonces se procedió a adaptar viales de 10 mL en los cuales se depositaron 5 mL de solución de almidón en concentraciones de (1; 1,5; 2; 2,5 y 3 % p/v), se ajustó el pH hasta 7 y se agregó 5 μ l de la enzima α -amilasa obtenida de *Bacillus licheniformis*, aislada de géiseres de Calientes-Candarave al 100 %, purificada en sulfato de amonio al 60 % (donado por el Mgr. Castellanos).

Posteriormente los viales se introdujeron en una estufa a 50 °C, con un tiempo de residencia alrededor de 1 hora durante las cuales se tomaron muestras cada 10 minutos.

III. RESULTADOS

3.1 Obtención de almidón

Los rendimientos obtenidos en la producción de almidón de los diferentes sustratos que fueron materia prima en la hidrólisis enzimática para producción de glucosa se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados de rendimiento de producción de almidón por cada 500 gramos de sustrato.

Sustrato	Almidón(g)	Cascara (g)	Pulpa (g)	Rendimiento (%)
Yuca	147,5	37,5	462,5	29,50
Papa	418,04	80,95	419,05	83,60
Camote	106,09	50	450	21,66
Arracacha	126	21,25	478,75	25,20

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el proceso de extracción del almidón se obtuvo a partir de 500 g de sustrato un promedio de: 145,5 g de almidón de yuca; 418,04 g de almidón de papa; 106,09 g de almidón de camote y 126 g de almidón de arracacha, con un rendimiento para la papa, yuca, arracacha y camote del 83,60; 29,5; 25,20 y 21,66 %

respectivamente, siendo el sustrato de elección la papa (*Solanum tuberosum*) por tener un rendimiento del 83,60 % en la obtención de almidón.

3.2 Caracterización físico-química del almidón

Los resultados obtenidos de la caracterización bromatológica del almidón de los diferentes sustratos que fueron utilizados como materia prima en la hidrólisis enzimática para producción de glucosa se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Resultados de la caracterización fisicoquímica de los sustratos de almidón.

Variables	Sustratos			
	Papa	Camote	Yuca	Arracacha
Humedad (%)	17,2	16,5	15,5	15,9
Proteína (%)	1,850	1,16	0,729	0,603
Grasa (%)	0,028	0,056	0,103	0,018
Ceniza (%)	1,092	0,703	0,740	1,227
Fibra (%)	0,500	0,819	1,028	0,995

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

La tabla 7, muestra los resultados de la caracterización bromatológica correspondiente a humedad, proteína, grasa ceniza y fibra los cuales se encuentran por encima de los parámetros establecidos por el Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC, 1986).

3.3 Producción enzimática de glucosa

3.3.1 Producción enzimática de glucosa a partir de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

La producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) obtenida del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

		Equivalentes dextrosa (ED)					
Concentración de solución de almidón (%)	Repetición	Tiempo (min)					
		10	20	30	40	50	60
1,0	I	1,221	0,920	1,469	1,238	1,398	1,327
	II	1,004	0,495	1,183	1,114	0,646	1,183
	III	1,306	1,273	1,390	1,306	1,557	1,407
1,5	I	0,768	0,717	0,674	1,084	1,075	0,708
	II	0,854	1,367	1,193	1,762	1,542	1,028
	III	3,301	1,383	1,240	1,422	1,788	1,161
2,0	I	1,149	1,370	0,956	1,106	1,506	1,634
	II	1,131	1,032	0,990	1,110	1,272	1,491
	III	1,454	1,515	1,290	1,385	1,653	2,026
2,5	I	0,949	1,012	0,322	0,923	1,079	1,230
	II	0,982	0,884	0,216	0,707	0,859	1,203
	III	1,856	1,501	0,573	1,619	2,429	2,765
3,0	I	1,213	1,092	0,838	0,932	1,693	1,450
	II	2,180	2,150	1,407	1,959	2,402	2,613
	III	2,091	2,156	1,372	1,775	2,570	2,787

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

La tabla 8, muestra los resultados de la producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa correspondiente a la fermentación aeróbica del almidón de papa (*Solanum tuberosum*), a intervalos de tiempo de 10 minutos. En estos tratamientos se observa que los mayores valores de ED se observan en el tratamiento usando 3 % de concentración de sustrato de almidón de papa a diferencia de las demás concentraciones al mismo tiempo.

3.3.2 Análisis de varianza de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

El análisis de varianza de la producción de glucosa obtenida del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 9, así mismo las figuras 5 y 6 muestran la producción de glucosa estimada expresados en equivalentes dextrosa (ED) en relación a la concentración y tiempo.

Tabla 9: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor -P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	3,65427	5	0,730853	3,00	0,0174
B:CONCENTRACION	5,00155	4	1,25039	5,14	0,0013
INTERACCIONES					
AB	4,2168	20	0,21084	0,87	0,6266
RESIDUOS	14,5945	60	0,243242		
TOTAL (CORREGIDO)	27,4671	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el análisis de varianza factorial los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores concentración de sustrato y el tiempo de reacción. Puesto que los valores-P para el tiempo y la concentración (0,0174 y 0,0013 respectivamente) son menores que 0,05; estos factores tienen un efecto estadístico significativo sobre equivalente dextrosa con un 95 % de nivel de confianza, en tanto que la presencia de ambos factores resultó ser no significativo, es decir, que los factores concentración de sustrato y el tiempo de reacción tienen efecto sobre la

producción enzimática de glucosa de manera independiente, expresados en equivalentes dextrosa (ED).

Al resultar significativo el factor concentración en el análisis de varianza factorial se realizó el análisis de varianza de regresión para observar si la relación entre concentración de sustrato y equivalente dextrosa (ED) es significativa y se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,3411	1	2,3411	8,20	0,0052
Residuo	25,126	88	0,285523		
Total (Corr.)	27,4671	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el análisis de varianza de regresión lineal el valor-P es menor que 0,05, por tal existe una relación estadística significativa entre equivalente dextrosa (ED) y concentración con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que existe relación entre la concentración sustrato y equivalentes de dextrosa (ED).

En la tabla 11 se observa la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal que explica el cambio de equivalente dextrosa (ED) en unidades de concentración.

Tabla 11: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,903411	0,168974	5,34644	0,0000
Pendiente	0,228089	0,0796552	2,86345	0,0052

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal el valor de la pendiente es altamente significativa lo que indica que por una unidad de concentración (% p/v), el equivalente dextrosa (ED) va cambiar en 0,228 unidades de concentración.

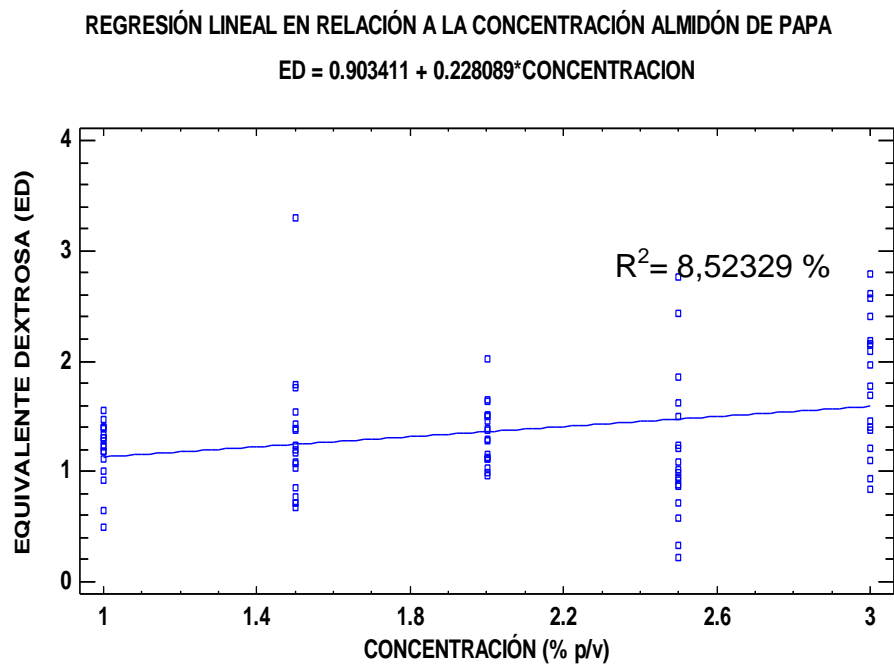


Figura 5: Equivalente dextrosa estimado en relación a la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La figura 5, muestra la producción enzimática de glucosa basada en diferentes concentraciones del almidón (% p/v) de papa, en el cual el equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 0,228 unidades de concentración.

Al resultar significativo el factor tiempo en el análisis de varianza factorial, se realizó el análisis de varianza de regresión lineal para observar si la relación entre el tiempo y equivalente dextrosa (ED) es significativa y se muestra en la tabla 12.

Tabla 12: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,909637	1	0,909637	3,01	0,0860
Residuo	26,5575	88	0,30179		
Total (Corr.)	27,4671	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el análisis de varianza de regresión lineal el valor-P es menor que 0,05, por tal existe una relación estadística significativa entre equivalente dextrosa (ED) y tiempo con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que existe relación entre el tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón de papa y equivalente dextrosa (ED).

En la tabla 13 se observa la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal que explica el cambio de equivalente dextrosa (ED) por unidades de tiempo.

Tabla 13: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis del almidón de papa (*Solanum tuberosum*).

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	1,15356	0,132048	8,73586	0,0000
Pendiente	0,00588667	0,00339069	1,73613	0,0860

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal el valor de la pendiente es significativo lo que indica que el equivalente dextrosa (ED) va cambiar cada 0,006 unidades de tiempo.

REGRESION LINEAL EN RELACIÓN AL TIEMPO DE REACCIÓN EN LA HIDROLISIS DE ALMIDÓN
 $ED = 1.15356 + 0.00588667 \cdot TIEMPO$

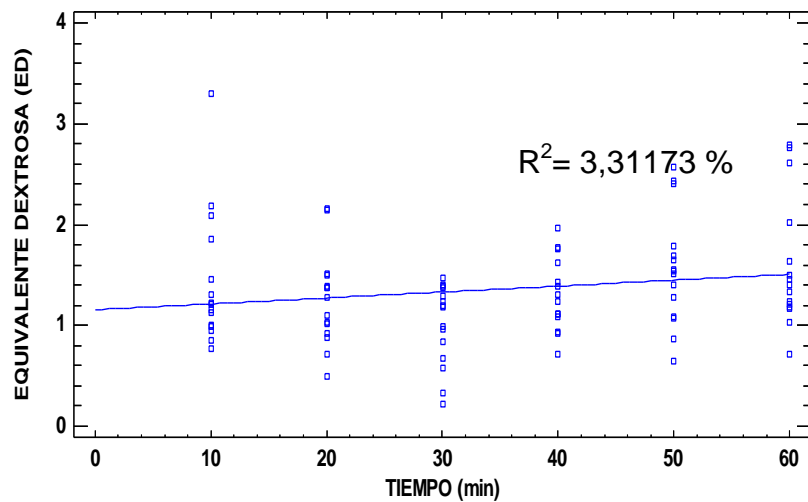


Figura 6: Equivalente dextrosa estimado en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis enzimática de almidón de papa (*Solanum tuberosum*)

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La figura 6, muestra la producción enzimática de glucosa basadas en diferentes espacios de tiempo (minutos), en el que el equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 0,006 unidades de tiempo.

3.3.3 Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta*)

La producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) obtenida del almidón de yuca (*Manihot esculenta*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 14.

Tabla 14: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de yuca (*Manihot esculenta*)

Concentración de solución de almidón (%)	Repetición	Equivalentes dextrosa (ED)					
		Tiempo (min)					
		10	20	30	40	50	60
1	I	2,111	2,518	2,505	1,933	2,352	3,904
	II	1,393	1,171	1,707	1,229	1,243	1,757
	III	2,181	1,756	2,687	2,133	3,029	4,066
1,5	I	1,326	1,161	1,512	1,178	1,512	1,764
	II	4,261	2,751	3,654	2,610	3,457	5,008
	III	1,766	1,278	1,881	1,091	2,304	2,864
2,0	I	1,370	1,758	1,249	1,055	1,800	2,279
	II	1,944	1,663	2,000	1,102	1,825	2,421
	III	1,355	1,557	1,592	0,974	1,663	2,501
2,5	I	1,433	1,564	1,063	1,230	1,415	1,445
	II	1,929	2,203	1,447	1,656	2,034	2,814
	III	1,436	1,365	1,011	1,185	1,622	1,448
3,0	I	0,968	0,916	0,904	0,824	1,084	1,196
	II	1,716	1,801	1,739	1,539	2,370	2,193
	III	1,931	1,914	1,955	1,620	2,192	2,192

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

La tabla 14, muestra los resultados de la producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa correspondiente a la fermentación aeróbica del almidón de yuca (*M. esculenta*) a intervalos de tiempo de 10 minutos.

3.3.4 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de papa (*Manihot esculenta*).

El análisis de varianza de la producción de glucosa obtenida del almidón de Yuca (*Manihot esculenta*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 15, así mismo las figuras 7 y 8 muestran la producción de glucosa estimada expresados en equivalentes dextrosa (ED) en relación concentración y tiempo.

Tabla 15: Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de yuca (*M. esculenta*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	10,2397	5	2,04793	3,86	0,0042
B:CONCENTRACION	8,79445	4	2,19861	4,15	0,0050
INTERACCIONES					
AB	3,8848	20	0,19424	0,37	0,9924
RESIDUOS	31,8106	60	0,530177		
TOTAL (CORREGIDO)	54,7295	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el análisis de varianza factorial los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores concentración de sustrato y el tiempo de reacción. Puesto que los valores-P para el tiempo y la concentración (0,0042 y 0,0050 respectivamente), son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadístico significativo sobre equivalente dextrosa con un 95 % de nivel de confianza, en tanto que la presencia de ambos factores resultó ser no significativo. Es decir que los factores concentración de sustrato y tiempo de reacción tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica

de manera independientemente, expresados en equivalentes dextrosa (ED).

Al resultar significativo el factor concentración en el análisis de varianza factorial se realizó el análisis de varianza de regresión para observar si la relación entre concentración de sustrato y equivalente dextrosa (ED) es significativa y se muestra en la tabla 16.

Tabla 16: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de yuca (*Manihot esculenta*).

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6,54368	1	6,54368	11,95	0,0008
Residuo	48,1858	88	0,547566		
Total (Corr.)	54,7295	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En el análisis de varianza de regresión lineal el valor-P es menor que 0,05, por tal existe una relación estadística altamente significativa entre equivalente dextrosa (ED) y

concentración de sustrato con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que existe relación entre la concentración de sustrato en la hidrólisis de almidón de yuca y el equivalente dextrosa (ED).

En la tabla 17 se observa la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal que explica el cambio de equivalente dextrosa (ED) en unidades de concentración.

Tabla 17: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de yuca (*Manihot esculenta*).

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	2,63506	0,234001	11,2609	0,0000
Pendiente	-0,381333	0,110309	-3,45695	0,0008

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión el valor de la pendiente es significativa lo que indica que el

equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 0,381 unidades de concentración.

REGRESION LINEAL EN RELACIÓN A LA CONCENTRACIÓN EN LA HIDROLISIS DE ALMIDÓN
ED = 2.63506 - 0.381333*CONCENTRACION

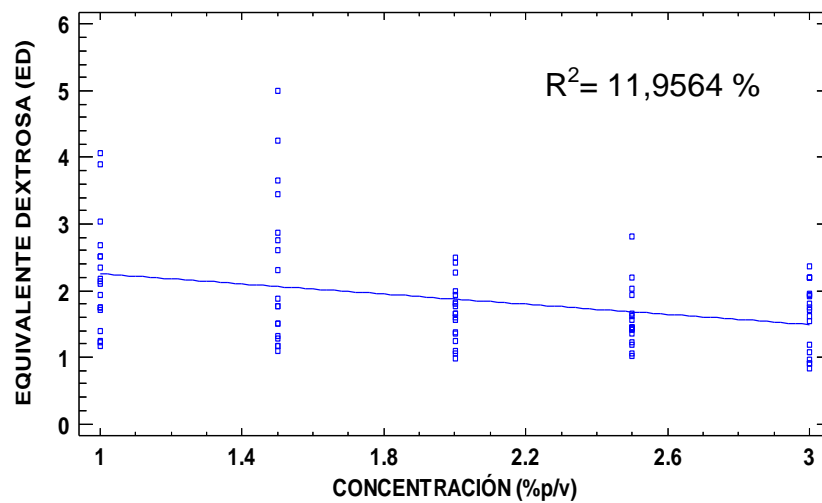


Figura 7: Equivalente dextrosa estimado en relación a la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática de almidón de yuca (*Manihot esculenta*).

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La figura 7, muestra la producción enzimática de glucosa basadas en diferentes concentraciones del almidón (% p/v) de yuca, en el cual el equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 0,381 unidades de concentración.

Al resultar significativo el factor tiempo se realizó el análisis de varianza de regresión lineal para poder observar si la relación entre el tiempo y equivalente dextrosa (ED) es significativa y se muestra en la tabla 18.

Tabla 18: Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón yuca (*Manihot esculenta*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,62455	1	3,62455	6,24	0,0143
Residuo	51,105	88	0,580738		
Total (Corr.)	54,7295	89			

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En análisis de varianza de regresión lineal el valor-P es menor que 0,05, por tal existe una relación estadística significativa entre ED y tiempo con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que existe relación entre el tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón de papa y equivalente dextrosa (ED).

En la tabla 19 se observa la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal que explica el cambio de equivalente dextrosa (ED) en unidades de tiempo.

Tabla 19: Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis de almidón yuca (*Manihot esculenta*).

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	1,46112	0,183177	7,97653	0,0000
Pendiente	0,0117507	0,00470355	2,49826	0,0143

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal el valor de la pendiente es significativa lo que indica que el equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 0,01 unidades de tiempo.

REGRESION LINEAL EN RELACION AL TIEMPO DE REACCIÓN EN LA HIDROLISIS DE ALMIDÓN
ED = 1.46112 + 0.0117507*TIEMPO

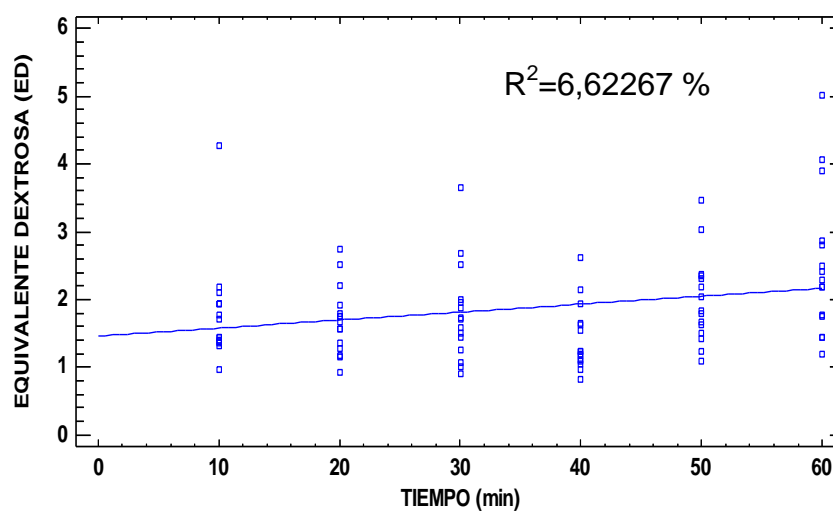


Figura 8: Equivalente dextrosa estimado en relación al tiempo de reacción en la hidrólisis enzimática de almidón de yuca (*Manihot esculenta*).

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La figura 8, muestra la producción enzimática de glucosa basada en diferentes espacios de tiempo (minutos), en el cual el equivalente dextrosa (ED) cambia por cada 0,01 unidades de tiempo.

3.3.5 Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de Camote (*Ipomoea batatas*).

La producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) obtenida del almidón de camote (*Ipomoea batatas*).como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 20.

Tabla 20: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica a partir de almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

Concentración de solución de almidón (%)	Repetición	Equivalentes dextrosa (ED)					
		Tiempo (min)					
		10	20	30	40	50	60
1,0	I	1,372	1,494	2,009	1,471	1,342	1,608
	II	2,331	2,885	2,814	2,430	2,118	2,914
	III	1,133	1,508	1,213	1,247	1,582	1,568
1,5	I	2,262	2,212	1,648	1,527	1,684	1,734
	II	8,755	9,987	7,425	8,431	7,328	5,739
	III	2,736	2,996	2,363	2,261	2,646	1,074
2,0	I	2,249	2,004	2,249	2,431	2,588	3,430
	II	2,032	1,995	2,374	2,612	2,501	4,882
	III	2,083	3,257	3,279	6,446	6,942	12,771
2,5	I	4,252	3,440	2,297	2,688	2,627	2,865
	II	1,349	2,613	2,181	1,461	1,480	1,585
	III	2,375	3,325	2,806	3,624	3,360	4,020
3,0	I	2,748	2,077	1,939	1,458	2,302	3,039
	II	1,875	1,814	2,149	2,093	1,885	2,468
	III	5,604	8,611	10,397	14,143	11,999	18,979

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

La tabla 20, muestra los resultados de la producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa correspondiente a la fermentación aeróbica del almidón de camote (*Ipomoea batatas*) a intervalos de tiempo de 10 minutos. Donde se evidencia que la mayor producción de ED se da en la concentración de 3 % a los 60 minutos en comparación de los demás tratamientos.

3.3.6 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

El análisis de varianza de la producción enzimática de glucosa obtenida del almidón de camote (*Ipomoea batatas*), como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 21 así mismo la figura 9 muestra la producción de glucosa por fermentación aeróbica estimada expresada en equivalentes dextrosa (ED) para diferentes concentraciones iniciales de almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

Tabla 21. Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	25,7387	5	5,14773	0,47	0,8000
B:CONCENTRACION	126,644	4	31,6611	2,87	0,0306
INTERACCIONES					
AB	74,5634	20	3,72817	0,34	0,9955
RESIDUOS	662,708	60	11,0451		
TOTAL (CORREGIDO)	889,654	89			

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza factorial el valor P prueba la significancia estadística del factor concentración. Puesto que este valor-P es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadístico significativo sobre equivalente dextrosa con un 95 % de nivel de confianza, en tanto que el factor tiempo así como la presencia de ambos factores; tiempo de reacción y concentración de sustrato resultaron ser no significativos. Es decir que solo el factor concentración de sustrato tiene efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresada en equivalente dextrosa (ED).

Al resultar significativo el factor concentración se realizó el análisis de varianza de regresión lineal para observar si la relación entre concentración de sustrato y equivalente dextrosa (ED) es significativa y se muestra en la tabla 22.

Tabla 22. Análisis de varianza de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato de almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	56,2488	1	56,2488	5,94	0,0168
Residuo	833,405	88	9,47052		
Total (Corr.)	889,654	89			

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza de regresión lineal el valor-P es menor que 0,05; por tal existe una relación estadística significativa entre ED y concentración con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que existe relación entre la concentración de sustrato en la hidrólisis de almidón de camote y el equivalente dextrosa (ED).

En la tabla 23 se observa la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal que explica el cambio de equivalente dextrosa (ED) en unidades de concentración.

Tabla 23. Prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal para equivalente dextrosa en relación a la concentración de sustrato en la hidrólisis del almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	1,27396	0,973166	1,30908	0,1939
Pendiente	1,11802	0,458755	2,43708	0,0168

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la prueba de hipótesis del coeficiente de regresión lineal el valor de la pendiente es significativa lo que indica que el equivalente dextrosa (ED) va a cambiar por cada 1,118 unidades de concentración.

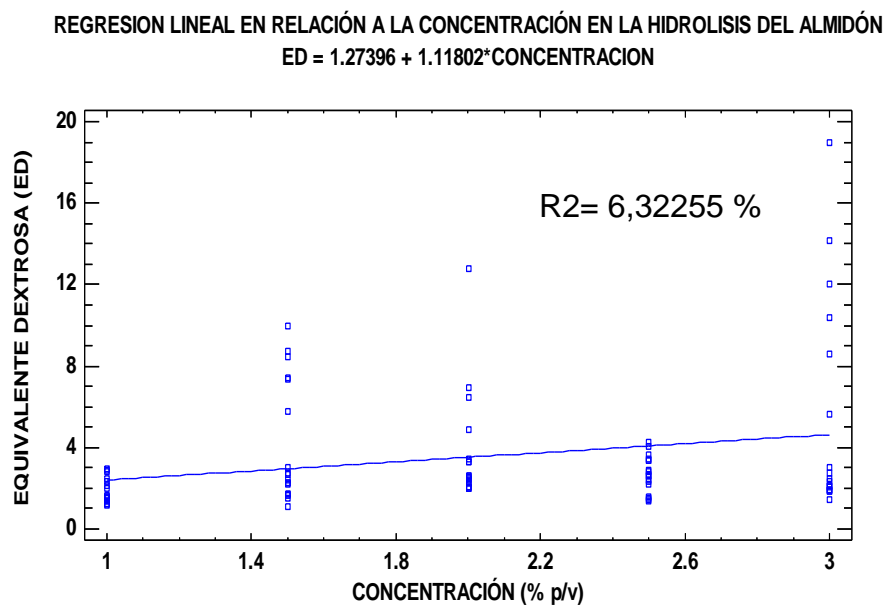


Figura 9: Equivalente dextrosa estimada en relación a la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática de almidón de camote (*Ipomoea batatas*).

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

La figura 9, muestra la producción enzimática de glucosa basada en diferentes concentraciones del almidón (% p/v) de camote, en el cual el equivalente dextrosa (ED) va cambiar por cada 1,118 unidades de concentración.

3.3.7 Producción enzimática de glucosa en equivalente dextrosa por fermentación aeróbica del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).

La producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) obtenida del almidón arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 24.

Tabla 24: Producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de almidón arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).

Concentración de solución de almidón (%)	Repetición	Equivalentes dextrosa (ED)					
		Tiempo (min)					
		10	20	30	40	50	60
1,0	I	0,749	0,763	0,577	0,665	0,732	0,648
	II	2,373	2,352	1,756	1,941	2,208	1,962
	III	3,689	3,590	2,852	3,148	2,689	3,230
1,5	I	3,840	3,621	3,041	3,636	3,401	3,542
	II	2,028	2,132	2,201	2,071	1,984	2,296
	III	1,899	1,776	1,916	2,074	2,021	1,881
2,0	I	1,594	1,934	1,922	2,022	2,148	2,022
	II	2,003	1,984	2,015	1,927	1,744	2,072
	III	1,820	2,415	2,275	2,093	2,289	2,093
2,5	I	1,379	2,255	1,961	1,491	1,582	1,785
	II	2,085	2,444	1,090	1,814	1,503	2,180
	III	2,075	3,012	5,230	2,775	2,811	3,582
3,0	I	1,154	1,767	1,862	0,613	1,221	1,363
	II	1,730	3,907	5,442	3,918	3,850	4,044
	III	4,096	3,876	3,605	2,364	2,739	2,700

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 24, muestra los resultados de la producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa correspondiente a la fermentación aeróbica del almidón de yuca (*A. xanthorrhiza*) a intervalos de tiempo de 10 minutos.

3.3.8 Análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica a partir de almidón de *arracacha* (*Arracacia xanthorrhiza*).

El análisis de varianza de la producción de glucosa obtenida del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Análisis de varianza factorial para equivalente dextrosa de almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	2,13358	5	0,426716	0,37	0,8701
B:CONCENTRACION	8,25777	4	2,06444	1,77	0,1470
INTERACCIONES					
AB	5,10399	20	0,255199	0,22	0,9998
RESIDUOS	70,0363	60	1,16727		
TOTAL (CORREGIDO)	85,5317	89			

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza factorial los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P de los factores concentración de sustrato y tiempo de reacción son menores que 0,05, éstos no tienen ningún efecto estadísticamente significativo sobre equivalente dextrosa con un 95 % de nivel de confianza. Es decir que tanto la concentración de sustrato como el tiempo de reacción no tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa.

3.3.9 Diferencias en producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica de almidón de papa (*S. tuberosum*), camote (*I. batatas*), yuca (*M. esculenta*) y arracacha (*A. xanthorrhiza*) en función al tiempo de reacción.

Las diferencias de producción enzimática de glucosa en ED obtenido de las cuatro especies de tubérculos se ve en la tabla 26.

Tabla 26: Diferencias de producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa (ED) por fermentación aeróbica del almidón de papa, camote, yuca y arracacha en función al tiempo de reacción.

Producción de glucosa (ED)							
Sustrato	Repetición	Tiempo					
		10	20	30	40	50	60
Papa	I	1,060	1,022	0,860	1,057	1,350	1,270
	II	1,230	1,186	1,032	1,330	1,344	1,503
	III	2,002	1,565	1,201	1,501	1,999	2,029
Camote	I	2,577	2,245	2,029	1,915	2,109	2,535
	II	3,268	3,859	3,389	3,405	3,062	3,518
	III	2,786	3,940	4,012	5,544	5,306	7,682
Yuca	I	1,441	1,583	1,446	1,244	1,633	2,118
	II	2,249	1,918	2,109	1,627	2,186	2,839
	III	1,734	1,574	1,825	1,401	2,162	2,614
Arracacha	I	1,743	2,068	1,873	1,685	1,817	1,872
	II	2,044	2,564	2,501	2,334	2,258	2,511
	III	2,716	2,934	3,176	2,491	2,510	2,697

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

La tabla 26, muestra los resultados de diferencia de producción enzimática de glucosa en equivalentes dextrosa correspondiente a la fermentación aeróbica del almidón de papa, camote, yuca y arracacha en función al tiempo de reacción.

3.3.10 Análisis de varianza factorial de la diferencia de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón de papa, camote, yuca y arracacha.

El análisis de varianza de la producción de glucosa obtenida de los diferentes almidones de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), como materia prima en la hidrólisis enzimática se muestra en la tabla 27 así mismo el gráfico 6 muestra la producción de glucosa expresada en equivalentes dextrosa (ED) para diferentes los diferentes sustratos de almidón.

Tabla 27: Análisis de varianza factorial para el equivalente dextrosa de almidón de papa (*S. tuberosum*), camote (*I. batatas*), yuca (*M. esculenta*) y arracacha (*A. xanthorrhiza*).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIPO DE SUSTRATO	45,3678	3	15,1226	19,94	0,0000
B:TIEMPO	4,00367	5	0,800733	1,06	0,3964
INTERACCIONES					
AB	4,30093	15	0,286728	0,38	0,9787
RESIDUOS	36,3984	48	0,7583		
TOTAL (CORREGIDO)	90,0708	71			

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza factorial el valor P prueba la significancia estadística del factor “tipo de sustrato”. Puesto que este valor-P es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadístico significativo sobre equivalente dextrosa con un 95 % de nivel de confianza, en tanto que el factor tiempo así como la presencia de ambos factores;

tiempo de reacción y tipo de sustrato resultaron ser no significativos. Es decir que solo el factor tipo de sustrato tiene efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresada en equivalente dextrosa (ED).

Al resultar significativo el factor tipo de sustrato se realizó la prueba de múltiples rangos para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras en relación al sustrato utilizado. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

En la tabla 28 se observa la comparación de medias para el factor tipo de sustrato por el método Tukey.

Tabla 28. Prueba de múltiples rangos para el equivalente dextrosa de almidón de papa (*S. tuberosum*), camote (*I. batatas*), yuca (*M. esculenta*) y arracacha (*A. xanthorrhiza*).

SUSTRATO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
PAPA	18	1,36339	0,205251	X
YUCA	18	1,87239	0,205251	XX
ARRACACHA	18	2,32189	0,205251	X
CAMOTE	18	3,51006	0,205251	X

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la tabla 28 muestra el procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias en la producción de glucosa expresada en equivalentes dextrosa (ED) son significativamente diferentes de otras. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5 % al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

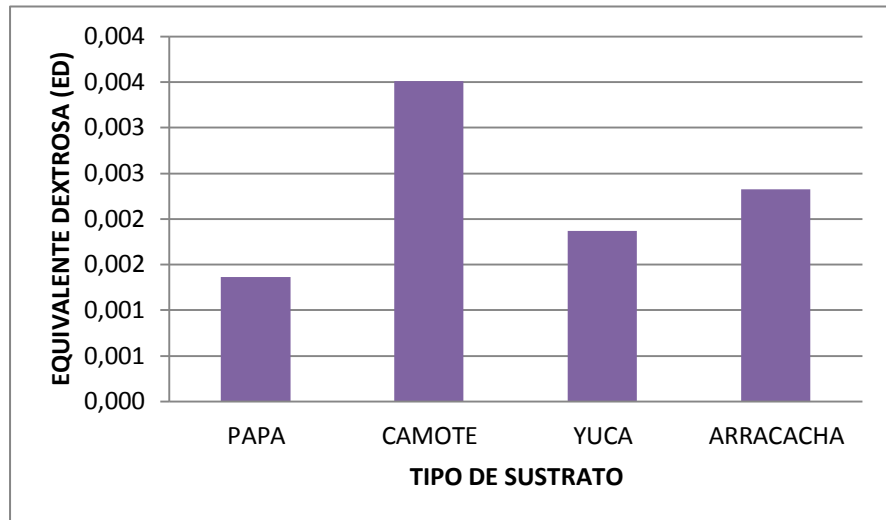


Figura 10: Diferencias de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón a partir de almidones de papa (*S. tuberosum*), camote (*I. batatas*), yuca (*M. esculenta*) y arracacha (*A. xanthorrhiza*).

Fuente. Elaboración propia.

Interpretación

La figura 10, muestra la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica del almidón a partir de almidones de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), en la cual exhibe una mayor producción el sustrato camote, en un tiempo de 60 minutos.

IV.DISCUSIÓN

Los sustratos de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) (Tabla 7) utilizados como materia prima en la hidrólisis enzimática para producción de glucosa, presentaron una humedad por encima de la reportada por el Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC), destacando la humedad de 17,2 % que si bien no afecta directamente el rendimiento del proceso constituye un riesgo en el almacenamiento del almidón, ya que corresponde a una actividad de agua (A_w) propicia para el ataque de microorganismos, que no solo afecta la calidad de este, sino también la calidad del producto final por la acumulación de pirógenos (Farmacopea, 2000). Con respecto al contenido de proteína, cenizas y fibra, también, se encuentran por encima de los parámetros establecidos por el ITINTEC.

En el proceso de extracción del almidón a partir de 500 g de cada sustrato se obtuvo un promedio de: 145,5 g de almidón de yuca; 418,04 g de almidón de papa; 106,09 g de almidón de camote y 126 g de almidón de arracacha, con un rendimiento para la papa, yuca, arracacha y camote

del 83,60; 29,5; 25,20 y 21,66 % respectivamente mostrados en la tabla 6 la cual nos muestra que un sustrato de mejor elección para la obtención de almidón es la papa ya que tiene un mayor rendimiento con 83,60 %. Los valores obtenidos en rendimiento de almidón de los sustratos utilizados en este trabajo a comparación con otros autores, fueron mayores. El rendimiento obtenido en otros tubérculos y cereales por otros autores (Badui., 1993; Corpoica., 2003; Fennema., 1993; Rivier., 2001).

En cuanto al análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica obtenida del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) se encontró que tanto el tiempo como la concentración de sustrato tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa. El ED obtenido en relación a la concentración en la licuefacción del almidón de papa fue mayor para la concentración de 3 % p/v, ya que exhibe el ED estimado más alto. Puesto que aumentaba las unidades de ED por cada 0,228 unidades de concentración. El ED estimado mediante regresión lineal para la concentración al 3 % fue de 1,588 unidades.

Con respecto al equivalente dextrosa (ED) estimado obtenido en relación al tiempo al finalizar la licuefacción, es decir, en el tiempo de 60 minutos el equivalente dextrosa (ED) cambia cada 0,006 unidades de tiempo. El ED estimado fue de 1,507 unidades.

Ambos valores obtenidos de ED estimados en relación a la concentración de sustrato y tiempo de reacción se encuentran en el rango máximo reportado con unidades de 0,9 a 1,5 ED. Considerando además que en la etapa de la licuefacción los valores entre 9 a 15 % de ED se dan cuando se utilizan concentraciones de almidón entre 20 a 35 % (Buchholz & Seibel., 2008; Van der Veen et al., 2006).

Los resultados en cuanto al análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa obtenida del almidón de yuca (*Manihot esculenta*), se encontró que tanto el tiempo como la concentración de sustrato tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa. El ED estimado obtenido en relación a la concentración en la licuefacción del almidón fue mayor para las concentraciones de 1 y 1,5 % p/v, así pues la concentración 1 % p/v es la que exhibe el ED estimado más alto puesto que éste aumentaba por cada 0,381 unidades de concentración. El ED estimado fue de 2,254 unidades de equivalente dextrosa (ED).

Con respecto al equivalente dextrosa (ED) estimado obtenido en relación al tiempo al finalizar la licuefacción (tiempo de 60 minutos) éste aumentaba por cada 0,012 unidades de tiempo. El ED estimado fue de 2,166 unidades. Este resultado es inferior a lo reportado por Salcedo et al (2009) quienes con almidón de yuca (*Manihot esculenta*) reportaron un ED. de 3,170 unidades al utilizar concentraciones de almidón de 1 % p/v.

Los resultados en cuanto al análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa obtenida del almidón de camote (*Ipomoea batatas*), se encontró que solo la concentración de sustrato tiene efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa. El ED obtenido en relación a la concentración en la licuefacción del almidón fue mayor para la concentración de 3 % p/v, así pues esta concentración es la que exhibe el ED estimado más alto puesto que éste aumentaba por cada 1,118 unidades de concentración. El ED estimado fue de 4,628 unidades de equivalente dextrosa (ED). Este resultado es mayor al reportado por las industrias encargadas en procesos de esta naturaleza (GPC, 1996), quienes con almidón de camote reportan un ED. de 1,5 unidades al utilizar concentraciones de almidón de 3 % p/v.

Los resultados en cuanto al análisis de varianza factorial de la producción enzimática de glucosa obtenida del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), se encontró que ninguno de los factores tanto concentración de sustrato como tiempo de reacción tienen efecto sobre la producción enzimática de glucosa expresados en equivalentes dextrosa. Por tal no es posible estimar el equivalente dextrosa (ED) en relación a la concentración de sustrato y el tiempo de reacción en la licuefacción del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) debido a la insuficiencia de tratamientos.

Los resultados obtenidos con el almidón de papa (*Solanum tuberosum*) con un ED de 1,588 y 1,507 unidades en relación a la concentración de sustrato al 3 % y tiempo de reacción a 60 minutos respectivamente, son menores a los obtenidos con yuca (*Manihot esculenta*) con 2,254 y 2,166 en relación a la concentración de sustrato al 1 % y el tiempo de reacción a 60 minutos así mismo con almidón camote (*Ipomoea batatas*) con un ED de 4,628 unidades al 3 % p/v

Por otra parte los valores de equivalente de dextrosa (ED) para el sustrato papa fue superior en la concentración de 3 %; camote de 3 %; yuca de 1 % en un tiempo de 60 minutos respectivamente con respecto a la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) con la cual no se pudo estimar el ED

ya que no hubo respuesta a la concentración de sustrato ni al tiempo de reacción usando la enzima de *Bacillus licheniformis* aislado de los géiseres de Candarave.

En el caso del sustrato yuca en la cual se obtuvo valores mayores de ED estimado en concentraciones de 1 %, esto puede ser debido a que el aumento de la concentración de este tipo de almidón disminuye la actividad de la α -amilasa (Baks et al.2006).

Los resultados con respecto a las diferencias de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica según la prueba de múltiples rangos así como el método empleado para discriminar entre las medias (Método Tukey) de los diferentes almidones de papa (*Solanum tuberosum*), camote (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) indican que hay diferencias en la producción de equivalentes de dextrosa en función del tipo de sustrato utilizado; así, el valor máximo alcanzado fue del sustrato camote en un tiempo de reacción de 60 minutos. Se entiende entonces que el aumento de la concentración de almidón produce un incremento del equivalente dextrosa ED excepto para el almidón de yuca. Se determinó entonces que al utilizar una concentración del 3 % p/v de almidón se obtiene un valor mayor de ED que cuando se utiliza una concentración del 1 % p/v de almidón. Estos resultados permiten

confirmar una mayor producción de ED por parte de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislada de los géiseres de Candarave sobre el almidón.

El hecho de que se observe un claro descenso en los valores de ED para concentraciones de almidón superiores al 2 % p/v de almidón yuca (*Manihot esculenta*) podría asociarse con algún tipo de inhibición de la enzima por parte del sustrato, o con el efecto de la concentración del sustrato sobre el fluido dinámico del sistema, puesto que un alto contenido de almidón puede aumentar la viscosidad del medio restringiendo las posibilidades de la interacción enzima-sustrato.

En tal sentido los resultados muestran que el sustrato de camote es el que tuvo la mejor producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica en comparación con los demás sustratos de almidón.

V. CONCLUSIONES

1. La producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica está determinada por la concentración de sustrato así como por los diferentes sustratos utilizados; obteniéndose la mayor para concentraciones al 3 % p/v de almidón de camote (*Ipomoea batatas*) con 4,628 ED y la menor al 1 % p/v de papa (*Solanum tuberosum*) con 1,132 ED.
2. Se determinó la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica expresado en equivalentes dextrosa (ED) estimado, a partir de almidón de papa (*Solanum tuberosum*), usando la amilasa de *B. licheniformis*, obteniéndose el mayor valor de ED en relación a la concentración de sustrato de 3 % p/v 1,588.
3. Se determinó la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica expresado en equivalentes dextrosa (ED) estimado, a partir de almidón de camote (*Ipomoea batatas*), usando la amilasa de *B. licheniformis*, obteniéndose el mayor valor de ED en relación a la concentración de sustrato de 3 % p/v 4,628.

4. Se determinó la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica expresado en equivalentes dextrosa (ED) estimado, a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) usando la amilasa de *B. licheniformis*, obteniéndose el mayor valor de ED en relación a la concentración de 1 % p/v 2,254.

5. Con almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), la producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica expresado en equivalentes dextrosa (ED) no tuvo respuesta a la concentración ni al tiempo al de reacción usando la amilasa de *B. licheniformis* debido a la insuficiencia de tratamientos.

6. Se determinó en los sustratos diferencias de producción enzimática de glucosa por fermentación aeróbica expresado en equivalentes dextrosa (ED); obteniéndose los mayores valores de ED en el sustrato camote seguido de arracacha, yuca y papa respectivamente en un tiempo de reacción de 60 minutos, indicando que el tipo de sustrato utilizado afecta de forma significativa la producción enzimática de glucosa debido a las características que el tipo almidón confiere durante la hidrólisis.

VI. RECOMENDACIONES

1. Es necesaria más investigación sobre el procesamiento del almidón para realizar la hidrólisis de los mismos para la producción enzimática de glucosa, otros intervalos de tiempos y concentraciones.
2. La extracción de almidón debe llevar algún método de purificación para eliminar los sedimentos y reducir las complicaciones en el proceso de hidrólisis.
3. Como los productos obtenidos se pueden considerar como jarabes intermedios de diferente composición ricos en oligosacáridos de cadenas lineales cortas o maltodextrinas es necesario saber si pueden ser más adelante, convertidos por enzimas específicas a otros productos como jarabes ricos en maltosa, jarabes de alto contenido de azúcares fermentables, entre otros.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, G. A.; Gallardo, A.; San Román, J.; Olivera, E. R.; Jodra, R.; García, B.; Minambres, B.; García, J. L.; Luengo, J. M. (2001). Microbial synthesis of poly (β -hydroxyalkanoates) bearing phenyl groups from *Pseudomonas putida*: chemical structure and characterization. *Biomacromolecules*, 2, 562-567.
- Absar, N., Zaidul, I. S., Takigawa, S., Hashimoto, N., Yamauchi, H., & Noda, T. (2009). Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. *Food Chemistry*, 112, 57-62.
- Adinarayana, K., & Suren, S. (2006). Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus sp.* AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1399-1404.
- Antonio, E. C., Bello P., L. A., Martínez S., C. E., Montañez S., J. L., Jiménez, H. J., & Vivar V., M. A. (2009). Producción enzimática de maltodextrinas a partir de almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). Enzymatic production of maltodextrins from taro (*Colocasia esculenta*) starch. *CyTA-Journal of Food*, 7(3), 233-241.
- AOAC. (1984). Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists . Association of Official Agricultural Chemists.EUA.Washington,DC.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists Washington,DC.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis . Association of Official Agricultural Chemists.EUA.

- Asgher, M., Javaid, M., Rahman, S. U., & Legge, R. L. (2006). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of food Engineering*, 950.
- Asquiere, E. R. (1990). Efeitos da fermentação nas características da fécula de mandioca (*Manihot sculenta*, Crantz) de três cultivares colhidas em diferentes épocas. Brasil: Lavras.
- Atkinson, B., & Mavituna, F. (1991). *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. New York, USA: 2a Edition.
- Badui, D. S. (1993). *Química de alimentos*. Mexico: 3th Ed.
- Badui, S. D. (2001). *Química de los alimentos*. D.F., Mexico: Pearson Education.
- Baks, T., Janssen, A., & Boom, R. M. (2006). The effect of carbohydrates on alpha amylase activity measurements. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 114-119.
- Bello, L. A., Sánchez H, H. L., Moreno D., D. E., & Toro V., V. F. (2002). Laboratory scale production of maltodextrins and glucose syrup from banana starch. *Acta Científica Venezolana*, 53, 44–48.
- Bello P, L. A., Agama, A. E., Sáyago A, S. G., Figueroa J, D. C., & Moreno , D. E. (2000). Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero. Mexico.

- Benavides, M., & Cabrera, J. A. (1983). Bases técnicas para el desarrollo de alimentos de baja viscosidad usando harina de arroz modificado con enzimas. *Tecnología. Instituto de Investigaciones Tecnológicas*, 146(24), 5-12.
- Benjumea R., M., & Correa G., I. (2008). *Edulcorantes*. Universidad de Caldas.
- Beynum G., M. A., & Roels, J. A. (1985). *Starch conversion technology*. Nueva York, Estados Unidos: Ed. MarcelDekker.
- Biliaderis, C. G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Phisiology and Pharmacology*, 69, 60-63.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochesmistry*, 72, 248-254.
- Buchholz, K., & Seibel, J. (2008). *Industrial carbohydrate biotransformations*. *Carbohydrate Research*, 343, 1966-1979.
- Cabra, J., & Sánchez, M. (1997). *Biotecnología para el desarrollo en Colombia (Vol. 6)*. Colombia: Innovacion y ciencia.
- Camargo, C., Colonna, P., Buleon, L., & Molard D, R. (Marzo de 1988). Funcional properties of sour cassava (*Manihot utilissima*) starch: polvilho azedo. (O. Mead, Ed.) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45(3), 273-289.
- Campbell, S. L. (2007). The continuous brewing of beer. Recuperado el 22 de Junio de 2014, de www.revistavirtualpro.com.

- Cárdenas, O. S., & Buckle, T. S. (1980). Sour cassava starch production: a preliminary study. *Journal of Food Science*, 45(6), 1509-1512.
- Carrera, J. (2003). Producción y aplicación de las enzimas industriales. *Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola*. Universidad Nacional de Salta. ISBN, 987-9381-16-5.
- Carver, G. W. (1937). How the farmer can save his sweet potatoes. En T. I. Alabama.. Cuarta Edición. Obtenido de Tuskegee Institute Press. Alabama: Disponible en la web [www.aggie-horticulture.tamu.edu/plantanswers/recipes/sweetpotatoes.html]
- Castañe, F. X., & Damm, S. A. (2007). Los tanques cilindro conicos y el tiempo de guarda de la cerveza. *Industria cervecera*. Recuperado el 15 de Junio de 2014, de www.revistavirtualpro.com.
- Cereda, M. P. (1983a). Avaliação da qualidade de duas amostras de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). I - Características viscosográficas e absorção de água. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia*, 17(3), 305-320.
- Cereda, M. P. (1985). Avaliação da qualidade da fécula fermentada comercial de mandioca (polvilho azedo). I - Características viscosográficas e absorção de água. *Revista Brasileira de mandioca*, 8(2), 7-13.
- Cereda, M., & Gíaj-Levra, L. (junio de 1987). Constatación de bacterias no simbióticas fijadoras de nitrogeno en fermentación natural de almidón. *Revista Brasileira de Almidón*, 6(1), 29-33.

- Cheetham, P. (1991). Aplicación de las enzimas en la industria. En A. Wiseman, Manual de de biotecnología de enzimas (págs. 319-322 ;325-330). Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- Corpoica. (2003). Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios, con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Discorea sp.*). Corpoica, Pronata, Tibaitata: Informe Técnico Final.
- Cruz R., K. A. (2012). Modelado del procesamiento de hidrolisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas. Escuela de Procesos y Energía.
- Damodara, R. M., Ratnam B., V. V., Purnima, C., & Ayyanna, C. (2005). Affinity chromatography of alpha amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 712-717.
- DEIA. (2010). Diccionario de Especialidades de la Industria Alimentaria. (Vigésima, Ed.)
- Delgado, R., Castro , A. J., & Vázquez , M. (2009). A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). *LWT - Food Science and Technology*, 42, 797-804.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-aoulmi, Z., & Meraihi Z, B. L. (2005). Application of a statistical too the optimization of culture medium for α -amylase production bye *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste power. *Journal of food Engineering*, 191.

- FAO. (2001). when people live with hunger. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farmacopea. (2000). USP , 25.
- Fennema, O. R. (1993). Química de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Fogarty, W. M., & Benson, C. P. (1983). Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 18, 271-278.
- Freedberg, I. M., Levin, Y., Cyril M., K., Mccubbin, W. D., & Katchalski-Katzir, E. (1975). Purification And Characterization Of *Aspergillus niger* Exo-1,4-Glucosidase. Biochimica et Biophysica Acta, 391, 361—381.
- Gacesa, P., & Hubble, J. (1990). Tecnología de las enzimas. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., Buléon, A., & Pérez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. Eur J. Clin. Nutr, 46, 3-16.
- García, M. A., Martino , M. N., & Zaritzky , N. E. (2000b). Microstructural characterization of plasticized starch-based films. 52(4), 118-124.
- GPC. (1996). Grain processing corporation. Maltrin. Maltodextrins and corn syrups solids. Muscatine . Iowa. USA.
- Guerra , R. E., Portilla R., O. M., Ramírez , A. J., & Vázquez , M. (2012). Modelling of the acid hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*) for fermentative purposes. Biomass and Bioenergy, 42, 59-68.

- Guzmán, M. H., & Paredes, L. O. (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(5), 373-403.
- Halley, P., Rutgers, R., Coombs, S., Kettels, J., Gralton, J., Christie, G., . . . Lonergan, G. (2001). Developing biodegradable mulch films from starch-based polymers. 53, 362-367.
- Hsu, S., Lu, S., & Huang, C. (2000). Viscoelastic changes of rice starch suspensions during gelatinization. *Journal of Food Science*, 65(2), 215-220.
- ITINTEC. (1986). Harina de trigo para consumo domestico y uso industrial. *Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC)* 205.27.
- IUBMB. (2008). Enzyme Nomenclature.
- Janecek, S., & Balaz, S. (1992). A-Amilases and approaches leading to their enhanced. *Federation of European Biochemical Societies*, 304(1), 1-3.
- Jiménez, H. J., Salazar, M. J., & Ramos, R. E. (2007). Physical chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison with potato and maize starches. *Carbohydrate Polymer*. 68, 279-286.
- Jing, Y., Jiayi, J., Wangming, J., Yuyang, L., & Jianpin, L. (2011). Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol. Lett.*, 33, 147-152.

- Khatoon, S., Sreerama, Y. N., Raghavendra, D., Bhattacharya, S., & Bhat, K. K. (2009). Properties of enzyme modified corn, rice and tapioca starches. *Food Research International*, 42, 1426-1433.
- Kim, C., Choi, H., & Lee, D. (1993). Purification and biochemical properties of an alkaline pullulanase from alkalophilic *Bacillus sp.* S-1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57(10), 1632-7.
- Krochta, J. M., & De Mulder, J. C. (1997). Edible and biodegradable polymer films. *Food Technology*, 51(2), 61-72.
- Lauro, M., Poutanen, K., & Forsell, P. (2000). Effect of partial gelatinization and lipid addition on alpha-amylase of barley starch granules. *Cereal Chemistry*, 77, 595-601.
- Lumdubwong, N., & Seib, A. P. (2001). Low- and Medium-DE Maltodextrins From Waxy Wheat Starch: Preparation and Properties. *Starch/Stärke*, 53, 605–615.
- Madhusudhan, B., & Tharanathan, R. N. (1995). Legume and cereal starches why differences in digestibility *Carbohydr. En Polym.*
- McPherson, A. E., & Seib, P. A. (1997). Preparation and properties of wheat and corn starch maltodextrins with a low dextrose equivalent. *Cereal Chemistry*, 74, 424-430.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem*, 31(3), 426-428.
- Moorthy, S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. 54, 559-592.

- Mouranche, A. (1985). Mode d' action des hydrolases. En A. Mouranche, & C. Costes, Hydrolases et depolymerases. Enzymes of interetindustriel (págs. 13-45). Paris: Gauthier-Villars-Bordas.
- Mundo alimentario. (2008). Recuperado el 20 de junio de 2014, de Aplicación de las enzimas en la producción industrial: http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MA002_enzimas4WSF.pdf
- Nahas, E., & Waldemarin, M. M. (2002). Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. Revista latinoamericana de microbiología(1), 5.
- Nakamura, N., Watanabe, K., & Horikoshi, K. (1976). Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *Bacillus*. (Lavras, Ed.) Biochem Biophys Acta, 1, 188-193.
- Oliveira, J. R., Vieira, A., Zaczuk B, P., Cordenunsi, B., Mainardi, J. A., Purgatto, E., & Lajolo, F. (2005). β -amylase expression and starch degradation during banana ripening. Posthaverst Biology and Technology, 41.
- Olusanjo A, I., Ngachi A, E., & Ihuoma O, F. (2006). Comparative studies on α -amylases from malted maize (*Zea mays*), millet (*Eleusine coracana*) and Sorghum. Carbohydrates Polymers, 72.
- Pandey, A., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation. Process Biochem, 35, 1153-1169.
- Paszczvdski., A., Miedziak,, I., & Tobarzewski, J. (1982). . A simple method of affinity chromatography for the purification of glucoamylase obtained from *Aspergilhs niger* C. 1(149).

- Planchot, V., Colonna, P., Gallant, D. J., & Bouchet, B. (1995). Extensive degradation of native starch granules by β -amylase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Cereal Sci*, 21, 163-171.
- Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2007). α -amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 2.
- Rindlav-Westling, A., & Gatenholm, P. (2003). Surface composition and morphology of starch, amylose and amylopectin films. *Biomacromolecules*(4), 166-172.
- Rivier, M. (2001). Almidón agrio de yuca en Colombia (Vol. 2). Cali, Colombia: CIAT - CIRAD - CETEC.
- Rocha G., G. M., Rodríguez, L. C., & Amante, E. R. (2005). Cassava and corn starch in maltodextrin production. *Química Nova*, 28(4), 596-600.
- Rodríguez, G. (2003). Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Discorea spp.*). Corpoica, Tabaitata, Colombia.
- Salas H., M., Rodríguez R., M., Pérez G., M., & Pérez R., R. (2005). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of food Engineering*, 94.
- Salcedo, J., Montes, E., & Zapata, J. (2009). Producción de jarabes de fructosa por medio de la hidrólisis enzimática del almidón de ñame. *19;17(3)*, 243-251.

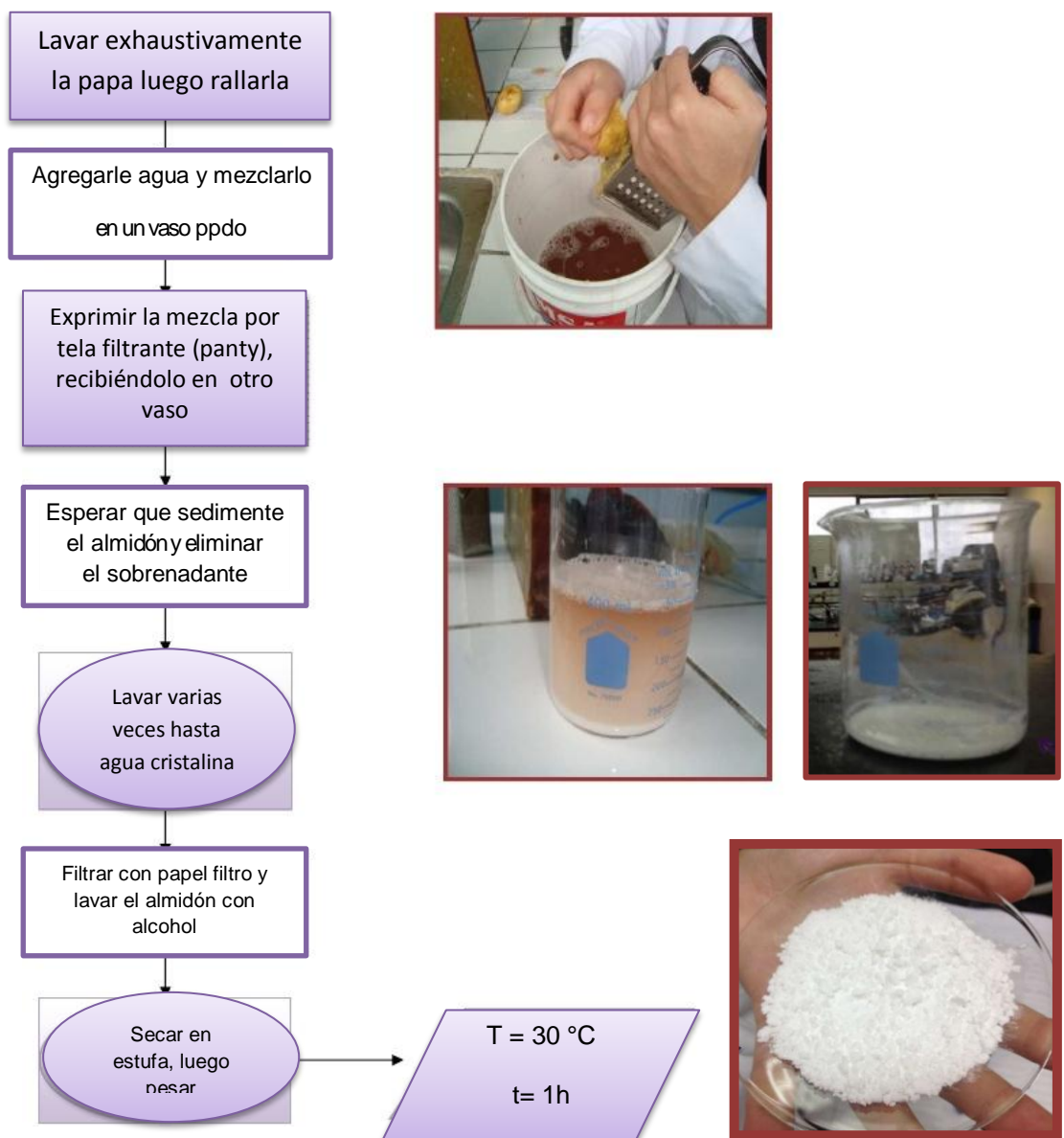
- Sebnem, H., & Shintaro, F. (2001). Chromatographic separation of amyloglucosidase from the mixtures of enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 257-267.
- Shahidi, F., & Vidana J, K. A. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Food Science y Technology*(10), 37-51.
- Shamekh, S., Myllarinen, O., Poutanen , K., & Forssell , P. (2002). Film formation properties of potato starch hydrolysates. 54, 20-24.
- Shamekh, S., Myllarinen, O., Poutanen, K., & Forssell , P. (2002). Film formation properties of potato starch hydrolysates. *Starch*.
- Shaw, N. B., Monahan, F. J., O`Riordan, E. D., & O`Sullivan, M. (2002). Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol or sorbitol. *Journal of Food Science*, 67(1), 164-167.
- Sivack, M., & Preiss , J. (1998). *Starch. Basic science to biotechnology*. In: *Advances in*. New Yorck: Academic press.
- Suckling, C. (1990). Impact and applications. (2, Ed.) *Enzyme Chemistry*, (310-312);(315-318).
- Surmely, R. (1996). Determinación de parámetros experimentales para la conversión enzimática rápida de féculas de mandioca en xirope de maltosa de bajo costo con un perfil adecuado para cervecería. Botacatu: Centro de raíces y almidones tropicales, Universidad Estadual Paulista.
- Sutthirak, P., Dharmsthiti, S., & Lertsiri, S. (2005). Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40, 2821–2826.

- Swinkels J., J. M. (1985). Sources of starch, its chemistry and physic. Vanbeynum,G.M.A., Roels,J.A. Starch,sources,its chemistry and physic, 15-46.
- Tester, F. R., & Karkalas , J. (2001). The effects of environmental conditions on structural features and physico-chemical properties of starches. 53, 513-519.
- Thiebault, J. F., & Colonna, P. (1988). Propriétés fontionnelles: pectines et amidon, dans Propriétés fontionnelles des macromoléculas alimentaires. Lescahiers del ENSBANA, 157-171.
- Tripathi, P., Leggio, L., Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., & Kayastha, A. (2007). Alpha-amylase of mung bean (*Vigna radiata*) correlation of biochemical properties and terciary structure by homology modelling. Phytochemistry, 1623.
- Van der Veen, M. E., Veelaert, S., Van der Goot, A. J., & Boom, R. M. (2006). Starch hydrolysis under low water conditions: a conceptual process design. Journal of Food Engineering, 75, 178-186.
- Van Der, M., & Marc J., E. C. (2002). Properties and applications of starchconverting enzymes of the alpha amylase family. Journal of biotechnology, 94, 137-155.
- Viara N., I., Dobрева, E. P., & Emanuilova, E. I. (1993). Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. Journal of Biotechnology, 28, 277-289.
- Wang, Y., & Wang, L. (2000). Structures and properties of commercial maltodextrinas from corn, potato y rice starches. Starch, 52, 296-304.

- Wang, Y., & Wang, L. (2001). Structures and physicochemical properties of acid Thinned corn, potato and rice starches. *Starch*, 53, 570-576.
- Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Paschall, E. F. (1984). *Starch chemistry y technology*. Nueva York, Estados Unidos: 2a Ed. Academic Press.
- Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food science*. Nueva York, USA: 2a Edition Marcel Dekker.
- Wiseman, A. (1985). *Manual de biotecnología de las enzimas*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Wiseman, A. (1991). *Biotecnología de las enzimas*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Zoe K., M. (2005). Coproduction of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 150.

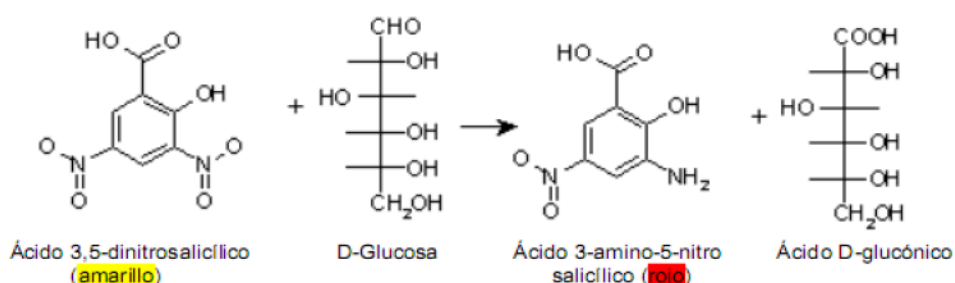
VIII. ANEXOS

Anexo 1: Obtención de almidón



Anexo 2: Determinación de azúcares reductores por método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores la cual se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia a 540 nm conllevando a la aplicación de la Ley de Beer_Lambert.



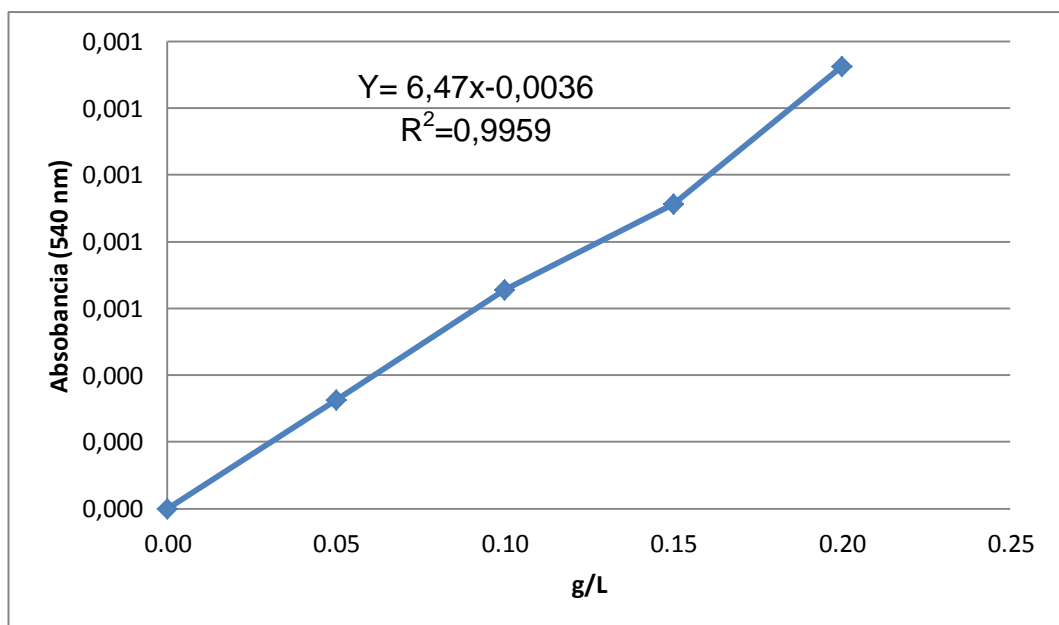
Preparación de 250ml del reactivo DNS al 1 %

Mezclar 4,0 g de NaOH con 75 g de tartrato de sodio y potasio, en un recipiente protegido de la luz con papel aluminio, calentar y agitar adicionando lentamente 2,5 g del ácido 3,5-dinitrosalicílico; tapar dejar enfriar y aforar a 250 mL con agua destilada. Posteriormente se guarda

almacena en un frasco ámbar, cubierto con papel aluminio, para evitar posteriores reacciones secundarias.

- **ELABORACION DE CURVA PATRON DNS**

Componentes	Tubos				
	1	2	3	4	5
Glucosa (µl)	0,00	2,50	5,00	7,50	10,00
H2O (µl)	500,00	497,50	495,00	492,50	490,00
DNS (µl)	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
ABS	0,00	0,35	0,78	0,92	1,31
g/L	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20





ARIADNA ZATYURI ZÚÑIGA LLANOS
TESISTA



Mgr. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA
ASESOR