

**DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN  
PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE YUCA  
NATIVA DE LA REGIÓN AMAZÓNICA EN LA CIUDAD DE LETICIA**

**WILHER ANDRÉS VILLADA PINILLA**  
**Ingeniero Químico**

**Universidad Nacional de Colombia**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Departamento de Ingeniería Química**  
**Bogotá D.C.**  
**2010**

**DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN  
PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE YUCA  
NATIVA DE LA REGIÓN AMAZÓNICA EN LA CIUDAD DE LETICIA**

**WILHER ANDRÉS VILLADA PINILLA**  
**Ingeniero Químico**

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en  
Ingeniería Química**

**Directores:**

**Juan Carlos Serrato B.**  
**Marcela Piedad Carrillo**

**Ingeniero Químico *M.Sc., D. Sc.***  
**Ingeniero Químico *M.Sc.***

**Universidad Nacional de Colombia**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Departamento de Ingeniería Química**  
**Bogotá D.C. 2010**

---

---

---

---

---

---

---

---

JURADO 1

---

JURADO 2

---

DIRECTOR

BOGOTÁ D.C., 2010

*Esta tesis está dedicada a la mujer que ha caminado junto a mí durante 8 años de mi vida mostrándome la belleza de la vida, la persistencia de las creencias, la firmeza en las ideas, la lealtad en los momentos difíciles, la imaginación frente a los retos, la fortaleza en las dudas, la inteligencia para la vida y el amor sin fronteras.*

**A: MARBY ROCÍO BARÓN NÚÑEZ**

## TABLA DE CONTENIDO.

<b>1</b>	<b>RESUMEN.</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>10</b>
2.1	OBJETIVO GENERAL:	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	10
2.3	HIPÓTESIS.	10
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>11</b>
3.1	ESTADO DEL ARTE.	13
<b>4</b>	<b>MARCO TEÓRICO.</b>	<b>14</b>
4.1	LA YUCA.	14
4.2	LA YUCA AMAZÓNICA.	14
4.3	CARACTERÍSTICAS DE LA YUCA.	15
4.4	EL ALMIDÓN DE YUCA.	16
4.5	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA.	18
4.5.1	<i>La hidrólisis.</i>	18
4.5.2	<i>Catalizadores utilizados para la reacción de hidrólisis del polisacárido de almidón.</i>	19
4.5.3	<i>Amilasas.</i>	20
4.5.4	<i><math>\alpha</math> amilasas.</i>	22
4.5.5	<i>Glucoamilasas.</i>	23
4.6	METODOLOGÍAS DE REACCIÓN EN EL USO DE LAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS.	23
4.6.1	<i>INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.</i>	24
4.7	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.	26
4.7.1	<i>Inmovilización por Adsorción.</i>	27
4.7.2	<i>Inmovilización por enlaces covalentes.</i>	29
4.7.3	<i>Encapsulamiento de enzimas.</i>	30
4.7.4	<i>Atrapamiento.</i>	31
4.8	REQUERIMIENTOS DEL SOPORTE EN EL MÉTODO DE ATRAPAMIENTO.	32
4.8.1	<i>Efectos del atrapamiento de la enzima.</i>	33
4.8.2	<i>La pérdida o retención de actividad.</i>	34
4.8.3	<i>Estabilidad.</i>	34
4.8.4	<i>Selectividad.</i>	35
4.9	PREPARACIÓN DEL MÉTODOS FÍSICOS DE ATRAPAMIENTO.	35
4.10	AZÚCARES OBTENIDOS DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA (CARBOHIDRATOS O AZÚCARES FERMENTABLES).	36
4.10.1	<i>Los monosacáridos.</i>	37
4.10.2	<i>Los disacáridos.</i>	38
4.10.3	<i>Los oligosacaridos.</i>	40
4.11	FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD CATALITICA.	40
4.11.1	<i>Temperatura.</i>	40
4.11.2	<i>pH.</i>	40

4.11.3	<i>Activación de proteínas cofactores</i> .....	41
4.11.4	<i>Inhibición (Aehle 2004)</i> .....	42
4.11.5	<i>Concentración de sustrato</i> .....	42
4.11.6	<i>Materiales porosos (Material zeolítico)</i> .....	42
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIEDADES DE YUCA AMAZÓNICA Y SU ALMIDÓN. ....	45
5.1.1	<i>Materia prima</i> .....	46
5.1.2	<i>Preparación de muestras</i> .....	46
5.2	ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LA PULPA.....	46
5.2.1	<i>Sólidos totales</i> .....	46
5.2.2	<i>Cenizas</i> . ....	46
5.2.3	<i>Almidón total por HPLC</i> . ....	47
5.2.4	<i>Almidón libre</i> . ....	47
5.3	ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE EL ALMIDÓN. ....	50
5.3.1	<i>Temperatura de gelatinización</i> .....	50
5.3.2	<i>Índice de absorción en agua, índice de solubilidad y poder de hinchamiento</i> . 50	
5.3.3	<i>Contenido de amilosa</i> . ....	50
5.3.4	<i>Susceptibilidad a la hidrólisis</i> . ....	50
5.3.5	<i>Contenido de proteína</i> . ....	51
5.4	CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES PROMISORIAS PARA SU TRANSFORMACIÓN EN AZÚCARES FERMENTABLES. ....	51
5.5	SELECCIÓN DE LA ENZIMA AMIOLÍTICA.....	52
5.5.1	<i>Determinación de la Actividad Enzimática</i> . ....	53
5.5.2	<i>Selección del tiempo de reacción</i> . ....	54
5.5.3	<i>Selección del proceso de hidrólisis enzimático</i> . ....	54
5.6	IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN.....	54
5.7	SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN. ....	55
5.7.1	<i>Metodología de inmovilización, biocatalizador de tipo coraza núcleo</i> .....	56
5.7.2	<i>Características del sistema de inmovilización para enzimas de tipo coraza núcleo de alginato de calcio AZE</i> .....	57
5.7.3	<i>Determinación de la Actividad Enzimática</i> . ....	59
5.8	SELECCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS PARA LA IMPLEMENTACIÓN EN LA REGIÓN AMAZÓNICA.....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
6.1	CARACTERIZACIÓN DE YUCA Y DEL ALMIDÓN AMAZÓNICO.....	62
6.1.1	<i>Materia prima</i> .....	62
6.2	CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA.....	63
6.2.1	<i>Sólidos totales o materia seca</i> . ....	63
6.2.2	<i>Cenizas</i> . ....	64
6.2.3	<i>Almidón total por HPLC</i> . ....	64
6.2.4	<i>Almidón libre</i> . ....	65
6.3	CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	66
6.3.1	<i>Temperatura de gelatinización</i> .....	66

6.3.2	<i>Índice de absorción en agua, índice de solubilidad y poder de hinchamiento.</i>	67
6.3.3	<i>Relación de amilosa/amilopectina.</i>	68
6.3.4	<i>Susceptibilidad a la hidrólisis.</i>	69
6.3.5	<i>Contenido de proteína.</i>	70
6.4	<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES PROMISORIAS PARA SU TRANSFORMACIÓN EN AZÚCARES FERMENTABLES.</b>	71
6.4.1	<i>Correlación entre factores de selección.</i>	73
6.4.2	<i>Análisis de ponderación por comparación múltiple.</i>	73
6.5	<b>SELECCIÓN DE LA ENZIMA AMIOLÍTICA.</b>	74
6.5.1	<i>Actividad enzimática.</i>	74
6.5.2	<i>Selección del tiempo de proceso con las enzimas en estado libre.</i>	77
6.6	<b>COMPARACIÓN CINÉTICA ENTRE ENZIMAS.</b>	78
6.7	<b>IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN.</b>	79
6.8	<b>SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN.</b>	81
6.8.1	<i>Inmovilización de tipo coraza núcleo de alginato de calcio AZE.</i>	81
6.8.2	<i>Cálculo de la actividad enzimática del biocatalizador y determinación del contenido de material poroso (material zeolítico) en alginato para la hidrólisis enzimática de almidón de yuca.</i>	81
6.9	<b>SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE YUCA NATIVO DE LA REGIÓN AMAZÓNICA COLOMBIANA.</b>	84
6.9.1	<i>Reacción de hidrólisis en estado libre.</i>	84
6.9.2	<i>Reacción de hidrólisis con el biocatalizador inmovilizado de tipo coraza núcleo 90</i>	
6.10	<b>COMPARACIÓN ENTRE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA DE TIPO CORZA/NÚCLEO DE LA HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE LAS VARIEDADES AMAZÓNICAS.</b>	94
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>LISTA DE ECUACIONES.</b>	<b>110</b>
<b>11</b>	<b>LISTA DE FIGURAS.</b>	<b>110</b>
<b>12</b>	<b>LISTA DE TABLAS.</b>	<b>113</b>
<b>13</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>114</b>

## 1 RESUMEN.

La amazonia colombiana cuenta con una amplia oferta de variedades de yuca que representan posibles alternativas industriales para la producción de azúcares fermentables y a partir de ellos obtener productos de mayor valor agregado como por ejemplo el alcohol biocombustible. En este trabajo, fueron identificadas y colectadas 21 variedades cultivadas por la asociación Agrovarzea<sup>1</sup> en el plano inundable del río Amazonas (Leticia), las cuales fueron caracterizadas, priorizando tres de estas variedades por sus características fisicoquímicas. A continuación mediante un diseño completamente al azar con estructura factorial fueron seleccionadas las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de hidrólisis enzimática en cuanto a tipo de enzima a emplear, orden de adición de las enzimas y concentración de sustrato. La hidrólisis se realizó a temperaturas medias con las enzimas en estado libre e inmovilizado. Para el biocatalizador inmovilizado se empleó un nuevo método de atrapamiento de tipo coraza-núcleo con alginato de calcio y material poroso. Los resultados obtenidos indicaron que las variedades de yuca *Arpon*, *Arawana* y *Piririca* presentaron la mayor potencialidad para la producción de azúcares fermentables. Adicionalmente, el par enzimático GC626 ( $\alpha$  amilasa) y GZYME<sup>®</sup>480 Ethanol (amiloglucosidasa) operado a 63°C por 30 horas a un pH de 4.5 adicionadas simultáneamente son las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el proceso. El estudio mostró que la mayor producción de azúcares fue obtenida con la variedad *Arpón* a una concentración de sustrato (almidón crudo) de 28% w/v con la enzima en estado libre. Por otro lado, los biocatalizadores desarrollados con concentraciones de material poroso del 3% para GC626 y 4% para GZYME<sup>®</sup>480 obtuvieron retenciones de actividad del 70% y 90% respectivamente, lograron a su vez la mejor concentración final de azúcares empleando la variedad *Arpon* como sustrato al 32% w/v.

## ABSTRACT

Colombian Amazon has a wide range of cassava varieties (*Manihot esculenta* Crantz), which represent an alternative industrial for the production of fermentable sugars and from them obtain greater value products such as alcohol. In this study, 21 varieties cassava were cultivated by the Agrovarzea Farmers Association on the Amazonas river (Leticia, Colombia), which were physicochemical characteristics, prioritizing three of these varieties. A complete randomized design with factorial structure allowed the selection of the best conditions for carrying out the enzyme hydrolysis reaction as a type of enzyme to use, enzyme order of addition and substrate concentration. The hydrolysis was performed at medium temperature with enzyme in free and immobilized state. For the immobilized biocatalyst was used a new shell-core method of trapping with calcium alginate as

---

<sup>1</sup> Asociación de 25 familias de indígenas cultivadores de yuca asentados en isla de la fantasía

<sup>2</sup> Temperatura optima de actividad entre 25°C y 70°C

material porous. The results showed that the varieties of cassava *Arpon*, *Pirica* and *Arawana* had the highest potential for the production of fermentable sugars. In addition, the enzymatic pair GC626 ( $\alpha$ -amylase) and Ethanol GZYME<sup>®</sup>480 (amyloglucosidase) operated at 63°C for 30 hours at pH 4.5 spiked simultaneously were the best conditions to carry out the process. The study showed how the most production of sugar was obtained with *Arpon* variety at a concentration of substrate (Starch crude) at 28% w/v with the enzyme in free state. On the other hand the developed biocatalysts with material porous concentrations of 3% for GC626 and 4% for GZYME<sup>®</sup>480 retention of activity obtained of 70% and 90%, respectively, managed to turn the best final concentration of sugars using a variety *Arpón* as substrate to 32% w/v.

## **2 OBJETIVOS.**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Determinar experimentalmente los parámetros de operación del proceso de hidrólisis enzimática de almidones de yuca amazónica.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Seleccionar 3 materiales nativos de almidón de yuca amazónica que presenten las mejores propiedades fisicoquímicas para realizar el proceso de hidrólisis.
2. Identificar, a partir de dos enzimas amilolíticas, la que permita la mayor producción de carbohidratos de bajo peso molecular, en una suspensión de almidón de yuca amazónica de manera económicamente atractiva.
3. Evaluar la secuencia de adición al sustrato de las enzimas amilasa y glucosidasa, que beneficie la producción de carbohidratos de bajo peso molecular.
4. Seleccionar las concentraciones más apropiadas de material poroso y de enzima en el biocatalizador, que permitan su empleo en la hidrólisis de almidones amazónicos de las inmediaciones de la ciudad de Leticia.
5. Determinar el efecto que el tipo de almidón, la concentración de sustrato y el tipo de enzima (libre y/o inmovilizada) tienen sobre el proceso hidrolítico.

### **2.3 HIPÓTESIS.**

La utilización de enzimas mesófilas<sup>2</sup> e inmovilizadas para la producción de azúcares fermentables a partir de almidón de yuca amazónica nativa posee unos parámetros específicos de operación para el establecimiento de un proceso de producción a nivel piloto que se amolde a las condiciones sociales, energéticas, ambientales y de consecución de materia prima en la ciudad de Leticia.

---

<sup>2</sup> Temperatura optima de actividad entre 25°C y 70°C

### 3 INTRODUCCIÓN.

La amazonia colombiana cuenta con una gran biodiversidad de especies vegetales que a través de diferentes generaciones han sido utilizadas para la alimentación, medicina e instrumentación ritual por las comunidades indígenas (Arias García Juan Carlos et al 2004; Acosta Muñoz Luis et al 2005). Dentro de esta importante biodiversidad se encuentra la yuca (*Manihot esculenta Crantz*) con una amplia oferta de variedades dulces y bravas las cuales representan una interesante alternativa para la región como la de generar materia prima para la industria como son los azúcares fermentables, el jarabe de fructosa o la producción de alcohol para biocombustible, entre otros, mediante procesos biotecnológicos que estén acorde con las características ambientales, culturales y geográficas de la región.

Con el fin de contribuir a la conservación de las variedades de uso tradicional de las comunidades indígenas y al mismo tiempo generar un producto de mayor valor agregado como una alternativa que beneficie a la región Amazónica Colombiana, el *Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia* apoyando la investigación realizada por el *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi*, realizó un proceso de colección y caracterización de las variedades de yuca más utilizadas en la ciudad de Leticia, capital del departamento del Amazonas con el fin de establecer las principales variedades que pueden ser transformadas en azúcares, así como también la selección de los parámetros de operación para la hidrólisis enzimática de las variedades seleccionadas que se ajusten a las condiciones locales requeridas para la producción de azúcares fermentables.

Para ello, fueron identificadas y colectadas 21 variedades cultivadas por la asociación Agrovarzea<sup>3</sup> en el plano inundable del Río Amazonas, sector Isla de la Fantasía, ubicado en la ciudad de Leticia, Amazonas. Posteriormente estas variedades fueron caracterizadas en los laboratorios del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi (Sede Bogotá), el Instituto de Ciencia de Tecnología de alimentos ICTA y el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá LIQ.

A continuación fueron seleccionadas las condiciones de operación para la hidrólisis enzimática de almidón de yuca de especies amazónicas, tomando como criterios principales el bajo consumo energético requerido para llevar a cabo la reacción y la reutilización del catalizador lo cual permite la aplicación de la tecnología en zonas como la amazonia colombiana donde la obtención de recursos energéticos y materia prima puede llegar a ser un factor limitante para la aplicación del procesos de producción de azúcares fermentables a nivel industrial.

---

<sup>3</sup> Asociación de 25 familias de indígenas cultivadores de yuca asentados en isla de la fantasía

Para alcanzar ésto, fue necesario comparar la catálisis enzimática en estado libre de un complejo enzimático denominado STARGEN<sup>TM</sup>001 que trabajó a temperatura ambiente con un par enzimático compuesto por GC626 ( $\alpha$  amilasa) y GZYME<sup>®</sup>480 Ethanol (enzima sacarificante amiloglucosidasa) que trabaja sinérgicamente a temperaturas entre 62 y 65 °C. Posteriormente fue seleccionado el tiempo de reacción y la secuencia de adición de la enzima seleccionada que permitiese la mayor producción de azúcares.

Paralelamente, fue evaluado un nuevo sistema de inmovilización por atrapamiento con Alginato de calcio que ha sido denominado inmovilización de tipo coraza núcleo el cual está compuesto por una membrana de Alginato-Enzima que recubre un núcleo sólido de Alginato de calcio con el fin de evitar la pérdida de enzima por efecto de la geometría esférica que limita la presencia de sustrato en el núcleo debido al espesor de la capa. La membrana es enriquecida con un material poroso de tipo zeolita a tres concentraciones diferentes (1%, 2% y 3% w/v) con el fin de aumentar la retención de actividad que es un efecto de la tasa de transferencia de masa.

Finalmente, mediante un diseño factorial fue analizado la interacción de las variables concentración de sustrato (12%, 28% y 32% w/v), variedades de almidón de yuca (3 variedades amazónicas) y tipo de enzima (libre e inmovilizada) que permitió la selección de las condiciones de operación para la realización de una hidrólisis enzimática en la región amazónica.

Los resultados obtenidos indicaron que las variedades de yuca *Arpon*, *Arawana* y *Piririca* presentan la mayor potencialidad para llevar a cabo la reacción hidrolítica mediante un proceso biocatalítico. Adicionalmente fue seleccionado el par enzimático GC626 ( $\alpha$  amilasa) y GZYME<sup>®</sup>480 Ethanol (enzima sacarificante amiloglucosidasa) operado a 63°C por presentar el mejor comportamiento durante la producción de dextrinas. Al ser seleccionadas las enzimas y las variedades de yuca se procedió a identificar la secuencia de adición y el tiempo de reacción obteniendo un periodo de quince (15) horas por biocatalizador mediante una adición simultánea.

Al mismo tiempo se seleccionó una concentración de zeolita del 3% w/v para GC626 y 4% w/v para GZYME<sup>®</sup>480 al obtener una retención de actividad del 70 y 90% respectivamente en una coraza de espesor  $0.7 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$  de una esfera de diámetro  $4.1 \pm 0.3 \text{ mm}$  que fue comparada por un periodo de 30 horas con la enzima libre, lo que permitió encontrar que los mayores efectos que alteran el proceso están dados por las interacciones que presenta la enzima con la concentración de sustrato y la enzima con la variedad de almidón de yuca siendo independiente de la interacción de las tres variables. Es así como se identificó que la mejor concentración para realizar la hidrólisis enzimática de la enzima en estado libre es del 28% w/v y para la enzima inmovilizada de tipo coraza/núcleo con material zeolítico es

del 32% w/v siendo la variedad arpón la más adecuada para el proceso llevado a cabo a pH 4.5, temperatura 63°C.

### **3.1 ESTADO DEL ARTE.**

Entre los diferentes cultivos de la Amazonía colombiana, la yuca (*M. esculenta*) es la principal fuente de alimentación e ingreso económico de las chagras<sup>4</sup> indígenas haciendo que un alto número de variedades de yuca de tipo amarillo, blanco, rosada o de rápido crecimiento hayan sido domesticadas mediante prácticas ancestrales de cultivo y conservación como es el caso de la cosecha, el enterramiento<sup>5</sup>, la maduración y el desenterramiento (Acosta M. et al. 2004).

Es así como treinta y ocho (38) variedades de yucas amazónicas han logrado ser identificadas sobre el Trapecio Amazónico, al sur del departamento del Amazonas en los municipios de Leticia, Puerto Nariño y el Corregimiento de Tarapacá, localizados en la parte alta del río Amazonas, desde la parte baja del río Atacuarí, entre Colombia y Perú, hasta la desembocadura del río Jutai, en el Brasil (Arias G. et al. 2005; Acosta M. et al. 2004). Estas variedades fueron clasificadas en 20 variedades de tipo dulce y 18 variedades de tipo amarga (Arias G. et al. 2005). Algunas de estas han sido encontradas sobre la región amazónica peruana donde la producción por hectárea se encuentra entre treinta (30) y cuarenta (40) ton/ha sobre la región inundable y desde dos punto cinco (2,5) hasta treintaicuatro (34) ton/ha para las terrazas de tierra firme (Inga S. & López P. 2001).

---

<sup>4</sup> Alquería o granja de las poblaciones indígenas

<sup>5</sup> Fase de almacenamiento de volúmenes considerables de yuca bajo el suelo.

## 4 MARCO TEÓRICO.

### 4.1 LA YUCA.

La yuca denominada científicamente *Manihot esculenta Crantz* (Figura. 4-1) perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, es conocida según la zona de origen como yuca, mandioca, aipi o *cassava*. Se caracteriza por el desarrollo de sus raíces, las cuales son vasos laticíferos<sup>6</sup> que se encuentran compuestos por células galactocitas o monosacáridos que son fuente de energía de la planta. La familia *Manihot* se encuentra naturalmente en las Américas desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina (Ospina & Hernán 2002; Ceballos & de la Cruz 2002). La gran ventaja que posee la especie radica en su capacidad para soportar largos periodos de sequía como también el de desarrollarse sobre suelos ácidos con baja fertilidad, además la amplia adaptación de la especie permite siembras desde los 800 msnm con temperatura promedio de 24°C ( $\pm$  5°C), humedad relativa del 72% ( $\pm$ 20%) y una precipitación anual de 1,500 mm ( $\pm$ 1,000mm). Por otra parte los periodos de cosecha de la yuca varían desde los siete (7) hasta los dieciocho (18) meses, lo cual está altamente relacionado con el tipo de variedad sembrada y las condiciones ambientales de la zona, efecto que se demuestra en el estado de maduración del tubérculo (Ospina & Hernán 2002; Aristizábal & Sánchez 2007).

La actual clasificación de la especie se encuentra dada por el CIAT<sup>7</sup> el cual cuenta con un banco de germoplasma *in vitro* de 5,724 clones entre cultivares primitivos y cultivares mejorados mediante un código único y específico. Sin embargo una clasificación mas general de la yuca se encuentra dada por la presencia de glucósidos cianogénicos el cual es un efecto de la variabilidad genética de la familia y de las condiciones edafoclimáticas<sup>8</sup> del cultivo (Aristizábal & Sánchez 2007), las diferentes concentraciones del glucósidos cianogénicos promueve la formación de ácidos cianhídricos (HCN) en dosis que oscilan desde valores inocuos de 10 a 20 mg HCN/Kg de yuca, tóxicas de 20 a 100 mg HCN/Kg de yuca o mortales de 100 mg HCN/Kg o más (da Silva et al. 2008; El-Sharkawy 2004). Sin embargo el uso de métodos industriales como la temperatura o el lavado permite la disminución de este componente tóxico.

### 4.2 LA YUCA AMAZÓNICA.

Un alto número de variedades de yuca nombradas tradicionalmente a lo largo de la amazonia como yuca de tipo amarillo, blanco, rosada, de rápido crecimiento, para farin<sup>9</sup>, solo para comer o para ambos usos, han sido domesticadas por las diferentes comunidades indígenas. Entre estos cultivos se han encontrado cerca de treintaiocho (38) variedades de

---

<sup>6</sup> Estructuras que secretan un tipo de látex, jugo espeso, cremoso, generalmente de aspecto blanco lechoso. (Strasburger 1974)

<sup>7</sup> Centro Internacional de Agricultura Tropical

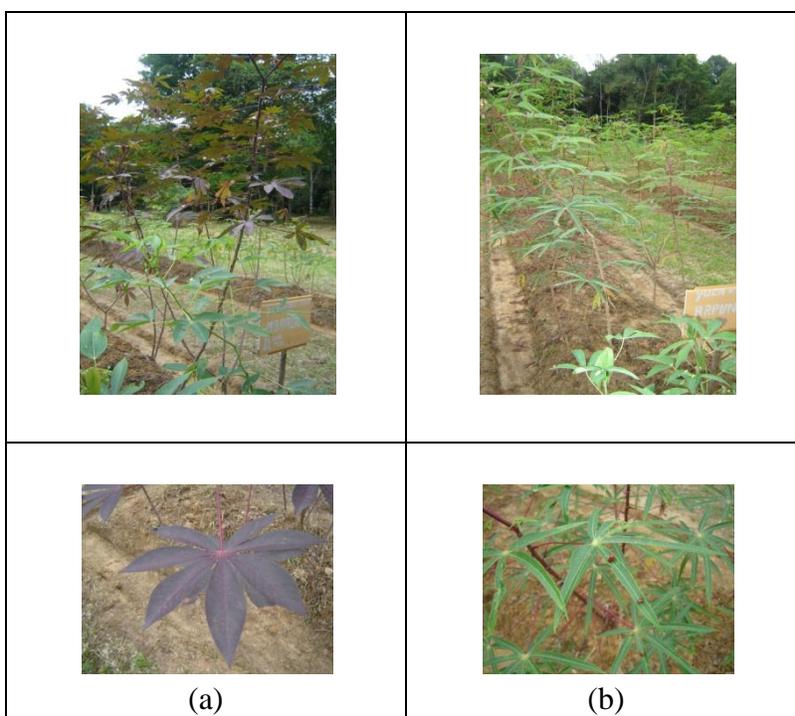
<sup>8</sup> Referente a las condiciones del suelo y del clima

<sup>9</sup> Tostado del almidón de yuca para su almacenamiento

yuca amazónica donde veinte (20) corresponden a las tipo dulce y dieciocho (18) a las tipo amarga. A pesar de esto existe una notable preferencia por las variedades amargas por ser estas las que generan un mayor tamaño de tubérculo además de ser capaces de superar plagas y enfermedades debido a su toxicidad lo que se demuestra con un setentaicinco por ciento (75%) de la superficie cultivada con estas especies (Arias G. et al. 2005; Acosta M. et al. 2004).

### 4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA YUCA.

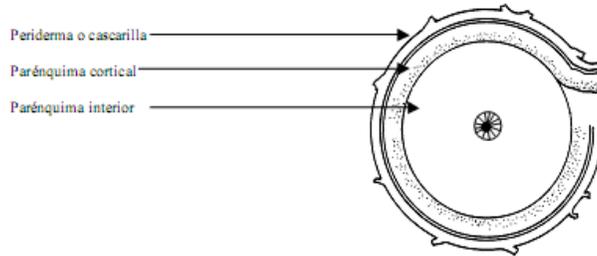
La morfología de la planta se ve influenciada por el factor edafoclimático donde su rasgo principal es ser un arbusto perenne de tipo monoica<sup>10</sup>, de ramificación simpodial<sup>11</sup> con variaciones en la altura de la planta que oscila entre 1 y 5 m (Ceballos & de la Cruz 2002). Las enfermedades que pueden atacar el cultivo de la yuca son: el añublo bacteriano (en hojas y tallos), pudriciones de la raíz, insectos chupadores (ácaro verde, piojo harinoso, mosca blanca) y fitófagos (gusano cachón que atacan las hojas, chinche y piojo subterráneo que afectan la raíz).



**Figura. 4-1** Planta de yuca *Manihot esculenta* Crantz, núcleo productivo del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, ciudad de Leticia, Amazonia Colombiana.

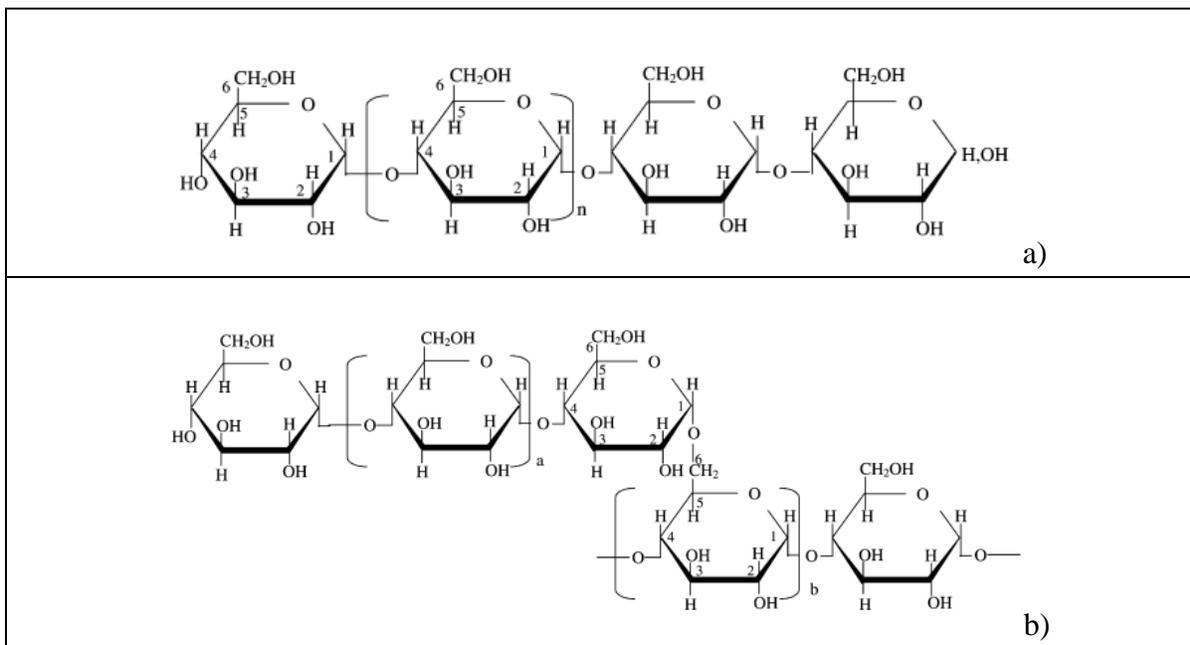
<sup>10</sup> Ambos sexos se presentan en la misma planta

<sup>11</sup> Sistema de crecimiento de la planta por la ramificación del brote.



**Figura. 4-2** Corte transversal de la raíz de la yuca (Alarcón & Dominique s.d.)

La yuca se encuentra constituida por tres tejidos principales: El periderma (cascarilla), la parénquima cortical (corteza) y la parénquima interior (Figura. 4-2). Estas raíces se encuentran constituidas principalmente por un 80% de parénquima interior el cual cuenta con un 60 a 70% de agua, 1% de fibra, 2 % de proteína y un porcentaje de almidón que representa la mayor parte de los carbohidratos de la yuca.(Alarcón & Dominique s.d.)



**Figura. 4-3** a) Amilosa.  $\alpha$ -(1→4) glucan; promedio  $n$ =ca 1000 cadena lineal que puede llevarse a cadenas moderadamente largas enlazadas con  $\alpha$ -(1→6). (Richard F. Tester et al. 2004a). b) Amilopectina.  $\alpha$ -(1→6) punto de ramificación; cadenas externas  $a$ =ca 12-23. Para cadenas internas  $b$ =ca. 20-30. Ambos se encuentran asociados al origen botánico. (Richard F. Tester et al. 2004a)

#### 4.4 EL ALMIDÓN DE YUCA.

El almidón de yuca es un polisacárido en forma de gránulo redondeado de tamaño desigual que está presente en las hojas, el tallo y principalmente en la pulpa de la raíz dentro de los tejidos secundarios del xilema (Ceballos & de la Cruz 2002). El almidón se encuentra

compuesto en un 98-99% de alfa glucanos<sup>12</sup>: amilosa y amilopectina (Figura. 4-3) (Aristizábal & Sánchez 2007), de un 1-2% de lípidos (William R. Morrison 1988; J Karkalas 1995; Richard F. Tester et al. 2004a) como los lisofosfolípidos (LFL) y los ácidos grasos libres (AGL) especialmente los lípidos monoacíclicos (Buléon 1998), un 0,6% o menos de proteínas y 0,4% o menos de minerales (BeMiller 2009).

La relación de los alfa glucanos en el almidón varía de acuerdo al origen botánico de la variedad, con concentraciones que van desde el 15% de amilosa para almidones con relación baja, 20 al 35% de amilosa para almidones con relación normal, hasta almidones con relaciones superiores en intervalos que oscilan en un 40% de amilosa. Estas relaciones manejan una humedad relativa del 14 al 18% que mantiene el sistema en equilibrio (Debet & M Gidley 2006; Richard F. Tester et al. 2004a).

Los lípidos hacen parte de los componentes del almidón mediante la asociación con las fracciones de amilosa en contenidos superiores al 2% (bs) de LFL, (William R. Morrison 1988; J Karkalas 1995; Richard F. Tester et al. 2004a). Además es posible encontrar otros compuestos grasos sobre la superficie de la partícula de almidón como triglicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos libres contaminantes del almidón derivados de la membrana de los amiloplastos<sup>13</sup> (W.R. Morrison & Gadan 1987; William R. Morrison 1988; J Karkalas 1995; Richard F. Tester et al. 2004a).

Por su parte el porcentaje de proteína se encuentra sobre la superficie de la partícula y no son derivados del almidón. El tipo de proteína presente en el almidón se diferencia entre la capa externa y las de conformación interna con pesos moleculares de 15 a 30 kDa para las capas externas y de 50 a 150 kDa para las capas internas, las cuales pueden relacionarse con la rigidez del gránulo y se encuentran conformadas por sintasas (BeMiller 2009; Buléon 1998; Richard F. Tester et al. 2004b).

Además pequeñas cantidades de minerales como calcio, magnesio, fósforo, potasio y sodio son encontradas en el almidón, donde el componente principal corresponde a los monoéster fosfatos en concentraciones inferiores al 0.4% (Richard F. Tester et al. 2004b; Buléon 1998; BeMiller 2009).

La combinación entre el contenido de proteína, la concentración de lípidos y las características de los alfa glucanos dentro del almidón, determinan la capacidad de hinchamiento del almidón, afectando las características reológicas de la emulsión (Debet & M Gidley 2006; J Liu et al. 2009), principalmente durante la gelatinización debido a que la concentración de lípidos monoacíclicos inducen la formación de un complejo amilosa-lípido-proteína el cual restringe el hinchamiento y la dispersión de los gránulos

---

<sup>12</sup> Polisacárido de monómeros de D-glucosa unidos con enlaces glucosídicos de la forma alfa ( $\alpha$ )

<sup>13</sup> Órganos celulares eucarióticos

disminuyendo la solubilidad de la amilosa lo que genera una baja viscosidad (Han 2002b; Han 2002a; Buléon 1998; BeMiller 2009; Richard F. Tester et al. 2004b).

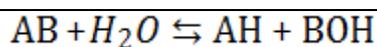
El alto contenido de almidón y sus diferentes propiedades fisicoquímicas hacen de la yuca un importante producto que se ofertada a nivel comercial en un 90% para la producción de almidón. (Alarcón & Dominique s.d.; Aristizábal & Sánchez 2007).

## 4.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA.

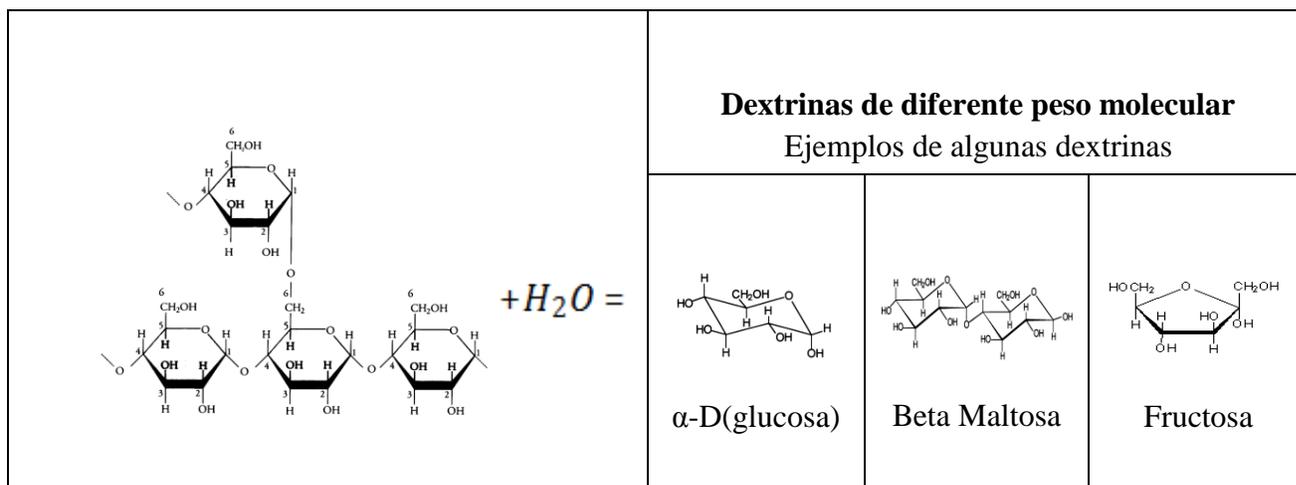
### 4.5.1 La hidrólisis.

La hidrólisis es el proceso químico en el cual una molécula es separada en dos partes por la adición de una molécula de agua. La reacción se lleva a cabo cuando uno de los fragmentos del par molecular gana una molécula de hidrogeno ( $H^+$ ) mientras que el otro grupo recibe un grupo hidroxilo ( $OH^-$ ) (Freifelder 1987; Bailey 1995).

#### Ecuación 4-1



Las reacciones de hidrólisis se basan en el rompimiento de tres tipos principales de macromoléculas que son los polipéptidos, los polisacáridos y los ácidos nucleicos (Bugg 2004). Cuando la molécula está compuesta por almidón el polisacárido es fraccionado en unidades de menor tamaño llamadas dextrinas<sup>14</sup> que son cuantificadas por diferentes métodos (HPLC<sup>15</sup>, DNS<sup>16</sup> entre otros) como el número de dextrosas equivalentes (DE).



**Figura. 4-4** Hidrólisis de almidón

<sup>14</sup> Oligosacáridos de bajo peso molecular

<sup>15</sup> Cromatografía líquida de alta presión

<sup>16</sup> Método de azúcares reductores por 3,5-dinitrosalicílico

Las variables que más influyen en la cinética de reacción del almidón son el tipo de catalizador, la temperatura de proceso, la relación sólido – líquido, el diámetro y cristalinidad de la partícula las cuales involucran la relación de amilosa/amilopectina, y el contenido de lípidos y proteínas (Roberto & Gerardo 1994; Buléon 1998; BeMiller 2009; Richard F. Tester et al. 2004b).

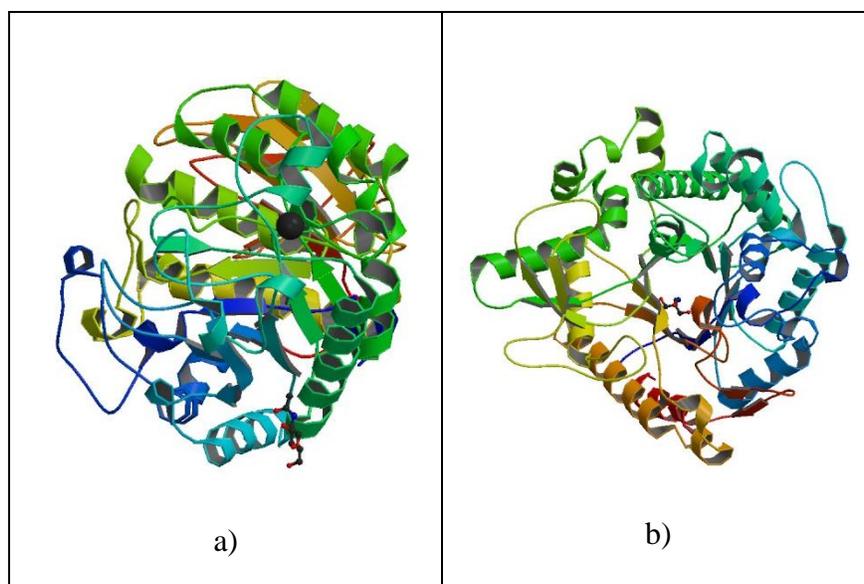
La reacción de hidrólisis se puede representar por una ecuación reversible de tipo ácido-base (Ecuación 4-1) la cual implica varios pasos; la etapa más lenta es cuando se genera un enlace covalente entre los átomos de oxígeno de la molécula de agua y el átomo de carbono. Posteriormente los enlaces carbono-oxígeno de los grupos funcionales y los iones de hidrogeno desprendidos de la molécula de agua se unen a la molécula de alcohol naciente (Boyer 2000).

#### **4.5.2 Catalizadores utilizados para la reacción de hidrólisis del polisacárido de almidón.**

Existen dos clases de catalizadores utilizados industrialmente para la realización de la hidrólisis, el primero consiste en la reacción llevada a cabo con un *agente ácido* como el sulfúrico o el clorhídrico entre otros, que actúan a altas temperaturas y/o presiones. Estos trabajan sobre el polisacárido afectando al azar los enlaces glucosídicos mediante dos fases: la primera afecta el material amorfo (amilopectina) de la partícula y el segundo es un proceso que ataca el material cristalino lentamente debido a la dificultad que tienen los iones de hidrogeno en penetrar la densa capa de enlaces glucosídicos que se encuentran en el interior de la doble hélice (Jacobs 1998), entre los ácidos más utilizados industrialmente el ácido sulfúrico ha tenido amplia aceptación debido a su menor costo y a su menor poder corrosivo (Roberto & Gerardo 1994).

El segundo catalizador es un *agente enzimático*, este es conocido como un catalizador biológico el cual afecta el curso y la velocidad de una reacción sin afectar el equilibrio ni la morfología de la proteína. La reacción se lleva a cabo en el centro activo o cavidad catalítica la cual se une específicamente al sustrato llevando a cabo la reacción en un complejo enzima-sustrato (Doble 2004), lo que permite una alta selectividad de sustratos y productos.

Estos agentes enzimáticos son producido por bacterias, hongos, animales y humanos los cuales convierten la estructura semi-cristalina del polisacárido en formas amorfas atacando los enlaces 1-4 y 1-6 dividiendo la estructura en dextrinas de diferentes pesos moleculares como la glucosa y la maltosa (R Tester et al. 2006). La mayoría de enzimas que catalizan las reacciones de hidrólisis del almidón son proteínas de tipo *amilasa* de la familia de las *hidrolasas* y cumplen con una función específica dentro del metabolismo. Estas están compuestas por cadenas o ensambles de polipéptidos que poseen una actividad catalítica en forma nativa.(Bailey 1995; Doble 2004; Doran 1998).



**Figura. 4-5** Enzimas amilolíticas utilizadas para la reacción de hidrolisis de almidón a) Alfa amilasa (Siddiqui et al. 2009) b) Glucoamilasa (Jeng et al. 2010)

#### 4.5.3 Amilasas.

Las *amilasas* son el grupo de enzimas que degradan el almidón, los glicógenos y los oligosacáridos de manera aleatoria liberando grupos de sacáridos de menor peso molecular. Inicialmente el termino *amilasa* fue usado para designar las enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-4 de la amilosa, la amilopectina, y el glicógeno (Fisher & EA Stein 1960; Bernfeld 1955; Brena et al. 1996). Sin embargo investigaciones recientes han encontrado un gran número de enzimas que actúan sobre diferentes enlaces glucosídicos bajo acciones de tipo endo y exo reactivas (R. Gupta et al. 2003; Taniguchi & Honnda 2009).

Las *amilasas* son clasificadas bajo el número EC (IUBMB nomenclatura enzimática), esta clasificación se basa en las propiedades catalíticas de las enzimas (Tabla 4-2), tales como las especificidades de sustrato y producto. Estas enzimas se dividen en tres clases de EC: *Transferasas* (EC 2), *Hidrolasas* (EC3) e *Isomerasas* (EC 5), la mayoría de las enzimas corresponden a la clase EC 3.

Nombre de la enzima	EC numero	GH familia	GH 13 subfamilia	Mecanismo
$\alpha$ -Amilasa	3.2.1.1	13	1,(2),5,7,(19), 27,28,32	Retención
$\beta$ -Amilasa	3.2.1.2	14		Inversión
Glucoamilasa	3.2.1.3	15		Inversión
Oligo-1,6-glucosidasa	3.2.1.10	13	31	Retención
$\alpha$ -Glucosidasa	3.2.1.20	13	21, 29	Retención

Nombre de la enzima	EC numero	GH familia	GH 13 subfamilia	Mecanismo
		31		
Amilo-1,6-glucosidasa	3.2.1.33	13	25	Retención
Pullanasa	3.2.1.41	13	12,13,14	Retención
Ciclomaltodextrinasa	3.2.1.54	13	(20).	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotetrahidrolasa	3.2.1.60	13	NC	Retención
Isoamilasa	3.2.1.68	13	11	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltohexahidrolasa	3.2.1.98	13	(19).	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotrihidrolasa	3.2.1.116	NC	NC	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotrihidrolasa	3.2.1.133	13	(20).	Retención
Neopululanasa	3.2.1.135	13	(20).	Retención
4- $\alpha$ -D-Glucanotriosa tetrahidrolasa	3.2.1.141	13	10	Retención
Enzimas ramificadoras	2.4.1.18	13	9	Retención
Ciclomaltodextrin glucanotrasnferasa	2.4.1.19	13	2	Retención
4- $\alpha$ -Glucanotrasnferasa	2.4.1.25	77		Retención
4- $\alpha$ -Glucan 1- $\alpha$ -D-glucosilmutasa	5.4.99.15	13	26	Retención

**4-1** Clasificación de amilasas (**Schaechter 2009**): EC- Clasificación de la enzima; GH Familia de amilasas clasificados según el número de glicósidos de la hidrolasa; NC no clasificado; NK no conocido.

Por otra parte, esta clasificación puede ser dividida en enzimas retenidas o invertidas basándose en los mecanismos de acción cinética, siendo las enzimas retenidas ( $\alpha$  amilasa “EC 3.2.1.1”) aquellas donde la configuración anomérica<sup>17</sup> es retenida por el sustrato después de la acción catalítica, por el contrario la configuración anomérica es modificada para el grupo de enzimas invertidas ( $\beta$  amilasas “EC 3.2.1.2” y glucoamilasa “EC 3.2.1.3”).

Nombre de la enzima	Modo	Fold	Base	Acido
$\alpha$ -Amilasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
$\beta$ -Amilasa	Exo	( $\beta/\alpha$ )8	Glu	Glu
Glucoamilasa	Exo	( $\alpha/\alpha$ )8	Glu	Glu
Oligo-1,6-glucosidasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
$\alpha$ -Glucosidasa	Exo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
			Asp	Asp
Amilo-1,6-glucosidasa	exo?	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Pullanasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Ciclomaltodextrinasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotetrahidrolasa	exo?	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu

<sup>17</sup> Isómero de los monosacáridos de más de 5 átomos de carbonos que ha desarrollado una unión.

Nombre de la enzima	Modo	Fold	Base	Acido
Isoamilasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltohexahidrolasa	exo?	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltotrihidrolasa	endo	NK	NK	NK
Glucan-1,4- $\alpha$ -maltohidrolasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Neopululanasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
4- $\alpha$ -D-Glucanotrialsosa tetrahidrolasa	exo?	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Enzimas ramificadoras	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
Ciclomaltodextrin glucanotrasnferasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
4- $\alpha$ -Glucanotrasnferasa	endo	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu
4- $\alpha$ -Glucan glucosilmutasa	1- $\alpha$ -D- exo?	( $\beta/\alpha$ )8	Asp	Glu

**Tabla 4-2** Clasificación de amilasas (Schaechter 2009): endo- de acción interna exo- de acción externa

El tercer criterio usado para clasificar las enzimas que pertenecen al grupo amilasa comprende la acción específica hacia las cadenas de  $\alpha$  glucanos, las enzimas pueden ser clasificadas en endo-acción (ataque interno) o exo-acción (ataque externo), lo que se refiere al tipo de ataque que genera la enzima sobre la partícula de almidón. Es así como se puede decir que la  $\alpha$  amilasa efectúa una endo-acción sobre la partícula de almidón debido a que ataca los enlaces glucosídicos internos de la estructura cristalina del polisacárido obteniendo sacáridos de diferentes grados de polimerización, por el contrario la  $\beta$  amilasa y la glucoamilasa presenta una exo-acción debido a que se encuentran relacionadas con la maltosa y la glucosa que son azúcares no reducidos de los  $\alpha$ -glucanos. (Siddiqui et al. 2009; R Tester et al. 2006; Taniguchi & Honnda 2009; Aehle 2004; Bugg 2004; Schaechter 2009)

#### 4.5.4 $\alpha$ amilasas.

La  $\alpha$  amilasa es una de las más importantes y populares amilasas de la industria, esta se encuentra distribuida a lo largo del reino animal, microbiano y de las plantas. Comercialmente se produce extracelularmente por medio de varios microorganismos como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lichemiformis*, *Bacillus stearothermophilus*, los cuales son fácil manipulables tanto en sus condiciones de cultivo como en sus características genéticas, ofreciendo así una diversa serie de condiciones que le proporcionan a las enzimas características funcionales específicas como los rangos de pH y temperatura. (Lonsane & Ramesh 1990; Sodhi et al. 2005).

Estas enzimas hidrolizan los enlaces  $\alpha$  1-4 de los  $\alpha$  glucanos pero no pueden hidrolizar los enlaces  $\alpha$  1-6, produciendo inicialmente dextrinas de un relativo alto peso molecular. Tras

el avance de la reacción catalizada, el grado de polimerización de las dextrinas decrece gradualmente hasta alcanzar cadenas de maltosa, maltotriosa, glucosa y oligosacáridos que todavía contienen enlaces  $\alpha$  1-6 con una configuración de tipo  $\alpha$ , esta reducción del polisacárido se expresa físicamente en la pérdida de viscosidad, sin embargo el perfil de composición de los azúcares obtenidos difiere en gran medida con el origen de la enzima.

Este tipo de enzimas han sido purificadas y caracterizadas a partir de un gran número de microorganismos donde se incluyen las arqueas (*Sulfolobus*), procariotas (*Bacillus*) y eucariotas (*Aspergillus*). Los intervalos de temperaturas aplicables para estas enzimas van desde los 30°C a pH neutro hasta los 100°C o más grados a pH bajos de 3 o altos de 10. Este tipo de enzima pertenece a la familia de los glicósidos de hidrolasa (GH) 13, que contienen en su estructura barras de  $(\beta/\alpha)_8$  con el ácido glutámico como el protón donador y el ácido aspártico como el nucleófilo en el sitio activo (Taniguchi & Honnda 2009; Schaechter 2009).

#### **4.5.5 Glucoamilasas.**

Descubierta en 1950, esta amilasa producida por un hongo fue la tercera enzima amilolítica descubierta después de la  $\alpha$  y la  $\beta$  amilasa. Esta fue nombrada glucoamilasa (GA) y es conocida como  $\gamma$  amilasa o amiloglucosidasa (1,4- $\alpha$ -d-glucan glucohidrolasa EC 3.2.1.3) la cual cataliza la hidrólisis sucesiva de los enlaces  $\alpha$  1-4 de los glucanos finales no reducidos, lo que produce la  $\beta$ -D-glucosa como un producto de la hidrólisis lo que indica que es una enzima de tipo invertida que presenta una exo-acción. Este tipo de enzima también hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-6 a un ritmo menor, sin embargo la gran ventaja que tiene frente a sus homologas es la de tener la capacidad de transformar el almidón completamente a glucosa.

La glucoamilasa contiene un número de glicósidos hidrolasas que lo ubican en la familia GH15 con al menos 23 estructuras primarias conocidas que provienen de los filamentos de los hongos, levaduras, eubacterias y aqueas (Sauer 2000). Este tipo de enzima contiene una estructura  $(\alpha/\alpha)_6$ , donde el protón donador y el nucleófilo del sitio activo de la enzima está determinado por el ácido glutámico.

### **4.6 METODOLOGÍAS DE REACCIÓN EN EL USO DE LAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS.**

El uso de las enzimas amilolíticas ha sido ampliamente centrado en las industrias textiles, energéticas y alimenticias con un constante consumo que alcanzó los US\$ 2 billones de dólares en el 2005 (Schaechter 2009). Debido a esto continuas investigaciones se han focalizado en alcanzar mejores rendimientos durante la etapa de reacción, inicialmente mediante la manipulación de factores como la temperatura, pH, fase de reacción, tipo y calidad de solvente, tipo y concentración de co-ayudantes, concentración de sustrato y concentración de enzima, buscando alcanzar una disminución significativa en los costos de

producción, sin embargo otros factores como el estado heterogéneo de la enzima han sido ampliamente estudiados ya que permiten la recuperación del catalizador.

Generalmente, el catalizador enzimático en reactores agitados trabaja libremente (*enzima Libre*) obteniendo la uniformidad en las condiciones de reacción lo que ha sido nombrado como una *reacción homogénea*, (Doran 1998) sin embargo el uso de la enzima libre a nivel industrial presenta inestabilidad frente a microambientes hostiles al igual que una continua pérdida del catalizador en cada proceso. Una de las alternativas con mejores perspectivas para solucionar estos efectos se localizó en *la inmovilización enzimática* la cual se conoció en 1916 gracias a los descubrimientos de Nelson and Griffin y consiste en el atrapamiento de la enzima mediante métodos físicos o químicos (Schaechter 2009) llevando a cabo la reacción en un estado *heterogéneo*.

#### 4.6.1 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

La inmovilización enzimática hace referencia a un proceso en el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a una forma insoluble que retiene su actividad catalítica permitiendo su reutilización varias veces (Leuchtenberger 1974), de igual manera este confinamiento afecta tanto positiva como negativamente el comportamiento de la enzima y su actividad (Tabla 4-3), es por esto que existen diferentes métodos de inmovilización que permiten seleccionar las parámetros óptimos de cada enzima para su aplicación en laboratorio o a nivel industrial.

<b>Ventajas</b> (CIBaQ 2009; Hernáiz 2009)	<b>Desventajas</b> (Martinek & Mozhaev 1987)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil extracción de la enzima del producto final.</li> <li>• Posible utilización en sistemas continuos.</li> <li>• Reutilización del biocatalizador.</li> <li>• Mayor concentración de enzima por unidad de volumen.</li> <li>• Mayor resistencia a las condiciones de operación (pH, temperatura, concentración de sustrato, concentración de producto).</li> <li>• Mayor control del proceso.</li> <li>• Aumento de la estabilidad del biocatalizador.</li> <li>• Disminución de los costos de proceso.</li> <li>• Posibilidad de utilizar distintas configuraciones y modos de producción (por lotes, continuo, etc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemas de transferencia de masa debido al diámetro de poro o al tamaño de la partícula.</li> <li>• Disminución en la actividad catalítica.</li> <li>• Posible alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado natural.</li> <li>• La gran heterogeneidad del sistema enzima - soporte donde puede existir distintas fracciones de proteína inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.</li> <li>• La preparación del biocatalizador es más costosa que con la enzima libre.</li> <li>• Diferentes gradientes de concentración del sustrato en la partícula inmovilizada.</li> </ul>

**Tabla 4-3** Ventajas y desventajas de la inmovilización enzimática

Por otra parte, la gran diversidad de procesos que dependen a su vez del tipo de sustrato, las condiciones de operación, el tipo de reacción y la configuración del reactor (continuo,

semicontinuo o por lotes), necesariamente requiere el diseño de un método de inmovilización correspondiente a los requerimientos establecidos por el proceso deseado (Katchalski-Katzir 1993). Es así que numerosos parámetros deben ser tomados en cuenta durante la inmovilización de enzimas, la mayoría de estos se encuentran mencionados en la Tabla 4-4.

<b>Enzima</b>	<b>Propiedades Bioquímicas</b>	Transferencia de masa
		Grupos prostéticos
		Grupos funcionales y superficie de proteínas
		Pureza (Inactivación/protección de las impurezas)
	<b>Parámetros de la Cinética Enzimática</b>	Actividad específica
		pH
		Perfil de temperatura
		Parámetros cinéticos de la actividad y la inhibición
		Estabilidad de la enzima frente al pH
		Temperatura
		Solvente
		Contaminantes
	Impurezas	
	<b>Soporte</b>	<b>Características Químicas</b>
Grupo funcional		
Comportamiento durante el hinchamiento		
Volumen accesible, matriz y tamaño de poro		
Estabilidad química del soporte		
<b>Propiedades Mecánicas</b>		Diámetro promedio de la partícula húmeda
		Comportamiento a la compresión de la partícula
		Resistencia al flujo (aplicación para lecho fijo)
		Velocidad de sedimentación (lecho fluidizado)
		Abrasión (tanque agitado)
<b>Enzima Inmovilizada</b>	<b>Método de inmovilización</b>	Enlace de proteína
		Rendimiento y actividad de la enzima
		Parámetros cinéticos intrínsecos (propiedades libres de los efectos de transferencia de masa)
	<b>Efecto de Transferencia de Masa</b>	Consistencia a la partición (diferentes concentraciones de soluto dentro y fuera de la partícula catalítica)

		Difusión externa e interna (poros)
		Efectividad de la enzima libre vs enzima inmovilizada
	<b>Estabilidad</b>	Estabilidad operacional (expresada en el decaimiento de la actividad sobre las condiciones de trabajo)
		Estabilidad de almacenamiento
	<b>Rendimiento</b>	Productividad (cantidad de producto formado por unidad de masa o de enzima)
		Consumo de enzima (e.g. unidad de producto kg <sup>-1</sup> , durante la vida media)

**Tabla 4-4** Parámetros característicos de selección para la inmovilización de enzimas.

Es así como el método seleccionado debe satisfacer los *factores catalíticos (CF)* correspondientes a la conversión, como son el tipo de sustrato, el tiempo de reacción, el volumen de reacción, la estabilidad de la enzima y la selectividad. Como también los *factores no catalíticos (NCF)* como son el sistema de separación, el control del proceso y la generación de residuos. Estos factores generan un grado de confiabilidad para proponer un sistema de inmovilización como adecuado, por lo tanto cuando las necesidades catalíticas como las funciones no catalíticas pueden cumplir los requisitos de una aplicación específica el biocatalizador se clasifica como “**robusto**”. (Katchalski-Katzir 1993)

Método	Inclusión en membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción Química	Unión
<b>Covalente</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí
<b>Preparación</b>	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
<b>Fuerza de unión</b>	Débil	Media	Débil - Media	Media	Fuerte
<b>Actividad Enzimática</b>	Media - Alta	Baja	Baja	Media	Alta
<b>regeneración soporte</b>	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
<b>Costo de proceso</b>	Media - Alta	Media	Media	Bajo	Alta
<b>Estabilidad</b>	Media	Alta	Alta	Bajo	Alta
<b>Validez</b>	General	General	Limitada	General	Limitada
<b>Resistencia Microbiana</b>	Sí	Sí	Sí	No	No

**Tabla 4-5** Cuadro comparativo de los métodos de inmovilización

#### 4.7 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.

La mayoría de los métodos aceptados para la inmovilización de enzimas y otras proteínas activas biológicamente, puede ser agrupada en cuatro clases (Katchalski-Katzir 1993):

- Adsorción, soporte inerte o intercambio iónico con resinas.

- Enlace covalente con un soporte polimérico, vía grupo funcional no esencial para la actividad biológica de la proteína.
- Encapsulamiento
- Atrapamiento, por oclusión con entrecruzamiento con geles o por encapsulamiento con microcápsulas, fibras huecas, liposomas o fibras.

Una comparación sencilla entre los métodos más utilizados se encuentra en la **Tabla 4-5**, la cual permite una selección ágil para el establecimiento del proceso de inmovilización.

#### 4.7.1 Inmovilización por Adsorción.

Es el método de inmovilización históricamente más utilizado y con mayor información disponible en la literatura, esto se debe a la facilidad que tiene la preparación del soporte sólido y su conjugación con la enzima.

El procedimiento se realiza al llevar una solución de enzima en contacto con una superficie adsorbente porosa, durante ese instante la enzima se une al soporte por presencia de diferentes interacciones físicas y químicas como: fuerzas iónicas, fuerza de van der Waals y puentes de hidrogeno, (Doran 1998; Katchalski-Katzir 1993) lo que promueve la interacción entre enzima - interface sólida – sustrato durante la reacción. Este proceso puede afectar la estructura conformacional de la enzima, teniendo un efecto en la actividad, cinética y selectividad de la catálisis (Yan et al. 2010).

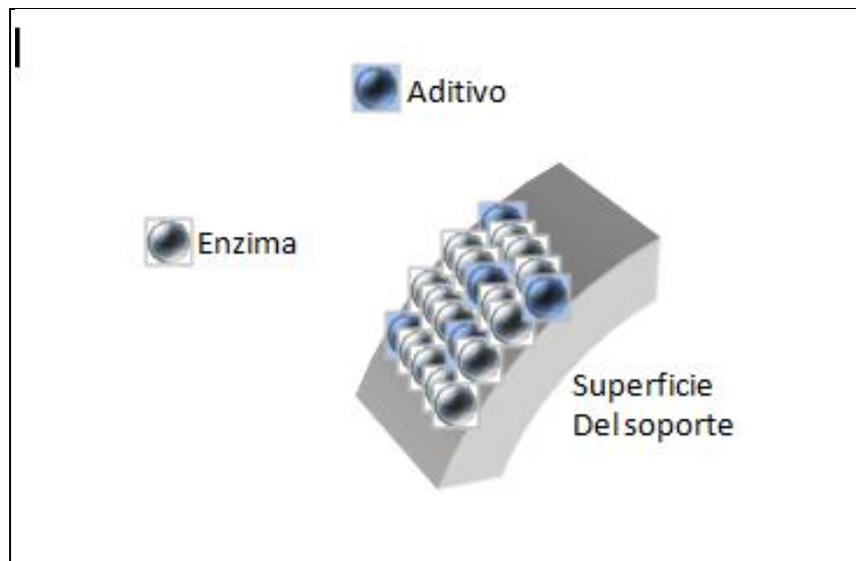
Durante el proceso de inmovilización de enzimas por adsorción no covalente sobre un soporte, se presentan cambios significativos del microambiente sobre el cual la enzima actúa, lo que ocasiona una alta solvatación que tienen lugar entre las moléculas enzimáticas y el solvente que las rodea. Estas fuerzas nativas que mantienen la solvatación pueden llegar a ser perturbadas provocando un proceso de desorción del soporte sobre la enzima (Cao 2005a).

<b>Tipo de material utilizado</b>	<b>Factores que afectan la inmovilización (CIBaQ 2009)</b>	<b>Ventajas (Arroyo 1998)</b>	<b>Desventajas (Klei et al. 1985; Arroyo 1998)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soportes inorgánicos</li> <li>• Minerales</li> <li>• Resinas de intercambio iónico</li> <li>• Polímeros neutrales</li> <li>• Caolinita</li> <li>• Bentonita</li> <li>• Gel de fosfato de calcio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH del medio (control de la carga de la superficie)</li> <li>• Fuerza iónica</li> <li>• Diámetro de poro</li> <li>• Presencia de iones</li> <li>• Solventes en el medio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil preparación.</li> <li>• Económico</li> <li>• No hay cambios en la especificidad enzimática</li> <li>• Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La estabilización de los parámetros que controlan la adsorción.</li> <li>• Los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico.</li> <li>• La unión al soporte es</li> </ul>

Tipo de material utilizado	Factores que afectan la inmovilización (CIBaQ 2009)	Ventajas (Arroyo 1998)	Desventajas (Klei et al. 1985; Arroyo 1998)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vidrio poroso</li> <li>• Alúmina</li> <li>• Carbón</li> <li>• Sílica / Sílica gel</li> </ul>		<p>contenido de agua</p>	<p>débil</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Altas concentraciones de sal o sustrato pueden generar desorción de la proteína.</li> <li>• Cambios conformacionales de la estructura de las proteínas.</li> </ul>

**Tabla 4-6** Principales características de los sistemas de inmovilización por adsorción.

La clasificación más general se encuentra definida por diferentes enlaces no covalentes existentes entre la enzima y el soporte; entre estas encontramos la adsorción física no específica (Ellen et al. 1974), enlaces iónicos (Maxim et al. 1987), coordinación (metales quelantes) (Moriya et al. 1989), adsorción por afinidad (Yan et al. 2010); en general estas técnicas son llamadas: adsorción física no específica, adsorción bio-específica, adsorción por afinidad, interacción electrostática, interacción hidrofóbica (Cao 2005a).



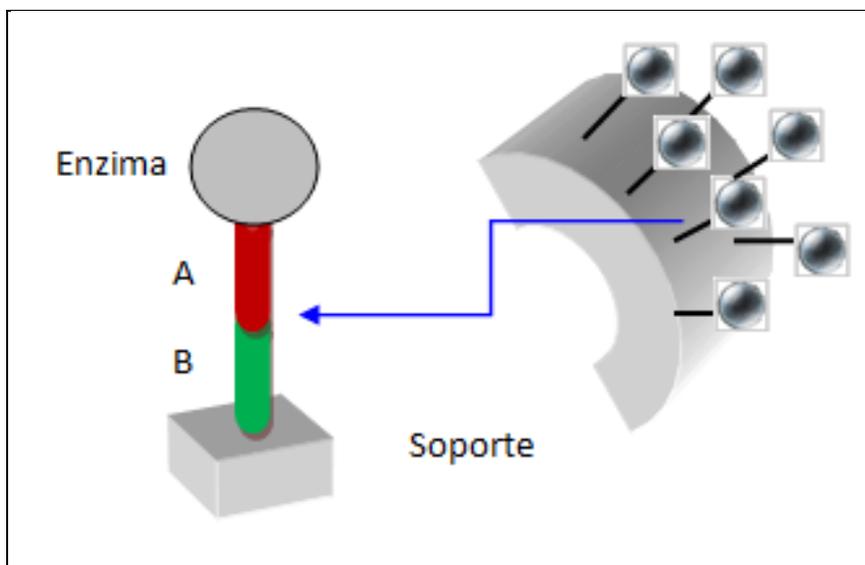
**Figura. 4-6** Inmovilización de tipo adsorción de una sola capa (fuente Autor).

La elección del soporte debe ser determinada por factores como los requerimientos de carga, la estabilización de la enzima, la inhibición de la enzima, el tamaño de poro, el intervalo de pH, la estructura interna del soporte, tamaño de partícula, la contaminación

microbiana y la adición de aditivos (suero fetal bovina, gelatina o caseína), siendo esta la información más relevante para determinar el comportamiento del biocatalizador.

#### 4.7.2 Inmovilización por enlaces covalentes.

Desarrollado en 1950, este tipo de inmovilización fundamenta su trabajo en la formación de fuertes enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. En general los enlaces covalentes son formados por la reacción química entre un residuo de amino ácido (AAR) localizado en la superficie de la enzima y una función activa que es unida a la superficie del soporte.



**Figura. 4-7** Inmovilización de tipo covalente A) amino ácido activo residual, B) enlace funcional del soporte (fuente Autor)

Por lo general el soporte es activado previamente antes de su interacción con la enzima (Tümtürk 2000; Kahraman et al. 2007), subsecuentemente la enzima inmovilizada es reactivada (Arica 1995), obteniendo así el biocatalizador.

Característica	Propiedades
Naturaleza física del soporte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superficie del soporte</li> <li>• Densidad de los enlaces de unión</li> <li>• Propiedades relacionadas con el poro</li> <li>• Tamaño de partícula</li> <li>• Forma del soporte</li> </ul>
Naturaleza químicas del soporte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga del enlace de los grupos activados (CGA)</li> <li>• Carga del enlace de los grupos inertes (CGI)</li> <li>• Brazos espaciadores entre CGA y CGI</li> </ul>

Aminoácidos residuales para los enlaces covalentes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reactivación de los aminoácidos residuales</li> <li>• Posición activa del aminoácido</li> </ul>
Factores que afectan el comportamiento de la enzima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retención de la actividad</li> <li>• Estabilidad de la enzima inmovilizada</li> <li>• Selectividad de la enzima inmovilizada</li> </ul>

**Tabla 4-7** Características del soporte y la enzima que deben tenerse en cuenta para la preparación de un sistema de inmovilización de tipo enlace covalente.

Sin embargo la inmovilización covalente de la enzima en un soporte puede tener efectos físicos y/o químicos que modifican la enzima y dependen de la naturaleza física y/o química del soporte usado. En general los enlaces covalentes tienen como característica general la irreversibilidad de los enlaces enzima-soporte, la rigidez conformacional de la enzima debido al ataque multipunto y la alteración de la entidad química producto de las modificaciones químicas experimentadas por la reacción, estas características alteran el comportamiento enzimático en sectores como la actividad, la selectividad y la estabilidad del biocatalizador. Por otro lado las variables críticas que podrían favorecer el comportamiento de la enzima inmovilizada son: tiempo de reacción entre la enzima y el soporte, valores de pH, temperatura, buffer usado e inhibidores presentes en el medio (Mateo et al. 2007; Cao 2005a)

#### 4.7.3 Encapsulamiento de enzimas.

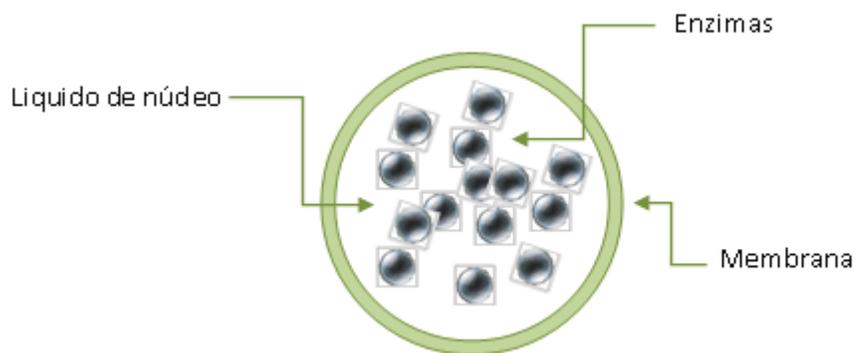
Consiste en la en la formación de un tipo de membrana física en forma de barrera alrededor de una preparación enzimática y se distingue del método de atrapamiento por el tipo de encapsulamiento realizado y el número simultáneo de enzimas retenidas. En este método se perciben las preparaciones de tipo encapsulamiento in-situ, encapsulamiento, entrecruzamiento, procesos sol-gel y encapsulamiento pos carga (Cao 2005a).

El método más utilizado, consiste en la preparación de una proporción de enzimas que pueden estar en estado disueltas o liofilizadas y son enclaustradas físicamente o químicamente con esferas semi-permeables de polímero que poseen una membrana de 1 a 100  $\mu\text{m}$ . (Betancor & Luckarift 2008; H. S. Azevedo & Reis 2009)

Encapsulamiento de enzimas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos interfaciales para la formación de corazas sólidas alrededor de gotas líquidas de enzimas</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de fase invertida</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plantilla de lixiviados</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Encapsulamiento post-carga</li> </ul>

**Tabla 4-8** Clasificación de los métodos de inmovilización por encapsulamiento

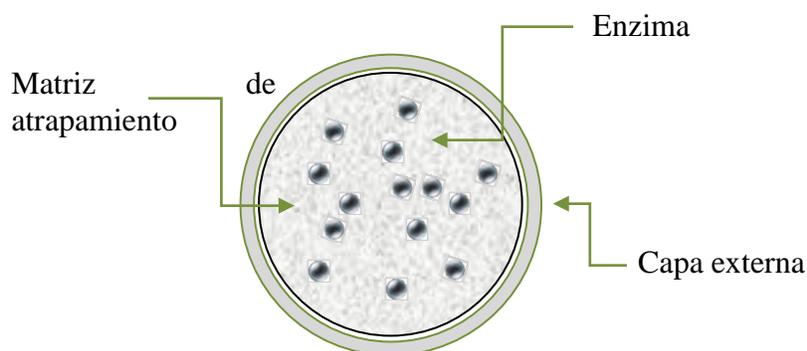
Las ventajas que presenta este tipo de tecnología se encuentran asociadas a la preparación de un sistema de múltiples enzimas que permiten una secuencias *in situ* de reacciones enzimática, como también la no modificación química de la enzima por efecto del proceso de atrapamiento (Edser 2005). Sin embargo su mayor desventaja radica en los problemas difusivos que pueden existir por efecto del diámetro de partícula del sustrato utilizado y su interacción con la capa de atrapamiento (Koyama 2004).



**Figura. 4-8** Encapsulamiento de enzimas en una membrana semipermeable

#### 4.7.4 Atrapamiento.

La inmovilización por atrapamiento consiste en el confinamiento de las enzimas sobre una matriz en la cual los componentes del catalizador han sido dispersados (enzimas solubles o insolubles) en un medio fluido (solución polimérica generalmente) generando una mezcla soluble que por acción de un precursor como la irradiación (Anming Wang et al. 2010), la foto activación (Grasselli et al. 2001) o la iniciación química (Koyama 2004; H Liu et al. 2008; Konsoula & Liakopouloukyriakides 2006; Tripathi et al. 2007) formando una membrana permeable que captura las enzimas de manera química o física.



**Figura. 4-9** Atrapamiento de enzimas en una resina polimérica.

La matriz puede ser preparada en diferentes formas como esferas, membranas, películas y fibras, así como también por diferentes métodos como medios químicos, medios físicos y combinaciones (Figura. 4-10), estos métodos utilizan precursores compatibles con las moléculas enzimáticas formando la membrana de atrapamiento durante el proceso de inmovilización lo que le confiere a la enzima un estado de retención física o de interacción de enlaces covalente. (Wingard 1976; Cao 2005a; Doran 1998)

A pesar de ser un método de inmovilización sencillo y de fácil aplicación, el atrapamiento tiene serias limitaciones difusivas que reducen la actividad aparente de la enzima (Doran 1998) y se encuentran dominadas por la ley de Fick de la difusión relaciona el movimiento de una especie química desde una región de concentración elevada hacia otra de baja concentración a través de una matriz porosa (Bird 1987)

#### **4.8 REQUERIMIENTOS DEL SOPORTE EN EL MÉTODO DE ATRAPAMIENTO.**

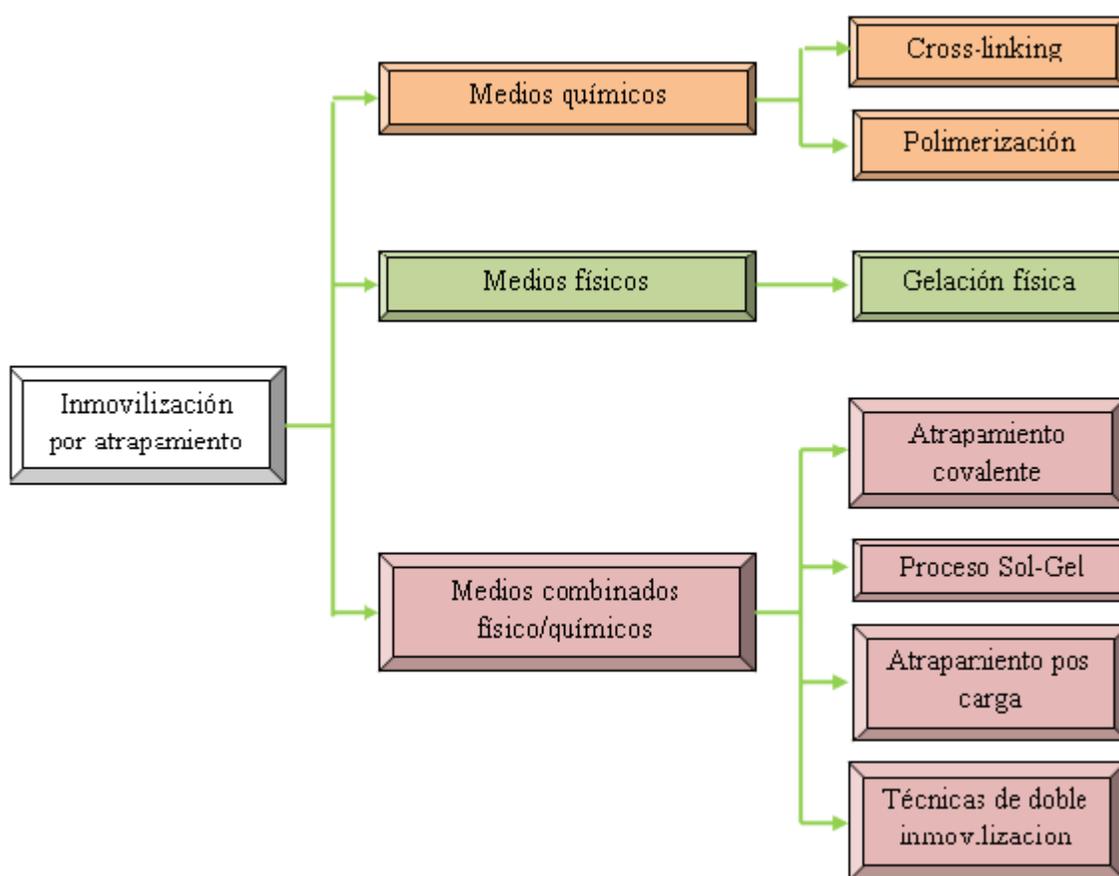
Diferentes propiedades debe de ser tenidas en cuenta para la selección de la matriz del soporte, siendo el factor no catalítico uno de los principales ya que involucra la no actividad del material de inmovilización frente a las condiciones en las que se encuentra el sustrato; un ejemplo de este tipo de condición se puede observar en los sistemas donde el sustrato está suspendido en un solvente orgánico. Por su parte otros factores como la afinidad al sustrato, los efectos de inhibición del catalizador, el rango de pH, la contaminación microbiana y la resistencia mecánica, son factores que delimitan el uso de los materiales de trabajo (Wingard 1976; Arroyo 1998)

Es así como los soportes pueden clasificarse en materiales inorgánicos (Bentonita (Ghiaci et al. 2009), pumita (Pazarlioğlu & Telefoncu 2005) y sílice (Lee et al. 2009; Pandya et al. 2005) entre otros) o manufacturados (vidrio (Kahraman et al. 2007), alúmina(Oliveira et al. 2008), óxidos de metales(Domínguez 2009; Liao & Syu 2005) y materiales orgánicos (Polímeros naturales, polímeros sintéticos)(Arroyo 1998).

<b>Requerimientos</b>	<b>Propiedad</b>	<b>Características de impacto</b>
Físicos	Tamaño de poro	Área total de reacción (Cao 2005b).
	Porosidad	Limita los efectos difusivos (Lee et al. 2009)
	Geometría	Superficie de acción (Cao 2005a)
	Tamaño de partícula	Retención de actividad por causa de los efectos difusivos (Cao 2005a)
Químicos	Naturaleza de la actividad funcional	Efecto de los grupos funcionales del soporte con las enzimas entre estos se encuentran (Cao 2005a): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Funcionalidad inerte – no hay reacción química entre la enzima y el soporte</li> </ul>

Requerimientos	Propiedad	Características de impacto
		(atrapamiento físico) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Funcionalidad activa – existe reacción de tipo sustrato-sustrato o enzima-sustrato que tiene un efecto en la actividad, selectividad y estabilidad de la enzima.</li> </ul>
	Hidrofilicidad del soporte	Efecto en la actividad, estabilidad, y selectividad de la enzima (Cao 2005a)

**Tabla 4-9** Requerimiento para la selección del material de atrapamiento



**Figura. 4-10** Métodos de inmovilización por atrapamiento

#### 4.8.1 Efectos del atrapamiento de la enzima.

Las propiedades del material y el tipo de técnica utilizada en la preparación de la matriz de atrapamiento, tiene un efecto en la actividad, selectividad y estabilidad de la enzima de acuerdo a las particularidades de la proteína utilizada y de la aplicación destinada.

#### 4.8.2 La pérdida o retención de actividad.

Entre los principales efecto, la pérdida o retención de actividad se cuantifica al relacionar la actividad específica de la enzima inmovilizada con respecto a la actividad específica de la enzima libre bajo las mismas condiciones de reacción. Este tipo de retención se da por factores físicos como la naturaleza de la matriz, el tamaño de la partícula, la carga de la matriz, los aditivos, el método de inmovilización y las condiciones de inmovilización (Wingard 1976; Mateo et al. 2007; Cao 2005a) que están involucrados en los factores de actividad (Tabla 4-10).

Factores de actividad	Características
Carga de la enzima en el catalizador	La actividad aumenta proporcionalmente a la cantidad de enzima en el medio, a pesar de esto algunas interacciones entre enzima-enzima pueden afectar el rendimiento de la reacción.
Dependencia de la matriz	La modificación del microambiente afecta la hidrofobicidad, hidrofílicidad y la carga de la enzima
Control de la difusión	Esta relaciona el tamaño de la partícula, la porosidad, el diámetro de poro que son factores relacionados con la transferencia de materia.
Conformación	Diminución en la velocidad de movilidad de la enzima afectando la enantioselectividad (Aehle 2004)

**Tabla 4-10** Dependencia de la actividad a los factores intrínsecos en la matriz

#### 4.8.3 Estabilidad.

Las enzimas se someten a una variedad de reacciones de desnaturalización durante la producción, almacenamiento y aplicación en la industria, desdoblado la estructura terciaria de la enzima que desordena el polipéptido en el que los residuos clave ya no están estrechamente alineados lo suficiente para continuar participando en la estabilización de las interacciones funcionales o estructurales Este fenómeno molecular da lugar a dos efectos distintas, el primera consiste en la estabilidad termodinámica que concierne a la resistencia al desdoblamiento conformacional de la proteína, el segundo corresponde a la medida de resistencia de la inactivación reversible llamada estabilidad a largo plazo. (Iyer & Ananthanarayan 2008).

Factores de estabilidad	Factores de alteración de la estabilidad
Microambiente	<p><i>Agentes de bloqueo</i> para la alteración de la estabilidad (Abian 2002)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Pequeñas moléculas:</b> aminoácidos y otros aminos</li> <li>• <b>Macromoléculas:</b> suero de bovino, gelatina, polietileno y polietilen glicol aminolato.</li> </ul>

<b>Factores de estabilidad</b>	<b>Factores de alteración de la estabilidad</b>
	<i>Macromoléculas hidrofílicas</i>
	<i>Espaciadores hidrofílicos</i>
Confinamiento y Condiciones de inmovilización	<i>Nuevos precursores</i>
	<i>pH de Inmovilización</i>
Tipo y numero de enlaces	<i>CLEAS - Cross-linker</i>

**Tabla 4-11** Factores que alteran la estabilidad de la enzima en la inmovilización

Sin embargo el uso de soporte de inmovilización como en la inmovilización covalente desfavorece la estabilidad de la enzima, por el contrario el atrapamiento físico de la enzima propone un estado de estabilidad mucho mayor que en estado nativo. Estos fenómenos están estrechamente relacionados con el número de enlaces formados entre la enzima y el soporte, el grado de confinamiento de las moléculas enzimáticas en el soporte, el microambiente del sistema y las condiciones de inmovilización (Cao 2005b) y se observan en la Tabla 4-11

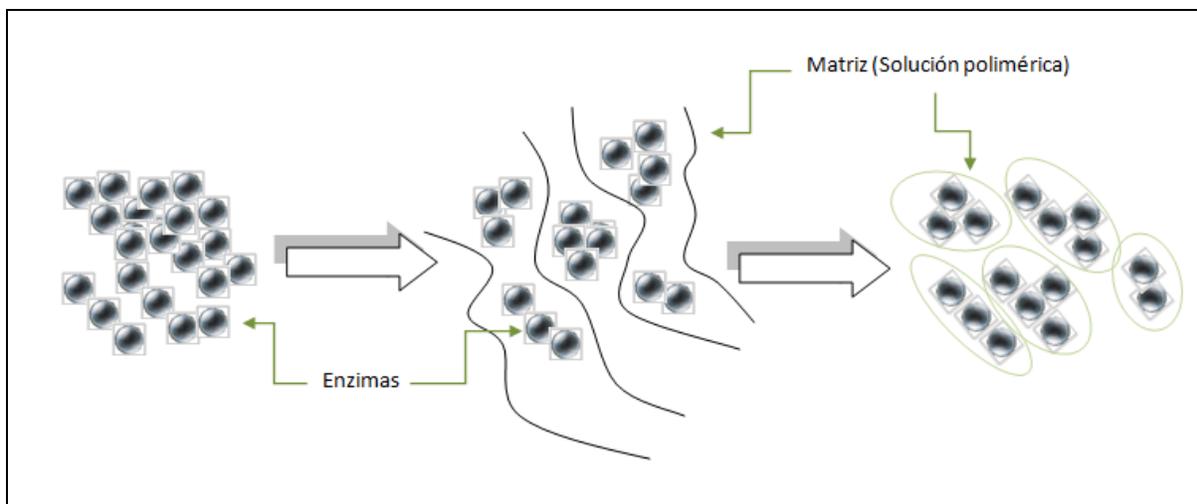
#### **4.8.4 Selectividad.**

La enantioselectividad de la enzima no solo es determinada por la secuencia del aminoácido residual sino también por los efectos del microambiente en el cual se encuentra. En general la selectividad de la enzima en atrapamiento se puede relacionar por los efectos de distorsión del sitio activo, la reducción de la movilidad de los grupos proteicos, las limitantes difusivas.(Cao 2005a; Mateo et al. 2007)

#### **4.9 PREPARACIÓN DEL MÉTODOS FÍSICOS DE ATRAPAMIENTO.**

EL método se basa en el atrapamiento de enzimas en un gel formado por **polímeros naturales** como gelatina, alginato, polímeros sintéticos, geles híbridos semi-sintéticos, por otro lado se encuentran los **polipéptidos** que incluyen albumina, gelatina, colágeno y caseína, **polisacáridos** como quitosán, agar o agarosa, almidón, celulosa, pectina, galactomanosa como también algunos otros **poli electrolitos**.

Metodológicamente, la enzima es atrapada en una matriz que se encuentra en estado líquida inicialmente, permitiendo así la inserción y dispersión de la enzima en la solución. Posteriormente el complejo enzima-polímero se transforma en un estado insoluble de carácter rígido al ser gelificado por acción de un cambio de temperatura, pH o estrés iónico, realizando la captura de la enzima que es retenida bajo fuerzas netamente físicas. Figura. 4-11., mejorando de esta manera la estabilidad de la enzima.



**Figura. 4-11** Proceso de atrapamiento de una enzima en una matriz polimérica.

Tipo de material utilizado	Factores que afectan la inmovilización	Ventajas (Doran 1998)	Desventajas (Klei et al. 1985)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pre polímeros fotoentrecruzables</li> <li>• Poliacrilamida</li> <li>• Colágeno</li> <li>• Alginato</li> <li>• Carraginato o resina de poliuretano.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de las condiciones de polimerización.</li> <li>• Concentración del polímero en la solución</li> <li>• Control de pH</li> <li>• Control de temperatura</li> <li>• Concentración de los solventes utilizados</li> <li>• Conocimiento del grupo activo con el fin de no afectar la proteína.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor resistencia de la enzima a las diferencias de calor.</li> <li>• Mayor resistencia de la enzima a las gradientes de concentración.</li> <li>• Mayor volumen de enzimas por volumen de matriz.</li> <li>• Reutilización del biocatalizador</li> <li>• Aumento de vida media de la enzima.</li> <li>• La enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustrato con moléculas de bajo peso molecular.</li> <li>• Problemas por resistencia a la difusión a través de la matriz que repercute en diferencias cinéticas.</li> <li>• Reacción del soporte con el medio utilizado.</li> <li>• Disminución de la actividad enzimática por unidad</li> <li>• Precipitación de la proteína por efecto del solvente</li> </ul>

**Tabla 4-12** Tabla general del método de atrapamiento

#### 4.10 AZÚCARES OBTENIDOS DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA (CARBOHIDRATOS O AZÚCARES FERMENTABLES)

Los carbohidratos o azúcares fermentables son compuestos orgánicos de tipo aldehídos o cetonas derivados de alcoholes polihídricos superiores o de componentes que han sido reducidos tras una reacción de hidrólisis (Holme 1998), estos se encuentran extensamente

distribuidos en plantas y animales cumpliendo con un rol importante tanto en la parte estructural como metabólica (Murray 2003). En general los carbohidratos pueden ser divididos en cuatro clases: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (Tabla 4-13) (Vogel 1997; Murray 2003)

Clasificación	Número de unidades	subclasificación	Ejemplos	
			Aldosas	Cetosas
monosacáridos	1 sacáridos	Triosas (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )	Glicerol	Dihidroxiacetona
		Tetrosas (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> )	Eritrosa	Eritrulosa
		pentosas (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	Ribosa	Ribulosa
		hexosas(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Glucosa	Fructosa
		Heptosas (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> )	L-glicerol-D-mano-heptosa	Sedoheptulosa
Disacáridos	2 sacáridos	No tiene	Maltosa	Sacarosa
Oligosacaridos	De 2 a 10 sacáridos	No tiene	Maltotriosa	Inulina
Polisacáridos	10 o más sacáridos	No tiene	Almidón	Dextrinas

**Tabla 4-13** Clasificación de carbohidratos

#### 4.10.1 Los monosacáridos

Son los carbohidratos más sencillos de cadena carbonada lineal en los cuales se involucran 3 a 7 átomos de carbono y no pueden ser degradados a sacáridos más sencillos (Holme 1998; Fernandez 2005; Murray 2003). Estos poseen un grupo funcional que para el caso de los aldehído (-CHO) es un carbonilo (Figura. 4-12) que se encuentra unido en los extremos del mono sacárido. Para el caso de las aldosas el grupo funcional cetosas (-CO-) se encuentra dentro de la estructura del mono sacárido.

$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\   \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{HO}^2\text{CH} - \text{C} - \text{C} - \text{CHO} \\   \quad   \quad   \\ \text{HO} \quad \text{HO} \quad \text{HO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{HO} \quad \text{HO} \\   \quad   \quad   \\ \text{HO}^2\text{CH} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{CHO} \\   \quad   \quad   \\ \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
D-Glicerosa (D-Gliceraldehido)	D-Eritosa	D-Lixosa

D-Xilosa	D-Arabinosa	D-Ribosa
D-Galactosa	D-Manosa	D-Glucosa

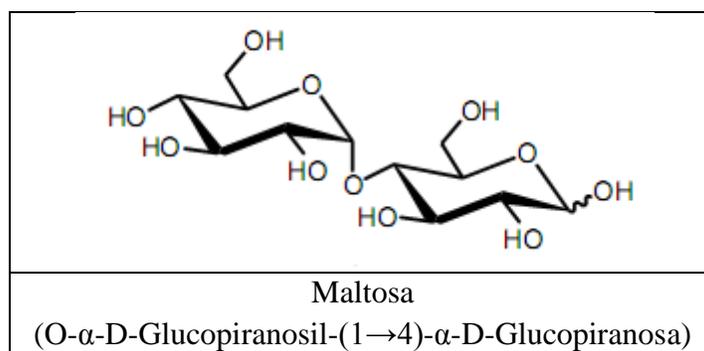
**Figura. 4-12** Ejemplos de aldosas (Murray 2003)

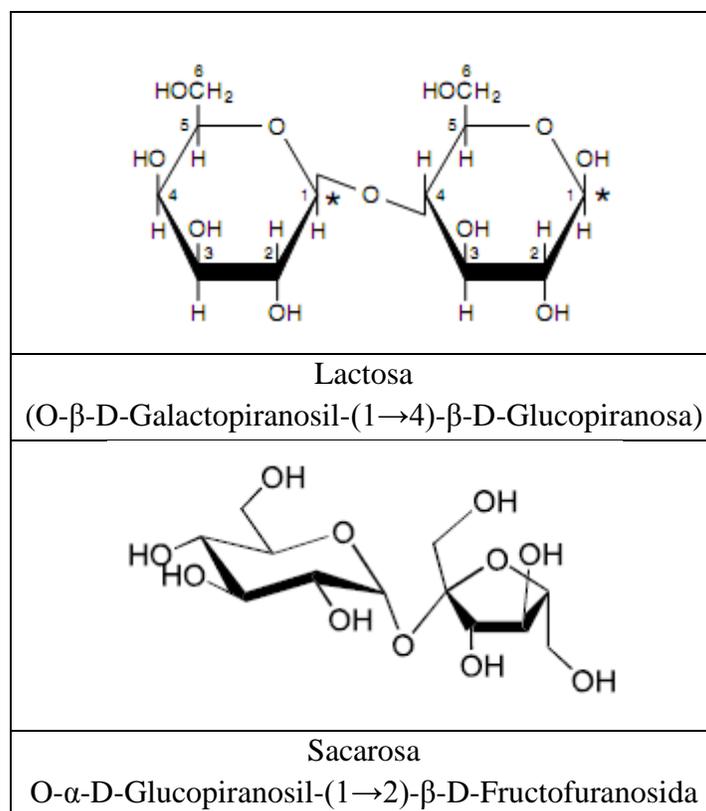
Dihidroxiacetona	D-Xilulosa	D-Ribulosa
D-Fructosa	D-Sedoheptulosa	

**Figura. 4-13** Ejemplo de cetosas (Murray 2003)

#### 4.10.2 Los disacáridos

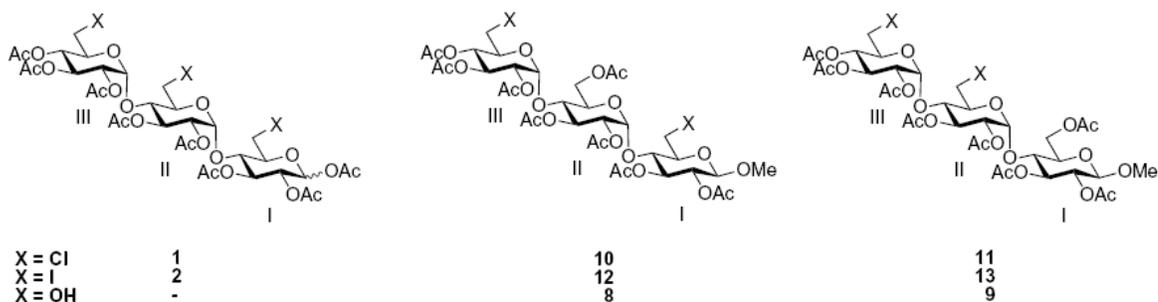
Es la condensación de productos de dos monosacáridos unidos en una molécula, como ejemplo se tienen la sacarosa que es una mezcla de glucosa y fructosa, este tipo de azúcares pueden llegar a ser denominados azúcares invertidos.





**Figura. 4-14** Ejemplos de disacáridos (Murray 2003; Potier 2001; Robert V & Spencer J 2009)

Los enlaces de unión de los disacáridos se encuentran entre el carbón anomérico<sup>18</sup> y el anomérico tras la pérdida de una molécula de agua mediante un enlace glicosídico aunque existen excepciones.(Bailey 1995; Robert V & Spencer J 2009; Fernandez 2005)



**Figura. 4-15** Derivados de la estructura de maltotriosa, (los números romanos ubicados debajo de los anillos glucopiranosidicos de cada unidad son usados para indicar el protón asociado al carbón) (Thiebault et al. 2008)

<sup>18</sup> isómeros del monosacárido de más de 5 átomos de carbono que han desarrollado una unión hemiacetalica, lo que les permitió tomar una estructura cíclica y determinar 2 diferentes posiciones para el ion hidroxilo (α o β).(Robert V & Spencer J 2009)

### 4.10.3 Los oligosacaridos.

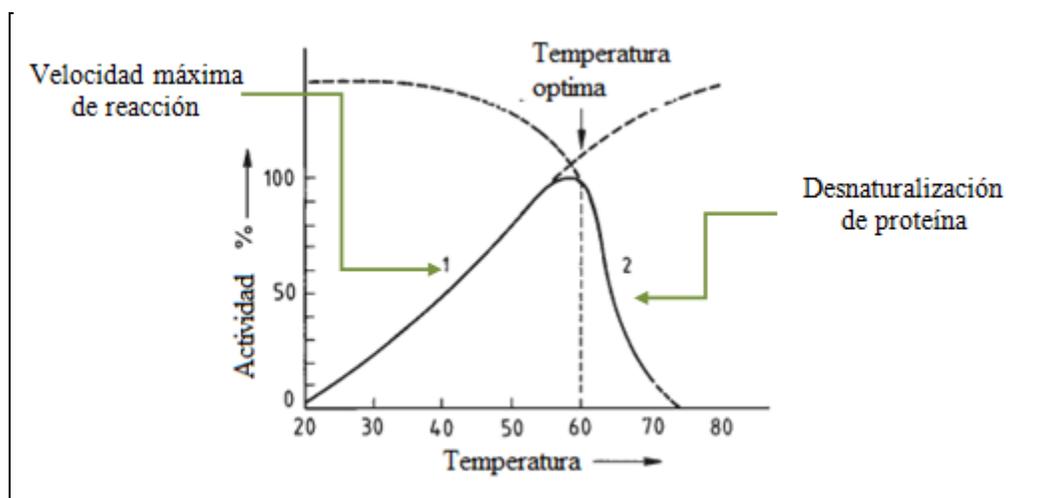
Es la condensación de moléculas de monosacáridos entre de 2 a 10 unidades, mediante enlaces glicosídicos. Existe un gran número de ellos en la naturaleza ya que pueden variar tanto en el número de unidades que componen la molécula como en las ramificaciones y tipo de enlaces que pueden obtenerse.

Los oligosacaridos se encuentran principalmente en la superficie exterior de la membrana celular, enlazados a moléculas de proteínas o de lípidos, debido a la capacidad que tienen de almacenar información cumpliendo la función de reconocimiento celular.

## 4.11 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA.

### 4.11.1 Temperatura.

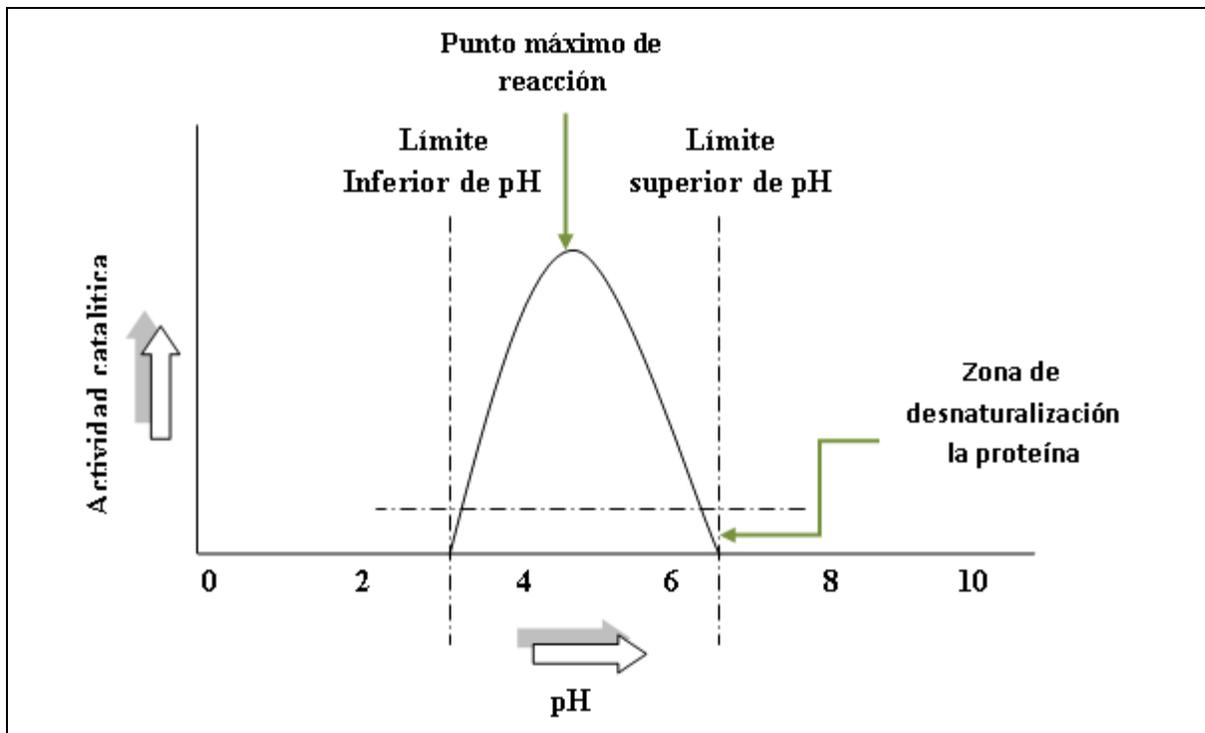
Las reacciones enzimáticas catalíticas obtienen las condiciones óptimas de reacción al encontrar la temperatura más adecuada para llevar a cabo la reacción (Figura. 4-16). La existencia de una dependencia directa entre el incremento termodinámico y la tasa de reacción hasta cierto punto donde la enzima es desnaturalizada. La temperatura óptima de reacción es dependiente del tipo de enzima y proceso que se pretende utilizar (Marangoni 2003; Aehle 2004)



**Figura. 4-16** Temperatura óptima de la actividad enzimática

### 4.11.2 pH

Todas las enzimas tienen un pH óptimo de actividad o supervivencia el cual se encuentra entre un valor mínimo y máximo y es altamente dependiente de la temperatura, el sustrato y la concentración de enzimas. El pH es una función logarítmica que representa el cambio de 10 unidades de hidrógeno por cada unidad de pH lo que significa que un pequeño cambio puede ocasionar la desnaturalización de la proteína. (Madigan 2008; Aehle 2004)



#### 4.11.3 Activación de proteínas *cofactores*.

Los iones metálicos sirven para una variedad de funciones en la proteína. Estos iones pueden estar directamente implicados en los procesos catalíticos durante la reacción enzimática o pueden participar en reacciones de transferencia de electrones o en las reacciones redox. A menudo los iones metálicos cumplen con un rol estructural estabilizando la macromolécula para cumplir con las funciones biológicas (Glusker 1991). Estos iones metálicos pueden encontrarse en las interfaces de dominio de la estructura de la enzima o entre los residuos alejados de la secuencia de aminoácidos. Cuando se localiza sobre la superficie de la proteína, los iones metálicos pueden contribuir a las interacciones que conducen a la formación de complejos con otras proteínas o membranas. Sin embargo casi siempre se dificulta el uso de proteínas con compuestos metálicos libres ya que estas son usualmente menos estables y difícilmente cristalizables (McPhalen et al. 1991)

Estudios adelantados por (Machius et al. 1998) han demostrado que dentro de la estructura de las enzimas amilolíticas el componente metálico más abundante está dado por el calcio seguido por el sodio, confirmando que el uso de este tipo de metales permite la activación de la enzima como fue determinado por (Vallee et al. 1959) proporcionando una mayor termoestabilidad a la enzima.

Por otra parte la dependencia metálica de las diferentes clases de hidrolasas, permiten mediante la combinación de diferentes cofactores con una cadena de aminoácidos realizar la hidrólisis catalítica de una variedad biológica de sustratos que incluyen carbohidratos, péptidos/proteínas, nucleótidos, fosfodiésteres y xenobióticos. Los cofactores iónicos de

metales, comúnmente utilizados por las hidrolasas son  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . Entre las propiedades más representativas que presentan estos cofactores en los procesos de reacción se encuentran la acidificación de Lewis, el número flexibles de coordinaciones y la geometría y el rápido relación de cambio de los enlaces. Juntas estas propiedades aceleran la hidrólisis del sustrato mejorando o compartiendo la reactividad de los nucleófilos de agua y la estabilización del producto intermedio de reacción.

#### **4.11.4 Inhibición (Aehle 2004).**

Los mecanismos de acción de muchas sustancias tóxicas y antídotos han sido un factor determinante en la actividad de la enzima, ya que estos afectan los mecanismos de reacción y en algunos casos o la estructura de la enzima. Existen dos tipo de inhibición, el primero consiste en la *inhibición irreversible* en la cual los componentes tóxicos forman componentes estables con la enzima al crear enlaces covalentes con los aminoácidos residuales de del sitio activo. Por su parte las *inhibiciones reversibles* se caracterizan por generar un estado de equilibrio entre la enzima y el inhibidor. Algunas clases de inhibidores son:

- Inhibidores competitivos. Se relaciona con el sustrato o con otra enzima por los enlaces que se presentan con el centro activo por la formación de un complejo enzima – inhibidor
- Inhibidores no competitivos se presentan por el decrecimiento de la actividad catalítica de la enzima cuando existe una influencia externa en la relación sustrato enzima. La velocidad de inactivación depende de la concentración del inhibidor y no del sustrato.

#### **4.11.5 Concentración de sustrato**

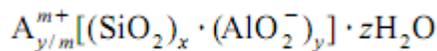
La cantidad de sustrato utilizado para la reacción catalizada enzimáticamente afecta la naturaleza de la relación enzima – sustrato afectando las funciones estructurales que los relacionan y confieren las características de selectividad ocasionando una inestabilidad de la enzima.

#### **4.11.6 Materiales porosos (Material zeolítico)**

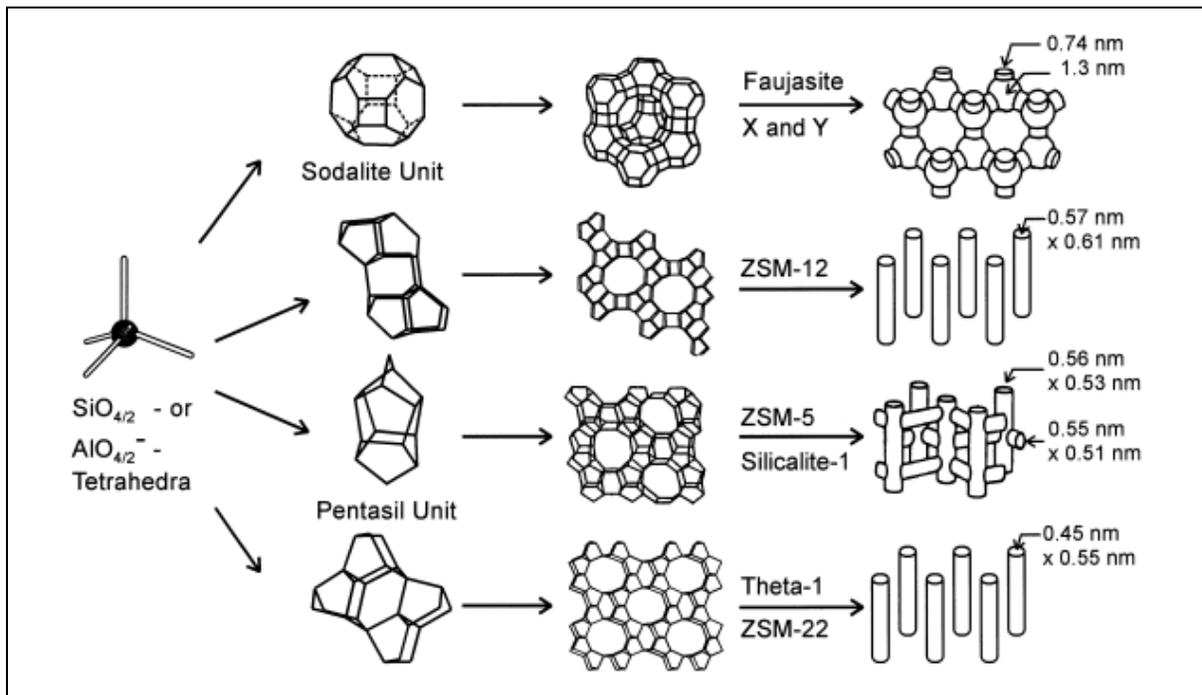
Hace 250 años los minerales aluminosilicatos, han sido frecuentemente estudiados debido al gran interés que se presenta en los usos catalíticos y biocatalíticos. Sin embargo sus formas naturales tienen un valor limitado debido a la presencia de impurezas y diferentes variaciones configuracionales y estructurales que afectan el pleno desarrollo de las reacciones (Davis 1998; Weitkamp 2000). Por su parte un nuevo tipo de zeolitas *in situ* ha sido desarrollado artificialmente utilizando altas presiones y temperaturas con diferentes medios de reacción (Ghobarkar et al. 1999).

Los elementos estructurales principales de las zeolitas son  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  tetraédrico que están unidos por enlaces elementales. Los enlaces adyacentes tetraédricos son enlazados en sus esquinas a través de un átomo de oxígeno, obteniendo una macromolécula inorgánica con una estructura diferente de marco tridimensional obteniendo una estructura tetraédrica  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_2^-$ . Una carga negativa reside en cada tetraedro del marco el cual se encuentra en el centro de la alúmina. Este marco denominado zeolita contiene canales, intersecciones y jaulas con dimensiones que van desde los 0.1 nm. Dentro de estas cavidades pequeñas moléculas de agua y cationes compensan la carga negativa del marco para mantenerlo. Por lo tanto la composición química de una zeolita puede ser representada por la ecuación Ecuación 4-2 .(Weitkamp 2000)

**Ecuación 4-2** Representación química de la zeolita



Donde A es el catión con una carga m, (x+y) que es un número del tetraedro por unidades de celda cristalográfica y x/y es llamado marco de la relación silicón/aluminio  $n_{\text{Si}}/n_{\text{Al}}$  (Davis 1998; Weitkamp 2000).



**Figura. 4-17** Estructura de cuatro zeolitas (de arriba para abajo: Feldespatos o zeolita X,Y; Zeolita ZSM-12; Zeolita ZSM-5 o silicalita-1; zeolita teta-1 o ZSM-22) y sus sistemas macroporoso y dimensionales (Weitkamp 2000)

Por otra parte componentes como  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  pueden reemplazar los iones no trivalentes de  $\text{Si}^{4+}$  en el marco de la zeolita, obteniendo cambios significativos tanto en su

estructura como en sus propiedades funcionales como la fuerza de acides o en el balance de protones. (Davis 1998)

Entre las principales características las zeolitas se distinguen por su gran superficie interna y externa de las moléculas, selectividad para absorber moléculas de diferentes tamaños, alto grado de hidratación y deshidratación, habilidad de absorber gases y vapores y su alta estabilidad térmica.(Hernández 2005).

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS.**

La investigación sobre el proceso de producción de azúcares fermentables por hidrólisis de almidón de yuca con un catalizador enzimático, presentó una serie de etapas que debieron ser ampliamente estudiadas: la selección de la materia prima, estudio de la actividad de las enzimas, selección del proceso enzimático con las enzimas, diseño del biocatalizador inmovilizado, para finalmente estudiar algunas condiciones del proceso enzimático libre e inmovilizado.

Inicialmente la investigación se enfocó en las características de la materia prima, permitiendo así el conocimiento exhaustivo del material a trabajar, adicionalmente fueron priorizados los factores que mayor relevancia tenían en la cinética de la reacción; esto permitió reducir el número de variedades de yuca adecuadas para llevar a cabo el proceso. Posteriormente se realizó la selección del catalizador enzimático más adecuado durante un proceso de hidrólisis a baja temperatura ( $T < 65^{\circ}\text{C}$ ), en este estudio se utilizaron tres tipos de catalizadores diferentes, un complejo enzimático denominado STARGEN<sup>TM</sup>001 que trabajó a temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$  y tuvo una doble funcionalidad (rompimiento de los enlaces 1-4 y 1-6), y un par enzimático compuesto por GC626 ( $\alpha$  amilasa) y G-ZYME<sup>®</sup>480 Ethanol (enzima sacarificante amiloglucosidasa) que trabajaron sinérgicamente a temperaturas entre  $62$  y  $65^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se inició un proceso de identificación de la secuencia de adición ya que este parámetro afecta los tiempos de proceso aumentando los gastos energéticos y el tamaño de los recipientes de almacenamiento; el penúltimo paso fue la etapa de reconocimiento de las características del sistema de inmovilización por atrapamiento, lo que permitió encontrar la relación más adecuada de alginato-zeolita-enzima de mejor desempeño en la producción de azúcares fermentables. Finalmente se estudió mediante un diseño factorial la hidrólisis enzimática del almidón para tres variedades de yuca a tres concentraciones distintas, probando las enzimas en estado libre e inmovilizado, obteniendo de esta manera las condiciones de proceso más adecuadas para ser aplicados en la región amazónica colombiana.

### **5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIEDADES DE YUCA AMAZÓNICA Y SU ALMIDÓN.**

23 variedades de yuca fueron analizadas en dos etapas, la primera etapa correspondió a las características fisicoquímicas de la pulpa de yuca descortezada<sup>19</sup>, para lo que se determinó el contenido de materia seca, cenizas, almidón total, almidón libre, acidez titulable y pH. La segunda etapa correspondió a los análisis realizados sobre el almidón de cada variedad, donde se identificó la temperatura de gelatinización, el índice de absorción en agua, el índice de solubilidad en agua, el poder de hinchamiento, la relación de amilosa/amilopectina, la susceptibilidad a hidrólisis y el contenido de proteína.

---

<sup>19</sup> Correspondiente a las secciones de peridemis, esclerénquima, parénquima y floema

La gran mayoría de análisis fueron adelantados en el laboratorio poscosecha del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, el Instituto de Ciencia de Tecnología de alimentos (ICTA) y el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (LIQ).

La información obtenida (tres replicas por análisis) fue comparada contra una yuca comercial de la variedad armenia (HMC-1), mediante un modelo de efecto aleatorio y comparación múltiple empleando el paquete estadístico Statistix 9.0.

### **5.1.1 Materia prima.**

23 variedades de yuca amazónica nativa fueron cosechadas en el plano inundable del Río Amazonas sector Isla de la Fantasía. Las variedades recolectadas fueron cultivadas en un núcleo productivo ubicado en el relieve plano del km 11 vía Leticia-Tarapacá, (latitud 4°12'19 S, longitud 69°55'58 w, altitud 96 msnm, temperatura promedio 28°C y humedad relativa 76%).

Los tubérculos cosechados fueron empacados en bolsas de polietileno calibre 30 debidamente marcados para su envío el mismo día vía aérea a los laboratorios de Bogotá para su análisis.

### **5.1.2 Preparación de muestras.**

Las variedades de yuca fueron lavadas con abundante agua y desinfectadas con hipoclorito de sodio en una concentración de 400 ppm. A continuación, la yuca fue pelada (descortezada) manualmente y almacenada a  $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 7 días máximos para la extracción de almidones y 30 días máximos para el análisis de la pulpa.

## **5.2 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LA PULPA.**

### **5.2.1 Sólidos totales.**

Este análisis está basado en la norma técnica NREL/TP-510-42621 para biomasa (A. Sluiter et al. 2008) con el fin de determinar el contenido de materia seca, la cantidad de humedad y el contenido de sólidos presentes en la muestra que son características físicas y conformacionales del material a analizar (Anexo A1). Para el procedimiento se utilizó una balanza analítica A&D serie HR 200 con precisión de 0.0001 mg y una estufa de secado marca Thermo Scientific HERAEUS Modelo: UT6060 EU28 que trabajó a 70 °C por 32°C.

### **5.2.2 Cenizas.**

El procedimiento empleado se basó en la norma técnica NREL/TP-510-42622 para biomasa realizada por (A. Sluiter et al. 2005), con el fin de identificar la cantidad de material inorgánico como sales y metales que se encuentra enlazados a la estructura física en la biomasa. La determinación del valor cuantitativo de este material se realiza por la medición

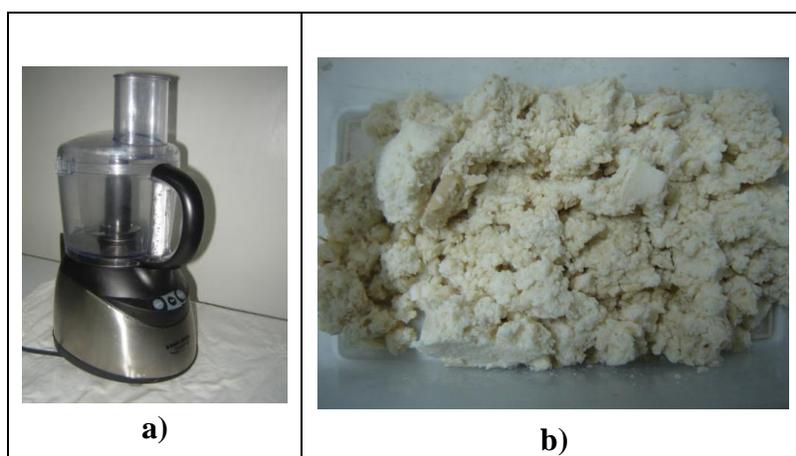
del remanente obtenido tras un proceso de incineración (Anexo A2). Para el procedimiento se utilizó una balanza analítica A&D serie: HR 200 con precisión de 0.0001 mg y una mufla de laboratorio marca THERM CONCEPT Modelo: TC-0011 que trabajó a 575°C por  $24 \pm 6$  horas (Anexo A2)

### 5.2.3 Almidón total por HPLC.

Basado en las normas técnicas para biomasa NREL/TP-510-42624, 996.11, AACC método 76.13, y ICC método estándar No 168. Propuesta por (A. Sluiter & J. Sluiter 2005), el procedimiento consiste en relacionar el contenido de almidón presente en la muestra con el contenido de dextrinas totales obtenidas después de un proceso de hidrólisis enzimático (Anexo A3). Las muestras son analizadas por cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC utilizando un equipo Agilent Technologies 1200, dotado con un detector de índice de refracción (RID), usando una columna AMINEX-HPX 87H (Biorad, 300 x 7.8 mm), como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM (Anexo 9)

### 5.2.4 Almidón libre.

2.000 gramos de cada variedad de yuca fueron lavados, descortezados y desinfectados en una solución acuosa de hipoclorito de sodio a 400 ppm durante 30 minutos. Las muestras fueron rayadas con un triturador de cuchillas controlando el tamaño de la partícula entre 1 y 3 mm de diámetro Figura. 5-1, posteriormente la muestra fue colocada sobre un tamiz de lienzo comercial (L1).



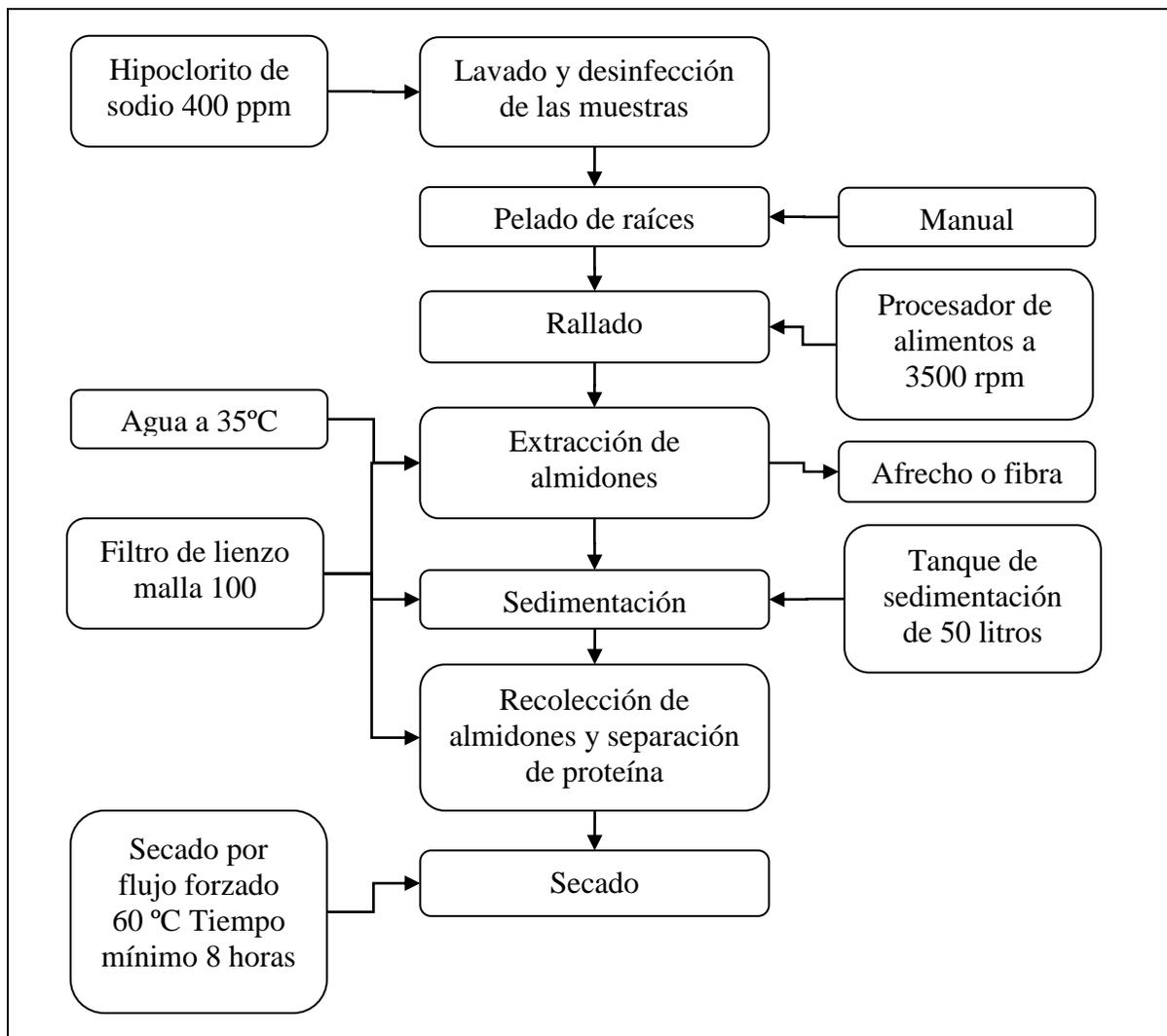
**Figura. 5-1** a) procesador de alimentos Black&Decker “powerPro II a 3.500 rpm, b) yuca rayada.

A continuación, sobre un tanque de 25 litros provisto de un prefiltro de lienzo (L2) (ubicado 10 cm del fondo), se colocó el tamiz L1 que contenía la muestra. (Figura. 5-3)

Las muestras fueron lavadas sobre el tanque con 20 litros de agua a 35°C, permitiendo que el líquido pasara a través de L1 y se retuvieran en el tanque. Terminado el lavado el

afrecho<sup>20</sup> fue retirado de L1, el cual fue esparcido sobre una bandeja plástica para ser llevado al secador. La lechada de yuca<sup>21</sup> se transportó en el tanque a un sector seco donde se dejó decantar por un periodo de 16 horas a la sombra, lo que permitió la separación de los almidones por diferencia de densidades y pesos moleculares (Figura. 5-3;Figura. 5-4).

Pasado el tiempo de sedimentación, dos productos son obtenidos de las diferentes secciones del tanque: mancha (sobre el prefiltro L2) y el almidón (en el fondo del tanque) los cuales fueron retirados y colocados en bandejas plásticas, que luego son introducidas en compañía del afrecho en un horno con flujo forzado de aire durante 24 horas, que trabaja a una temperatura de 75°C y caudal de 15.75 CFM<sup>22</sup> construido en el laboratorio poscosecha del instituto SINCHI.



**Figura. 5-2** Metodología de adecuación de muestras (Autor)

<sup>20</sup> Material Lignocelulosico sobrante, obtenido del procesos de filtración de almidón

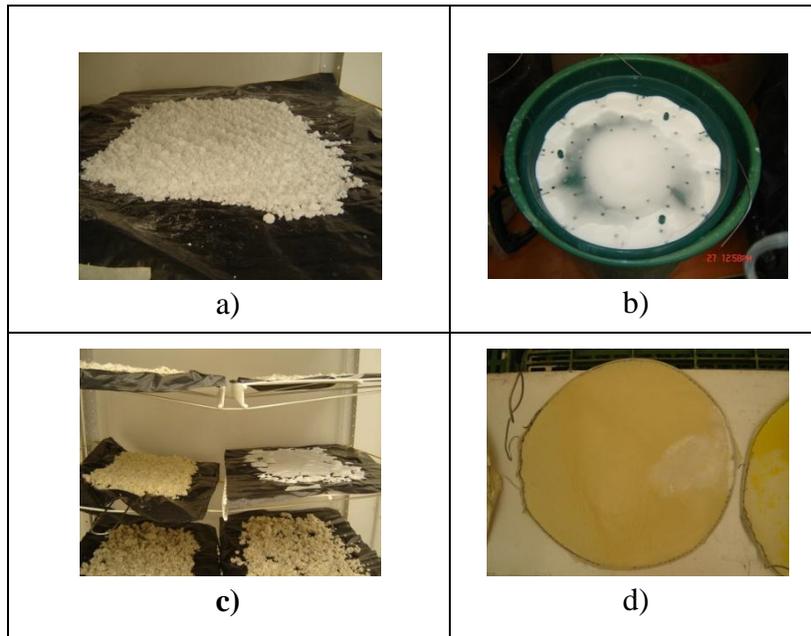
<sup>21</sup> Agua de lavado de la yuca compuesta principalmente por almidón y unas fracciones de proteína y lípidos

<sup>22</sup> Pies Cúbicos por Minuto



**Figura. 5-3** a) Tanque de lavado de yuca de 25 L y pre-filtro de fondo b) Lechada de yuca después de lavado.

El afrecho, la mancha y el almidón fueron revisados y volteados con el fin de permitir un secado uniforme a óptimas condiciones de operación. Cada tres horas se tomó el peso hasta obtener un valor constante, momento en el cual se garantizó el mínimo contenido de humedad de las muestras.



**Figura. 5-4** a) almidón final obtenido después de secado, b) fondos recogidos después del proceso de decantación, c) proceso de secado en bandejas del almidón después de decantación d) mancha recogido en el prefiltro (L2)

Tanto el almidón, como la mancha<sup>23</sup> y el afrecho fueron pesados (Figura. 5-4). Los datos se tabularon y analizaron posteriormente. Cada producto fue almacenado en bolsas de polietileno negro evitando la degradación, contaminación o modificación que puede ocasionar la exposición a la luz solar y el ambiente (Anexo A4).

### **5.3 ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE EL ALMIDÓN.**

#### **5.3.1 Temperatura de gelatinización.**

Basado en la técnica utilizada por (Aristizábal & Sánchez 2007; Grace 1977), donde se desea encontrar una temperatura a la cual se presenta un hinchamiento en los gránulos de almidón por hidratación, debido a una alteración de la estructura molecular produciendo la lixiviación de la amilosa luego de ser sometido a un calentamiento regular (Anexo A5)

#### **5.3.2 Índice de absorción en agua, índice de solubilidad y poder de hinchamiento.**

Los análisis del índice de absorción de agua, índice de solubilidad en agua y el poder de hinchamiento se basaron en la metodología propuesta por (Aristizábal & Sánchez 2007) donde la capacidad de absorción de agua de un granulo y la exudación de las fracciones de almidón, son determinadas mediante la cuantificación del poder de hinchamiento generado por la absorción progresiva e irreversible de agua, durante el calentamiento de la suspensión. (Anexo A6)

#### **5.3.3 Contenido de amilosa.**

El análisis se realizó basado en lo propuesto por (Wrolstad 2000), en el cual se debe inicialmente liberar los almidones de la mayor cantidad de lípidos posibles, posteriormente se inicia un proceso de dispersión del almidón para finalmente realizar la medición del dato mediante absorbancia. (Anexo A7)

#### **5.3.4 Susceptibilidad a la hidrólisis.**

La identificación de los almidones que tienen una mayor posibilidad de ser degradados a sacáridos de menor peso molecular como glucosa, maltosa o fructosa a temperaturas bajas se basa en el comportamiento de las cadenas glucosídicas de los almidones durante la catálisis de la enzima STARGEN<sup>TM</sup>001 en la fase de mayor actividad,.

Basado en los experimentos realizados por (Tanaka 2002; Wrolstad et al. 2005; Whitaker 2003; Bernfeld 1955; GENENCOR 2007; GENENCOR 2004; GENENCOR 1999; Shariffa et al. 2009) un reactores de vidrio enchaquetado donde circula agua a 30°C. ± 2 con un recirculador marca LAUDA serie: Ecoline, se deja reaccionar 2.273 (µL de solución

---

<sup>23</sup> Material proteico de color amarillo que fue separado de las fracciones de almidón mediante el uso del prefilto L2

enzimática/gramo de almidón) de la enzima STARGEN<sup>TM</sup>001 por un periodo de 10 minutos a una concentración de sustrato del 20%. La agitación se lleva a cabo con un magneto de 4 centímetros que es impulsado por una plancha de calentamiento marca CIMAREC DIG 115V serie: STIR 7X7. A 100 rpm (anexo A8)

### **5.3.5 Contenido de proteína.**

Basado en el método Kjeldahl para la determinación del contenido de nitrógeno total el cual mediante un factor de conversión, el dato es homologado al contenido de proteína. El procedimiento se basa en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico usando  $\text{CuSO}_4/\text{TiO}_2$  como catalizador, convirtiendo el N en  $\text{NH}_3$ . (Wrolstad 2000).

## **5.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES PROMISORIAS PARA SU TRANSFORMACIÓN EN AZÚCARES FERMENTABLES.**

Cuatro características fueron tomadas en cuenta para la selección de la variedad según los criterios físico-químicos y la evaluación realizada por expertos de la Universidad Nacional en cooperación con científicos del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi.

Es así como se tomó en cuenta el contenido de almidón libre que es uno de los patrones iniciales de selección a nivel industrial, el contenido de almidón libre se relaciona directamente con el mínimo material de yuca aprovechable, por eso diferentes industrias buscan un contenido de almidón libre superior al 18% (bh) lo que permite tener un balance positivo en el flujo de caja (Drapcho 2008a).

Otra de las características esenciales para la selección de una variedad promisorias se encuentra relacionada con el contenido de proteína, estudios realizados por (Han 2002a; Han 2002b; Buléon 1998; BeMiller 2009; Richard F. Tester et al. 2004c; J Liu et al. 2009; Debet & M Gidley 2006) muestran como el contenido de proteína afecta la viscosidad en solución, la temperatura de hinchamiento y el hinchamiento del almidón, esta última asociada a la accesibilidad de la enzima sobre las regiones amorfa y cristalina del gránulo (Martín & López 2006; Watcharatewinkul et al. 2009; Debet & M Gidley 2006) y está dada por la relacionado del complejo lipido-proteína- $\alpha$ \_glucanos presentes sobre la superficie de la partícula (J Liu et al. 2009; Debet & M Gidley 2006; Richard F. Tester et al. 2004b).

Una tercera característica se encuentra dominada por la relación de amilosa/amilopectina en la partícula de almidón la cual afecta la cristalinidad del granulo y la complejidad del polisacárido lo que determina la estabilidad de la partícula de almidón, la complejidad de sus enlaces y su capacidad de dispersión en solución lo que afecta la actividad catalítica (R Tester et al. 2006; Richard F. Tester et al. 2004c; Marangoni 2003)

La última característica es la susceptibilidad a hidrólisis, la cual bajo condiciones controladas de pH (4.5), temperatura (32°C), concentración de enzima (2.273 µL de solución enzimática de STARGEN<sup>TM</sup>001/gramo de almidón) y concentración de sustrato (20% w/v) se dejó reaccionar la enzima durante 10 minutos (tiempo de máxima actividad) determinando la producción de dextrinas de cada muestra siguiendo el procedimiento propuesto por (Tanaka 2002; Wrolstad et al. 2005; Whitaker 2003; Bernfeld 1955; GENENCOR 2007; GENENCOR 2004; GENENCOR 1999; Shariffa et al. 2009) con las modificaciones respectivas, esto con el fin de conocer el comportamiento del almidón durante una hidrólisis a baja temperatura a las mejores condiciones de reacción.

Criterio de selección	Peso de ponderación
Contenido de proteína (CP)	5 %
Contenido de amilosa (AA)	10%
Rendimiento de almidón (RA)	40%
Susceptibilidad a hidrólisis (DE)	45%

**Tabla 5-1** Peso ponderado de variables caracterizadas de yuca Amazónica (*M. Esculenta*) colectada de la ciudad de Leticia

Para la selección de los mejores materiales para la producción de azúcares fermentables se utilizó el método de ponderación de factores, éste se basa en la asignación de un peso a cada factor analizado de acuerdo con su importancia relativa en el proceso bajo el criterio de expertos en la materia. Los pesos empleados para cada factor analizado se muestran en la Tabla 5-1 y su ponderación se evaluó según la Ecuación 5-1, los resultados obtenidos fueron analizados con el modelo de factores aleatorios para luego diferenciar los posibles grupos mediante su media aritmética con el método de Tukey.

**Ecuación 5-1** Ponderación de datos para la yuca Amazónica (*M. Esculenta*) colectada de la ciudad de Leticia

$$f = AA \times n_{AA} + CP \times n_{CP} + RA \times n_{RA} + DE \times n_{DE}$$

## 5.5 SELECCIÓN DE LA ENZIMA AMILOLÍTICA.

La selección de la enzima amilolítica más adecuada para un proceso de hidrólisis enzimática en la región amazónica colombiana tuvo en cuenta la acción biocatalítica a baja temperatura (inferiores a 70°C), las cuales en el mercado son ofrecidas por la empresa Genencore de la división Danisco, distribuidas por Merquiand LTDA para Colombia. El análisis de las enzimas se inició al definir la actividad enzimática la cual es comparada con la ficha técnica del producto, seguidamente se hace un análisis del tiempo de reacción estimado para la hidrólisis y finalmente se realiza un seguimiento cinético de las tres enzimas de estudio conocidas comercialmente como STARGEN<sup>TM</sup>001 (complejo enzimático de amilasas), GC626 (α amilasa) y G-ZYME<sup>®</sup>480 (glucoamilasa)

### 5.5.1 Determinación de la Actividad Enzimática.

La actividad fue determinada de acuerdo al procedimiento propuesto por (Tanaka 2002; Wrolstad et al. 2005; Whitaker 2003; Bernfeld 1955; GENENCOR 2007; GENENCOR 2004; GENENCOR 1999; Shariffa et al. 2009) con algunas modificaciones. El método inicia determinando el tiempo donde se presenta la linealidad de la reacción (generalmente se estima en 5 minutos), a continuación se hace el cálculo de la actividad en el tiempo estimado.

#### Estado lineal de la reacción.

El estado lineal de la hidrólisis fue seleccionado al reaccionar las enzimas por un periodo de 20 minutos (alícuotas de 1 mL cada 2 minutos) a un de pH  $4.5 \pm 0.3$  y concentración de sustrato 0.6% (w/v almidón de papa Merck grado analítico) en un reactor de vidrio enchaquetado con control de temperatura (marca LAUDA serie: Ecoline), pH y agitación magnética (plancha de calentamiento marca CIMAREC DIG 115V serie: STIR 7X7. A 100 rpm). La concentración de enzima estuvo dada por las recomendaciones del fabricantes que son: 2.273  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para **STARGEN<sup>TM</sup>001**, 0.438  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para  $\alpha$  amilasa **GC626** y 0.8849  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para la glucoamilasa **G-ZYME<sup>®</sup>480**) (GENENCOR 2008; GENENCOR 2004; GENENCOR 2005), a temperaturas de operación de  $32^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  para **STARGEN<sup>TM</sup>001** y  $63^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  para **GC626** y **G-ZYME<sup>®</sup>480**. La adecuación del medio al pH estuvo dada por una solución de Acetato de sodio buffer 0.1M-pH 4.3 y la neutralización con hidróxido de sodio 1N.

La reacción fue detenida utilizando 1 mL de buffer de borato stop (ANEXO A8) que se encontraba dentro de un ependorf de 2 mL donde fue tomada la muestra. Las muestras son centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a  $10^\circ\text{C}$ , filtradas por un diámetro de poro de 0.24  $\mu\text{m}$  y analizadas por cromatografía líquida (ANEXO A9). Los resultados fueron graficados lo que permite determinar la zona lineal.

#### Actividad enzimática.

Tres diferentes concentraciones (0.6, 1.5 y 3% w/v) de almidón de papa (marca Merck grado analítico) fueron preparadas en 40 ml de agua desionizada y esterilizada, para ser reaccionados por una concentración de enzima al 3% dada por 2.273  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para **STARGEN<sup>TM</sup>001**, 0.438  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para  $\alpha$  amilasa **GC626** y 0.8849  $\mu\text{L}$  enzima/g almidón para la glucoamilasa **G-ZYME<sup>®</sup>480**) (GENENCOR 2008; GENENCOR 2004; GENENCOR 2005). La reacción se llevó a cabo a una velocidad de agitación orbital de 100 rpm y la suspensión fue acidificada con un buffer de acetato de sodio (pH  $4.3 \pm 0.2$ ) a un pH de  $4.5 \pm 0.3$

La reacción se lleva a cabo durante el tiempo estimado en *Estado lineal de la reacción* a las condiciones para cada enzima de:  $35^\circ\text{C} \pm 2$  para **STARGEN<sup>TM</sup>001**,  $63^\circ\text{C} \pm 2$  para  $\alpha$  amilasa **GC626** y glucoamilasa **G-ZYME<sup>®</sup>480**. Para todas las enzimas se midió la

producción de dextrinas para el periodo de reacción. Estas concentraciones fueron cuantificadas mediante HPLC. La reacción se detuvo mediante el cambio de pH con buffer de borato 200 mM (pH 9.5). Con esta información se realizó un gráfico de producción de glucosa vs porcentaje de almidón, obteniendo la actividad en g glucosa/g almidón (U). Finalmente se realizó una comparación entre la actividad reportada por la ficha técnica y la actividad obtenida del método empleado.

### **5.5.2 Selección del tiempo de reacción.**

El procedimiento para la selección del tiempo de reacción se basó en el comportamiento cinético de las enzimas GC626 (E1), G-ZYME<sup>R</sup>480 (E2) y STARGEN<sup>TM</sup>001 (E3) por separado durante veinticuatro horas (24 h) a una concentración de sustrato del 12% de almidón de yuca variedad *Arpón* en 250 mL de agua destilada y esterilizada; el pH utilizado fue 4.5 para todos los tratamientos y las temperaturas de proceso fueron 63 °C para E1 y E2 y 35 °C para E3. Las dosis utilizadas de enzima se determinó con base a lo propuesto en las fichas técnicas de los productos, por tanto para E1 se utilizaron 60 µL de enzima que es la dosis recomendada para 316 gr de almidón, 10 µL de E2 que es la dosis recomendada para 20 gr de almidón debido a su alta actividad y 310 µL que es la dosis recomendada para degradar 316 gr de almidón por la enzima E3 en 350 ml de solución.

### **5.5.3 Selección del proceso de hidrólisis enzimático.**

Tres tratamientos realizados por duplicado fueron evaluados en un reactor enchaquetado de vidrio de 400 mL durante quince horas (24h) a una concentración de sustrato del 12% de almidón de yuca *Arpón* en 350 mL de agua destilada y esterilizada; el pH utilizado fue 4.5 para todos los tratamientos y las temperaturas de proceso fueron 63 °C ± 2 para E1 y E2 y 35 °C ± 2 para E3. Las dosis utilizadas de enzima se determinó con base a lo propuesto en las fichas técnicas de los productos. La selección de la enzima se realizó mediante un diseño completamente aleatorio de los tratamientos utilizando Statistix 9 por comparación de las curvas cinéticas.

El primero de los casos se basó en la inyección de las enzimas GC626 (**E1**), el segundo tratamiento se realizó con la enzima G-ZYME<sup>R</sup>480 (**E2**), el tercer tratamiento se fundamentó en la inyección del complejo enzimático STARGEN<sup>TM</sup>001 durante el periodo total de reacción (**E3**). Los resultados fueron analizados por cromatografía líquida HPLC basados en el cálculo de azúcares totales (Fructosa/L y D-Xilosa/L-Ribosa, Glucosa, Maltosa/D-Sacarosa).

## **5.6 IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN.**

La secuencia de adición es un parámetro que afecta los tiempos de proceso, aumentando los gastos energéticos y el tamaño de los recipientes de almacenamiento; el procedimiento se lleva a cabo con tres tratamientos realizados por duplicado los cuales fueron evaluados en

un reactor enchaquetado de vidrio de 400 mL durante treinta horas (30h), utilizando una concentración de sustrato del 12% de almidón de yuca Y1 en 350 mL de agua destilada y esterilizada; el pH utilizado fue 4.5 para todos los tratamientos y las temperaturas de proceso fueron  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  para E1 y E2 y  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  para E3. Las dosis utilizadas de enzima se determinó con base a lo propuesto en las fichas técnicas de los productos.

Nombre Prueba	Secuencia de enzima
P1S	GC626 (15 h) - G-ZYME <sup>R</sup> 480 (15 h)
P2S	G-ZYME <sup>R</sup> 480 (15 h) - GC626 (15 h)
P3S	GC626/G-ZYME <sup>R</sup> 480 (30 h simultaneo)

**Tabla 5-2** Pruebas experimentales para la identificación y selección de la secuencia de adicción.

La selección del proceso se realizó mediante un diseño completamente aleatorio de los tratamientos, el primer de ellos se basó en la inyección de las enzimas GC626 la cual actuó durante quince horas (15 h) para luego ser inoculada la enzima G-ZYME<sup>R</sup>480 las cuales se dejaron actuar hasta completar el tiempo total de reacción (**P1S**), el segundo tratamiento consistió en la adición de las enzimas con quince horas (15 h) de diferencia iniciando con G-ZYME<sup>R</sup>480 y completando con GC626 (**P2S**), el tercer tratamiento se fundamenta en la inyección de GC626 y G-ZYME<sup>R</sup>480 simultáneamente (**P3S**). Los resultados fueron analizados por cromatografía líquida HPLC basados en el cálculo de azúcares totales (Fructosa/L y D-Xilosa/L-Ribosa, Glucosa, Maltosa/D-Sacarosa).

## 5.7 SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN.

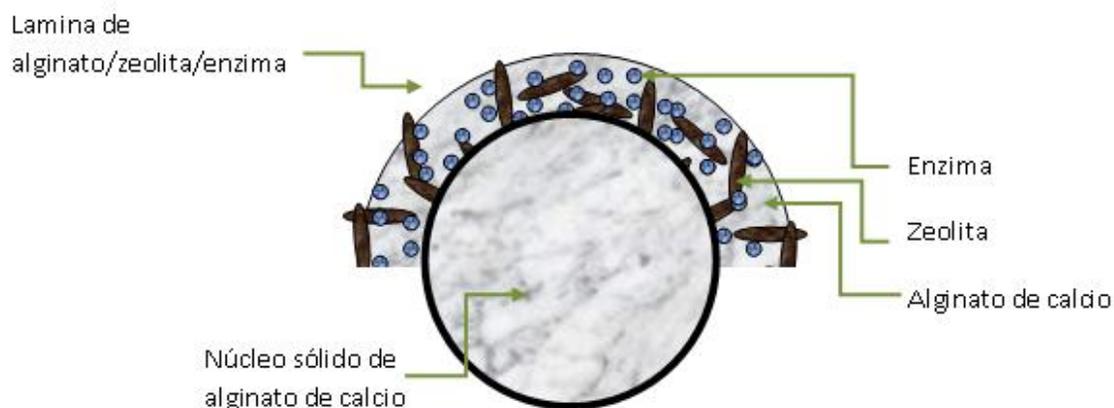
Los diferentes métodos de inmovilización buscan disminuir los gastos ocasionados por el consumo de enzimas debido a su fácil remoción del medio de reacción permitiendo así su reutilización. Esta característica permite la aplicación de los procesos biotecnológicos en zonas que presentan dificultades en la consecución de recursos como es el caso de la región Amazónica Colombiana. Por otra parte distintos métodos de inmovilización logran determinadas características para las reacciones biocatalizadas, sin embargo pensando en la zona de aplicación, el estudio selecciono el método de **atrapamiento en resina polimérica mediante la matriz de alginato de calcio**, principalmente por ser la que presenta una *mayor facilidad durante el procedimiento de inmovilización, presenta una alta estabilidad de la enzima en el inmovilizado y no genera ninguna alteración en las características conformacionales de la enzima*, sin embargo la **alta retención de actividad** por efecto de la baja tasa de transferencia al igual que la **perdida de enzima** por efecto de la geometría esférica que limita la presencia de sustrato en el núcleo por efecto del espesor de la capa puede ver comprometido la utilidad del biocatalizador.

Como ya ha sido mencionado, los factores que alteran la actividad de este tipo de biocatalizadores están relacionados con los requerimientos químicos y físicos (Tabla 4-8) en los que se involucran los diámetros de poro, la porosidad de la matriz, la geometría, el tamaño de la partícula, las fuerzas intermoleculares entre enzima-soporte y la hidrofiliidad del soporte, para lo cual el presente estudio pretendió manipular la geometría y las características físicas de la matriz de inmovilización, al introducir un material poroso de tipo zeolita sobre el gel de alginato que permitió alcanzar la porosidad necesaria para obtener una actividad cercana al estado libre, por su parte se pretendió anular la pérdida de catalizador por efecto de la geometría al incorporar una lámina de tipo coraza que contiene la enzima y el material poroso sobre un núcleo inerte de alginato que sirve como soporte de la coraza.

### 5.7.1 Metodología de inmovilización, biocatalizador de tipo coraza núcleo.

La metodología de inmovilización consistió en la elaboración de una serie de biocatalizadores que manejan una nueva geometría denominada *coraza-núcleo AZE*, la cual consiste en un núcleo inerte de alginato de calcio (Merck para inmovilización) que es recubierto con una lámina de alginato de calcio-material zeolítico que contiene la enzima.

**Figura. 5-5**



**Figura. 5-5** Método de inmovilización de tipo coraza núcleo.

El método de inmovilización utilizado se preparó en dos etapas: La primera de ellas consistió en la producción de un núcleo compuesto por 3% (w/v) de alginato de calcio (Merck para inmovilización) gelificadas en 0,5 M CaCl durante 168 horas utilizando la metodología propuesta por (Serrato B 2004).

El segundo paso se lleva a cabo por el cubrimiento del núcleo con una lámina de *alginato de calcio, material zeolítico y enzima (AZE)*. Para esta lámina la solución utilizó una concentración de enzima y alginato de calcio del 25% y del 3% (w/v) respectivamente, por su parte tres (3) concentraciones de zeolita fueron probadas para las enzimas GC626 ( $\alpha$

amilasa) y G-ZYME<sup>R</sup>480 (glucoamilasa) que fueron de 0%,1%,2% y 3% (w/v) en 50 mL de solución la cual fue llevada a volumen con agua desionizada y esterilizada.

Nombre del biocatalizador	Enzima	Zeolita		Alginato		Solución de Enzima	
		gramos	% w/v	gramos	% w/v	mL	% w/v
AIC <sub>0</sub> A	α amilasa	0.0	0	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>1</sub> A	α amilasa	0.5	1	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>2</sub> A	α amilasa	1.0	2	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>3</sub> A	α amilasa	1.5	3	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>0</sub> G	Glucoamilasa	0.0	0	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>1</sub> G	Glucoamilasa	0.5	1	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>2</sub> G	Glucoamilasa	1.0	2	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>3</sub> G	Glucoamilasa	1.5	3	1.5	3	12.5	25
AIC <sub>4</sub> G	Glucoamilasa	2.0	4	1.5	3	12.5	25

**Tabla 5-3** Metodología de inmovilización, biocatalizador de tipo coraza núcleo

El proceso de recubrimiento con de la lámina AZE, se llevó al cabo mediante la inmersión del núcleo en la solución AZE a cada concentración de zeolita y enzima (AIC<sub>0</sub>A, AIC<sub>1</sub>A, AIC<sub>2</sub>A, AIC<sub>3</sub>A, AIC<sub>0</sub>G, AIC<sub>1</sub>G, AIC<sub>2</sub>G, AIC<sub>3</sub>G), posteriormente el núcleo esférico recubierto es introducido en una solución de CaCl al 0,5 M por un periodo de 15 minutos donde la lámina es finalmente gelificada.

Con el fin de mantener el biocatalizador hidratado y en condiciones de máxima esterilidad, el catalizador *coraza-núcleo AZE* es introducido en una solución de buffer de acetato al 0.05 M que contiene 0.0006 M de CaCl<sub>2</sub>, debidamente clasificadas y almacenados a 4 °C.

### 5.7.2 Características del sistema de inmovilización para enzimas de tipo coraza núcleo de alginato de calcio AZE.

La metodología utilizada para el recubrimiento se llevó a cabo con un equipo de captura y recubrimiento de núcleos (CRN) (Figura. 5-6) el cual fue diseñado y construido en acrílico de 15 por 8 cm de diámetro con forma cuadrada que consta de una tapa, un soporte para núcleos y dos reservorios.

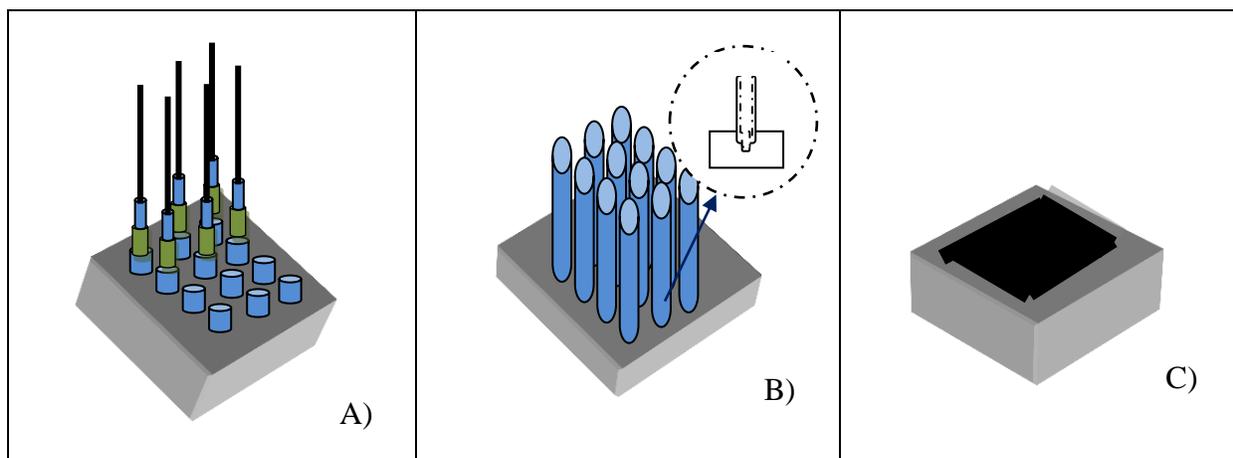
La tapa contiene doce (12) soportes para agujas de 38 mm de largo con gauge<sup>24</sup> 20 (0.75 mm) las cuales pueden ser renovadas, por otra parte las agujas son alineadas a el soporte para núcleos que está compuesto de 12 capilares de 40 mm de altura y 0.8 mm de ancho

<sup>24</sup> Ancho de la aguja

que se encuentran perforados en el fondo. Adicionalmente los reservorios consisten en dos tinas de 70 mm de largo, 50 mm de ancho y 30 mm de alto, la primera tina mantiene la solución de inmovilización (Zeolita-alginato-enzima) y la segunda la solución de CaCl al 0,5 M que son requeridos para la creación de la coraza de alginato (Figura. 5-7).



**Figura. 5-6** Equipo de captura y recubrimiento de núcleos (CRN) fabricado y construido Universidad nacional de Colombia, Instituto amazónico de Investigaciones científicas Sinchi (Autor).



**Figura. 5-7** Equipo de captura y recubrimiento de núcleos (CRN) A) tapa y agujas; B) reservorio de retención de esferas; C) reservorio tina para solución

El procedimiento consistió en insertar los núcleos dentro de los capilares del reservorio (Figura. 5-7 B), posteriormente la tapa (Figura. 5-7 A) es colocada sobre el reservorio hasta que encaje con los soportes teniendo cuidado de insertar las agujas dentro de los capilares. La tapa sale con los núcleos que se encuentran insertados sobre las agujas para luego ser sumergidas en la tina 1 (Figura. 5-7 C) que contiene la solución de inmovilización, a continuación los núcleos recubiertos son sumergidos sobre la solución de CaCl al 0,5 M (tina 2) para realizar la polimerización.

### 5.7.3 Determinación de la Actividad Enzimática.

La actividad de los biocatalizadores se determinó de acuerdo al procedimiento propuesto por (Tanaka 2002; Wrolstad et al. 2005; Whitaker 2003; Bernfeld 1955; GENENCOR 2007; GENENCOR 2004; GENENCOR 1999; Shariffa et al. 2009) con algunas modificaciones. El número de esferas utilizadas fueron dos por cada prueba experimental la cual consistió en preparar 40 ml de agua desionizada y esterilizada una suspensión de almidón de papa (Merck grado analítico) a tres diferentes concentraciones (0.6, 1.5 y 3% w/v) y velocidad de agitación orbital 100 rpm. Posteriormente la mezcla se acidifica con buffer de acetato de sodio (pH 4.3). La reacción se lleva a cabo durante el tiempo estimado en **Estado lineal de la reacción** tomando un alícuota de 1 mL. Las condiciones de operación fueron similares para los dos biocatalizadores:  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $\text{pH } 4.5. \pm 0.2$  En todas las enzimas se midió la producción de dextrinas para el periodo de reacción. Estas concentraciones fueron cuantificadas mediante cromatografía líquida de alta presión HPLC (Anexo 9). La reacción se detuvo mediante el cambio de pH con buffer de borato stop 200 mM (pH 9.2). Con esta información se realizó un gráfico de producción de glucosa vs porcentaje de almidón obteniendo la actividad en g glucosa/g almidón (U). Finalmente se realizó una comparación entre la actividad obtenida en estado libre vs la actividad inmovilizada de cada biocatalizador.

### 5.8 SELECCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS PARA LA IMPLEMENTACIÓN EN LA REGIÓN AMAZÓNICA.

La hidrólisis enzimática del almidón de yuca de tres variedades distintas, a tres concentraciones de almidón en solución probando los biocatalizadores seleccionados frente a las enzimas libres, permite seleccionar las condiciones más adecuadas de operación para la producción de azúcares fermentables a partir de especies nativas amazónicas.

Por medio de un diseño factorial  $3^2 \times 2$  fueron evaluadas las concentraciones 12%, 28% y 38% (w/v) de almidón en solución, para tres diferentes variedades de yuca conocidas como *Y1*, *Y2* y *Y3* utilizando dos catalizadores biológicos, uno en estado libre y otro en estado inmovilizado de tipo *coraza-núcleo AZE*. La reacción se llevó a cabo en un reactor enchaquetado de vidrio de 400 mL durante veinticuatro horas (24 h) para enzima libre y treinta y tres horas (33) para enzima inmovilizada. El procedimiento se siguió bajo los siguientes parámetros.

1. Dos bioreactores en vidrio se esterilizaron durante 30 min a  $121^{\circ}\text{C}$ .
2. Los bioreactores se llevaron a una cabina de flujo laminar donde se agrega la concentración de almidón (gramos) y se lleva a volumen de 300 ml de agua destilada y esterilizada obteniendo la concentración de sustrato deseada.

3. Los reactores son ensamblados a un equipo de recirculación que trabaja a  $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  controlando la temperatura de proceso durante todas las etapas de la prueba.
4. A continuación los bioreactores fueron colocado sobre dos planchas de calentamiento con el fin de generar una agitación magnética regular y leve, dentro del interior del recipiente donde fue colocado un magneto de 4 cm de diámetro que genera la turbulencia.
5. Se hidratan el material de estudio por el lapso de una hora 1 hora a agitación leve y constante. Durante esta etapa se mide el pH inicial, tiempo inicial de hidratación y el tiempo final de hidratación.
6. Se adecua el pH de reacción a  $4.5, \pm 0.2$ , para aquellos almidones donde su pH fuera inferior a este valor ( $4.5 > \text{pH}$ ) no se realiza modificación. El control del pH se lleva a cabo con Acetato de sodio buffer 0.1M, pH  $4.3 \pm 0.2$ . para la acidificación y NaOH 1N para la neutralización. El análisis de pH es cuantificado en línea con un potenciómetro de 3 cifras decimales.
7. Las enzimas GC626 (libre 60  $\mu\text{L}$  inmovilizada Seis (6) esferas) y G-ZYME<sup>R</sup>480 (libre 10  $\mu\text{L}$  de enzima inmovilizada cuatro (4) esferas) fueron colocadas en la mezcla, permitiendo la reacción por el periodo deseado, monitoreado continuamente el pH, y la temperatura de operación.
8. El tiempo estimado de reacción fue utilizado para la toma de 8 alícuota de 10 mL en tubos falcón esterilizado que contenían 3 mL de Solución de Borato Stop previamente insertado.
9. Las alícuotas tomadas fueron adecua mediante centrifugando a 10.000 RPM por 20 min a  $10^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante es filtrado con pregeringa de 0,25  $\mu\text{m}$ .
10. Los hidrolizados purificados son inyectados por duplicado con el fin de analizar los azúcares resultantes en cromatografía líquida HPLC utilizando el método establecido (anexo 9).

Variedad	Concentración de sustrato	Replica	Estado de la enzima
Y1	S1=12%	R1=1	L=LIBRE
Y2	S2=28%	R2=2	I=INMOVILIZADA
Y3	S3=38%		

**Tabla 5-4 Símbolos de los tratamientos para la selección del proceso de hidrólisis**

Muestra	Variedad	Concentración de sustrato	Estado de la enzima
LY1R1S1	Y1	S1	Libre
LY1R1S1	Y1	S2	Libre

Muestra	Variedad	Concentración de sustrato	Estado de la enzima
LY1R1S1	Y1	S3	Libre
IY1R1S1	Y1	S1	Inmovilizada
IY1R1S1	Y1	S2	Inmovilizada
IY1R1S1	Y1	S3	Inmovilizada
LY2R1S1	Y2	S1	Libre
LY2R1S1	Y2	S2	Libre
LY2R1S1	Y2	S3	Libre
IY2R1S1	Y2	S1	Inmovilizada
IY2R1S1	Y2	S2	Inmovilizada
IY2R1S1	Y2	S3	Inmovilizada
LY3R1S1	Y3	S1	Libre
LY3R1S1	Y3	S2	Libre
LY3R1S1	Y3	S3	Libre
IY3R1S1	Y3	S1	Inmovilizada
IY3R1S1	Y3	S2	Inmovilizada
IY3R1S1	Y3	S3	Inmovilizada

**Tabla 5-5 Tratamiento aplicados para la selección del proceso de hidrólisis.**

## 6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos del proceso de caracterización de yuca fueron utilizados para el artículo CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE YUCA AMAZÓNICA COLOMBIANA Y SUS PERSPECTIVAS DE USO. Revista Colombia Amazónica 2010 No 4. El tipo de inmovilización *coraza-núcleo AZE* se encuentra en proceso de patente. Los resultados obtenidos de la metodología de inmovilización, actividad del inmovilizado y cinética de la enzima libre vs inmovilizada para tres variedades de yuca amazónica, fueron utilizados para el poster número P174 - Immobilization of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase in alginate/zeolite modified core-shell system for the hydrolysis of amazonian starch cassava, en el 5 Congreso Internacional en Biocatálisis 2010 Agosto 29 – septiembre 2 en Hamburgo Alemania.



**Figura. 6-1** Núcleo productivo de yuca nativa amazónica del Instituto Amazónico de Investigaciones científicas Sinchi y la asociación Agrovarzea, Leticia Amazonas 2010.

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE YUCA Y DEL ALMIDÓN AMAZÓNICO.

#### 6.1.1 Materia prima.

Las yucas fueron clasificadas y marcadas (Tabla 6-1) dependiendo del tipo de variedad encontrando la existencia de 8 yucas de tipo brava y 15 de tipo dulce para un total de 23 variedades nativas que fueron caracterizadas en campo mediante marcadores moleculares.

	Nombre común	Tipo
1	Arpón	Brava
2	Brasilera 1	Brava
3	Brasilera 2	Brava
4	Carai	Brava
5	Ceiba	Brava
6	Indio	Brava
7	Lupuna	Brava
8	Pibicho 005	Brava
9	Arawana	Dulce
10	Barandilla	Dulce
11	Canero	Dulce
12	Catala	Dulce
13	Cuya	Dulce
14	Lombriz	Dulce
15	Manicuera	Dulce
16	Morada	Dulce
17	Pájaro ahumao	Dulce
18	Pan	Dulce
19	Pata de paloma	Dulce
20	Pibicho	Dulce
21	Piririca	Dulce
22	Vega	Dulce
23	Yema de huevo	Dulce

**Tabla 6-1** Informe Variedades de yuca colectadas en la ciudad de Leticia Barrera y Rodríguez 2010 en Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA.

Las características de la pulpa, permitieron diferenciar a las variedades de yuca en función de su contenido de sólidos totales, cenizas, almidón total y almidón libre que son las propiedades globales que priorizan la utilidad del tubérculo. A continuación se muestran los resultados obtenidos para las 23 variedades nativas de la amazonia y un clon modificado utilizado como referencia y denominado Armenia (HMC1 - CIAT).

### 6.2.1 Sólidos totales o materia seca.

El contenido de materia seca para las variedades de yuca analizadas (Tabla 6-2) mostró una alta dispersión variando entre el 12.5% para la variedad *Arpon* y el 36.7% para la variedad

*Cuya*. Los resultados no indican ninguna tendencia entre las variedades dulce o brava con respecto al contenido de materia seca. Estudios previos realizados por (Cárdenas 2006) encontraron variedades con un alto contenido de materia seca del 37.18% que es superior a las encontradas para la región amazónica, sin embargo tres (3) de las variedades amazónicas (*Indio*, *Cuya* y *Yema de huevo*) se encuentran por encima del promedio general para sur América (López Montes et al. 2000) que es del 33% al 35% de materia seca, además variedades como *Barandilla*, *Catalan*, *Lombriz* y *pájaro ahumado* se encuentran dentro de estos valores.

### 6.2.2 Cenizas.

El contenido de cenizas que se observa en la Tabla 6-2 indica que el grado de minerales de la mayoría de variedades es normal, por lo tanto las yucas amazónicas estudiadas presentan una calidad aceptable para la industria de alimentos. Entre las variedades más destacadas sobresale *pájaro ahumado* por la alta concentración de minerales con una diferencia del 0.98% con respecto a la variedad de referencia (*Armenia*), por otro lado con una diferencia del 0.14% sobre la variedad *Armenia*, *Brasilera 2* se distingue por el menor contenido de minerales.

### 6.2.3 Almidón total por HPLC.

Las variedades *Morada* y *Piririca* con un 91% y 92% respectivamente presentaron el porcentaje más bajo frente a las demás especies amazónicas analizadas las cuales presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) mediante un análisis de varianza de una sola vía lo que demuestra la variabilidad de material. Por otra parte 21 variedades se encuentran dentro del intervalo reportado del 92 al 96% por el CIAT para los clones modificados (Aristizábal & Sánchez 2007), desatancándose las variedades *Indio*, *Barandilla*, *Cuya*, *Yema de huevo* y *Arpon* por su alto contenido de almidón total.

Nombre común	Materia Seca (g)	% cenizas (p/p)	Almidón Total p/p (bs)	almidón libre (p/p)
Armenia (HMC-1)	11.22	0.0029	0.9039	0.175
Arpon	12.53 <sup>B</sup>	0.0050	0.9444 <sup>M</sup>	0.152
Brasilera1	27.66	0.0042	0.9208	0.157
Brasilera2	30.23	0.0015 <sup>B</sup>	0.9382	0.153
Carai	31.00	0.0025	0.9438	0.175 <sup>M</sup>
Ceiba	32.25	0.0041	0.9414	0.117
Indio	35.17 <sup>A</sup>	0.0039	0.9503 <sup>M</sup>	0.140
Lupuna	32.60	0.0078	0.9420	0.103
Pibicho005	27.48	0.0067	0.9429	0.087
Arawana	21.24	0.0088	0.9046	0.218 <sup>M</sup>

Nombre común	Materia Seca (g)	% cenizas (p/p)	Almidón Total p/p (bs)	almidón libre (p/p)
Barandilla	34.44 <sup>M</sup>	0.0087	0.9578 <sup>M</sup>	0.142
Canero	31.00	0.0083	0.9366	0.113
Catalan 022	33.70 <sup>M</sup>	0.0067	0.9457	0.125
Cuya	36.66 <sup>A</sup>	0.0074	0.9548 <sup>M</sup>	0.085
Lombriz	33.45 <sup>M</sup>	0.0093	0.9453	0.125
Manicuera	29.06	0.0055	0.9443	0.132
Morada	22.06	0.0068	0.9108 <sup>B</sup>	0.180 <sup>M</sup>
Pájaro ahumao	33.79 <sup>M</sup>	0.0127 <sup>A</sup>	0.9469	0.117
Pan	25.74	0.0029	0.9309	0.139
Pata de Palomo	23.78	0.0066	0.9311	0.103
Pibicho	31.12	0.0072	0.9495	0.127
Piririca	24.34	0.0068	0.9151 <sup>B</sup>	0.161 <sup>M</sup>
Vega	32.21	0.0084	0.9407	0.137
Yema de Huevo	36.48 <sup>A</sup>	0.0071	0.9539 <sup>M</sup>	0.123

**Tabla 6-2** Caracterización fisicoquímica de pulpa de yuca amazónica; **A** la más alta concentración, **M** concentraciones medias o promedio, **B** las más baja concentración.

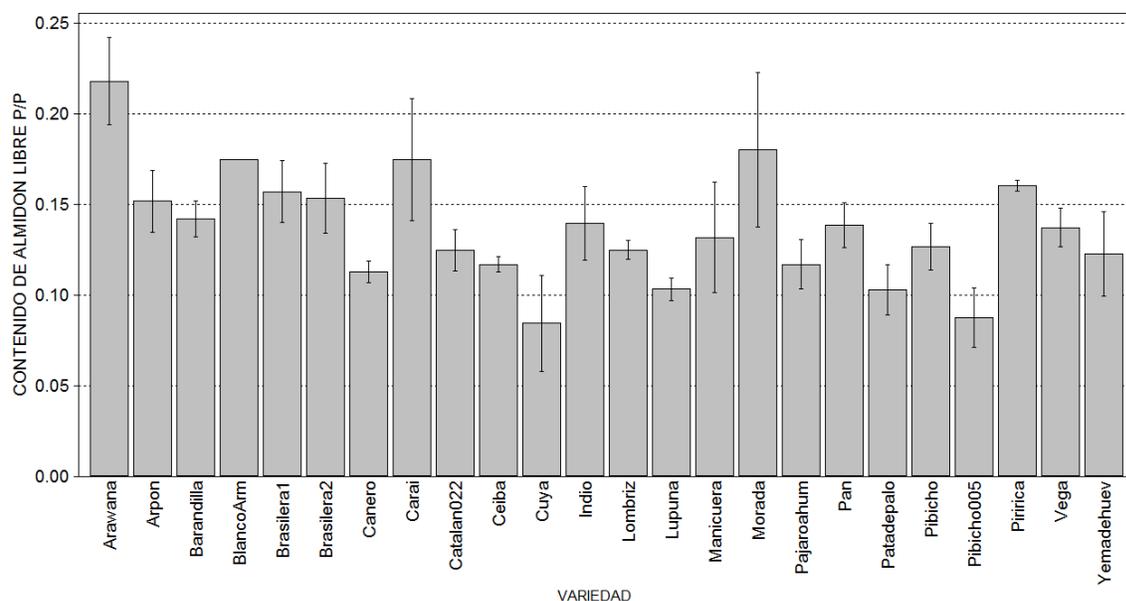
#### 6.2.4 Almidón libre.

El contenido de almidón libre en g de almidón/g de yuca (Tabla 6-2) para todas las variedades analizadas permitió identificar a las variedades *Arawana*, *Morada*, *Carai*, y *Piririca*, con porcentajes de almidón libre promedio de 21.8%, 18.0%, 17.5%, 16.1% respectivamente como las de mayor potencial. Entre estas muestras se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) lo que indica la potencialidad de la variedad *Arawana* en la producción de almidón libre.

De acuerdo al análisis de diferencias entre medias, se identificaron tres (3) grupos de acuerdo a la similitud en el contenido de almidón libre. Un primer grupo se encontró representado por la variedad *Arawana* con un contenido de almidón libre superior a las demás variedades. Un segundo grupo compuesto por las variedades *Morada*, *Armenia*, *Carai*, *Piririca*, *Brasilera 1*, *Brasilera 2*, *Arpón*, *Barandilla*, *Indio*, *Pan*, *Vega*, *Manicuera*, *Pibicho*, *Lombriz*, *Catalana 022*, *Yema de huevo*, *Pájaro ahumao* y *Ceiba*, con un nivel medio de almidón libre. Un tercer grupo con un contenido bajo de almidón libre constituido por las variedades *Canero*, *Lupuna*, *Pata de Palomo*, *Pibicho 005* y *Cuya*.

Variedades como *Arawana* y *Morada* presentaron un contenido de almidón libre superior a la variedad *Armenia*, la cual es un clon modificado genéticamente por el CIAT con pasaporte HMC1. Esta última variedad fue igualmente caracterizada por (Alvis et al. 2008)

obteniendo resultados similares entre los estudios. Por lo tanto se puede establecer que el contenido de almidón libre de las variedades *Arawana* y *Morada* son de alto interés para la industria de harinas y alimentos.



**Figura. 6-2** Contenido de Almidón Libre de yuca Amazónica (*M. Esculenta*) colectada de la ciudad de Leticia.

### 6.3 CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA.

Las características del almidón de yuca, permiten valorar la calidad y cualidades del almidón proveniente de las variedades de yuca en función de su temperatura de gelatinización, índice de absorción de agua, índice de solubilidad, poder de hinchamiento, relación de amilosa/amilopectina, susceptibilidad al ataque enzimático y contenido de proteína que son las propiedades que establecen la utilidad del almidón. A continuación se muestran los resultados obtenidos para las 23 variedades nativas de la amazonia y un clon modificado utilizado como referencia y denominado Armenia (HMC1 - CIAT).

#### 6.3.1 Temperatura de gelatinización.

La gran mayoría de variedades de almidón tuvieron una temperatura de gelatinización regular similar al reportado en la literatura de 58 a 65°C (Aristizábal & Sánchez 2007), sin embargo el análisis estadístico clasificó nueve (9) grupos distintos lo que permitió diferenciar a los grupos superiores como variedades con un mejor desempeño durante las reacciones a altas temperaturas.

Los grupos principales fueron conformados por las yucas *Indio* y *Yema de huevo* para temperaturas altas, seguido del grupo dos (2) compuesto por *Vega* y tres (3) por *Catalana*,

*Lupuna* y *Piririca*. Los grupos siete (7), ocho (8) y nueve (9) que corresponden a las temperaturas bajas tuvieron las variedades *Carai* y *Canero* (grupo siete (7)), *Brasilera 1* y *Manicuera* (grupo ocho (8)) y *Brasilera2* (grupo nueve (9)).

Nombre común	Temperatura Gel (°C)	IAA* (p/p)	ISA** (ml)	PH*** (p/p)
Armenia (HMC-1)	65.0	9.00	9.30	9.97
Arpon	66.0	5.94	9.11	6.42
Brasilera1	63.0	30.44 <sup>A</sup>	26.59 <sup>A</sup>	34.55 <sup>A</sup>
Brasilera2	62.0 <sup>B</sup>	6.72	5.74	7.06
Carai	64.0	11.45 <sup>A</sup>	12.62	13.37 <sup>A</sup>
Ceiba	66.0	5.67	5.92	6.18
Indio	71.5 <sup>A</sup>	6.01	6.53	6.63
Lupuna	68.0	3.75 <sup>B</sup>	3.71 <sup>B</sup>	3.92 <sup>B</sup>
Pibicho005	65.0	6.46	15.28 <sup>A</sup>	7.21
Arawana	66.0	6.12	3.78 <sup>B</sup>	6.47
Barandilla	65.0	6.28	13.89 <sup>A</sup>	7.16
Canero	64.0	5.28	7.38	5.86
Catalan 022	68.0	5.18	5.89	5.65
Cuya	65.5	7.41	4.65	8.00
Lombriz	67.0	5.99	5.22	6.50
Manicuera	64.0	6.08	14.26 <sup>A</sup>	6.96
Morada	67.0	8.86	7.18	9.52
Pájaro ahumao	65.7	5.5	4.27	5.89
Pan	65.0	26.18 <sup>A</sup>	26.57 <sup>A</sup>	29.30 <sup>A</sup>
Pata de Palomo	65.7	5.12	5.32	5.34
Pibicho	67.0	6.61	16.39 <sup>A</sup>	7.68
Piririca	68.0	4.85	5.84	5.08
Vega	69.0	7.43	6.78	7.90
Yema de Huevo	71.0 <sup>A</sup>	4.21	5.93	4.55

**Tabla 6-3** Caracterización fisicoquímica en el almidón nativo de yuca amazónica 1: \*Índice de Absorción de agua; \*\*Índice de Solubilidad de Agua; \*\*\*Poder de Hinchamiento; **A** la más alta concentración, **M** concentraciones medias o promedio, **B** las más baja concentración.

### 6.3.2 Índice de absorción en agua, índice de solubilidad y poder de hinchamiento.

En la producción de azúcares fermentables (Mahasukhonthachat et al. 2010; Sodhi et al. 2005; Richard F. Tester et al. 2004b) recomiendan la utilización de yucas con bajo índice

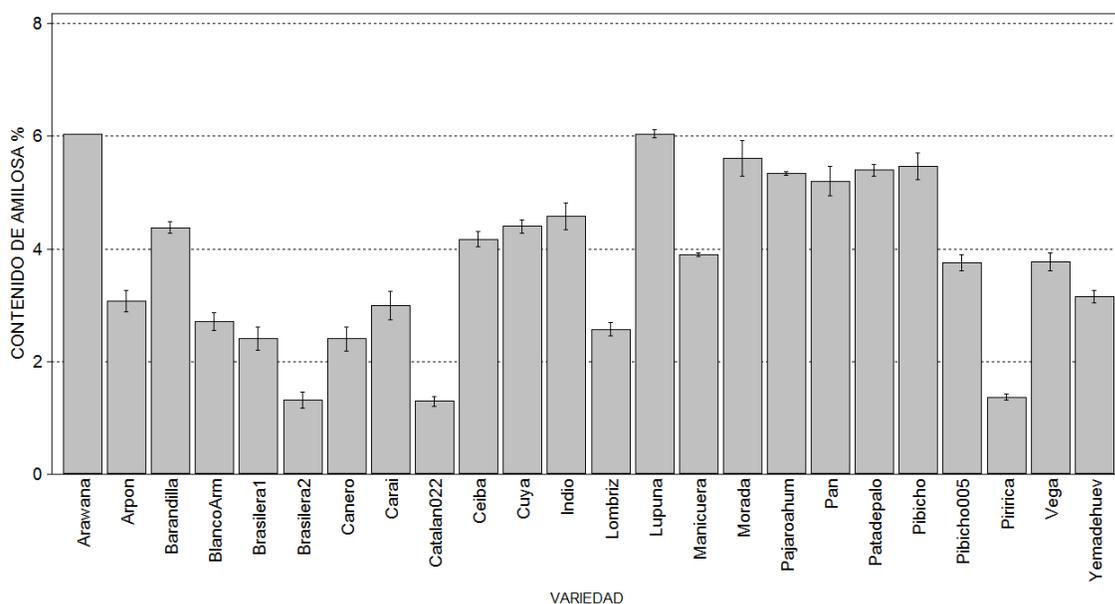
de absorción de agua, alto poder de solubilidad e hinchamiento como es el caso de las yucas nativas *Arpón*, *Pibicho brava y dulce*, *Barandilla* y *Piririca*.

Por otro lado, la calidad de un almidón para la industria de alimentos y farmacéuticos según (Aehle 2004) está asociada a la alta absorción de agua, el alto poder de hinchamiento y el bajo índice de solubilidad, características que fueron demostradas por las variedades *Brasilera 2*, *Arawana*, *Cuya*, *Morada* y *Vega*. Caso contrario es el obtenido sobre las variedades *Arpon*, *Pibicho 005*, *Barandilla*, *Canero*, *Manicuera* y *Yema de huevo* que por sus valores relativamente altos en su índice de solubilidad en agua son variedades que pueden considerarse con baja calidad.

Finalmente las variedades *Pan*, *Lupuna* y *Brasilera 1* muestran un comportamiento que puede ser de interés para la industria de papel debido al alto índice de absorción en agua, poder de hinchamiento e índice de solubilidad.

### 6.3.3 Relación de amilosa/amilopectina.

El mayor contenido de amilosa afecta tanto la característica nutricional del producto como sus propiedades técnicas (Bradshaw & Kennedy 1985), los factores de mayor trascendencia están asociados a la solubilidad del almidón, la temperatura de gelatinización, la susceptibilidad al ataque enzimático, la retrogradación y algunas propiedades reológicas (Wulff 1998; Hoover 2001; X Qi 2003; Whistler 1984; Bradshaw & Kennedy 1985).



**Figura. 6-3** Relación Amilosa – amilopectina de las yucas Amazónicas colectadas

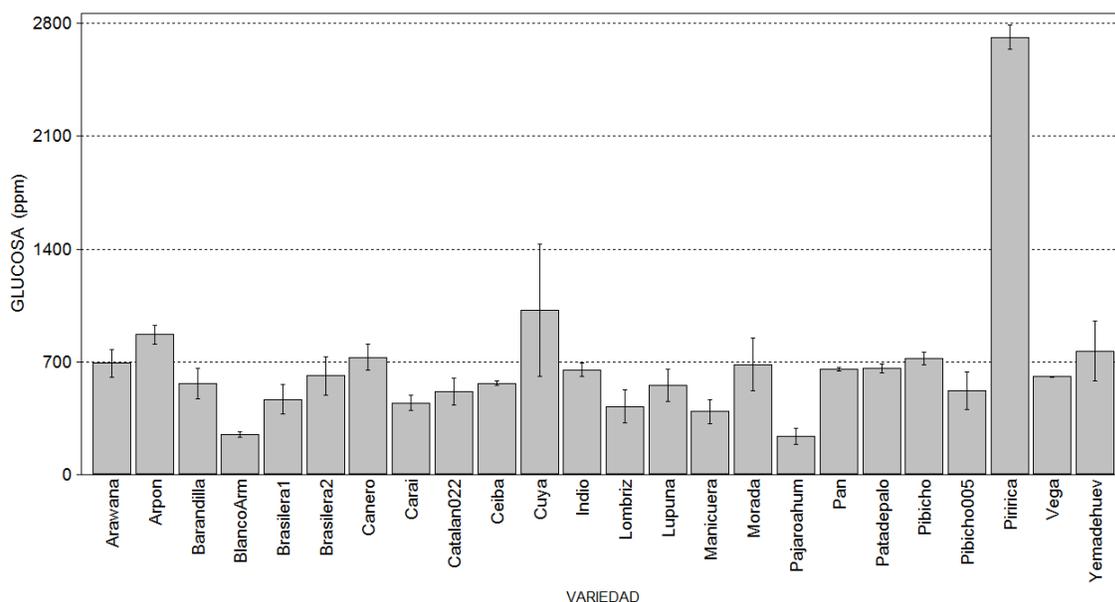
El contenido de amilosa entre las muestras (Figura. 6-3) presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Las yucas nativas con un mayor contenido de amilosa fueron *Lupuna* y *Arawana*, seguidas de la variedad *Morada*. Este grupo presenta características especiales de

insolubilidad en agua fría debido a la dificultad que tiene la molécula de agua en penetrar la estructura cristalina del polisacárido. Las variedades *Brasilera 2*, *Piririca* y *Catalan* deben mostrar una mayor producción de dextrinas de menor peso molecular acompañado de una mayor poder de endulzamiento como también fue encontrado por (Hoover 2001), adicionalmente su capacidad de absorción de agua y su temperatura de gelatinización los hace adecuados para procesos de extrusión (F. Xie et al. 2009).

Un nivel medio de amilosa lo tienen las variedades *Pibicho*, *Pata de Palomo*, *Pájaro ahumao* y *Pan*, como también *Cuya*, *Barandilla*, *Ceiba*, *Manicuera*, *Vega*, *Pibicho 005*, *Yema de Huevo*, *Arpón Carai*, *Armenia*, *Lombriz*, *Brasilera1*, *Canero*; por lo que son útiles para el sector de alimentos.

### 6.3.4 Susceptibilidad a la hidrólisis.

La Figura. 6-4 mostró que los almidones de las variedades *Piririca*, *Cuya*, *Arpón* y *Yema de huevo* son los más susceptibles al ataque hidrolítico a baja temperatura mediante la enzima STARGEN™001.



**Figura. 6-4** Producción de azúcares por hidrólisis enzimática de almidones de yuca nativa.

Al analizar los datos por análisis de varianza de una sola vía demostró la existencia de diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ) adicionalmente un análisis por comparación múltiple de Tukey determino que la variedad *Piririca* tiene una alta producción de glucosa (2713.6 ppm) frente a la variedad *Cuya* (1020,4 ppm) que se presenta como la segunda mejor. Por otra parte los almidones de las yucas *Arpon*, *Yema de huevo*, *Canero*, *Pibicho*, *Arawana*, *Morada*, *Pata de Palomo*, *Pan*, *Indio*, *Brasilera2*, *Vega*,

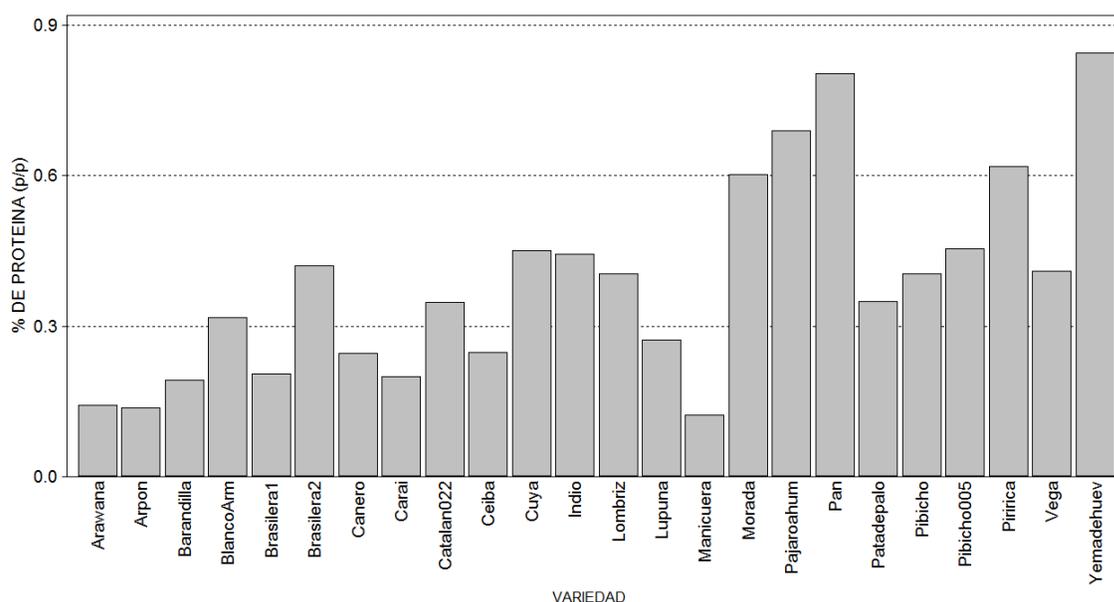
*Ceiba, Barandilla, Lupuna, Pibicho005, Catalán022, Brasileira1, Carai y Lombriz* tienen una capacidad de producción de glucosa promedio que es mayor a la obtenida por la variedad referencia Armenia.

Solamente, los almidones de las variedades *Manicuera* (390.9 ppm) y *pájaro ahumao* (238.9 ppm) presentan una susceptibilidad a ser degradados enzimáticamente comparable con la Blanco Armenia (233.7 ppm), lo que indica el potencial de las variedades amazónicas para ser utilizadas en la producción de azúcares fermentables.

### 6.3.5 Contenido de proteína.

Las variedades de yuca pueden ser clasificadas por su contenido de proteína en tres grupos estadísticamente, alto (10,0% - 7,0% p/p), medio (6,9% - 4,0% p/p) y bajo (3,9% - 1,0% p/p). En el grupo de contenido alto se encuentran las yucas *Yema de Huevo, Pan, Pájaro ahumao, Piririca y Morada*; en el nivel medio se encuentran *Pibicho 005, Cuya, Indio, Brasileira 2, Vega, Pibicho, Lombriz, Catalan 022, Pata de Paloma y Armenia*, y en el nivel bajo *Arawana, Arpón, Barandilla, Brasileira 1, Canero, Carai, Ceiba, Lupuna y Manicuera*.

Un contenido medio de proteína mantiene un valor adecuado sobre la viscosidad de la solución con un poder de hinchamiento del almidón equilibrado (J Liu et al. 2009; Debet & M Gidley 2006) por lo cual las variedades del grupo dos pueden presentarse como materiales con ventajas durante el proceso de hidrólisis enzimática.



**Figura. 6-5** Contenido de Proteína en almidón por variedad de yuca Amazónica (*M. Esculenta*) colectada de la ciudad de Leticia

#### 6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES PROMISORIAS PARA SU TRANSFORMACIÓN EN AZÚCARES FERMENTABLES.

Los resultados de los cuatro análisis físico-químicos realizados: almidón libre, susceptibilidad al ataque enzimático, contenido de proteína y relación de amilosa ponderados se presentan en la Tabla 6-4. Esta muestra una variabilidad moderada y la existencia de casos atípicos que se salen de la tendencia general (Figura. 6-6).

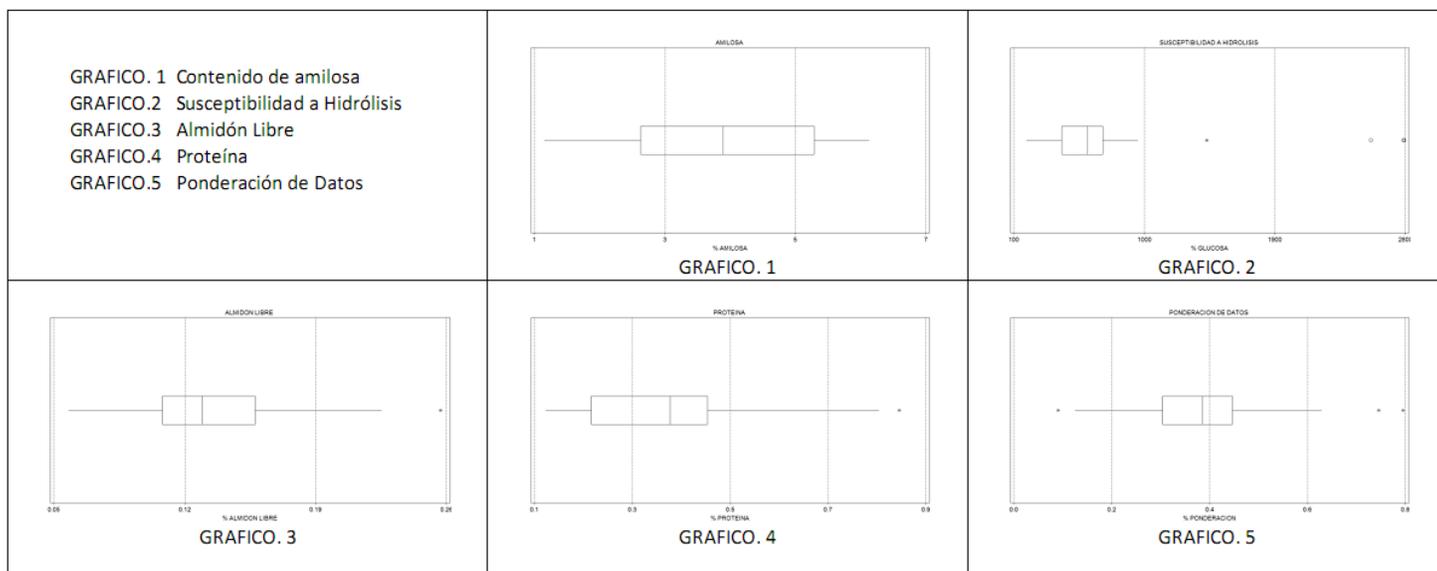


Figura. 6-6 Medida de la tendencia central y variabilidad de los cuatro análisis básicos para la selección de la yuca nativa.

Los datos de caracterización físicoquímica priorizados para la selección de la variedad de yuca fueron analizados independientemente por diferencia de medias, lo que mostró la existencia de diferencias significativas entre las variedades con una  $p < 0.05$ .

No	Variedad	almidón libre (p/p)	Susceptibilidad al ataque enzimático (ppm de glucosa)	Proteína (% p/p)	Amilosa (p/p)	Ponderación de datos
1	<b>BlancoArm</b>	0.175	233.717 <sup>B</sup>	0.318	0.027	0.163
2	<b>Arawana</b>	0.218 <sup>A</sup>	691.818	0.142	0.060 <sup>A</sup>	0.565
3	<b>Arpon</b>	0.152	867.762	0.137 <sup>B</sup>	0.031	0.417
4	<b>Barandilla</b>	0.142	564.486	0.192	0.044	0.383
5	<b>Brasilera1</b>	0.157	467.795	0.206	0.024	0.369
6	<b>Brasilera2</b>	0.153	614.293	0.421	0.013 <sup>B</sup>	0.342
7	<b>Canero</b>	0.113	728.358	0.245	0.024	0.318
8	<b>Carai</b>	0.175	445.919	0.200	0.030	0.406
9	<b>Catalan022</b>	0.125	516.322	0.348	0.013 <sup>B</sup>	0.285

No	Variedad	almidón libre (p/p)	Susceptibilidad al ataque enzimático (ppm de glucosa)	Proteína (% p/p)	Amilosa (p/p)	Ponderación de datos
10	<b>Ceiba</b>	0.117	568.133	0.248	0.042	0.331
11	<b>Cuya</b>	0.085 <sup>B</sup>	1,020.397 <sup>A</sup>	0.451	0.044	0.260
12	<b>Indio</b>	0.140	649.731	0.444	0.046	0.376
13	<b>Lombriz</b>	0.125	423.328	0.405	0.026	0.296
14	<b>Lupuna</b>	0.103	556.012	0.273	0.060 <sup>A</sup>	0.337
15	<b>Manicuera</b>	0.132	390.933	0.123 <sup>B</sup>	0.039	0.347
16	<b>Morada</b>	0.180	683.460	0.602	0.056	0.461
17	<b>Pájaro ahumao</b>	0.117	238.884 <sup>B</sup>	0.689	0.053	0.290
18	<b>Pan</b>	0.139	655.127	0.803 <sup>A</sup>	0.052	0.363
19	<b>Patadepaloma</b>	0.103	660.238	0.350	0.054	0.328
20	<b>Pibicho</b>	0.127	720.488	0.405	0.055	0.376
21	<b>Pibicho005</b>	0.087 <sup>B</sup>	521.576	0.454	0.038	0.253
22	<b>Piririca</b>	0.161	2,713.573 <sup>A</sup>	0.619	0.014 <sup>B</sup>	0.573
23	<b>Vega</b>	0.137	607.513	0.410	0.038	0.273
24	<b>Yemadehuevo</b>	0.123	767.294	0.845 <sup>A</sup>	0.031	0.312

**Tabla 6-4** Caracterización fisicoquímica en el almidón nativo de yuca amazónica 2: **A** la más alta concentración, **B** la más baja concentración.

De acuerdo con los resultados estadístico el coeficiente de determinación (**Tabla 6-5**) con respecto a la variación del contenido de almidón libre, susceptibilidad a hidrólisis y relación de amilosa se aplican al modelo en un 55.9%, 94.3% y 99.7% respectivamente. El coeficiente de determinación bajo obtenido en el análisis de almidón libre puede estar asociado por el método de extracción y los factores ambientales en el cultivo.

Fuente de variación	MSE
Almidón libre	0.0052
Susceptibilidad a hidrólisis	0.0001
Relación de amilosa	0.0001
Sumatoria de funciones	0.0404

**Tabla 6-5.** Media de cuadrados del error del análisis de varianza para contenido de almidón libre, hidrólisis, relación amilopeptina, análisis de ponderaciones para almidón de yuca amazónica y sumatoria de funciones.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura. 6-6, la variación del contenido de almidón libre, susceptibilidad a hidrólisis y relación de amilosa demuestran la existencia de diferencias significativas en cada una de las respuestas de los tratamiento.

#### 6.4.1 Correlación entre factores de selección.

Los cuatro factores analizados fueron correlacionados para identificar el grado de asociación entre variables, encontrando la existencia de una relación directamente proporcional entre el contenido de proteína y la relación de amilosa como se muestra en la

Tabla 6-6.

	ALMIDÓN	AMILOSA	HIDRÓLISIS
AMILOSA	-0.2129		
VALOR DE P	0.318		
HIDRÓLISIS	0.2296	-0.3231	
VALOR DE P	0.2805	0.1235	
PROTEÍNA	-0.4723	0.0542	0.2478
VALOR DE P	0.0198	0.8013	0.2431

	Sin relación		Muy Poca Relación
	Relación positiva		

**Tabla 6-6** Correlación de factores que afectan la producción de glucosa en la yuca Amazónica (*M. Esculenta*) colectada de la ciudad de Leticia

Confirmando los resultados obtenidos por (BeMiller 2009). De la misma manera (Salgado et al. 2008) reportaron la existencia de una relación positiva entre el contenido de proteína y el índice de absorción.

Por otra parte se puede observar la existencia de una relación inversa entre el contenido de amilosa y la susceptibilidad a la hidrólisis lo cual indica que a mayor concentración de amilosa se disminuye la capacidad para producir azúcares a partir de almidón; caso similar al ocurrido entre el contenido de almidón-concentración de amilosa (almidón/amilosa) y contenido de almidón-contenido de proteína (almidón/proteína) debido a que la concentración de proteína y el contenido de amilosa definen las fuerzas iónicas y la cristalinidad del granulo determinando que a mayor concentración de estas variables se disminuye la facilidad para la extracción del almidón libre.

#### 6.4.2 Análisis de ponderación por comparación múltiple.

Utilizando una comparación múltiple de Tukey sobre la sumatoria de la ponderación de valores (Ecuación 5-1.), las variedades con un alto potencial para la producción de azúcares fermentables son: *Piririca* y *Arawana* (Grupo A) seguido por las variedades *Morada*, *Pan*, *Arpón*, *Carai*, *Indio*, *Pibicho*, *Yema de Huevo*, *Barandilla*, *Brasileira 1*, *Brasileira 2*, *Pájaro Ahumado*, *Pata de Palomo*, *Lupuna*, *Manicuera*, *Ceiba*, *Canero*, *Lombriz*, *Catalan 022*,

Vega 022, Cuya y Pibicho 005 (Grupo AB); finalmente la variedad *Armenia* con el más bajo nivel de ponderación permite demostrar la potencialidad de las variedades nativas.

No Variedad	Media	homogeneidad de grupos	No Variedad	Media	homogeneidad de grupos
22	0.572	A	14	0.337	AB
2	0.564	A	10	0.331	AB
16	0.461	AB	19	0.328	AB
3	0.417	AB	7	0.318	AB
8	0.406	AB	24	0.312	AB
4	0.383	AB	13	0.296	AB
12	0.376	AB	17	0.290	AB
20	0.376	AB	9	0.285	AB
5	0.369	AB	23	0.273	AB
18	0.363	AB	11	0.260	AB
15	0.347	AB	21	0.253	AB
6	0.342	AB	1	0.163	B

**Tabla 6-7** Evaluación de la diferencia entre medias de los datos ponderados de la yuca Amazónica nativa (*M. Esculenta*).

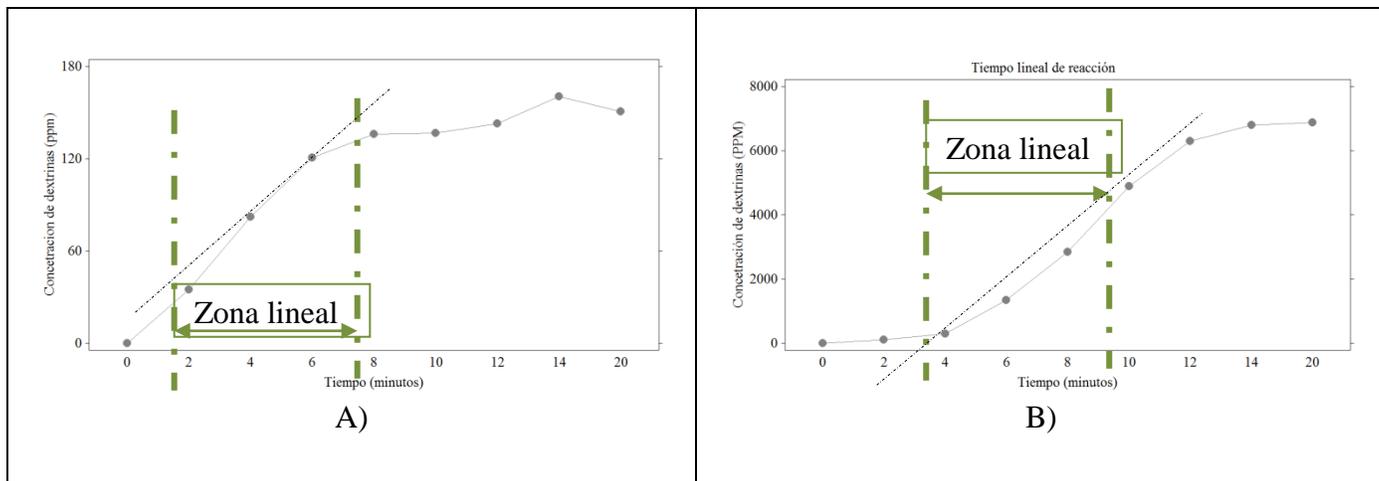
Aunque todas las variedades nativas de almidón presentan características que hacen factible su transformación en azúcares fermentables, las variedades *Piririca* y *Arawana* se destacan estadísticamente al separarse del grupo AB con un valor crítico de comparación del 0.3671, lo que las clasifica como las variedades amazónicas más representativas para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis en la región amazónica. De igual manera (Drapcho 2008b; Shariffa et al. 2009) encontraron que los efectos del contenido de proteína, almidón libre y relación de amilosa/amilopectina son los factores que mayor efecto tienen sobre el acoplamiento de la enzima hidrolítica en la partícula de almidón lo que ratifica la selección realizada.

## 6.5 SELECCIÓN DE LA ENZIMA AMIOLÍTICA.

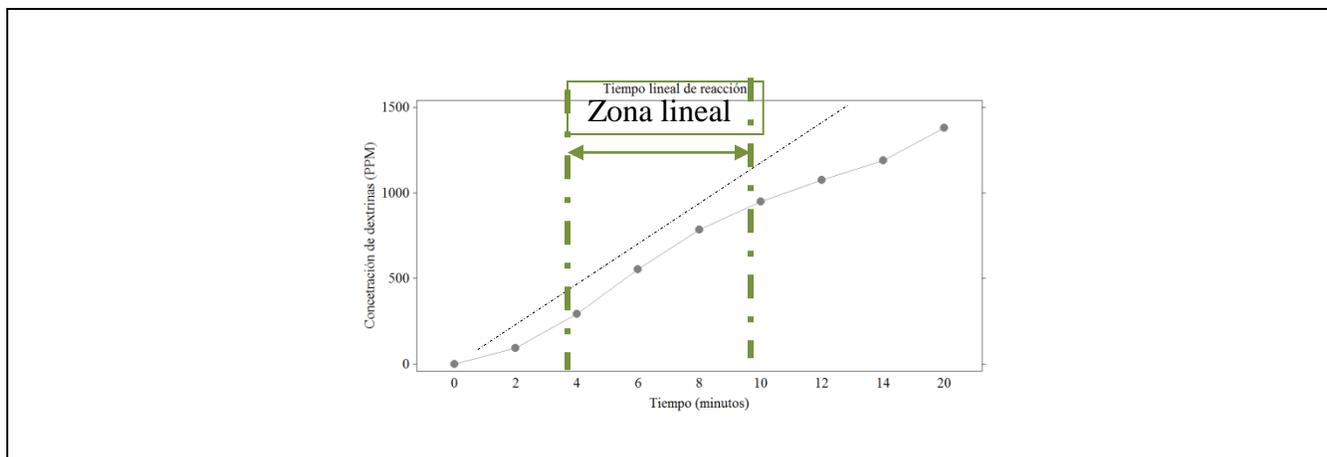
### 6.5.1 Actividad enzimática.

#### Tiempo de toma de muestra de la actividad catalítica.

El periodo durante el cual la enzima muestra una actividad máxima y constante se dedujo a partir de la Figura. . En esta figura se encuentra que la enzima STARGEN<sup>TM</sup>001 presentó esta zona en el intervalo de tiempo de 2 a 8 minutos (Figura. A) mientras que las enzimas GC626 y G-ZYME<sup>®</sup>480 mostraron intervalos de tiempo entre 4 a 8 minutos (Figura. B, Figura. 6-8).



**Figura. 6-7** Selección de la zona lineal para la reacción de hidrólisis a pH 4.5 y concentración de sustrato de 0.6% para las enzimas **A)** STARGEN™001 que trabaja a temperatura de  $32^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y para el par enzimático **B)** GC626 que trabajan a  $63^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

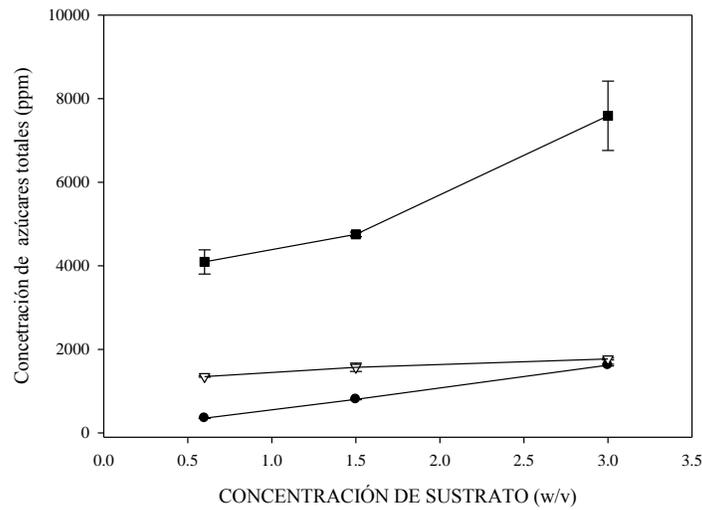


**Figura. 6-8** Selección de la zona lineal para la reacción de hidrólisis a pH 4.5 y concentración de sustrato de 0.6% para las enzimas G-ZYME<sup>R</sup>480 que trabajan a  $63^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

En los intervalos encontrados se halla la menor posibilidad de encontrar condiciones inhibitorias a la cinética catalítica, por lo cual los tiempos adecuados para la determinación de la actividad enzimática se encuentran a los 5, 6 y 7 minutos de reacción.

### Determinación de la actividad catalítica

El tiempo de reacción seleccionado para la toma de datos fue de 6 minutos, en el cual la actividad para cada una de las enzimas tiene una tendencia lineal con una alta correlación ( $0.95 < r < 0.99$ ) obteniendo una desviación (Des) entre las réplicas de  $0.11 < \text{Des} < 0.12$  para cada uno de los puntos analizados.



**Figura. 6-9** Estudio de la actividad enzimática a partir de almidón de papa determinada por cromatografía líquida. ■G-ZYME<sup>R</sup>480; ● STARGEN<sup>TM</sup>001; ▽ GC626 en ppm sobre % w/v.

La actividad de las enzimas fue determinada a partir de la información que se muestra en la Figura. 6-9. Las unidades de actividad están dadas en miligramos de dextrina por gramo de almidón (U), los cuales fueron convertidos a unidades de actividad específica de enzima por gramo de enzima (Ecuación 6-1).

	STARGEN <sup>TM</sup> 001		GC626		G-ZYME <sup>R</sup> 480	
	Dextrinas (ppm)	Desviación estándar	Dextrinas (ppm)	Desviación estándar	Dextrinas (ppm)	Desviación estándar
<b>0.6%</b>	1,772.689	0.012	4,725.781	0.012	14,328.592	0.070
<b>1.5%</b>	4,028.126	0.012	5,499.919	0.064	16,631.801	0.012
<b>3.0%</b>	8,119.601	0.013	6,196.822	0.013	26,563.077	0.109
<b>Actividad</b>	<b>265,302.679</b>		<b>59,779.792</b>		<b>525,312.524</b>	

**Tabla 6-8** Tabla de datos de la actividad enzimática a 6 minutos de las enzimas STARGEN<sup>TM</sup>001, G-ZYME<sup>R</sup>480 y GC626

La actividad calculada para la **glucoamilasa G-ZYME<sup>R</sup>480 es de 525,312.52 U** que fue convertida en cantidades de enzima que pueden liberar un gramo de dextrinas por hora de un sustrato de almidón soluble a condiciones de reacción, obteniendo un valor de **464.88 GAU/g** donde GAU (gramos de dextrinas producida por gramo de almidón por unidad de tiempo (hora) y **g** es la dosis de la enzima en gramos. Este valor de actividad es superior en un **18.26%** a la actividad reportada por la ficha técnica que es de 380 GAU/g (mínimo).

$$\frac{\frac{\text{Actividad de la enzima}}{\text{Tiempo de reacción}}}{\text{Dosis reaccionante de enzima} \times \text{Densidad enzimática}} = \frac{\text{Unidades enzimáticas}}{\text{Gramos de enzima}}$$

#### **Ecuación 6-1** Cálculo de actividad enzimática

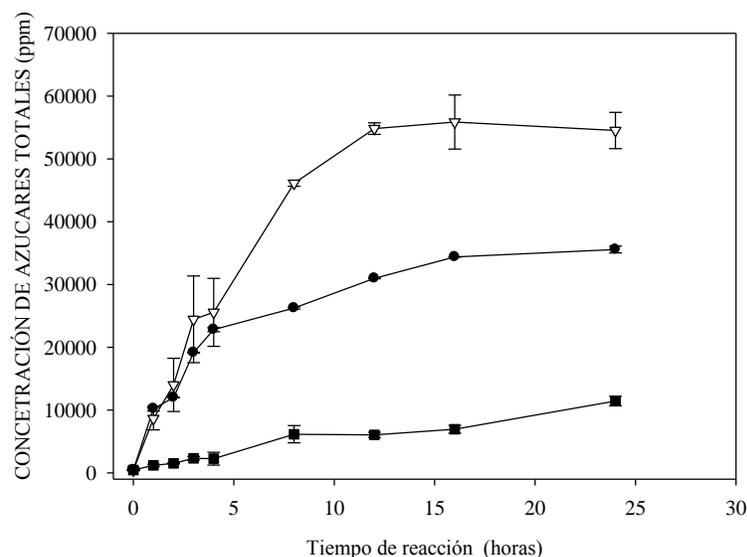
Por su parte la enzima **STARGEN<sup>TM</sup>001** tuvo una actividad de **265,302.68 U** que **corresponde a 496.26 GSHU/g** donde GSHU es el nivel de actividad enzimática en un material de almidón el cual es calculado como los miligramos de dextrinas producidas por gramo de almidón en una unidad de tiempo (horas). La actividad obtenida fue 8% superior a la reportada por la ficha técnica que es como mínimo de 456 GSHU/g.

Finalmente, el cálculo de la actividad de la enzima **GC626** **correspondió a 59,779.79 U** que son **10,282.04 SSU/g** siendo esta la cantidad de enzima que puede liberar un miligramo de glucosa por gramo de almidón soluble y por minuto a condiciones del ensayo. Este valor es aproximado al reportado por la ficha técnica (10,000 SSU/g mínimo) en un 2.7%. Gracias a que las actividades enzimáticas encontradas son muy similares a las reportadas en la ficha técnica se decidió emplear las dosis recomendadas para los ensayos de hidrólisis que se realizaron posteriormente.

#### **6.5.2 Selección del tiempo de proceso con las enzimas en estado libre**

La selección del tiempo de proceso permitió identificar el momento en el cual las enzimas no presentan una producción significativa de azúcares a partir de almidón crudo de tipo granular (sin previa gelatinización), momento en el cual la reacción es finalizada disminuyendo así el consumo energético y el gasto de materias primas.

El tiempo en el cual se obtuvo la máxima tasa de generación de producto fue evaluado durante veinticuatro horas (Figura. ) y cada muestra fue analizada por varianza de una sola vía utilizando un análisis de Tukey, lo cual permitió calcular el momento donde no se presentan diferencias de producción de dextrinas a través del tiempo. Es así como el tratamiento E1 (enzima GC626) no presentó un incremento en el producto obtenido a partir de las 16 horas, por su parte el tratamiento E2 (G-ZYME<sup>R</sup>480) aunque tiene un comportamiento uniforme durante toda su cinética, a partir de las 12 horas de reacción su comportamiento se estabiliza hasta obtener muy bajas desviaciones, finalmente el tratamiento E3 (STARGEN<sup>TM</sup>001) mostró diferencias entre todos los tiempos de muestreo sin alcanzar un periodo durante el cual la reacción enzimática termine. Por otra parte, la constante actividad de las enzimas durante todo el experimento a través del tiempo demostró la estabilidad de estas a las condiciones de operación establecidas de pH, temperatura y concentración de sustrato.



**Figura. 6-10** Selección del tiempo de reacción de las enzimas ● GC626 (E1); ▽ G-ZYME<sup>R</sup>480 (E2) y ■ STARGEN<sup>TM</sup>001 (E3) obtenida de las dextrinas producidas a través del tiempo.

Los resultados muestran que a partir de la hora quince no se genera una cantidad significativamente mayor de dextrinas producto de la hidrólisis (Figura. ), lo cual no corresponde al efecto causado por la concentración de sustrato ya que la reacción contenía del 71.3% al 85,2% w/v del almidón inicial. Sin embargo, la causa de la disminución de la actividad puede estar asociado a la pérdida o distorsión de la estructura de caja de la proteína por la acción física y/o química de la interacción de los componentes del sustrato y de los productos lo que genera una inhibición del centro activo de la enzima o la desnaturalización de la misma.

## 6.6 COMPARACIÓN CINÉTICA ENTRE ENZIMAS.

Uno de los factores que permitió comparar las enzimas fue la producción de dextrinas a través del tiempo a partir de almidón crudo de tipo granular, para lo cual el tratamiento E2 presentó una mayor efectividad al lograr una concentración máxima de 54,526.80 ppm. A su vez los tratamientos E1 y E3 obtuvieron concentraciones de 35,558.98 y 11,429.00 ppm indicando un 65.2% y un 20.9% menos de la producción de dextrinas con respecto a la reacción llevada a cabo con el tratamiento E2. Sin embargo, la cinética de las reacciones de hidrólisis (Figura. ) muestra un comportamiento similar durante los primeros cinco minutos entre las reacciones E1 y E2 ( $p < 0.05$ ), momento a partir del cual las curvas cinéticas se separan. Este comportamiento se encuentra relacionado con el tipo de degradación que cada enzima realiza sobre el granulo de almidón, mientras que la enzima GC626  $\alpha$  amilasa (E1) únicamente ataca los enlaces  $\alpha$  1-4 de los glucanos (es decir, la exoestructura del polisacárido), el tratamiento con G-ZYME<sup>R</sup>480 glucoamilasa (E2) presenta un efecto

simultaneo de degradación de los enlaces  $\alpha$  1-4, así como también de los glucanos  $\alpha$  1-6 (endoestructura del polisacárido), lo que genera una mayor producción de azúcares totales.

Un caso contrario es el ocurrido con el tratamiento E3 que corresponde a la enzima STARGEN<sup>TM</sup>001, la cual desde su inicio mostró una cinética diferente y definida, que se encuentra alejada de E1 y E2. Una regresión lineal (con un coeficiente de correlación de 96%) (Ecuación 6-2) de esta cinética, mostró que el tiempo estimado para alcanzar la concentración de dextrinas producidas en veinticuatro horas por el tratamiento E1 (54,526 ppm) es de 122.95 horas (5 días), lo cual indica que el tratamiento E3 no es efectivo a condiciones granulares contrario a lo encontrado por (Johnson et al. 2009) el cual obtuvo eficiencias similares entre enzimas amilolíticas de alta temperatura y el complejo enzimático STARGEN<sup>TM</sup>001 al realizar una gelatinización previa del almidón.

$$Y = 436.47 x + 860.23$$

**Ecuación 6-2** Regresión lineal de la enzima STARGEN<sup>TM</sup>001 de la cinética a 24 horas

Finalmente se estableció que el tiempo para realizar el estudio de la secuencia de adición de cada enzima es de quince horas, bajo las siguientes condiciones: pH de 4.5 y una temperatura de  $63^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , las enzimas más adecuadas para realizar la hidrólisis enzimática de almidón de yuca amazónico fueron G-ZYME<sup>R</sup>480 y GC626 que corresponden a los tratamientos E1 y E2 las cuales deben actuar sinérgicamente con el fin de alcanzar mejores rendimientos y aprovechar la especificidad del ataque endo y exo de la estructura del polisacárido que cada una de las enzimas presenta.

## **6.7 IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN.**

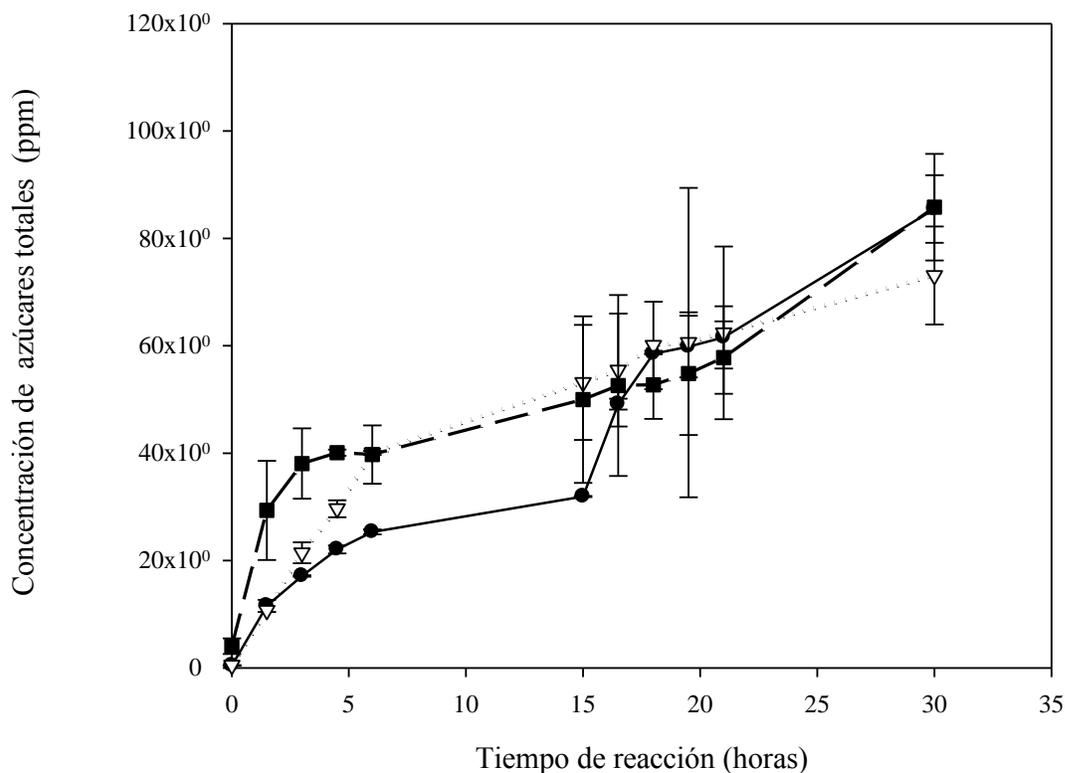
El estudio del proceso de hidrólisis fue realizado mediante 3 experimentos donde se evaluó la secuencia GC626-G-ZYME<sup>R</sup>480 (P1S) y G-ZYME<sup>R</sup>480-GC626 (P2S) con un periodo de reacción de 15 horas por cada enzima, posteriormente se evaluó la adición simultánea de las enzimas GC626/ G-ZYME<sup>R</sup>480 (PS3). Todos los tratamientos fueron realizados en un periodo de tiempo de 30 horas, obteniendo una conversión máxima del 76.4% del almidón inicial a condiciones de operación, el cual es un valor relativamente cercano al obtenido por (Johnson et al. 2009) del 95.16 % para un mayor tiempo de proceso (49 horas) empleando adicionalmente almidón pre gelatinizado como materia prima.

Todos los muestreos tomados a través del tiempo mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) lo que indicó la continua actividad en el periodo de estudio para los tres tratamientos probados.

Un análisis de varianza completamente aleatorizado de la información obtenida indicó que desde el tiempo cero hasta las seis horas existieron diferencias significativas entre los

tratamientos para cada tiempo analizado ( $p < 0.05$ ), efecto que se relaciona con la actividad de cada tipo de enzima en el inicio de la reacción por el ataque a la endo y exo estructura del almidón, lo cual es homólogo a lo observado en la Figura. para el periodo de tiempo contemplado entre cero y cinco horas para E1 y E2. Sin embargo, hacia la primera hora de reacción el tratamiento P3S produjo cuatro veces más dextrosa que la suma de las reacciones de P1S y P2S lo que indica un avance superior por parte del tratamiento P3S en la degradación de almidón en las primeras etapas que son las de mayor actividad de las enzimas.

Caso contrario es lo obtenido desde las quince horas hasta las veinte horas donde existen altas similitudes entre los datos ( $P > 0.05$ ), lo que es un efecto de la adición del catalizador complementario el cual es G-ZYME<sup>R</sup>480 para el tratamiento P1S y GC626 para P2S alcanzando rápidamente la concentración de dextrosas obtenida por el tratamiento P3S.



**Figura. 6-11** Selección de la secuencia de adición mediante la sumatoria de los azúcares producidos. ● GC626-G-ZYME<sup>R</sup>480 (P1S); ▽ G-ZYME<sup>R</sup>480-GC626 (P2S); ■ GC626/G-ZYME<sup>R</sup>480 simultáneo (P3S).

Sin embargo, las rutas cinéticas de los tratamientos se ven separadas en el periodo de tiempo contemplado entre las veintiún y treinta horas donde la actividad de la enzima ha

disminuido, en este punto el tratamiento P3S presenta la mayor producción de dextrinas con una pequeña diferencia del 0.4% con respecto a P1S y un diferencia de 14.7% con respecto a P2S, sin embargo estas diferencias no se muestran estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Este análisis indica que la secuencia de adición del par enzimático solamente presenta diferencia altamente significativa en la producción de dextrinas durante los primeros periodos del proceso (5 horas), a pesar de esto *la adición de la enzima simultáneamente (tratamiento P3S)* muestra una mayor tendencia en la producción de dextrinas además de ir acompañada técnicamente por una menor manipulación del sustrato durante el proceso, lo que disminuye los riesgos de contaminación. Esto motivó la selección del tratamiento P3S como el más adecuado para llevar a cabo las etapas posteriores de esta investigación.

## **6.8 SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN.**

### **6.8.1 Inmovilización de tipo coraza núcleo de alginato de calcio AZE.**

El método de inmovilización AZE permitió obtener núcleos con diámetros de  $3.4 \text{ mm} \pm 0.3 \text{ mm}$  y corazas de  $0.7 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$ , la principal dificultad durante el método de inmovilización se encontró en la toma de la esfera para el recubrimiento.

El equipo de inmovilización utilizado permitió la fabricación de 200 biocatalizadores (28 biocatalizadores/hora) teniendo una efectividad del 64% lo cual indica que el sistema debe ser mejorado tanto en su proceso de retención de las esferas como en la inmersión sobre la solución de inmovilización, por otro lado el equipo debe ser automatizado y mejorado en su diseño ergonómico con el fin de facilitar la manipulación del equipo por parte del operario.

### **6.8.2 Cálculo de la actividad enzimática del biocatalizador y determinación del contenido de material poroso (material zeolítico) en alginato para la hidrólisis enzimática de almidón de yuca.**

Los resultados obtenidos para la hidrólisis con el biocatalizador de tipo coraza núcleo con una concentración de zeolita del 0 % muestran una retención de la actividad inicial para AIC<sub>0</sub>A (Actividad inmovilizado a concentración de zeolita del 0% para la enzima GC626) y AIC<sub>0</sub>G (Actividad inmovilizado a concentración de zeolita del 0% para la enzima GZYME<sup>®</sup>480) del 53 y 59% respectivamente, que es un valor similar a la obtenida por (Taqieddin 2004) del 60%, lo que sugiere que la pérdida de actividad se debe a la interacción entre la enzima y los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , como sugiere el autor mencionado. Sin embargo, (Konsoula & Liakopouloukyriakides 2006; Zanin & Moraes 1995; Roy 2004) han obtenido retenciones de actividad entre el 70 y el 80%, lo cual indica que el sistema coraza núcleo presenta un factor adicional que afecta los efectos de transferencia de masa al igual que la movilidad de la enzima.

% zeolita	Actividad SSU/g	Actividad g dextrina/g Almidón	% de retención de actividad
0% Libre	10,282.04	59,779.79 *	100%
0% <sup>N</sup> Inmovilizado	5,423.58	725,932.74 **	53%
1%	3,191.76	427,208.50 **	31%
2%	3,820.02	511,299.57 **	37%
3%	7,690.50	1,029,352.98 **	75%
3.2% <sup>N</sup>	5,425.14	30,552.20***	55%

**Tabla 6-9** Cálculo de actividad enzimática de GC6262  $\alpha$  amilasa inmovilizada a 6 minutos y diferentes concentraciones de zeolita sobre coraza: \* dosis 0.83  $\mu$ L; \*\*dosis 19.57  $\mu$ L;\*\*\* 4.94  $\mu$ L; <sup>N</sup> enzima inmovilizada en solo núcleo sin coraza.

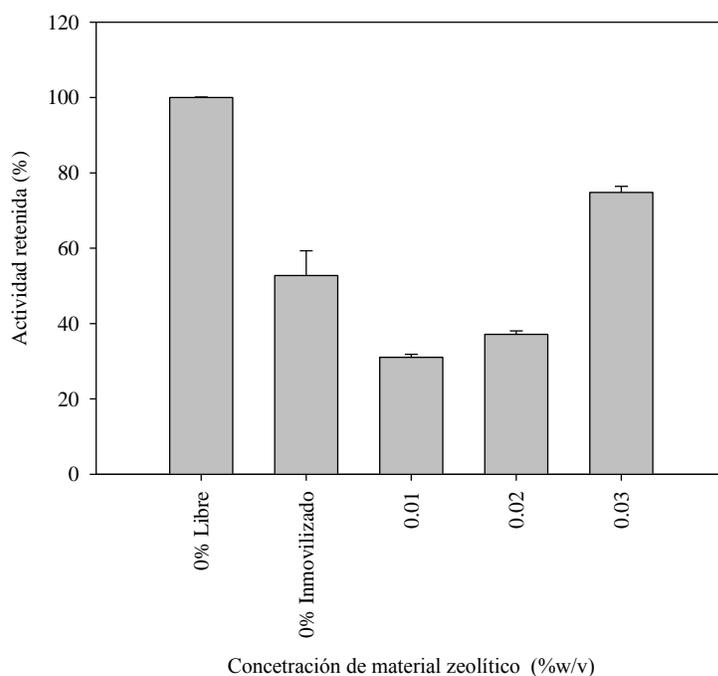
Este puede estar relacionado con el efecto de absorción de agua sobre el núcleo y la coraza lo que ocasiono un aumento en el diámetro de 1.3 mm  $\pm$  0.2 y se encuentra regido por el equilibrio de las fase líquida en la endo y la exo estructura del biocatalizador, este problema fue igualmente encontrado por (Koyama 2004) sobre núcleos líquidos. Este hinchamiento disminuye la difusividad efectiva de la coraza por un efecto de las tensiones radiales y tangenciales que deforma el poro durante el estiramiento de las fibras, aumentando la tensión de permeabilidad del sistema como también fue observado por (Dimitrovova 2002; Federico & Herzog 2008) sobre fibras porosas. Los resultados obtenidos de actividad se observan en la Tabla 6-9 para  $\alpha$  amilasa y en la Tabla 6-10 para glucoamilasa, obteniendo resultados similares de disminución de actividad durante la inserción de la zeolita al 1, 2 y 3% (w/v).

% zeolita	Actividad SSU/g	Actividad mg dextrina/g Almidón	% de retención de actividad
0% Libre	464.88	525,312.52 *	100%
0% Inmovilizado	275.80	609,864.45 **	59%
1%	157.94	349,250.57 **	34%
2%	178.99	395,780.31 **	39%
3%	333.23	736,850.15 **	72%
4%	416.22	920,357.76 **	90%

**Tabla 6-10** Cálculo de actividad enzimática de GZYME<sup>®</sup> 480 glucoamilasa inmovilizada a 6 minutos y diferentes concentraciones de zeolita: \* dosis 10  $\mu$ L; \*\* dosis 19.57  $\mu$ L.

A pesar de la disminución en la actividad remanente, el aumento en la concentración de material zeolítico mejora la actividad del biocatalizador por el efecto ácido que genera el material en el sustrato al igual que por la capacidad de hidratación de este material que mejora las interacciones enzima-solvente lo cual también fue observado por (Gonçalves 1996).

La comparación realizada entre una esfera de alginato inmovilizada con 3.2% de material poroso y un diámetro de  $3.4 \text{ mm} \pm 0.3 \text{ mm}$ , y el nuevo sistema núcleo-coraza inmovilizada con 3% de material poroso con un diámetro de coraza de  $0.7 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$ , muestra como la retención en la actividad enzimática es mayor en el sistema coraza-núcleo ya que con éste se logra una retención de actividad del 75% comparada con un 55% obtenida con la esfera. Esto puede ser causado por que el efecto del aumento de la porosidad del biocatalizador logrado con la adición del material zeolítico es más visible en el caso del sistema núcleo-coraza, ya que en la lámina donde se encuentra tanto la enzima como el material zeolítico las limitaciones al transporte de masa son pequeñas, en comparación con el otro sistema, donde a pesar de que el material zeolítico puede estar aumentando la difusividad, es tal la restricción al transporte (especialmente a una buena distancia de la superficie del biocatalizador) que los efectos positivos se ven eliminados llevando a una muy baja retención de la actividad. Adicionalmente, es mayor la probabilidad de acción de la enzima cuando se encuentra en la lámina cerca de la superficie, que dentro del catalizador (esfera) donde por los efectos difusionales mencionados tal vez el sustrato ni siquiera sea capaz de llegar.



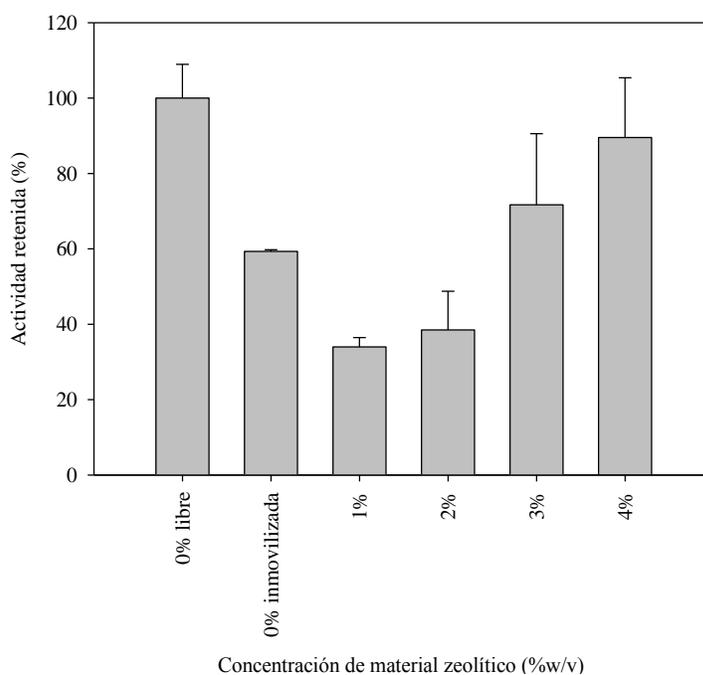
**Figura. 6-12** Porcentaje de actividad retenida en función de la concentración de zeolita en la coraza del inmovilizado para la enzima GC6262  $\alpha$  amilasa.

Por lo tanto la interacción entre el fenómeno de estiramiento de las fibras de alginato y la inserción de material poroso, genera espacios hidratados que proporcionan en la coraza una mayor permeabilidad, facilitando el transporte del almidón dentro de la coraza y su

interacción con la enzima, sin embargo para lograr una alta actividad catalítica se debe alcanzar una concentración mínima de espacios los cuales, como se observa en la Figura. 6-12 para  $\alpha$  amilasa y en la Figura. 6-13 para glucoamilasa se logra con la adición mínimo de un 3% de material poroso.

Como se observa en las Figura. 6-12 y Figura. 6-13, se alcanzaron retenciones de la actividad enzimática del 70% y del 90% para los biocatalizadores con concentración de zeolita del 3% para  $\alpha$  amilasa y del 4% para glucoamilasa sobre la coraza, respectivamente. Siendo esto muy conveniente para llevar a cabo la hidrólisis de almidón con sistemas inmovilizados.

Por lo tanto se estima que la adición de material zeolítico por encima del 3% en el catalizador enzimático inmovilizado tipo núcleo-coraza mejora sus características para el transporte de la suspensión de almidón, al mismo tiempo que establece condiciones microambientales del biocatalizador más adecuadas para una mayor interacción de la enzima con el agua y de la enzima con el sustrato.

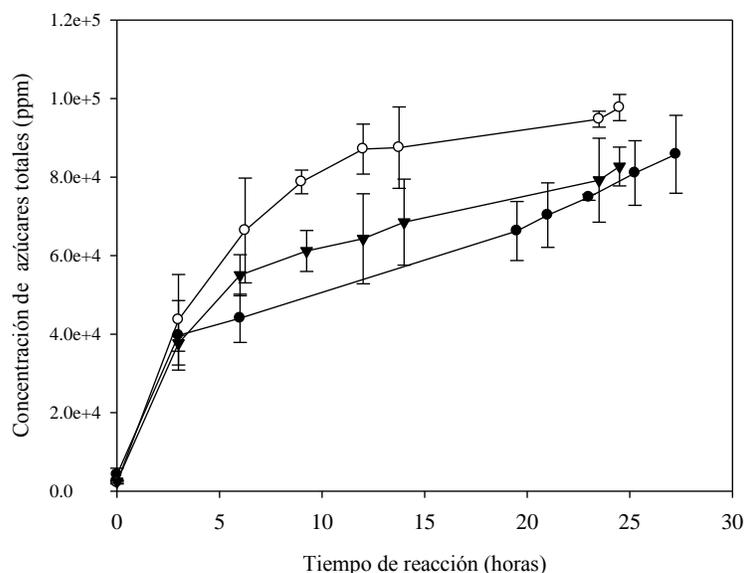


**Figura. 6-13** Porcentaje de actividad retenida en función de la concentración de zeolita en la coraza del inmovilizado para la enzima GZYME<sup>®</sup> 480 glucoamilasa.

## 6.9 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE YUCA NATIVO DE LA REGIÓN AMAZÓNICA COLOMBIANA.

### 6.9.1 Reacción de hidrólisis en estado libre

Los resultados del proceso de hidrólisis enzimática en estado libre se observan en las Figura. 6-14, Figura. 6-15 y Figura. 6-16 para las tres variedades de almidón de yuca seleccionadas (*Arpon* (Y1), *Arawana* (Y2) y *Piririca* (Y3)), con tres diferentes concentraciones de sustrato para cada variedad y empleando adición de las enzimas GC626 y GZYME<sup>R</sup>480 simultáneamente por un periodo de 30 horas a una temperatura de 63°C y pH 4.5.



**Figura. 6-14** Cinética del par enzimático GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480 adicionadas simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para la variedad de almidón de yuca *Arpon* (Y1). Tratamiento ● Y1S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y1S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y1S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)

Los resultados estadísticos muestran que la acción enzimática en estado libre presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las variedades de yuca. Esto está relacionado con la constitución característica de cada variedad de almidón y su capacidad para ser degradado a las condiciones de reacción. Por otro lado, las diferentes concentraciones de sustrato mostraron que durante las primeras tres horas de operación no se presentaron diferencias entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), lo que es visible en las figuras, Figura. 6-14 Figura. 6-15 y Figura. 6-16. Sin embargo, en el periodo de tiempo contemplado entre las 6 y las 30 horas se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones, siendo la concentración de sustrato de 28% (w/v) la mejor condición para todos los tratamientos.

Analizando las Figura. 6-14, Figura. 6-15 y Figura. 6-16 y teniendo como base de comparación la misma concentración de almidón (28%), se observó que la variedad Arpón presentó una disminución en la producción de dextrinas del 13.7% y del 17.8% para las concentraciones de sustrato al 12% y 32% (w/v) respectivamente. Por su parte para la

variedad Arawana se encontró una disminución del 8% para una concentración de 32% (w/v) y una pérdida del 26.2% para la relación al 12% (w/v) de almidón. Un caso más crítico lo presentó la variedad Piririca que presentó una pérdida de producción de dextrinas del 23.4% y 41.2% para las concentraciones del 32% y del 12% (w/v) de sustrato.

Con el fin de realizar un análisis de la información recogida de manera más sencilla, los datos fueron analizados con base en el rendimiento de la reacción para cada tratamiento a 30 horas, calculados como g azúcar/g almidón lo que permite relacionar la producción final de dextrinas con respecto a la concentración inicial de sustrato. Es así como para la concentración de sustrato del 12% (w/v) para todas las variedades (Y1, Y2 y Y3), los resultados fueron 71.51%, 34.40% y 47.18% (g azúcar/g almidón) respectivamente, las cuales fueron mayores a las obtenidas con las concentraciones de sustrato del 28% y del 32% (w/v) en cada variedad. Este alto rendimiento se debe a la influencia de la baja concentración de sustrato que genera un menor efecto de las condiciones inhibitorias del proceso además de requerir un menor tiempo para transformar la cantidad de sustrato presente en el medio.

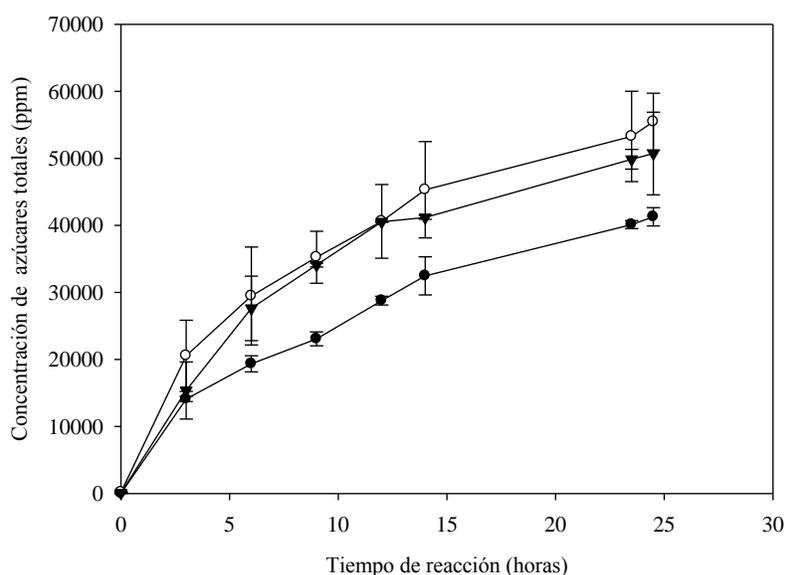
Por su parte la concentración de sustrato del 32% (w/v) presenta rendimientos del 25.84%, 15.85% y 24.88% (g azúcar/g almidón) para las variedades Y1, Y2 y Y3 las cuales son menores a las obtenidas para una concentración del 28% (w/v) de sustrato que fueron del 34.90%, 19,91% y 34.59% (g azúcar/g almidón), lo cual se encuentra relacionado con una posible inhibición por sustrato de la enzima. Concentraciones superiores a este valor no es posible emplearlas debido a que este es el límite de saturación. Por lo tanto los resultados indican que la concentración del 28% (w/v) de almidón es la concentración más adecuada para realizar la hidrólisis enzimática de almidón para las tres variedades estudiadas ya que aunque no presenta el rendimiento más alto del proceso, la concentración de sustrato si produce la mayor cantidad de dextrinas finales que es el principal interés del trabajo.

Por su parte, un análisis realizado sobre las cinéticas de reacción de las variedades de yuca a una misma concentración de sustrato (28% w/v) pueden observarse en la Figura. 6-17, donde la variedad Arawana (Y2S2) se aleja drásticamente del comportamiento observado para los tratamientos Y1S2 y Y3S2 que corresponden a las especies Arpon y Piririca las cuales no presentan diferencias en sus trayectorias. Este comportamiento puede ser influenciado por la cristalinidad del polisacárido que impide un mayor hinchamiento de la molécula evitando la inserción de la enzima a la endo estructura lo cual puede verificarse en la sección 6.1.3.3 donde se indica que la variedad Arawana contiene una concentración de amilosa (6.0% w/w) superior a las variedades Arpon (3.1% w/w) y Piririca (1.4% w/w).

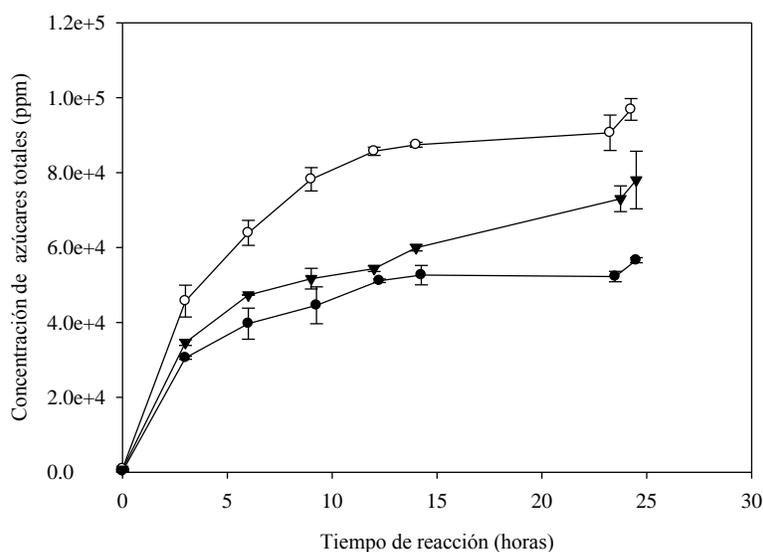
Variedad	Concentración de Sustrato w/v	Concentración final de dextrina (ppm)	Rendimiento (g Azúcar/g Almidón)
Arpon	12%	85,811.98	71.51%

Variedad	Concentración de Sustrato w/v	Concentración final de dextrina (ppm)	Rendimiento (g Azúcar/g Almidón)
Arpon	28%	97,713.38	34.90%
Arpon	32%	82,701.32	25.84%
Arawana	12%	41,275.62	34.40%
Arawana	28%	55,476.99	19.81%
Arawana	32%	50,732.86	15.85%
Piririca	12%	56,615.26	47.18%
Piririca	28%	96,863.01	34.59%
Piririca	32%	78,018.86	24.38%

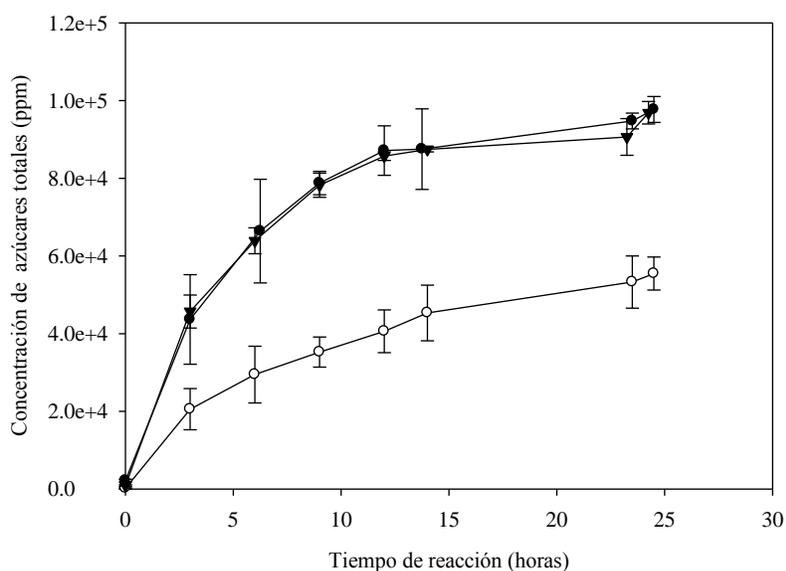
**Tabla 6-11** Tabla de rendimiento de la hidrolisis por efecto de la concentración de sustrato y variedad de yuca para enzima libre



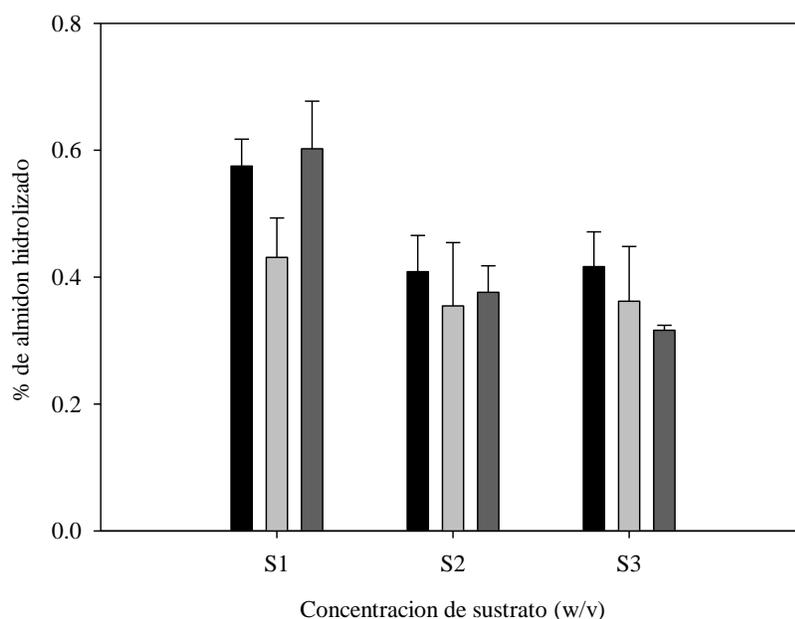
**Figura. 6-15** Cinética del par enzimático GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480 adicionado simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para el almidón de la variedad de yuca *Arawana* (Y2). Tratamiento ● Y1S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y1S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y1S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)



**Figura. 6-16** Cinética del par enzimático GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480 adicionadas simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para la variedad de almidón de yuca *Piririca* (Y3). Tratamiento ● Y1S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y1S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y1S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)



**Figura. 6-17** Cinética del par enzimático GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480 adicionado simultáneamente a una concentración de sustrato del 28% (S2) para tres variedades de almidón de yuca. Tratamiento ● Y1S2 (*Arpón* al 28% w/v); ○ Y2S2 (*Arawana* al 28% w/v); ▼ Y3S2 (*Piririca* al 28% w/v)



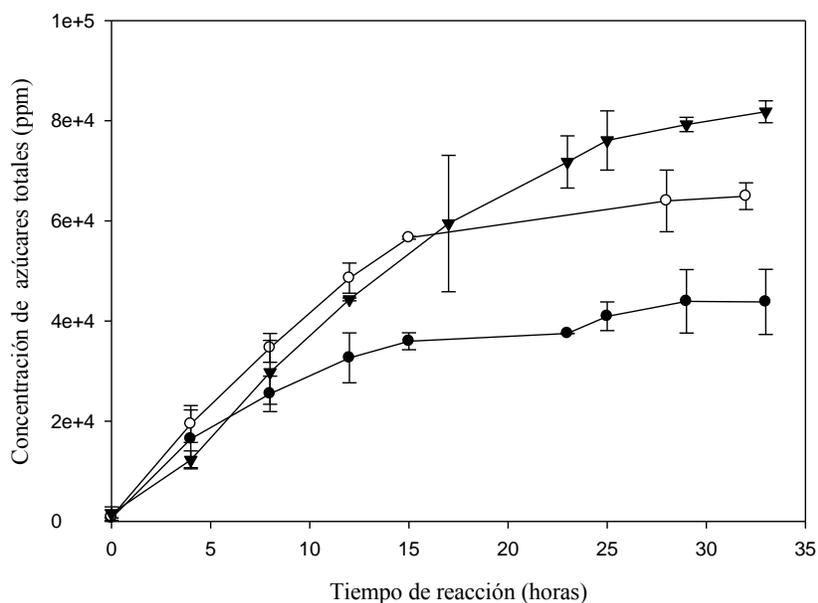
**Figura. 6-18** Cantidad de residuo obtenido del proceso de hidrólisis enzimática a las condiciones de operación establecidas: S1 (12% w/v); S2 (28% w/v); S3 (32% w/v); ■ Y1 (*Arpon*); ■ Y2 (*Arawana*); ■ Y3 (*Piririca*)

Por otro lado, se determinó la eficiencia de la hidrólisis al final de cada experimento con el peso del almidón no reaccionado. Los resultados indicaron que la cantidad de residuo generado por la reacción depende de la concentración inicial del sustrato. Por lo tanto la concentración del 32% w/v genera un porcentaje de residuos superior al obtenido a partir de las concentraciones del 12% y del 28% w/v de sustrato, además la baja tasa de conversión obtenida por la variedad *Arawana* genera la mayor producción de residuos que las otras variedades.

Es así como es posible identificar al almidón de las variedades *Arpon* y *Piririca* como los más adecuados para su transformación en azúcares fermentables a una concentración de 28%, sin embargo la variedad *Piririca* es una yuca de tipo dulce la cual es frecuentemente utilizada como alimento, por otra parte la variedad *Arpon* que es clasificada como yuca de tipo brava es una especie que presenta una menor competencia con los productos alimenticios lo cual la coloca como una variedad de interés comercial y para este estudio se convierte en la variedad con mayor capacidad para la obtención de almidones y su posterior transformación en azúcares fermentables. Por ello, la variedad *Arpon* fue seleccionada para realizar las pruebas experimentales que determinarán las condiciones de operación del proceso a implantar en la región amazónica colombiana.

### 6.9.2 Reacción de hidrólisis con el biocatalizador inmovilizado de tipo coraza núcleo

Utilizando los biocatalizadores de tipo coraza núcleo a una concentración de zeolita del 3% w/v para GC626 y 4% para GZYME<sup>R</sup>480 simultáneamente por un periodo de 30 horas a una temperatura de 63°C y pH 4.5, fueron hidrolizadas tres variedades de almidón de yuca seleccionadas previamente las cuales son mostradas en la Figura. 6-19, Figura. 6-20 y Figura. 6-21 y corresponden a las variedades *Arpon* (Y1), *Arawana* (Y2) y *Piririca* (Y3) a tres concentraciones de sustrato 12% (S1), 28% (S2) y 32% (S3).



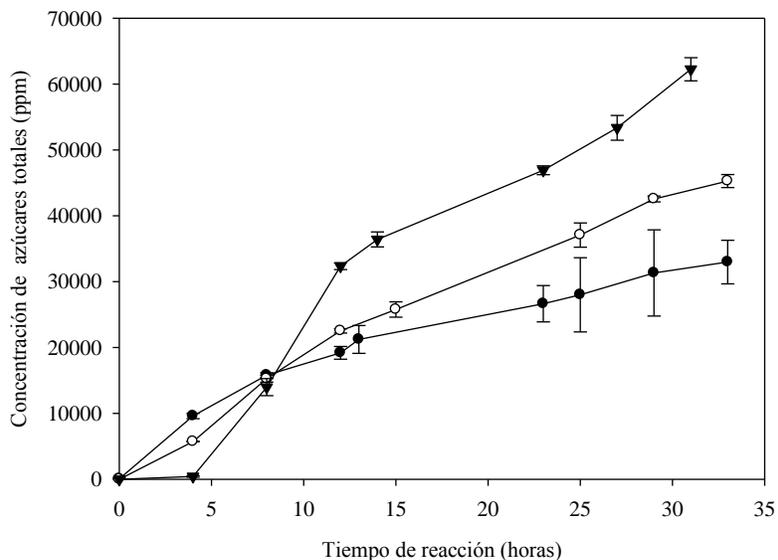
**Figura. 6-19** Cinética del par enzimático inmovilizado en el sistema coraza-núcleo de alginato, enzima (GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480) y zeolita al 3% y 4% respectivamente, adicionadas simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para almidón de la variedad de yuca *Arpon* (Y1). Tratamiento ● Y1S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y1S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y1S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)

Los datos muestran como la concentración de sustrato así como el tipo de almidón de yuca afectan la reacción enzimática del biocatalizador de tipo coraza/núcleo, lo cual es comprobado estadísticamente al encontrar diferencias significativas en cada una de las variables ( $p < 0.05$ ) durante las 10 primeras horas de operación. Por su parte desde las 15 hasta las 30 horas se presentan diferencias ( $p < 0.05$ ) solamente entre las tratamientos que dependen de la concentración como se muestra en las Figura. 6-19, Figura. 6-20 y Figura. 6-21 indicando que el sustrato al 32% (w/v) genera la mayor producción de dextrinas aunque su rendimiento es el más bajo de los tratamientos (Tabla 6-12).

Variedad	Concentración de sustrato w/v	Concentración final de dextrina (ppm)	Rendimiento (g Azúcar/g Almidón)
Arpon	12%	43822.56	36.52%
Arpon	28%	73118.42	26.11%
Arpon	32%	81803.35	25.56%
Arawana	12%	32977.95	27.48%
Arawana	28%	43352.42	15.48%
Arawana	32%	56595.24	17.69%
Piririca	12%	38081.44	31.73%
Piririca	28%	69482.66	12.41%
Piririca	32%	68128.48	21.29%

**Tabla 6-12** Rendimiento de la hidrólisis calculada como gramos de dextrinas por gramo de almidón en función de la concentración de sustrato y variedad de yuca para enzima inmovilizada.

Por otra parte la variedad de almidón de yuca *Arawana* mostró un comportamiento bajo del rendimiento de la reacción con respecto a los otros tratamientos, en un segundo nivel la variedad *Piririca* se encuentra por debajo de la variedad *Arpon* la cual es la variedad con el mejor comportamiento cinético basado en el rendimiento de la reacción.

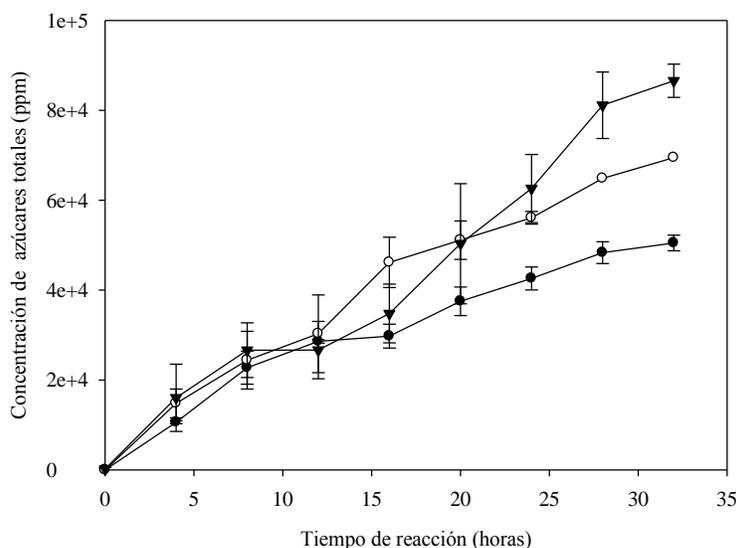


**Figura. 6-20** Cinética del par enzimático inmovilizado en el sistema coraza-núcleo de alginato, enzima (GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480) y zeolita al 3% y 4% respectivamente, adicionadas simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para la variedad de almidón de yuca *Arawana* (Y2). Tratamiento ● Y2S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y2S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y2S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)

Para todos los tratamiento el mejor rendimiento fue obtenido para la concentración de sustrato al 12% (w/v) a la cual le sigue la concentración de sustrato al 28% (w/v) con un valor muy similar al obtenido para él 32% (w/v) lo que indica como la protección del encapsulamiento disminuye los efectos producidos por la concentración de sustrato.

Variedad	Concentración de sustrato (w/v)	Concentración final de dextrina (ppm) enzima libre	Concentración final de dextrina (ppm) enzima inmovilizada	Porcentaje de actividad mantenida de la reacción
Arpon	12%	85,811.98	43,822.56	51.07%
Arpon	28%	97,713.38	73,118.42	74.83%
Arpon	32%	82,701.32	81,803.35	98.91%
Arawana	12%	41,275.62	32,977.95	79.90%
Arawana	28%	55,476.99	43,352.42	78.14%
Arawana	32%	50,732.86	56,595.24	111.56%
Piririca	12%	56,615.26	38,081.45	67.26%
Piririca	28%	96,863.01	34,741.33	35.87%
Piririca	32%	78,018.86	68,128.48	87.32%

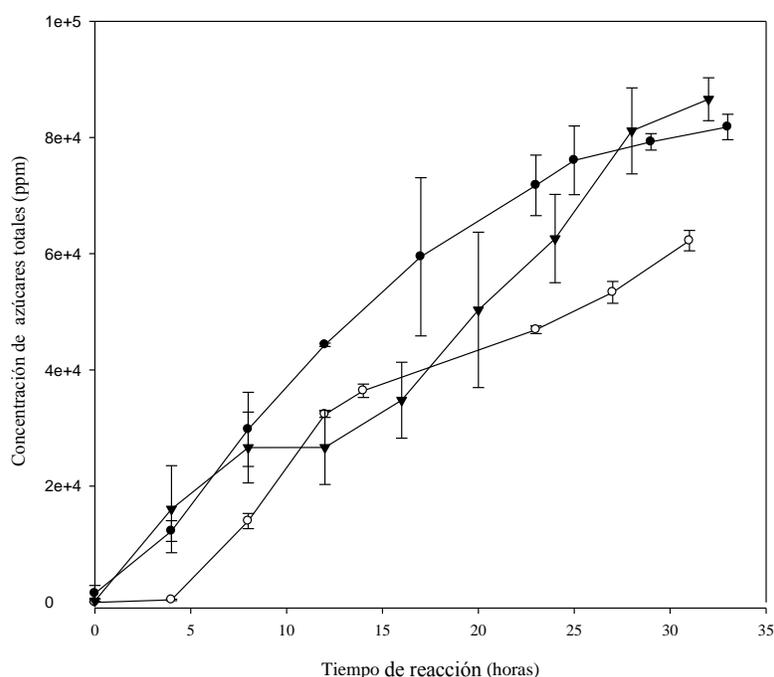
**Tabla 6-13** Rendimiento de la hidrólisis calculada como gramos de dextrinas por gramo de almidón en función de la concentración de sustrato y variedad de yuca para enzima inmovilizada.



**Figura. 6-21** Cinética del par enzimática inmovilizado en el sistema coraza-núcleo de alginato, enzima (GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480) y zeolita al 3% y 4% respectivamente, adicionadas simultáneamente a tres diferentes concentraciones de sustrato para la variedad de almidón de yuca *Piririca* (Y3). Tratamiento ● Y3S1 (concentración de sustrato al 12% w/v); ○ Y3S2 (concentración de sustrato al 28% w/v); ▼ Y3S3 (concentración de sustrato al 32% w/v)

Una comparación realizada sobre la diferencia existente en el comportamiento final del producto de la reacción para la enzima libre vs inmovilizada, muestra como la actividad del biocatalizador se ve favorecida por las concentraciones altas de sustrato en el medio obteniendo un porcentaje de retención de actividad superior al 87.32% para la concentración de sustrato al 32% (w/v) (Tabla 6-13) lo cual puede ser un efecto del microambiente que genera el encapsulamiento protegiendo la enzima de factores indeseables desconocidos como es el caso de la variedad *Arawana*.

La comparación cinética de la hidrólisis de las variedades de yuca a una concentración de sustrato del 32% w/v para la reacción catalizada por la enzima inmovilizada de tipo coraza núcleo que se observa en la **Figura. 6-22**, muestra que la variedad *Arawana* (INY2S3) se aleja del comportamiento observado para INY1S3 (*Arpon*) y INY3S3 (*Piririca*) a partir de las 10 horas de proceso. Por su parte las curvas INY1S3 y INY3S3 no presentan diferencias en sus trayectorias ( $p>0.05$ ) lo que demuestra una vez más la dificultad para la degradación de la variedad *Arawana* frente a las otras especies debido a su alto contenido de amilosa.



**Figura. 6-22** Cinética del par enzimático inmovilizado en el sistema coraza-núcleo de alginato, enzima (GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480) y zeolita al 3% y 4% respectivamente, adicionadas simultáneamente la concentraciones de sustrato del 32% (S3) para las tres variedades de almidón de yuca. Tratamiento ● Y1S3 (*Arpon*); ○ Y2S3 (*Arawana*); ▼ Y3S3 (*Piririca*).

Siendo difícil la identificación de la variedad de almidón amazónico más adecuada para la realización de la hidrólisis con la enzima inmovilizada de tipo coraza-núcleo debido a la no existencia de diferencias significativas ( $p>0.05$ ), se puede determinar que las variedades

*Arpon* y *Piririca* muestran la mayor producción de dextrinas, sin embargo la variedad *Arpon* presenta una concentración relativamente superior de estas durante toda la cinética de reacción lo que la convierte en una especie interesante para llevar a cabo el proceso de hidrólisis en la región amazónica colombiana.

#### 6.10 COMPARACIÓN ENTRE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA DE TIPO CORZA/NÚCLEO DE LA HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE LAS VARIEDADES AMAZÓNICAS.

El análisis factorial de los resultados mostró que la interacción entre las cuatro variables de estudio tipo de enzima (TE) (inmovilizado vs libre), concentración de sustrato (CS) (12%, 28% y 32% w/v), variedades de almidón de yuca (VAY) (*Arpon*, *Arawana* y *Piririca*) y tiempo (T) no tienen un impacto directo sobre la reacción en función del tiempo  $p < 0.05$ , sin embargo al analizar las interacciones triples se puede observar que *la concentración de sustrato-tipo de enzima-tiempo* al igual que *variedad de almidón de yuca-enzima- tiempo* presentan una alteración en el comportamiento de la producción de dextrinas totales, lo cual es fácilmente apreciable al ver el efecto que tiene la concentración de sustrato sobre la enzima libre (Tema 6.9.1) o el comportamiento de la variedad de almidón sobre la enzima inmovilizada (6.9.2) en función del tiempo.

Por otra parte, el análisis estadístico ratifica que todas las interacciones dobles como son CS\*VAY, CS\*E, CS\*T, VAY\*E, VAY\*T y E\*T son factores que alteran el proceso de producción de dextrinas lo que indica que las condiciones de operación de una hidrólisis son específicas para las características de la materia prima y no puede formularse una sola metodología de proceso, siendo así que cada sustrato tiene sus condiciones específicas de máxima producción de producto para lo cual se debe realizar una selección completa de las variables de proceso como también ha sido mencionado por diversos autores (Roberto & Gerardo 1994; Bai et al. 2008; Vogel 1997; Drapcho 2008b; Doble 2004; R Tester et al. 2006; Ogonna & Okoli 2010) entre otros.

Source	DF	SS	MS	F	P
REPLICA (A)	1.0000	0.0024	0.0024		
SUSTRATO (CS)	2.0000	1.0785	0.5393	438.2100	0.0000
VARIEDAD (VAY)	2.0000	0.6933	0.3467	281.7100	0.0000
ENZIMA (E)	1.0000	0.5978	0.5978	485.7500	0.0000
TIEMPO (T)	7.0000	2.2855	0.3265	265.3200	0.0000
CS*VAY	4.0000	0.1209	0.0302	24.5600	0.0000
CS*E	2.0000	0.1578	0.0789	64.1000	0.0000
CS*T	14.0000	0.1957	0.0140	11.3600	0.0000
VAY*E	2.0000	0.0876	0.0438	35.6100	0.0000
VAY*T	14.0000	0.1162	0.0083	6.7400	0.0000
E*T	7.0000	0.0812	0.0116	9.4300	0.0000

<b>CS*VAY*E</b>	4.0000	0.0894	0.0224	18.1700	0.0000
<b>CS*VAY*T</b>	28.0000	0.0303	0.0011	0.8800	0.6434
<b>CS*E*T</b>	14.0000	0.0447	0.0032	2.5900	0.0023
<b>VAY*E*T</b>	14.0000	0.0186	0.0013	1.0800	0.3837
<b>CS*VAY*E*T</b>	28.0000	0.0293	0.0011	0.8500	0.6826
<b>Error</b>	143.0000	0.1760	0.0012		
<b>Total</b>	287.0000	5.8051			
<b>Grand Mean</b>	0.1864	<b>CV</b>	18.82		

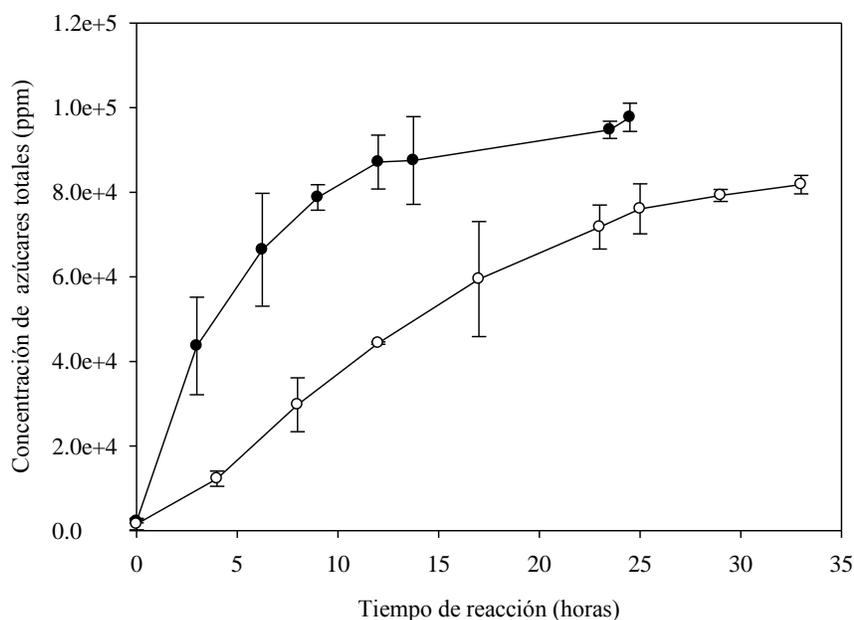
**Tabla 6-14** Análisis factorial del proceso de hidrólisis enzimática en estado libre e inmovilizado para tres variedades de yuca de la región amazónica colombiana a tres concentraciones de sustrato en función del tiempo.

Por otro lado las una comparaciones múltiples por diferencia de medias y agrupación de grupos homogéneos por prueba de Tukey (Tabla 6-15) muestra como las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso están dados por el grupo A el cual corresponde a las condiciones de la enzima en estado libre a una concentración de sustrato del 28% w/v para las variedades de yuca *Arpon* y *Piririca*, por otro lado las mejores condiciones para la enzima en estado inmovilizado están dadas por una concentración de sustrato al 32% w/v y la variedad de yuca *Arpon* el cual pertenece al grupo AB. De igual manera el comportamiento puede observarse en las curvas Figura. 6-15, Figura. 6-20, Figura. 6-23.

Tipo de Enzima	Concentración de sustrato	Variedad de yuca	Media	Grupos
1	2	1	97713	A
1	2	3	96863	A
1	1	1	85701	AB
1	3	1	82701	AB
2	3	1	81803	AB
1	3	3	78019	AB
2	2	1	73118	AB
2	3	3	68128	AB
1	1	3	56615	AB
2	3	2	56595	AB
1	2	2	55477	AB
1	3	2	50733	AB
2	1	1	43823	AB
2	2	2	43452	AB
1	1	2	41276	AB
2	1	3	38081	B
2	2	3	34741	B
2	1	2	322978	B

**Tabla 6-15** Selección del proceso de hidrólisis enzimática, comparaciones múltiples por diferencia de medias y agrupación de grupos homogéneos por prueba de Tukey: Tipo de

enzima (1 – libre; 2 – Inmovilizada), Concentración de sustrato (1- 12% (w/v); 2-28% (w/v); 3-32% (w/v)), variedad de yuca (1-*Arpon*; 2-*Arawana*; 3-*Piririca*).



**Figura. 6-23** Comparación cinética del par enzimática en estado inmovilizado y en estado libre de las enzimas GC6262 y GZYME<sup>R</sup>480 adicionadas simultáneamente a la concentraciones de sustrato del 32% w/v (○) para la enzima inmovilizada y del 28% w/v (●) para la enzima libre sobre la variedad de almidón de yuca *Arpon*.

Por su parte el efecto de la interacción enzima con respecto a la variedad puede observarse en la Figura. 6-17 y Figura. 6-22 donde las características específicas de cada variedad determinan la curva cinética recorrida por la enzima siendo la variedad *Piririca* y *Arpon* las de mejor comportamiento, por otra parte mientras en el estado libre la curva cinética de reacción muestra una alta diferencia entre los tratamientos (LY1S2 vs LY2S2) aproximadamente de 40,000.00 ppm  $\pm$  5000.00 para la enzima inmovilizada la diferencia entre los tratamientos InY1S2 vs InY2S2 es 20000.00 ppm  $\pm$  5000.00 lo cual indica que en la enzima inmovilizada el factor que domina el comportamiento de la enzima no es la variedad de la yuca sino la distribución de tamaño de las macromoléculas en la solución.

ENZIMA	VARIEDAD	SUSTRATO	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	3	0.12	0.25%	25.45%	33.05%	37.14%	42.61%	43.86%	43.53%	47.18%
1	3	0.32	0.24%	10.82%	14.78%	16.15%	16.99%	18.73%	22.82%	24.38%
1	3	0.28	0.33%	16.32%	22.83%	27.93%	30.60%	31.22%	32.37%	34.59%
1	2	0.12	0.03%	11.76%	16.13%	19.23%	23.98%	27.06%	33.43%	34.40%
1	2	0.28	0.07%	7.34%	10.52%	12.59%	14.50%	16.19%	19.03%	19.81%
1	2	0.32	0.04%	4.80%	8.63%	10.65%	12.67%	12.87%	15.58%	15.85%

ENZIMA	VARIEDAD	SUSTRATO	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	1	0.12	0.0349	33.08%	36.70%	55.22%	58.59%	62.38%	67.52%	0.7151
1	1	0.28	0.78%	15.59%	23.72%	28.13%	31.12%	31.25%	33.84%	34.90%
1	1	0.32	0.76%	11.78%	17.19%	19.12%	20.09%	21.41%	24.75%	25.84%
2	3	0.12	0.00%	8.84%	15.66%	19.21%	20.24%	24.80%	27.08%	31.73%
2	3	0.28	0.00%	5.29%	8.72%	10.82%	13.53%	15.84%	17.26%	12.41%
2	3	0.32	0.07%	5.01%	8.33%	8.33%	10.87%	14.68%	16.25%	21.29%
2	2	0.12	0.06%	8.00%	13.17%	17.88%	19.69%	22.21%	23.34%	27.48%
2	2	0.28	0.00%	1.55%	4.12%	4.70%	5.66%	9.39%	11.22%	15.48%
2	2	0.32	0.00%	0.13%	4.37%	8.70%	9.96%	11.97%	13.51%	17.69%
2	1	0.12	0.55%	13.73%	21.23%	27.21%	29.98%	31.27%	34.12%	36.52%
2	1	0.28	0.34%	6.94%	12.37%	17.35%	20.22%	22.85%	23.19%	26.11%
2	1	0.32	0.48%	3.84%	9.30%	13.85%	18.59%	22.43%	23.77%	25.56%

**Tabla 6-16** Rendimiento de la reacción de hidrólisis para cada tiempo a las condiciones de: Tipo de enzima libre (1) e Inmovilizada (2); Variedad de almidón de yuca *Arpon* (1), *Arawana* (2) y *Piririca* (3); Concentración de sustrato 12% (w/v), 28 (w/v) y 32% (w/v); Tiempo en horas T0=0,0 T1=4.5, T2=8.5, T3=13.0, T4=17.0, T5=22.0, T6=25.0, T7= 30.5

## 7 CONCLUSIONES

Las variedades de la región amazónica con mayor potencialidad desde el punto de vista fisicoquímico para su transformación son *Piririca* y *Arawana*, esto debido a la alta relación de respuesta que se obtuvo al evaluar los cuatro factores de estudio.

Las enzimas más viables para un proceso de producción de azúcares fermentables a baja temperatura son la GC626 y G-ZYME<sup>®</sup>480 que trabajan a pH 4.5 y temperatura 63°C ya que estas trabajan sinérgicamente y son activadas a la temperatura de procesos el cual beneficia las condiciones de hinchamiento del almidón..

La diferencia existente entre la secuencia mostro como entre las enzimas GC626-GZYME<sup>®</sup>480 se presentan similitudes entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ) sin embargo el proceso más adecuado para la hidrólisis de almidón de yuca es la adición simultanea de las enzimas debido a una menor manipulación del medio de reacción.

La mejor actividad encontrada para el método de inmovilización de tipo coraza-núcleo se percibe para la enzima GC626 al 3% w/v de material poroso con una similitud frente a la enzima libre del 75% por otro lado la concentración de material poroso para la enzima GZYME<sup>®</sup>480 es del 4% w/v con una similitud en la actividad con la enzima libre del 90%.

Bajo las características de un biocatalizador libre se recomienda la implantación de un proceso de hidrólisis con la variedad *Arpon* por ser una variedad de tipo brava, a una concentración del 28% de almidón w/v con una dosis de enzima de 0,438  $\mu$ L enzima/g almidón para  $\alpha$  amilasa **GC626** y 0.8849  $\mu$ L enzima/g almidón para la glucoamilasa **G-ZYME<sup>R</sup>480**.

El uso de enzimas inmovilizadas en la región amazónica para los procesos industriales debe tomarse en cuenta ya que la dificultad en el transporte aumentan el precio de los insumos afectando económicamente la producción lo cual puede ser mitigado por la reutilización del biocatalizador.

Las condiciones experimentales de operación para el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de yuca nativa de la región amazónica en la ciudad de Leticia deben ser llevadas a cabo a 63°C por un periodo mínimo de 30 horas con almidón de la variedad *Arpon* al 32%(w/v), con un pH de 4.5 trabajando con las enzimas **GC626** y **G-ZYME<sup>R</sup>480** simultáneamente inmovilizadas por atrapamiento con alginato de calcio en el sistema coraza-núcleo utilizando un porcentaje superior al 3% (w/v) de material poroso en la coraza.

## 8 RECOMENDACIONES

Se debe realizar la confrontación entre las condiciones experimentales obtenidas del proceso de reacción del sistema coraza núcleo con un modelo matemático de reacción que permita definir los espesores adecuados del nuevo sistema de inmovilización.

Es necesario tener en cuenta para la selección de la variedad de yuca para un proceso de hidrólisis enzimática *las condiciones agrícolas* como son el rendimiento por hectárea y la concentración de almidón libre así como también *las condiciones de reacción* como la susceptibilidad a la hidrólisis, la relación de amilosa/amilopectina y la concentración de proteína.

El modelo de selección de variedad debe ser optimizado, al cual se le debe adicionar la variable rendimiento por hectárea con el fin de tener un modelo que se aproxime a la condiciones reales de selección, lo cual permitirá una fácil selección de las variedades de yuca para la producción de azúcares fermentables en todo el país.

## 9 BIBLIOGRAFÍA.

- Abian, O., 2002. Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 295-303.
- Acosta M., L.E. et al., 2004. *Enterramiento de masas de yuca del pueblo Ticuna: Tecnología tradicional en la várzea del Amazonas colombiano*. 2005° ed., Leticia, Colombia: Equilátero.
- Aehle, W., 2004. *Enzymes in industry : production and applications* 2° ed., Weinheim: Wiley-VCH.
- Alarcón, F. & Dominique, D., *Almidón agrio de yuca en Colombia producción y recomendaciones*, Centro Internacional de Agricultura Tropical, International Center for Tropical Agriculture.
- Alvis, A. et al., 2008. Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame, Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. *Información tecnológica*, 19(1).
- Arias G., J.C. et al., 2005. *Diversidad de yucas ( Manihot esculenta Crantz) entre los Ticuna: Riqueza cultural y genética de un producto tradicional* 2005° ed., Leticia, Colombia: Equilatero.
- Arica, M., 1995. Covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase onto pHEMA microspheres: preparation and application to fixed bed reactor. *Biomaterials*, 16(10), 761-768.
- Aristizábal, J. & Sánchez, T., 2007. *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca*, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Arroyo, M., 1998. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39, 23-39.
- Azevedo, H.S. & Reis, R.L., 2009. Encapsulation of  $\alpha$ -amylase into starch-based biomaterials: An enzymatic approach to tailor their degradation rate. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3021-3030.
- Bai, F., Anderson, W. & Mooyoung, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89-105.
- Bailey, P., 1995. *Organic chemistry : a brief survey of concepts and applications* 5° ed., Englewood Cliffs N.J.: Prentice Hall.
- BeMiller, J., 2009. *Starch : chemistry and technology* 3° ed., London: Academic.

- Bernfeld, P., 1955. Amylase, alfa and beta. *Methods Enzymol*, (1).
- Betancor, L. & Luckarift, H., 2008. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 26(10), 566-572.
- Bird, R., 1987. *Fenómenos de transporte : un estudio sistemático de los fundamentos del transporte de la materia, energía y cantidad de movimiento*, México: Ediciones Repla ;Editorial Reverté.
- Boyer, R., 2000. *Conceptos en bioquímica*, México: Rodney Boyer.
- Bradshaw, I.J. & Kennedy, J.F., 1985. Starch: Chemistry and technology, 2nd edition edited by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall, Academic Press, Orlando, Florida, 1984. pp. 736, price £53.00. ISBN 0-12-746270-8. *British Polymer Journal*, 17(4), 377-378.
- Brena, B. et al., 1996. Chromatographic methods for amylases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 684(1-2), 217-237.
- Bugg, T., 2004. *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry 2º ed.*, Oxford UK ;Malden MA USA: Blackwell Pub.
- Buléon, A., 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85-112.
- Cao, L., 2005a. *Carrier-bound immobilized enzymes : principles, applications and design*, Weinheim: Wiley-VCH.
- Cao, L., 2005b. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 217-226.
- Cárdenas, F.M., 2006. *EL CULTIVO DE LA YUCA*, Ecuador: INIAP.
- Ceballos, H. & de la Cruz, G.A., 2002. Taxonomía y Morfología de la Yuca. *Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización*, 586.
- CIBaQ, 2009. Guía de Trabajo Práctico.
- Davis, M., 1998. Zeolite-based catalysts for chemicals synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials*, 21(4-6), 173-182.
- Debet, M. & Gidley, M., 2006. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64(3), 452-465.
- Dimitrovova, Z., 2002. Analysis and Characterization of Relative Permeability and Capillary Pressure for Free Surface Flow of a Viscous Fluid across an Array of Aligned Cylindrical Fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 245(2), 325-

- Doble, M., 2004. *Biotransformations and bioprocesses*, New York: Marcel Dekker.
- Domínguez, C., 2009. *Inmovilización Covalente y Orientada de Enzimas Lacasas sobre distintas superficies para su uso como cátodo en pilas de combustible*. Doctoral. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Doran, P., 1998. *Principios de ingeniería de los bioprocesos*, Zaragoza: Acribia.
- Drapcho, C., 2008a. *Biofuels engineering process technology*, New York: McGraw-Hill.
- Drapcho, C., 2008b. *Biofuels engineering process technology*, New York: McGraw-Hill.
- Edser, C., 2005. Encapsulation, controlled release and other applications. *Focus on Surfactants*, 2005(11), 1-2.
- Ellen, F., Wallace, L. & Walter, L., 1974. Studies on the Carbohydrate Moiety of Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase: Interaction of the Enzyme with Concanavalin A — PNAS. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 17(8), 3217-3220.
- El-Sharkawy, M.A., 2004. Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology*, 56(4), 481-501.
- Federico, S. & Herzog, W., 2008. On the permeability of fibre-reinforced porous materials. *International Journal of Solids and Structures*, 45(7-8), 2160-2172.
- Fernandez, J., 2005. Estructura y Función de los hidratos de carbono: azúcares, almidón, glucógeno, celulosa. En *Ampliación de Tecnología de los Alimentos*. España: Facultad de Ingeniería Química Universidad de Almería.
- Fisher, E. & Stein, E., 1960. alfa Amylase. *The Enzyme*, 2.
- Freifelder, D., 1987. *Study guide for Molecular biology, 2nd edition*, Boston: Jones and Bartlett.
- GENENCOR, 2007. Method Number. C100C-00 Fungal Glucoamylase, GAU/g Activity.
- GENENCOR, 2004. Method Number. C113C-00 Alpha-Amylase, AAU Activity.
- GENENCOR, 1999. Method Number: C100C-02, GAU Activity.
- GENENCOR, 2008. REV 0608GC 626 Acid Alpha Amylase.
- GENENCOR, 2004. REV0804 G-ZYME 480 ETHANOL Saccharifying Enzyme for Ethanol Production.

- GENENCOR, 2005. STARGEN 001 Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production.
- Ghiaci, M. et al., 2009. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science*, 43(3-4), 289-295.
- Ghobarkar, H., Schaf, O. & Guth, U., 1999. Zeolites: from kitchen to space. *Progress in Solid State Chemistry*, 27(2-4), 29-73.
- Glusker, J.P., 1991. Structural Aspects of Metal Liganding to Functional Groups in Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 42, 1-76.
- Gonçalves, A., 1996. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1(2), 53-60.
- Grace, M., 1977. *Analisis de la yuca.*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Grasselli, M. et al., 2001. From microspheres to monoliths: Synthesis of porous supports with tailored properties by radiation polymerization. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4), 254-261.
- Gupta, R. et al., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Han, X., 2002a. Influence of maize starch granule-associated protein on the rheological properties of starch pastes. Part I. Large deformation measurements of paste properties. *Carbohydrate Polymers*, 49(3), 315-321.
- Han, X., 2002b. Influence of maize starch granule-associated protein on the rheological properties of starch pastes. Part II. Dynamic measurements of viscoelastic properties of starch pastes. *Carbohydrate Polymers*, 49(3), 323-330.
- Hernáiz, M., 2009. Fundamentos y Generalidades de la inmovilización.
- Hernández, R.J., 2005. *Utilización de aluminosilicatos cubanos no tradicionales en la fabricación de vidrio sódico-cálcico.* Cuba: IMRE.
- Holme, D., 1998. *Analytical biochemistry* 3<sup>o</sup> ed., Harlow Essex U.K. ;;New York: Longman.
- Hoover, R., 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 253-267.
- Inga S., H.I. & López P., J., 2001. DIVERSIDAD DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)

EN JENARO HERRERA, LORETO – PERÚ.

- Iyer, P.V. & Ananthanarayan, L., 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032.
- Jacobs, H., 1998. Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches—DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydrate Research*, 308(3-4), 359-371.
- Jeng, W. et al., 2010. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047847710002224>.
- Johnson, R., Padmaja, G. & Moorthy, S., 2009. Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 616-620.
- Kahraman, M. et al., 2007.  $\alpha$ -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, 104(4), 1385-1392.
- Karkalas, J., 1995. Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. *Carbohydrate Research*, 268(2), 233-247.
- Katchalski-Katzir, E., 1993. Immobilized enzymes—learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, 11(11), 471-478.
- Klei, H., Sundstrom, D. & Shim, D., 1985. Immobilization of enzymes by microencapsulation en Immobilized cells and enzymes: a practical approach J. Woodward. *IRL Pres*, 49-54.
- Konsoula, Z. & Liakopouloukyriakides, M., 2006. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41(2), 343-349.
- Koyama, K., 2004. Evaluation of mass-transfer characteristics in alginate-membrane liquid-core capsules prepared using polyethylene glycol. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(2), 114-121.
- Lee, C., Lin, T. & Mou, C., 2009. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, 4(2), 165-179.
- Leuchtenberger, A., 1974. L. B. Wingard: Enzyme Engineering, Biotechnology and Bioengineering. Symposium Nr. 3, 415 Seiten. Interscience Publishers a division of J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1972. Preis: 5,45 £. *Food / Nahrung*, 18(2), 226-227.

- Liao, Y. & Syu, M., 2005. Novel immobilized metal ion affinity adsorbent based on cross-linked  $\beta$ -cyclodextrin matrix for repeated adsorption of  $\beta$ -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 17-24.
- Liu, H. et al., 2008. Fabrication of novel core-shell hybrid alginate hydrogel beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 351(1-2), 104-112.
- Liu, J. et al., 2009. Iodine binding property of a ternary complex consisting of starch, protein, and free fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 75(2), 351-355.
- Lonsane, B. & Ramesh, M., 1990. Production of Bacterial Thermostable  $\alpha$ -Amylase by Solid-State Fermentation: A Potential Tool for Achieving Economy in Enzyme Production and Starch Hydrolysis. *Advances in Applied Microbiology*, 35, 1-56.
- Machius, M. et al., 1998. Activation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase through a disorder $\rightarrow$ order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, 6(3), 281-292.
- Madigan, M., 2008. *Brock biología de los microorganismos* 10<sup>o</sup> ed., Madrid [etc.]: Pearson Prentice Hall.
- Mahasukhonthachat, K., Sopade, P. & Gidley, M., 2010. Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size $\star$ . *Journal of Food Engineering*, 96(1), 18-28.
- Marangoni, A., 2003. *Enzyme kinetics : a modern approach*, Hoboken N.J.: Wiley-Interscience.
- Martín, J. & López, E., 2006. Modificación Física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. *Universida Nacional de Colombia*.
- Martinek, K. & Mozhaev, V., 1987. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Enzymol*, 57, 179-249.
- Mateo, C. et al., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
- Maxim, S., Flondor, A. & Carpov, A., 1987. Ionic binding of biologically active proteins on cross-linked acrylic macromolecular supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(5), 593-597.
- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C. & James, M.N., 1991. Calcium-Binding Sites in Proteins: A Structural Perspective. *Advances in Protein Chemistry*, 42, 77-82.
- Moriya, K., Tanizawa, K. & Kanaoka, Y., 1989. Immobilized chymotrypsin by means of Schiff base copper(II)chelate. *Biochemical and Biophysical Research*

*Communications*, 162(1), 408-414.

Morrison, W. & Gadan, H., 1987. The amylose and lipid contents of starch granules in developing wheat endosperm. *Journal of Cereal Science*, 5(3), 263-275.

Morrison, W.R., 1988. Lipids in cereal starches: A review. *Journal of Cereal Science*, 8(1), 1-15.

Murray, R., 2003. *Harper's illustrated biochemistry* 26<sup>o</sup> ed., New York ;London: McGraw-Hill.

Ogbonna, C.N. & Okoli, E.C., 2010. Conversion of cassava flour to fuel ethanol by sequential solid state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, 45(7), 1196-1200.

Oliveira, G.B. et al., 2008. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive and Functional Polymers*, 68(1), 27-32.

Ospina, B. & Hernán, C., 2002. *La Yuca en el Tercer Milenio*, Cali, Colombia: Cebtro Internacional de Agricultura Tropical.

Pandya, P. et al., 2005. Studies on the activity and stability of immobilized  $\alpha$ -amylase in ordered mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 77(1), 67-77.

Pazarlioğlu, N.K. & Telefoncu, A., 2005. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochemistry*, 40(5), 1807-1814.

Potier, P., 2001. Proteinase N-catalysed regioselective esterification of sucrose and other mono- and disaccharides. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12(17), 2409-2419.

Qi, X., 2003. Molecular Basis of the Gelatinisation and Swelling Characteristics of Waxy Rice Starches Grown in the Same Location During the Same Season. *Journal of Cereal Science*, 37(3), 363-376.

Robert V, S. & Spencer J, W., 2009. Disaccharides, Oligosaccharides and polysaccharides. En *Carbohydrates: the Sweet Molecules of Life*. 10.

Roberto, E. & Gerardo, E., 1994. Etanoil de lignocelulósicos tecnología y perspectiva.

Roy, I., 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 26-32.

Salgado, P. et al., 2008. Biodegradable foams based on cassava starch, sunflower proteins and cellulose fibers obtained by a baking process. *Journal of Food Engineering*,

85(3), 435-443.

Sauer, J., 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 275-293.

Schaechter, M., 2009. *Encyclopedia of microbiology*. 3° ed., London: Academic.

Serrato B, J.C., 2004. *ESTUDIO CINÉTICO DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA EN UN REACTOR DE LECHO FIJO CON RECIRCULACIÓN*. Msc. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Shariffa, Y. et al., 2009. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 434-440.

Siddiqui, K. et al., 2009. 3KWX Alpha-amylase A type-1/2. *RCSB Protein Data Bank*. Available at: <http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?outformat=&qrid=78E6012A&tabtoshow=Current> [Accedido Octubre 14, 2010].

da Silva, J.T. et al., 2008. Derivados de la Yuca y Componentes Tóxicos en Brasil. *TEMAS AGRARIOS*, 13(2), 5-16.

Sluiter, A. et al., 2008. *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy.

Sluiter, A. et al., 2005. *Determination of Ash in Biomass*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute • Battelle.

Sluiter, A. & Sluiter, J., 2005. *Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute • Battelle.

Sodhi, H.K. et al., 2005. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40(2), 525-534.

Strasburger, E., 1974. *Tratado de botánica* 6° ed., Barcelona: Marín.

Tanaka, A., 2002. Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with *Bacillus*  $\alpha$ -amylases in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(5), 485-490.

Taniguchi, H. & Honnda, Y., 2009. *Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier.

- Taqieddin, E., 2004. Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25(10), 1937-1945.
- Tester, R., Qi, X. & Karkalas, J., 2006. Hydrolysis of native starches with amylases☆. *Animal Feed Science and Technology*, 130(1-2), 39-54.
- Tester, R.F., Karkalas, J. & Qi, X., 2004a. Starch--composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Tester, R.F., Karkalas, J. & Qi, X., 2004b. Starch--composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Tester, R.F., Karkalas, J. & Qi, X., 2004c. Starch--composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Thiebault, N. et al., 2008. Efficient regioselective chemical modifications of maltotriose: an easy access to oligosaccharidic scaffold. *Carbohydrate Research*, 343(16), 2719-2728.
- Tripathi, P. et al., 2007. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1-4), 69-74.
- Tümtürk, H., 2000. Covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene -2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on the enzyme activity. *Food Chemistry*, 68(3), 259-266.
- Vallee, B.L. et al., 1959. Metal Content of Alfa Amylases of Various Origins. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(11).
- Vogel, H., 1997. *Fermentation and biochemical engineering handbook : principles, process design, and equipment*. 2<sup>o</sup> ed., Westwood N.J. U.S.A.: Noyes Publications.
- Wang, A. et al., 2010. Stable and efficient immobilization technique of aldolase under consecutive microwave irradiation at low temperature. *Bioresource Technology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410014082>.
- Watcharatewinkul, Y. et al., 2009. Pasting properties of a heat-moisture treated canna starch in relation to its structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 505-511.
- Weitkamp, J., 2000. Zeolites and catalysis. *Solid State Ionics*, 131(1-2), 175-188.
- Whistler, R., 1984. *Starch : chemistry and technology* 2<sup>o</sup> ed., Orlando: Academic Press.

- Whitaker, J., 2003. *Handbook of food enzymology*, New York: Marcel Dekker.
- Wingard, L., 1976. *Immobilized enzyme principles*, New York: Academic Press.
- Wrolstad, R., 2000. *Handbook of food analytical chemistry [vol.1] water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates [vol.2] pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
- Wrolstad, R.E. et al., 2005. *Handbook of food analytical chemistry*, Hoboken N.J.: J. Wiley.
- Wulff, G., 1998. Modification of amylose and investigation of its inclusion behavior. *Carbohydrate Research*, 307(1-2), 19-31.
- Xie, F. et al., 2009. Rheological properties of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 49(3), 371-377.
- Yan, J. et al., 2010. Adsorption, immobilization, and activity of  $\beta$ -glucosidase on different soil colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348(2), 565-570.
- Zanin, G.M. & Moraes, F.F., 1995. Stability of immobilized amyloglucosidase in the process of cassava starch saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51-52(1), 253-262.

## 10 LISTA DE ECUACIONES.

ECUACIÓN 4-1 .....	18
ECUACIÓN 4-2 REPRESENTACIÓN QUÍMICA DE LA ZEOLITA .....	43
ECUACIÓN 5-1 PONDERACIÓN DE DATOS PARA LA YUCA AMAZÓNICA ( <i>M. ESCULENTA</i> ) COLECTADA DE LA CIUDAD DE LETICIA .....	52
ECUACIÓN 6-1 CALCULO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	77
ECUACIÓN 6-2 REGRESIÓN LINEAL DE LA ENZIMA STARGEN <sup>TM</sup> 001 DE LA CINÉTICA A 24 HORAS .....	79

## 11 LISTA DE FIGURAS.

FIGURA. 4-1 PLANTA DE YUCA MANIHOT ESCULENTA CRANTZ, NÚCLEO PRODUCTIVO DEL INSTITUTO AMAZÓNICO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS SINCHI, CIUDAD DE LETICIA, AMAZONIA COLOMBIANA.....	15
FIGURA. 4-2 CORTE TRANSVERSAL DE LA RAÍZ DE LA YUCA (ALARCÓN & DOMINIQUE S.D.) 16	
FIGURA. 4-3 A) AMILOSA. A-(1→4) GLUCAN; PROMEDIO N=CA 1000 CADENA LINEAL QUE PUEDE LLEVARSE A CADENAS MODERADAMENTE LARGAS ENLAZADAS CON A-(1→6). (RICHARD F. TESTER ET AL. 2004A). B) AMILOPECTINA. A-(1→6) PUNTO DE RAMIFICACIÓN; CADENAS EXTERNAS A=CA 12-23. PARA CADENAS INTERNAS B=CA. 20- 30. AMBOS SE ENCUENTRAN ASOCIADOS AL ORIGEN BOTÁNICO. (RICHARD F. TESTER ET AL. 2004A).....	16
FIGURA. 4-4 HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN .....	18
FIGURA. 4-5 ENZIMAS AMIOLÓLICAS UTILIZADAS PARA LA REACCIÓN DE HIDROLISIS DE ALMIDÓN A) ALFA AMILASA (SIDDIQUI ET AL. 2009) B) GLUCOAMILASA (JENG ET AL. 2010).....	20
FIGURA. 4-6 INMOVILIZACIÓN DE TIPO ABSORCIÓN DE UNA SOLA CAPA (FUENTE AUTOR). ...	28
FIGURA. 4-7 INMOVILIZACIÓN DE TIPO COVALENTE A) AMINO ACIDO ACTIVO RESIDUAL, B) ENLACE FUNCIONAL DEL SOPORTE (FUENTE AUTOR).....	29
FIGURA. 4-8 ENCAPSULAMIENTO DE ENZIMAS EN UNA MEMBRANA SEMIPERMEABLE .....	31
FIGURA. 4-9 ATRAPAMIENTO DE ENZIMAS EN UNA RESINA POLIMÉRICA. ....	31
FIGURA. 4-10 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO.....	33
FIGURA. 4-11 PROCESO DE ATRAPAMIENTO DE UNA ENZIMA EN UNA MATRIZ POLIMÉRICA. ..	36
FIGURA. 4-12 EJEMPLOS DE ALDOSAS (MURRAY 2003).....	38
FIGURA. 4-13 EJEMPLO DE CETOSAS (MURRAY 2003).....	38
FIGURA. 4-14 EJEMPLOS DE DISACÁRIDOS (MURRAY 2003; POTIER 2001; ROBERT V & SPENCER J 2009) .....	39
FIGURA. 4-15 DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA DE MALTOTRIOSA, (LOS NÚMEROS ROMANOS UBICADOS DEBAJO DE LOS ANILLOS GLUCOPIRANOSIDICOS DE CADA UNIDAD SON USADOS PARA INDICAR EL PROTÓN ASOCIADO AL CARBÓN) (THIEBAULT ET AL. 2008) .	39
FIGURA. 4-16 TEMPERATURA OPTIMA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	40
FIGURA. 4-17 ESTRUCTURA DE CUATRO ZEOLITAS (DE ARRIBA PARA ABAJO: FELDESPATOS O ZEOLITA X,Y; ZEOLITA ZSM-12; ZEOLITA ZSM-5 O SILICALITA-1; ZEOLITA TETA-1 O ZSM-22) Y SUS SISTEMAS MOCROPOROSOSO Y DIMENSIONALES (WEITKAMP 2000).....	43
FIGURA. 5-1 A) PROCESADOR DE ALIMENTOS BLACK&DECKER “POWERPRO II A 3.500 RPM, B) YUCA RAYADA.....	47

FIGURA. 5-2 METODOLOGÍA DE ADECUACIÓN DE MUESTRAS (AUTOR) .....	48
FIGURA. 5-3 A) TANQUE DE LAVADO DE YUCA DE 25 L Y PRE-FILTRO DE FONDO B) LECHADA DE YUCA DESPUÉS DE LAVADO. ....	49
FIGURA. 5-4 A) ALMIDÓN FINAL OBTENIDO DESPUÉS DE SECADO, B) FONDOS RECOGIDOS DESPUÉS DEL PROCESO DE DECANTACIÓN, C) PROCESO DE SECADO EN BANDEJAS DEL ALMIDÓN DESPUÉS DE DECANTACIÓN D) MANCHA RECOGIDO EN EL PREFILTRO (L2) ....	49
<b>FIGURA. 5-5 MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN DE TIPO CORAZA NÚCLEO.</b> .....	56
FIGURA. 5-6 EQUIPO DE CAPTURA Y RECUBRIMIENTO DE NÚCLEOS (CRN) FABRICADO Y CONSTRUIDO UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, INSTITUTO AMAZÓNICO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS SINCHI (AUTOR).....	58
FIGURA. 5-7 EQUIPO DE CAPTURA Y RECUBRIMIENTO DE NÚCLEOS (CRN) A) TAPA Y AGUJAS; B) RESERVORIO DE RETENCIÓN DE ESFERAS; C) RESERVORIO TINA PARA SOLUCIÓN .....	58
FIGURA. 6-1 NÚCLEO PRODUCTIVO DE YUCA NATIVA AMAZÓNICA DEL INSTITUTO AMAZÓNICO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS SINCHI Y LA ASOCIACIÓN AGROVARSEA, LETICIA AMAZONAS 2010. ....	62
FIGURA. 6-2 CONTENIDO DE ALMIDÓN LIBRE DE YUCA AMAZÓNICA ( <i>M. ESCULENTA</i> ) COLECTADA DE LA CIUDAD DE LETICIA. ....	66
FIGURA. 6-3 RELACIÓN AMILOSA – AMILOPECTINA DE LAS YUCAS AMAZÓNICAS COLECTADAS .....	68
FIGURA. 6-4 PRODUCCIÓN DE AZÚCARES POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDONES DE YUCA NATIVA. ....	69
FIGURA. 6-5 CONTENIDO DE PROTEÍNA EN ALMIDÓN POR VARIEDAD DE YUCA AMAZÓNICA ( <i>M. ESCULENTA</i> ) COLECTADA DE LA CIUDAD DE LETICIA.....	70
FIGURA. 6-6 MEDIDA DE LA TENDENCIA CENTRAL Y VARIABILIDAD DE LOS CUATRO ANÁLISIS BÁSICOS PARA LA SELECCIÓN DE LA YUCA NATIVA.....	71
FIGURA. 6-7 SELECCIÓN DE LA ZONA LINEAL PARA LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS A pH 4.5 Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DE 0.6% PARA LAS ENZIMAS A) STARGEN <sup>TM</sup> 001 QUE TRABAJA A TEMPERATURA DE 32°C ± 3° C Y PARA EL PAR ENZIMÁTICO B) GC626 QUE TRABAJAN A 63°C ± 3° C.....	75
FIGURA. 6-8 SELECCIÓN DE LA ZONA LINEAL PARA LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS A pH 4.5 Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DE 0.6% PARA LAS ENZIMAS G-ZYME <sup>R</sup> 480 QUE TRABAJAN A 63°C ± 3° C.....	75
FIGURA. 6-9 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A PARTIR DE ALMIDÓN DE PAPA DETERMINADA POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA. ■G-ZYME <sup>R</sup> 480; ● STARGEN <sup>TM</sup> 001; GC626 EN PPM SOBRE %W/V.....	76
FIGURA. 6-10 SELECCIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN DE LAS ENZIMAS ● GC626 (E1); G-ZYME <sup>R</sup> 480 (E2) Y ■ STARGEN <sup>TM</sup> 001 (E3) OBTENIDA DE LAS DEXTRINAS PRODUCIDAS A TRAVÉS DEL TIEMPO. ....	78
FIGURA. 6-11 SELECCIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN MEDIANTE LA SUMATORIA DE LOS AZÚCARES PRODUCIDOS. ● GC626-G-ZYME <sup>R</sup> 480 (P1S); G-ZYME <sup>R</sup> 480-GC626 (P2S); ■ GC626/G-ZYME <sup>R</sup> 480 SIMULTÁNEO (PS3).....	80
FIGURA. 6-12 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD RETENIDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ZEOLITA EN LA CORAZA DEL INMOVILIZADO PARA LA ENZIMA GC6262 A AMILASA.....	83
<b>FIGURA. 6-13 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD RETENIDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ZEOLITA EN LA CORAZA DEL INMOVILIZADO PARA LA ENZIMA GZYME<sup>®</sup> 480 GLUCOAMILASA.</b> .....	84

FIGURA. 6-14 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480 ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA LA VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA <i>ARPON</i> (Y1). TRATAMIENTO ● Y1S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y1S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y1S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	85
FIGURA. 6-15 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480 ADICIONADO SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA EL ALMIDÓN DE LA VARIEDAD DE YUCA <i>ARAWANA</i> (Y2). TRATAMIENTO ● Y1S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y1S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y1S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	87
FIGURA. 6-16 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480 ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA LA VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA <i>PIRIRICA</i> (Y3). TRATAMIENTO ● Y1S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y1S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y1S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	88
FIGURA. 6-17 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480 ADICIONADO SIMULTÁNEAMENTE A UNA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DEL 28% (S2) PARA TRES VARIEDADES DE ALMIDÓN DE YUCA. TRATAMIENTO ● Y1S2 ( <i>ARPON</i> AL 28% w/v); ○ Y2S2 ( <i>ARAWANA</i> AL 28% w/v); ▼ Y3S2 ( <i>PIRIRICA</i> AL 28% w/v) .....	88
FIGURA. 6-18 CANTIDAD DE RESIDUO OBTENIDO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN ESTABLECIDAS: S1 (12% w/v); S2 (28% w/v); S3 (32% w/v); Y1 ( <i>ARPON</i> ); Y2 ( <i>ARAWANA</i> ); Y3 ( <i>PIRIRICA</i> ).....	89
<b>FIGURA. 6-19</b> CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO INMOVILIZADO EN EL SISTEMA CORAZA-NÚCLEO DE ALGINATO, ENZIMA (GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480) Y ZEOLITA AL 3% Y 4% RESPECTIVAMENTE, ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA ALMIDÓN DE LA VARIEDAD DE YUCA <i>ARPON</i> (Y1). TRATAMIENTO ● Y1S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y1S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y1S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	90
FIGURA. 6-20 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO INMOVILIZADO EN EL SISTEMA CORAZA-NÚCLEO DE ALGINATO, ENZIMA (GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480) Y ZEOLITA AL 3% Y 4% RESPECTIVAMENTE, ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA LA VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA <i>ARAWANA</i> (Y2). TRATAMIENTO ● Y2S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y2S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y2S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	91
FIGURA. 6-21 CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO INMOVILIZADO EN EL SISTEMA CORAZA-NÚCLEO DE ALGINATO, ENZIMA (GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480) Y ZEOLITA AL 3% Y 4% RESPECTIVAMENTE, ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO PARA LA VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA <i>PIRIRICA</i> (Y3). TRATAMIENTO ● Y3S1 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 12% w/v); ○ Y3S2 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 28% w/v); ▼ Y3S3 (CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO AL 32% w/v) .....	92
<b>FIGURA. 6-22</b> CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICO INMOVILIZADO EN EL SISTEMA CORAZA-NÚCLEO DE ALGINATO, ENZIMA (GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480) Y ZEOLITA AL 3% Y 4% RESPECTIVAMENTE, ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE LA CONCENTRACIONES DE	

SUSTRATO DEL 32% (S3) PARA LAS TRES VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA. TRATAMIENTO ● Y1S3 (ARPON); ○ Y2S3 (ARAWANA); ▼ Y3S3 (PIRIRICA).....	93
FIGURA. 6-23 COMPARACIÓN CINÉTICA DEL PAR ENZIMÁTICA EN ESTADO INMOVILIZADO Y EN ESTADO LIBRE DE LAS ENZIMAS GC6262 Y GZYME <sup>R</sup> 480 ADICIONADAS SIMULTÁNEAMENTE A LA CONCENTRACIONES DE SUSTRATO DEL 32% W/V (○) PARA LA ENZIMA INMOVILIZADA Y DEL 28% W/V (●) PARA LA ENZIMA LIBRE SOBRE LA VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA ARPON.....	96

## 12 LISTA DE TABLAS

4-1 CLASIFICACIÓN DE AMILASAS (SCHAECHTER 2009): EC- CLASIFICACIÓN DE LA ENZIMA; GH FAMILIA DE AMILASAS CLASIFICADOS SEGÚN EL NÚMERO DE GLICÓSIDOS DE LA HIDROLASA; NC NO CLASIFICADO; NK NO CONOCIDO.....	21
TABLA 4-2 CLASIFICACIÓN DE AMILASAS (SCHAECHTER 2009): ENDO- DE ACCIÓN INTERNA EXO- DE ACCIÓN EXTERNA.....	22
TABLA 4-3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	24
TABLA 4-4 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE SELECCIÓN PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....	26
<b>TABLA 4-5</b> CUADRO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.....	26
TABLA 4-6 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN.....	28
TABLA 4-7 CARACTERÍSTICAS DEL SOPORTE Y LA ENZIMA QUE DEBEN TENERSE EN CUENTA PARA LA PREPARACIÓN DE UN SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN DE TIPO ENLACE COVALENTE.....	30
TABLA 4-8 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN POR ENCAPSULAMIENTO	30
TABLA 4-9 REQUERIMIENTO PARA LA SELECCIÓN DEL MATERIAL DE ATRAPAMIENTO.....	33
TABLA 4-10 DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD A LOS FACTORES INTRÍNSECOS EN LA MATRIZ	34
TABLA 4-11 FACTORES QUE ALTERAN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA EN LA INMOVILIZACIÓN .....	35
TABLA 4-12 TABLA GENERAL DEL MÉTODO DE ATRAPAMIENTO.....	36
<b>TABLA 4-13</b> CLASIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	37
TABLA 5-1 PESO PONDERADO DE VARIABLES CARACTERIZADAS DE YUCA AMAZÓNICA ( <i>M.</i> <i>ESCULENTA</i> ) COLECTADA DE LA CIUDAD DE LETICIA.....	52
TABLA 5-2 PRUEBAS EXPERIMENTALES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICCIÓN.....	55
TABLA 5-3 METODOLOGÍA DE INMOVILIZACIÓN, BIOCATALIZADOR DE TIPO CORAZA NÚCLEO .....	57
TABLA 5-4 SÍMBOLOS DE LOS TRATAMIENTOS PARA LA SELECCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS.....	60
TABLA 5-5 TRATAMIENTO APLICADOS PARA LA SELECCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS. ...	61
TABLA 6-1 INFORME VARIEDADES DE YUCA COLECTADAS EN LA CIUDAD DE LETICIA BARRERA Y RODRÍGUEZ 2010 EN INSTITUTO AMAZÓNICO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS SINCHI.....	63
TABLA 6-2 CARACTERIZACIÓN FISIQUÍMICA DE PULPA DE YUCA AMAZÓNICA; A LA MÁS ALTA CONCENTRACIÓN, M CONCENTRACIONES MEDIAS O PROMEDIO, B LAS MÁS BAJA CONCENTRACIÓN.....	65

TABLA 6-3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA EN EL ALMIDÓN NATIVO DE YUCA AMAZÓNICA 1: *ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA; **ÍNDICE DE SOLUBILIDAD DE AGUA; ***PODER DE HINCHAMIENTO; A LA MÁS ALTA CONCENTRACIÓN, M CONCENTRACIONES MEDIAS O PROMEDIO, B LAS MÁS BAJA CONCENTRACIÓN. ....	67
TABLA 6-4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA EN EL ALMIDÓN NATIVO DE YUCA AMAZÓNICA 2: A LA MÁS ALTA CONCENTRACIÓN, B LA MÁS BAJA CONCENTRACIÓN. ....	72
TABLA 6-5. MEDIA DE CUADRADOS DEL ERROR DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CONTENIDO DE ALMIDÓN LIBRE, HIDRÓLISIS, RELACIÓN AMILOPECTINA, ANÁLISIS DE PONDERACIONES PARA ALMIDÓN DE YUCA AMAZÓNICA Y SUMATORIA DE FUNCIONES..	72
TABLA 6-6 CORRELACIÓN DE FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA EN LA YUCA AMAZÓNICA ( <i>M. ESCULENTA</i> ) COLECTADA DE LA CIUDAD DE LETICIA .....	73
TABLA 6-7 EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIA ENTRE MEDIAS DE LOS DATOS PONDERADOS DE LA YUCA AMAZÓNICA NATIVA ( <i>M. ESCULENTA</i> ). ....	74
TABLA 6-8 TABLA DE DATOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A 6 MINUTOS DE LAS ENZIMAS STARGEN™ 001, G-ZYME <sup>R</sup> 480 Y GC626.....	76
TABLA 6-9 CALCULO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GC6262 A AMILASA INMOVILIZADA A 6 MINUTOS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEOLITA SOBRE CORAZA: * DOSIS 0.83µL; **DOSIS 19.57 µL;*** 4.94 µL; <sup>N</sup> ENZIMA INMOVILIZADA EN SOLO NÚCLEO SIN CORAZA. ....	82
TABLA 6-10 CÁLCULO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GZYME <sup>®</sup> 480 GLUCOAMILASA INMOVILIZADA A 6 MINUTOS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEOLITA: * DOSIS 10 µL; ** DOSIS 19.57 µL. ....	82
TABLA 6-11 TABLA DE RENDIMIENTO DE LA HIDROLISIS POR EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y VARIEDAD DE YUCA PARA ENZIMA LIBRE .....	87
TABLA 6-12 RENDIMIENTO DE LA HIDROLISIS CALCULADA COMO GRAMOS DE DEXTRINAS POR GRAMO DE ALMIDÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y VARIEDAD DE YUCA PARA ENZIMA INMOVILIZADA. ....	91
TABLA 6-13 RENDIMIENTO DE LA HIDROLISIS CALCULADA COMO GRAMOS DE DEXTRINAS POR GRAMO DE ALMIDÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y VARIEDAD DE YUCA PARA ENZIMA INMOVILIZADA. ....	92
TABLA 6-14 ANÁLISIS FACTORIAL DEL PROCESO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA EN ESTADO LIBRE E INMOVILIZADO PARA TRES VARIEDADES DE YUCA DE LA REGIÓN AMAZÓNICA COLOMBIANA A TRES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO. ....	95
TABLA 6-15 SELECCIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, COMPARACIONES MÚLTIPLES POR DIFERENCIA DE MEDIAS Y AGRUPACIÓN DE GRUPOS HOMOGÉNEOS POR PRUEBA DE TUKEY: TIPO DE ENZIMA (1 – LIBRE; 2 – INMOVILIZADA), CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO (1- 12% (w/v); 2-28% (w/v); 3-32% (w/v)), VARIEDAD DE YUCA (1- <i>ARPON</i> ; 2- <i>ARAWANA</i> ; 3- <i>PIRIRICA</i> ). ....	95
TABLA 6-16 RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS PARA CADA TIEMPO A LAS CONDICIONES DE: TIPO DE ENZIMA LIBRE (1) E INMOVILIZADA (2); VARIEDAD DE ALMIDÓN DE YUCA <i>ARPON</i> (1), <i>ARAWANA</i> (2) Y <i>PIRIRICA</i> (3); CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO 12% (w/v), 28 (w/v) Y 32% (w/v); TIEMPO EN HORAS T0=0,0 T1=4.5, T2=8.5, T3=13.0, T4=17.0, T5=22.0, T6=25.0, T7= 30.5 .....	97

## **13 ANEXOS**

### **13.1 ANEXO A) METODOLOGÍAS DE LABORATORIO**

#### **Anexo A1) MATERIA SECA O SÓLIDOS TOTALES**

##### **Título y norma**

CONTENIDO DE MATERIA SECA basado en la norma ICONTEC del 2002 (Aristizábal & Sánchez 2007; A. Sluiter et al. 2008)

##### **Introducción**

El contenido de materia seca, permite determinar la cantidad de humedad y de sólidos presentes en la muestra características físicas y conformacionales del material a analizar.

##### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar el contenido de humedad de un material.
- La diferencia entre el contenido de humedad y el peso inicial total, permite cuantificar el contenido de materia seca en el material.
- Partes del procedimiento puede ser homologado con la norma ASTM E1756-01

##### **Significado y usos**

- Caracterización de materiales celulósicos.
- Determinación de humedad en el material.
- Identificación de materia seca en las muestras.

##### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

##### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 0,01 mg
- Horno con temperatura constante y ventilación forzada

##### **Reactivos y materiales**

##### **Reactivos**

- Ninguno

##### **Materiales**

- Desecador con un agente de secado
- Pinzas

- Crisol plástico o de vidrio

### **Consideraciones y recomendaciones**

- No se debe tocar las muestras con la mano ya que pueden generar error en la medición
- A la salida de las muestra, después del secado en horno, los crisoles pueden estar a alta temperatura y generar quemaduras en la piel

### **Procedimiento**

- Pesar los crisoles vacíos, limpios y dejar los secar a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  por cinco horas ( $P_1$ ), enfriarlos en un desecador.
- Pesar el crisol vacío y adicionarle entre 20- 30 g de la muestra ( $P_2$ )
- Colocar el crisol con la muestra en un horno a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  durante 24 horas.
- Enfriar los crisoles con la muestra seca en un desecador hasta obtener peso constante ( 30-45 minutos) ( $P_3$ )
- Pesar los crisoles con la muestra de almidón seca.

### **Cálculos**

El cálculo del contenido de materia seca esta dado por

$$\text{Contenido de materia seca} = \frac{100 \times (P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} \quad (0.1)$$

## **Anexo A2) DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

### **Título y norma**

Contenido de cenizas en biomasa basado en la norma NREL/TP-510-42622 (Aristizábal & Sánchez 2007; A. Sluiter et al. 2005)

### **Introducción**

La cantidad de material inorgánico en la biomasa, aunque sea posible su extracción por lavado, puede ser medida como parte de la composición total. La determinación del valor cuantitativo de este material se realiza por la medición del contenido de cenizas obtenido tras un proceso de incineración.

Las cenizas conseguidas, están compuestas principalmente por algún tipo de material inorgánico que se encuentra enlazado a la estructura física de la biomasa, la ceniza extraíble de un proceso de incineración puede ser el resultado de los sólidos remanentes como sales y metales que pueden estar presentes en la biomasa.

### **Aplicación**

- Procedimiento aplicable a maderas duras y suaves, materiales herbáceos, residuos agrícolas, papel reutilizado y materiales sólidos.
- Significado y usos
- El procedimiento es utilizado para la caracterización fisicoquímica de la biomasa.
- El contenido de cenizas se puede relacionar con el porcentaje de minerales presentes en el material biomásico.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI sede Bogotá.

### **Equipos**

- Muffle con termostato con rango de temperatura entre 575 + 25 °C con rampa de temperatura como opcional.
- Balanza analítica, con un rango promedio de 0.1 mg
- Desecador con material desecante.
- Crisol de incineración de 50 ml en porcelana, sílica o platino.
- Marcador para porcelana de alta temperatura o su equivalente.

- Quemador de incineración, pinzas y triangulo de porcelana.
- Horno de convección forzada, con control de temperatura de  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$

### **Reactivos y materiales**

Ninguno

### **Consideraciones y recomendaciones**

- Utilizar apropiadamente las medidas y equipos de seguridad para altas temperaturas
- Cuando se coloquen los crisoles en el horno o sean removidos use el equipo apropiado como guantes resistentes al calor.

### **Procedimiento**

Usando un marcador para porcelana o grafito, marcar los crisoles de muestra con el fin de ser identificados apropiadamente, lleve las muestras a la mufla a  $575^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$  por unos minutos o por cuatro horas. Remueva el crisol de la mufla directamente al desecador. Si se utiliza un horno a  $575^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ , enfríe por un periodo específico de tiempo, es recomendado una hora. Anote el tiempo de enfriamiento. Debe ser medido el peso del crisol en una balanza con precisión de 0.01 mg, anote el peso.

La muestra se traslada nuevamente a la mufla a  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  hasta que seque y alcance peso constante. El peso constante es definido como un valor cercano  $\pm 0,3$  mg a una hora de recalentamiento.

Pese entre 0.5g a 2.0 g con un error cercano al 0.1 mg de la muestra en el crisol, la balanza debe estar previamente tarado, anote el peso de la muestra. Si la muestra analizada se encuentra a  $105^{\circ}\text{C}$ , la muestra debe ser almacenada en un desecador hasta su uso. Si el flujo de aire es utilizado se puede llevar a cabo simultáneamente la prueba LAP o Materia seca. Cada muestra debe ser analizada por duplicado como mínimo.

### **Muestras de ceniza.**

Use el paso *prueba con mufla* si utiliza una mufla que maneja  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  use el paso *Prueba con rampa de temperatura* si usa una mufla con rampa de temperatura.

#### *Prueba con mufla*

Las muestras es calentada hasta los  $575^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ , al alcanzar la temperatura la muestra es extraída de la mufla y colocada sobre un soporte triangular con un mechero con el fin de realizar una quema controlada del material hasta que aparezca humo. Inmediatamente inicie el humo, este se debe encender hasta que no haya más flama o humo. Deje enfriar el crisol antes de llevarlo nuevamente a la mufla. Alternativamente, un horno con función de rampa de temperatura puede ser utilizado para remplazar este procedimiento. El crisol dentro de la mufla debe alcanzar los  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 6$  horas, hasta obtener de las cenizas un peso constante. Coloque una placa encima del crisol para no tener pérdidas de muestras en la

manipulación. Extraiga la muestra del horno con el crisol directamente al desecador y deje enfriar por un periodo prudente de 1 hora, pese el crisol y las cenizas con una balanza cercana a 0.1 mg y anote el dato. Devuelva la muestra a la mufla de  $575^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$  hasta obtener un peso constante. Es necesario anotar el tiempo de enfriamiento.

#### *Prueba con rampa*

Sostenimiento a  $105^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos. Rampa de temperatura hasta  $250^{\circ}\text{C}$  elevando  $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Sostenimiento de  $250^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Rampa de temperatura hasta  $575^{\circ}\text{C}$  por  $20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Sostenimiento a  $575^{\circ}\text{C}$  por 180 minutos. Permitir que la temperatura baje a  $105^{\circ}\text{C}$ . Sostener a  $105^{\circ}\text{C}$  antes de remover las muestras.

Ponga los crisoles en el horno de la mufla e inicie el programa de rampas. Cuando manipule los crisoles, proteja las muestras con una lámina en la parte superior a fin de evitar las pérdidas de material. Retire completamente los crisoles del horno y lleve los directamente dentro de un desecador para ser enfriados. Pese los crisoles y las cenizas con una balanza cercana a 0.1 mg y anote el dato de peso.

Lleve la muestra de regreso al horno a  $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante.

#### **Cálculos**

El cálculo se basa en el contenido total de material inicial con respecto a las cenizas obtenidas.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{g \text{ Cenizas}}{\text{Masa Inicial}} \times 100 \quad (1.1)$$

Para reportar o calcular la diferencia porcentual relativa (RPD) entre dos muestras analizadas, use el siguiente cálculo.

$$RPD = \left( \frac{(X_1 + X_2 + X_i)}{X_{\text{mean}}} \right) \quad (1.2)$$

Donde

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_i$  = son los valores medidos

$X_{\text{mean}}$  = Promedio de el numero de números

Para reportar o calcular la raíz cuadrada media (RMS desviación) o desviación estándar (st dev) de las muestras use el siguiente cálculo.

Primer raíz cuadrada media (RMS)

$$RMS = X_m = \text{promedio} = \sqrt{\left(\frac{\sum_1^n X}{n}\right)^2} \quad (1.3)$$

Al encontrar la desviación de la raíz cuadrada media, o desviación estándar, use-

$$\text{desviacionRMS} = \delta = \text{sedev} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X_m)^2}{n}} \quad (1.4)$$

Donde

$X_m$  = es la raíz cuadrada promedio de todos los valores de X en conjunto

$n$  = numero de muestras en conjunto

$X_i$  = los valores medidos en conjunto

## **Anexo A3) DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN TOTAL EN MUESTRAS DE BIOMASA SOLIDA POR HPLC**

### **Título**

DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN MUESTRAS DE BIOMASA SOLIDA POR HPLC Técnica NREL/TP – 510 – 42624 de junio 2008 (A. Sluiter & J. Sluiter 2005)

### **Introducción:**

Los carbohidratos constituyen la porción más importante de biomasa en las muestras. Estos carbohidratos son polisacáridos constituidos principalmente por glucosa, xilosa, arabinosa, y manosa y se presentan en unidades monoméricas. Uno de estos polisacáridos es el almidón, el cual se encuentra presente en ciertos tipos de biomasa. El almidón presente en la muestra se relaciona con el contenido de glucosa total en la muestra después de ser hidrolizada.

El método que se presenta a continuación se encuentra estipulado por la AOAC método 996.11, AACC método 76.13, y ICC método estándar No 168.

### **Aplicación:**

- Procedimiento utilizado para la medida del contenido almidón en muestras solidas.
- Este procedimiento solo es apropiado para muestras solidas de biomasa que contienen almidón.

### **Significado y usos.**

- Composición de almidón en biomasa.
- Determinar la composición fisicoquímica de la biomasa

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos utilizados.**

- Balanza analítica con precisión 0.01 mg
- Horno de secado temperatura 105°C
- pH metro
- Baño de agua
- Vortex
- Centrifuga, velocidad 3.000 rpm, con volumen de vial 15 ml
- Equipo HPLC, con detector de índice de refracción columna HPX 87H se recomienda guarda columna.

## **Reactivos y materiales.**

### **Reactivos.**

- Estándar de azúcares (glucosa principalmente)
- Etanol grado analítico
- DMSO Dimetil sulfoxido, grado analítico
- $\alpha$  amilasa (enzima amilolítica)
- Amiloglucosidasa (enzima amilolítica)
- MOPS buffer
- MOPS (sal de sodio, 11.55 g: Cat. Numero M9381)
- 1M (10%) acido clorhídrico
- Cloruro de calcio dihidratado
- Sodio azide
- Acetato de sodio Buffer
- Acido acético glacial
- 1M hidróxido de sodio en solución
- Sodio azide
- Agua HPLC, filtrada por 0,2  $\mu$ m
- Almidón grado analítico
- 5  $\mu$ M acido sulfúrico como fase movil

### **Material**

- Erlenmeyer de 1 L
- 2 Frasco SCHOTT de un litro (para buffer)
- Tubos falcon de 15 ml plásticos con tapa rosca
- Filtro geringa de 0,2  $\mu$ m
- Geringa de 3 ml
- Pipeta volumétrica, Clase A de 100 ml
- Pipeteador.

### **Consideraciones y recomendaciones**

- El acido sulfúrico, acido clorhídrico y acido acético glacial son corrosivos y pueden ocasionar lesiones a la salud.
- El sodio azide es altamente toxico, y explota al calentar. Este genera gases venenosos cuando acidifica “debe utilizarse en cámara de flujo”. Se adiciona al buffer como preservativo de la solución y puede ser remplazado por el almacenamiento del buffer a temperatura de 4°C.

### **Procedimiento.**

## **Preparación de buffer**

### **MOPS Buffer**

En un Erlenmeyer de 1 L, se adicionan 11.55 g de MOPS, sal de sodio, a 900 ml de agua ionizada. Se ajusta a pH 7 usando 1M (10%) HCL. Aproximadamente 17 ml de 1M HCL es requerido. Agregue 0.74 g de cloruro de calcio dihidratado. Si decide adicionar 0.2 g de sodio azide. El sodio azide puede ser omitido si el buffer es almacenado en refrigeración a 4°C. El sodio azide es altamente toxico, su omisión es recomendada.

### **Acetato de sodio buffer.**

En un Erlenmeyer de un 1 L, adicionar 11.8 ml de acido acético glacial a 900 ml de agua desionizada. Ajustar la solución a pH 4.5 usando 1M (4g/100ml) de solución de hidróxido de sodio. Aproximadamente 60 ml de solución de hidróxido de sodio 1M puede ser requerida. Si desea adherir 0,2g de sodio azide. El sodio de azide puede ser omitido si el buffer es almacenado en el refrigerador a 4°C. el sodio azide es altamente toxico, omitirlo es recomendado.

## **Preparación de muestras para cromatografía liquida de alta presión HPLC**

Colocar 100 mg (+-) de muestra a un falcón de 15 ml plástico de tapa rosca que ha sido tarado, registrar el peso de la muestra a partir de una balanza de 0.01 mg, el análisis de materia seca puede ser realizado al mismo tiempo, se recomienda que la muestra se realice como mínimo por duplicado. Repetir el paso anterior a partir de una muestra de almidón conocido con el fin de prepara el estándar correspondiente de la muestra.

Agregue 0.2 ml de etanol 190 grado analítico y llevar a vortex vigorosamente. Hasta obtener una mezcla completamente dispersa. Inmediatamente coloque 2 ml de dimetil sulfoxido (DMSO) y agite en vortex vigorosamente.

Colocar los tubos falcon en un baño que se encuentre a temperatura de ebullición durante 5 min. Tenga precaución al remover los tubos, podrían estar calientes. Inmediatamente adicionar 2.9 ml de MOPS buffer and y 0.1 ml de termoestable alfa amilasa (o 300 unidades). Cierre el tubo y agite vigorosamente en Vortex. Incubar el tubo a temperatura de burbujeo por 6 minutos, y llevar a Vortex por 2 minutos.

Llevar el tubo a 50°C en un baño de agua. Adherir 4 ml de acetato de sodio buffer, seguido por 0.1 ml (20 unidades) amiloglucosidasa. Lleve a Vortex vigorosamente e incubar por 30 minutos a 50°C.

Remueva las muestras del baño de agua y centrifugue los tubos por 10 minutos a 3000 rpm y temperatura de 10°C. Si las muestras han sido arregladas para el análisis, el volumen del solvente debe ser constante siendo este de 9.3 ml. Filtre a través de 0.2 µm dentro de un vial. Preparar las muestras por duplicado si se desea.

## **Cálculos**

Los resultados son obtenidos tras el análisis realizado por cromatografía liquida de alta presión HPLC

## **Anexo A4) CONTENIDO DE ALMIDÓN LIBRE.**

### **Título y Norma**

CONTENIDO DE ALMIDÓN LIBRE. (Aristizábal & Sánchez 2007)

### **Introducción**

Se denomina almidón libre al polisacárido que puede ser extraído por métodos mecánicos de un material celulósico, el método de separación generalmente utilizado es la disminución de diámetro de partícula seguido de un lavado y filtración del sólido remanente sobre la lechada (suspensión de almidón en agua).

El contenido de almidón libre permite identificar la cantidad de almidón que puede ser retirado de la biomasa total, este dato sirve para calcular el rendimiento del proceso de separación afrecho/almidón en un proceso productivo.

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar el contenido de almidón libre en yuca.
- La diferencia entre el contenido de almidón extraído y el peso inicial de la muestra determina la cantidad de almidón libre.
- El análisis de almidón libre determina el contenido de almidón utilizable para el proceso productivo.

### **Significado y usos**

- Caracterización de materiales celulósicos.
- Determinación del contenido de almidón libre en yuca.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Triturador de cuchillas
- Balanza con precisión de 0.01 g
- Secador de flujo forzado.
- Selladora automática

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Ninguno

## **Materiales**

- Cuchillo
- 1 Caneca de 500 litros con tapa
- 3 Caneca de 25 litros con tapa
- Resistencia eléctrica para calentamiento de agua
- Bolsas de plástico negro de 20 X 10 cm
- Lienzo tipo comercial malla 100

## **Consideraciones y recomendaciones**

- No se debe tocar las muestras con la mano sin cubrir ya que pueden generar error en la medición
- Se debe manipular adecuadamente evitando corto circuito o quemaduras

## **Procedimiento**

2.000 gramos de cada muestra fueron lavados, descortezados y desinfectados en una solución acuosa de hipoclorito de sodio a 400 ppm durante 30 minutos. Las muestras fueron rayadas con un triturador de cuchillas controlando el tamaño de la muestra, no se recomienda tener diámetros de partícula muy finos, posteriormente la muestra fué colocada sobre un tamiz de lienzo comercial (L1) que se soporta sobre un tanque de 25 litros.

Simultáneamente se llenó un tanque de 500 litros de agua donde se introdujo una resistencia eléctrica que calentó el agua hasta alcanzar los 35°C permanentemente. Por otra parte se adecuó los tanques de 25 litros montando un prefiltro de lienzo (L2) a 10 cm desde el extremo inferior del tanque y el filtro L1 sobre la tapa del tanque.

Las muestras se lavaron con 20 litros de agua a 35°C sobre L1, donde permaneció el afrecho<sup>25</sup>. La lechada de yuca obtenida se transportó en el tanque a un sector seco y a la sombra, siendo retirado el afrecho y tapando el tanque para su posterior uso. El afrecho fué esparcido en una bandeja plástica y la lecha se dejó decantar por un periodo de 16 horas permitiendo la separación de los almidones por diferencia de densidades y pesos moleculares.

Dos productos son obtenidos de las diferentes secciones del tanque: mancha (prefiltro L2) y el almidón (fondos), los cuales fueron retirados y colocados en bandejas plásticas, que luego son introducidas en compañía del afrecho en un horno con flujo forzado de aire durante 24 horas, que trabaja a 110 V, temperatura de 75°C y caudal de 15.75 CFM<sup>26</sup> construido en el laboratorio poscosecha del instituto SINCHI.

El afrecho, la mancha y el almidón fueron revisados y volteados con el fin de permitir un secado uniforme a óptimas condiciones de operación. Cada tres horas se tomó el peso hasta

---

<sup>25</sup> Material Lignocelulosico sobrante, obtenido del procesos de filtración de almidón

<sup>26</sup> Pies Cúbicos por Minuto

obtener un valor constante, momento en el cual se garantizo el mínimo contenido de humedad de las muestras.

Tanto el almidón, como la mancha<sup>27</sup> y el afrecho fueron pesados, los datos se tabularon y analizaron posteriormente. Cada producto fue almacenado en bolsas de polietileno negro evitando la degradación, contaminación o modificación que puede ocasionar la exposición a la luz solar y el ambiente.

## Cálculos

### Porcentaje de agua en yuca

$$\% \text{ de agua en yuca} = \frac{(Myi - Man - Almi - afre)}{Myi} \quad (1.5)$$

Donde

Myi = Masa inicial de yuca (gr)

Man = Mancha (gr)

Almi = Almidón (gr)

Afre = Afrecho (gr)

### Porcentaje de afrecho.

#### Base húmeda

$$\% \text{ de Afre}_{(base\ húmeda)} = \frac{(Agua + Afre + Almi + Man)}{Afre} \quad (1.6)$$

#### Base seca

$$\% \text{ de Afre}_{(base\ seca)} = \frac{(Afre + Almi + Man)}{Afre} \quad (1.7)$$

Myi = Masa inicial de yuca (gr)

Man = Mancha (gr)

Almi = Almidón (gr)

Afre = Afrecho (gr)

### Porcentaje de Almidón

---

<sup>27</sup> Material proteico de color amarillo que es retirado de la parte superior de los almidones sedimentados en el tanque

### **Base húmeda**

$$\% \text{ de Almi}_{(\text{base húmeda})} = \frac{Myi}{Almi} \quad (1.8)$$

### **Base seca**

$$\% \text{ de Almi}_{(\text{base seca})} = \frac{(Afre + Almi + Man)}{Almi} \quad (1.9)$$

Myi = Masa inicial de yuca (gr)

Man = Mancha (gr)

Almi = Almidón (gr)

Afre = Afrecho (gr)

### **Porcentaje de Mancha**

#### **Base húmeda**

$$\% \text{ de Man}_{(\text{base húmeda})} = \frac{Myi}{Man} \quad (1.10)$$

#### **Base seca**

$$\% \text{ de Man}_{(\text{base seca})} = \frac{(Afre + Almi + Man)}{Man} \quad (1.11)$$

Myi = Masa inicial de yuca (gr)

Man = Mancha (gr)

Almi = Almidón (gr)

Afre = Afrecho (gr)

## **Anexo A5) TEMPERATURA DE GELATINIZACIÓN**

### **Título**

TEMPERATURA DE GELATINIZACIÓN, basado en la técnica utilizada por (Grace 1977; Aristizábal & Sánchez 2007)

### **Introducción**

La temperatura de gelatinización hace referencia a la temperatura a la cual se presenta hinchamiento en los gránulos de almidón por hidratación, debido a una alteración de la estructura molecular produciendo la lixiviación de la amilosa, luego de ser sometido a un calentamiento regular.

### **Campo de aplicación**

- Caracterización fisicoquímica del material

### **Significados y usos**

- Propiedad que permite determinar las condiciones de operación en un proceso
- En conjunto con otras propiedades fisicoquímicas y funcionales permite determinar la posibilidad de usos industriales del material.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI sede Bogotá.

### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 0,01 g
- Plancha de calentamiento

### **Reactivos y Materiales**

#### **Reactivos**

- Ninguno

#### **Materiales**

- Vasos de precipitado de vidrio de 100 y 250 mL
- Frascos volumétricos de 40 mL
- Pinzas de acero inoxidable
- 2 Termómetros con escala de 0-100 °C
- 2 Agitadores magnético

### **Consideraciones y recomendaciones**

- Las altas temperaturas tanto de la plancha como de las muestras pueden causar quemaduras graves a la piel
- Se recomienda utilizar guantes de carnaza y gafas de protección con el fin de evitar quemaduras

### **Procedimiento**

Pesar 3.33 g de almidón (bs) disolver en agua destilada y desionizada grado HPLC y completar a 37 mL. Calentar agua en un vaso de precipitado de 250 mL a 85 °C e Introducir el vaso de 40 mL con la muestra en el agua. Agitar con el termómetro constantemente la suspensión de almidón hasta la formación de una pasta y estabilización de la temperatura por unos segundos. Leer la temperatura de gelatinización y anotarla.

### **Cálculos**

La temperatura de gelatinización se lee directamente en el termómetro.

## **Anexo A6) ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA, ÍNDICE DE SOLUBILIDAD EN AGUA Y PODER DE HINCHAMIENTO**

### **Título**

ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA, ÍNDICE DE SOLUBILIDAD EN AGUA Y PODER DE HINCHAMIENTO basado en (Anderson et al. 1970; Aristizábal & Sánchez 2007)

### **Introducción**

La determinación de la capacidad de absorción de agua en un granulo y la exudación de las fracciones de almidón son determinadas mediante la cuantificación del poder de hinchamiento, generado por la absorción progresiva e irreversible de agua durante el calentamiento de la suspensión.

### **Aplicación**

- Caracterización fisicoquímica del material

### **Significados y usos**

- Propiedad que permite determinar las condiciones de operación en un proceso
- En conjunto con otras propiedades fisicoquímicas y funcionales permite determinar la posibilidad de usos industriales del material.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 0,01 g
- Centrífuga
- Horno con temperatura constante

### **Reactivos y Materiales**

#### **Reactivos**

Ninguno

#### **Materiales**

- Baño con calentamiento constante
- Tubos de centrifuga plásticos de 15 mL
- Vasos de precipitado de vidrio de 20 mL

- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Pipeteador de 30 mL

### Consideraciones y recomendaciones

A la salida de las muestra, después del secado en horno y calentamiento del gel, los recipientes se encuentran calientes a elevada temperatura lo que puede ocasionar quemaduras en la piel.

### Análisis

Pesar los tubos falcon de 15 ml previamente secos a 60 °C durante 30 minutos, anotar el dato de peso. Agregue a los tubos 0.63 g de muestra (bs) y 15 mL de agua destilada y desionizado la cual debe estar precalentada a 60 °C, agitar levemente. Colocar los tubos en un baño de agua a 60 °C durante 30 minutos; agitar la suspensión a los 10 minutos de haber iniciado el calentamiento. Centrifugar a 4. 900 RPM durante 30 minutos a una temperatura de 17°C. Decantar el sobrenadante inmediatamente después de centrifugar (máximo un minuto después) y medir el volumen en una probeta de 50 mL. Tomar 10 mL del sobrenadante y colocar en un vaso de precipitados de 20 mL (previamente pesado), tomar el dato. Secar el sobrenadante en un horno durante toda la noche a 70 °C, por otra parte se debe pesar el tubo de centrifuga con el gel. Anotar el peso. Pesar el vaso de precipitados con los insolubles. Anotar el peso.

### Cálculos e interpretación de los resultados

$$\text{Indice de absorcion de Agua (AAI)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g) bs}} \quad (7.1)$$

$$\text{Indice de solubilidad de agua (ISA)} = \frac{\text{Peso solubles (g)} \times V \times 10}{\text{Peso muestra (g) bs}} \quad (7.2)$$

$$\text{Poder de Inchamiento (pH)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g) bs} - \text{Peso solubles (g)}} \quad (7.3)$$

## **Anexo A7) CONTENIDO DE AMILOSA/AMILOPECTINA**

### **Título y Norma**

ANÁLISIS DE AMILOSA / AMILOPECTINA (Wrolstad 2000; Tester et al. 2004)

### **Introducción**

El almidón es un polisacárido constituido por dos polímeros de glucosa llamados amilosa y amilopectina. Su principal diferencia radica en su estructura química (lineal o ramificada) que determina las características fisicoquímicas del almidón y que varía según las condiciones del cultivo.

Estos polímeros forman una estructura en capas de regiones amorfas y cristalinas alternadas, de alta y baja densidad. Los enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares empaquetan densamente el polisacárido generando insolubilidad en agua fría y resistencia a los tratamientos hidrolíticos (MITSUIKI S. *et al* 2005; MARTÍN Jenny y LÓPEZ Elizabeth 2006).

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar la relación de amilosa/amilopectina en almidón de yuca.
- La identificación de la relación de amilosa/amilopectina permite predecir de cierta forma el comportamiento del almidón en proceso.

### **Significado y usos**

- Caracterización del almidón.
- Determinación del contenido de amilosa en almidón.
- Identificación de contenido de amilopectina en almidon.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Vortex
- Equipo de vacío
- Plancha de calentamiento
- Espectrofotómetro UV
- Celda de cuarzo
- Vallo de agua a 85 °C

### **Reactivos y materiales**

### **Reactivos**

- Agua destilada
- 75 % (v/v) iso-propanol
- Dimetilsulfoxido (DMSO) al 90% v/v
- Amilosa de papa purificada.
- Amilopectina de papa purificada

### **Solución de yodo**

preparar una mezcla 0.0025 M I<sub>2</sub> /0.0065 M KI para 100 – ml de solución: Disolver 0.1079 g KI g en 5 ml de agua en un balón volumétrico de 100 ml adherir 0.0315 g I<sub>2</sub>, agitar con la mano y disolver el KI, ajustar el volumen a 100 ml. La solución es almacenada a botellas ámbar a de 4 °C, para usarlo posteriormente.

### **Materiales**

- Filtros de papel No 40
- Embudos de diámetro 40 cm

### **Consideraciones y recomendaciones**

- Utilizar apropiadamente las medidas y equipos de seguridad para reactivos que generan gases tóxicos
- Mantener los boffer en envases tipo ámbar a bajo nivel de luminosidad a temperatura de almacenamiento.ç

### **Procedimiento**

Análisis Preparación de la curva estándar de amilosa/amilopectina

#### **Almidón libre de lípidos**

Pesar 5 g de almidón dentro de un erlenmeyer de 50 ml, al cual se le adiciona 30 ml de iso–propanol. La solución es agitada en una plancha con agitación magnética por el tiempo de hora y media (95 minutos) a 85 °C |para generar la extracción de los lípidos presentes en el almidón. Al cabo del tiempo de extracción el sobrenadante es extraído por filtración al vacío con un embudo de vidrio de diámetro 4 cm de diámetro y filtro de papel No 40.

El almidón obtenido es secado en un horno con flujo forzado a temperatura de 75 grados (°C) durante 12 horas para después tomar las muestras y llevarlas al desecador por 4 horas

#### **Dispersión de almidón (Solución 1)**

Pesar 20 mg de almidón sin lípidos en un balón aforado de 25 ml con tapa. Con el fin de preparar la curva de calibración del equipo se prepara una serie de mezclas de amilosa y amilopectina de papa en las concentraciones de 0%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80% y 90% de amilosa, para lo cual el peso total debe ser de 20 mg los cuales se adicionan en un balón aforado de 50 ml. Las muestras son disueltas en 8 ml de de DMSO al 90 % y se agitan vigorosamente con vortex durante 2 minutos y medio (95 segundos). Las muestras son calentadas a 85 °C durante 15 minutos y enfriadas a temperatura ambiente durante 45

minutos (se debe revisar la presencia de geles de ser así las muestras debe repetir bajo todo el procedimiento establecido anteriormente). Diluir las muestras en 25 ml de agua en un balón aforado.

### **Determinación de la absorbancia**

1.0 ml de una solución diluida (solución 1) es colocada en un valon aforado de 50 ml con 40 ml de agua destilada. Adicionar 5 ml de solución de iodo y mezclar vigorosamente, la cual es finalmente aforada con agua destilada. (el color debe dejarse desarrollar por 15 minutos). Medir la absorbancia de las muestras del estándar a 600 nm con el blanco de referencia.

### **Preparación de la curva estándar**

Los datos obtenidos de los estándares de amilosa amilopectina son graficados en una curva de absorción ( $A_{600}$ ) vs % amilosa. Se realiza una regresión lineal con el fin de obtener los parámetros de observación y la obtención de la ecuación de cálculo ( $R^2 > 95\%$ )

## **Anexo A8) SUSCEPTIBILIDAD A LA HIDRÓLISIS**

### **Título y Norma**

Susceptibilidad a la hidrólisis. Basado en las experiencias de (Tanaka 2002; Wrolstad et al. 2005; Whitaker 2003; Bernfeld 1955; GENENCOR 2007; GENENCOR 2004; GENENCOR 1999; Shariffa et al. 2009) y metodología estandarizada en el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi

### **Introducción**

El proceso de hidrólisis enzimático permite observar el comportamiento de las cadenas glucosídicas de los almidones, durante la catálisis de la enzima en la fase de mayor actividad, identificando los almidones que tienen una mayor posibilidad de ser degradados a sacáridos de menor peso molecular a temperaturas bajas.

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático
- La identificación de la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático permite preseleccionar diferentes especies para su transformación en azúcares fermentables.

### **Significado y usos**

- Caracterización de materias primas para la industria de azúcares fermentables.
- Determinación la concentración máxima de dextrinas que puede producir un material por ataque enzimático a la máximas condiciones de actividad.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Reactor de vidrio enchaquetado de 500 mL
- Recirculador de agua con control de temperatura
- Plancha de calentamiento
- Micropipeta de 1000 µL
- Agitador magnético

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Enzima STARGE 001 (GENECORE)

- Acetato de sodio tri-hidratado
- Acido acético glacial
- Borato de sodio decahidratado
- Hidróxido de sodio 1N
- Agua desionizada

### **Preparación de reactivos**

#### **Acetato de sodio buffer 0.1M, pH 4.3.**

En un Erlenmeyer de un 1 L, disolver 4.4 gramos de acetato de sodio tri-hidratado en aproximadamente 800 ml de agua desionizada. Ajustar la solución a pH 4.3 con ácido acético glacial y llevar a volumen. La solución debe ser almacenada en el refrigerador por dos semanas.

#### **Solución de Borato Stop**

Disolver 19.04 gm de borato de sodio decahidratado en aproximadamente 400 mL de agua desionizada por un periodo de 30 minutos. Se revisa el pH que debe estar entre 9.15 y 9.25 lleve a volumen de 500 mL y almacene a temperatura ambiente por 6 semanas.

#### **Hidróxido de sodio 1N**

40 g de hidróxido de sodio al 90% en perlas, se disuelve en un litro de agua.

### **Consideraciones y recomendaciones**

- Utilizar apropiadamente las medidas y equipos de seguridad para reactivos que generan gases tóxicos y quemaduras
- Mantener los boffer en envases tipo ámbar a bajo nivel de luminosidad a temperatura de almacenamiento.

### **Procedimiento**

11. Dos bioreactores en vidrio se esterilizaron durante 30 min a 121°C.
12. Los bioreactores se llevaron a una cabina de flujo laminar donde se agrega 16.2 gramos de material y 65 ml de agua destilada y esterilizada obteniendo una concentración de sustrato del (20% w/w).
13. Los reactores son ensamblados a un equipo de recirculación que trabaja a 30°C ± 2°C controlando la temperatura de proceso durante todas las etapas de la prueba.
14. A continuación son colocado sobre dos planchas de calentamiento con el fin de generar una agitación magnética regular y leve, dentro del interior del recipiente donde fue colocado un imanes de 4 cm de diámetro que genera la turbulencia.
15. Se hidratan el material de estudio por el lapso de una hora 1 hora a agitación leve y constante. Durante esta etapa se mide el pH inicial, tiempo inicial de hidratación y el tiempo final de hidratación.
16. Se adecua el pH de reacción a 4.5, ± 0.2, para aquellos almidones donde su pH fuera inferior a este valor (4.5 > pH) no se realiza modificación. El control del pH se lleva

- a cabo con Acetato de sodio buffer 0.1M, pH 4.3. para la acidificación y NaOH 1N para la neutralización. El análisis de pH es cuantificado en línea con un potenciómetro de 3 cifras decimales.
17. 34,7  $\mu\text{L}$  de enzima STARGE 001 son adicionados a la mezcla permite la reacción por un periodo de 10 minutos. Durante esta etapa los datos adquiridos son pH final de reacción, tiempo inicial y final de reacción.
  18. Al finalizar el periodo de tiempo se toma una alícuota de 10 mL en un tubo falcón esterilizado que contiene 3 mL de Solución de Borato Stop previamente insertado.
  19. La muestra se adecua mediante centrifugando a 10.000 RPM por 20 min a 10°C, el sobrenadante es filtrado con pregeringa de 0,25  $\mu\text{m}$ .
  20. Los hidrolizados purificados son inyectados por duplicado con el fin de analizar los azúcares resultantes en cromatografía líquida HPLC utilizando el método establecido (anexo 9).



**Figura. Anexo A.1** biorreactor enchaquetado con acoplamiento a un recirculador de agua y agitación magnética

## **Anexo A9) ANÁLISIS DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PRESIÓN HPLC**

### **Título y Norma**

Análisis de muestras para cromatografía líquida de alta presión HPLC (A. Sluiter & J. Sluiter 2005)

### **Introducción**

La producción y contenido de azúcares en muestras puede ser identificados al montar una curva de calibración de los analitos glucosa, fructosa, utilizando una columna AMINEX-HPX 87HP (Biorad, 300 x 7.8 mm) para cromatografía líquida de alta presión HPLC utilizando un equipo Agilent Technologies 1200, dotado con un detector de índice de refracción (RID)

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar la producción y contenido de azúcares en matrices vegetales y reacciones de hidrólisis enzimática.

### **Significado y usos**

- Caracterización de materias primas y matrices vegetales.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazonico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

La dilución de la muestra en la fase móvil  $H_2SO_4$  5 mM no genera ninguna reacción de hidrólisis ya que la temperatura de la columna se encuentra por debajo de la energía de activación.

### **Equipos**

- Columna MINEX-HPX 87HP (Biorad, 300 x 7.8 mm)
- Equipo Agilent Technologies 1200 para cromatografía líquida de alta presión
- Detector de índice de refracción (RID)
- Desgasificador

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Acido sulfúrico
- Agua desionizada

## **Materiales**

- Frasco Schot de 1000 mL
- Balón aforado de 1000 mL
- Micropipeta de 10 mL
- Jeringa de inyección de 10 a 50 µL

## **Preparación de reactivos**

### **Acido sulfúrico 5mM para usar como fase móvil.**

### **Preparación de Acido Sulfúrico 0.8 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

En un balón aforado de 1L con agua tipo HPLC, llenar hasta aproximadamente 700 ml y adicionar 44,44 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%, lleva a 1000 ml en, filtrar a través de membrana de 0.2 µm.

### **Fase móvil. Acido sulfúrico 5mM**

En un balón de 1L con agua tipo HPLC, llenar hasta aproximadamente 700 ml adherir 6,250 mL de acido sulfúrico 0.8 M llevar a volumen, filtrar por membrana de 0,2 µm, y sonicar para desgasificar durante 15 minutos sin temperatura.

Prepara una serie de estándares de calibración que contienen D(+) glucosa y certifique los datos.

### **Características de la cromatografía**

- Análisis de calibración estándar utilizando
- Columna HPX-87H
- Jeringa de inyección de 10 a 50 µL
- Fase móvil, 5mM de acido sulfúrico, filtrado por 0,2 µm.
- Rata de flujo 0,5 mL/min
- Temperatura de columna 40 °C
- Detector de índice de refracción
- Tiempo de corrida 40 minutos

## **Cálculos.**

Cálculo sobre peso seco (ODW) de la muestra, usando el promedio del total de sólidos contenidos para determinar por LAP “estándar Method for the determination of total solid in Biomass”

$$ODW = \frac{Peso_{Muestraseca} \times Sólidos\ totales}{100} \quad (7.4)$$

Sólidos totales = peso final de la muestra seca /peso inicial de la muestra\*100

Inicialmente se debe generar una curva de calibración para cada análisis con el fin de cuantificar los datos utilizando una regresión lineal. Desde las curvas, determinar la concentración en mg/ml de cada componente presente en el análisis por HPLC, corregir con diluciones si se requiere.

Calcular y gravar la cantidad de cada calibración verificando con estándar (CVS) Gravar por el siguiente análisis de HPLC.

$$\%CVS_{promedio} = \frac{\text{Concentracion detectada por el HPLC en mg/ml}}{\text{concentracion conocida de standar mg/ml}} \times 100 \quad (7.5)$$

Para la cantidad de almidón en las muestras, calcular la cantidad de almidón obtenido para cada análisis. Un promedio por duplicado ( $\%R_{\text{starch}}$ ) obteniendo los valores para cada almidón individualmente en las muestras y reportarlos en  $\% R_{\text{avg, starch}}$

$$\%R_{almidon} = \frac{\text{concentracion detectada por el HPLC mg/ml}}{\text{peso conocido de almidon antes del analisis mg/ml}} \times 100 \quad (7.6)$$

Calculo del % de almidón en cada muestra

$$\% Almidon = \left( \frac{C_{HPLC} \times \left( \frac{\text{Vol.solucion, ml}}{ODW} \right)}{1.11 \times \%R_{almidon}} \right) \times 100 \quad (7.7)$$

- Donde:
- $C_{HPLC}$  = concentración de glucosa determinada por HPLC en mg/ml
- Vol. Solution = 9.4 ml, volumen total de líquido adicionado al sólido.
- ODW= sobre peso seco de la muestra, mg, calculado en el paso

Para reportar o calcular la diferencia del porcentaje relativo (RPD) entre dos muestras, usare el siguiente cálculo.

$$RPD = \left( \frac{(X_1 - X_2)}{X_{promedio}} \right) \times 100 \quad (7.8)$$

- Donde:
- $X_1$  y  $X_2$  = valores medidos
- $X_{promedio}$ =el promedio de  $X_1$  y  $X_2$

Para reportar el cálculo de la desviación mínimo del cuadrado (RMS desviación) y de la desviación estándar (st dev) de las muestras, use el siguiente calculo.

$$RMS = X_m = \text{promedio} = \sqrt{\left( \frac{\sum_1^n X}{n} \right)^2} \quad (7.9)$$

Para encontrar la raíz del promedio de la desviación o la desviación estándar se usa.

$$RMS_{desviacion} = \delta = stdev = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X_m)^2}{n}} \quad (7.10)$$

Donde

$X_m$  = la raíz cuadrada de todos el conjunto de valores de x

n = Numero de muestras en conjunto

$X_i$  = el numero de valores en conjunto

## **Anexo A10) ACIDEZ TITULABLE Y pH**

### **Título y Norma**

ACIDEZ TITULABLE Y PH (Aristizábal & Sánchez 2007)

### **Introducción**

La determinación de la acidez o alcalinidad y la cantidad de ácido presente en el material es uno de los parámetros más relevantes para la adecuación y utilización de la materia prima en los análisis de laboratorio y producción.

El análisis de pH (acidez o alcalinidad) es llevado a cabo con un medidor de pH, mientras que la acidez titulable es analizada por la adición de hidróxido de sodio en el cambio final con fenolftaleína.

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar la acidez o alcalinidad en muestras sólidas.
- Metodología utilizada para identificar la cantidad de ácido presente en muestras sólidas.
- Partes del procedimiento puede ser homologado con la norma ISI

### **Significado y usos**

- Caracterización de materiales sólidos.
- Determinación de alcalinidad en el material.
- Identificación de cantidad de ácidos en las muestras.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg
- Triturador de cuchillas
- Medidor de pH (rango de 1 a 14)

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Soluciones tampón de pH 4,0 y 7,0
- Hidróxido de sodio 0,1 N
- Fenolftaleína 1 por ciento (p/v en etanol)

- Etanol
- Agua destilada y desionizada

### **Materiales**

- Bureta de 25 ml
- Erlenmeyer de vidrio de 50 ml
- Balones volumétricos de 100 y 200 ml
- Probeta
- Agitador magnético
- Embudo

### **Consideraciones y recomendaciones**

- No se debe tocar las muestras con la mano ya que pueden generar daños a la piel
- No oler ni probar tanto los reactivos como las muestras reaccionantes ya que pueden causar intoxicación en caso de esto retirar a la persona de la zona de gases.
- Tener cuidado con los ojos y la piel frente a salpicaduras de los reactivos y los reactantes, para la cual el uso adecuado de los implementos de laboratorio son recomendados.

### **Procedimiento**

#### **Medición de pH**

Calibrar el medidor de pH con las soluciones tampón pH 4,0 y pH 7,0, Mezclar 15,0 g de muestra en base seca con 30 mL de agua destilada y desionizada. Triturar la suspensión durante 5 minutos con el fin de homogenizar las muestras y tomar una alícuota de 5 ml para medir el pH con dos cifra decimales.

#### **Medición de acidez**

Mezclar 15,0 g de muestra en base seca con 30 mL de agua destilada y desionizada, triturando la suspensión durante 5 minutos con el fin de homogenizar las muestras de donde se toma 20 mL de suspensión a la cual se le agrega 1 gota de fenolftaleína que funciona como indicador, luego es titular con hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener un leve cambio de color.

#### **Cálculos**

$$Na \times Va = Nb \times Vb \quad (9.1)$$

Donde

Na = normalidad del ácido

Va = volumen del ácido (dato de interés)

$N_b$  = Normalidad de la base (NaOH)

$V_b$  = Volumen de la base

La ecuación (9.1) permite calcular la concentración de la solución de los ácidos al ser despejado  $N_a$  de la ecuación. Los datos deben ser calculados como miliequivalentes de ácido por 100 g de muestra seca.

## **Anexo A11) DETERMINACIÓN DE COLOR (GRACE 1977)**

### **Título**

Determinación de color por (Grace 1977)

### **Introducción**

El grado de brillantes y blancura de un almidón, al igual que el seguimiento que se puede realizar a frutas y tubérculos como la yuca, puede orientar los usos básicos que este puede tener en la industria farmacéutica, alimenticia, textil o química. El método utilizado por el laboratorio poscosecha del Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI es colorimetría en un equipo HunterLab “MiniScan™ XE Plus”, el cual permite obtener un dato cuantitativo de las características del almidón y características fisiológicas de yuca, la exactitud del método es de 95% y esta dado por las características del equipo.

### **Aplicación**

- Determinación de color y brillantes del almidón cuantitativamente seleccionando las especies con potencial para un proceso industrial específico.
- Clasificación física de las características de un tipo de yuca.

### **Significado y usos**

- Características físicas del almidón.
- Cuantificación del color y brillantes del almidón.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Colorímetro

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Ninguno

#### **Materiales**

- Espátula
- Hojas en blanco

### **Consideraciones y recomendaciones**

- Manipular el equipo bajo las condiciones ambientales más adecuadas para que no se produzcan accidentes eléctricos no errores en los datos analizados.

### **Procedimiento**

Calibrar el equipo pasando inicialmente la trampa de luz, la placa blanca y como estándar es utilizado la placa blanca. Con una espátula sobre una hoja de papel blanco se agrega una cantidad de almidón necesaria para llenar al recipiente de muestreo. Tomar la medida del equipo y Anotar los datos en el libro de fisicoquímicos.

## **Anexo A12) DENSIDAD APARENTE**

### **Título y Norma**

DENSIDAD APARENTE Técnica usada (Aristizábal & Sánchez 2007)

### **Introducción**

Las partículas sólidas individuales pueden ser caracterizadas por su tamaño, forma y densidad, siendo esta última la medida que relaciona el peso del sólido con el volumen ocupado por él mismo.

La densidad puede ser expresada como densidad libre cuando la masa se encuentra suelta sobre una unidad de volumen conocida, o como densidad empacada cuando el material es sometido a un grado de compactación ocasionado por vibración o apisonamiento a fin de reducir los espacios libres entre partículas.

### **Aplicación**

- Caracterización fisicoquímica del material biomásico
- Determinación de color y brillantes
- Seguimiento fisiológico de yuca amazónica

### **Significados y usos**

- Este procedimiento es usado para caracterizar e identificar materiales sólidos finos
- Este procedimiento puede ser complementado con determinación del tamaño y forma de las partículas las cuales son comúnmente empleados en diversos cálculos de propiedades.
- La caracterización fisiológica permite identificar la degradación biológica del material.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 1 mg

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Ninguno

#### **Materiales**

- Probeta graduada de 50 mL

- Embudo
- Espátula
- Equipo de vibración de base de madera o Vortex

## **Análisis**

### **Determinación de Densidad libre.**

Pesar la probeta, la cual debe estar seca y vacía, anotar el dato (P1). Adicionar cuidadosamente con una espátula la muestra de material solido a la probeta de 50 mL por medio de un embudo hasta obtener el volumen total deseado. Pesar la probeta con el material solido en su interior, anotar el dato (P2).

### **Densidad Empacada**

Pesar la probeta, la cual debe estar seca y vacía. anotar el dato (P1). Sostener la probeta y Adicionar cuidadosamente con una espátula la muestra de material solido a la probeta de 50 mL por medio de un embudo hasta obtener el volumen total. Realizar la vibración durante cinco minutos a una frecuencia y amplitud moderada. Medir el volumen final ( $V_f$ )m anotar el dato. Pesar la probeta con el material solido en su interior, anotar el dato (P2).

## **Anexo A13) CONTENIDO DE ÁCIDO CIANHÍDRICO EN YUCA.**

### **Título.**

CONTENIDO DE ÁCIDO CIANHÍDRICO EN YUCA MÉTODO CUALITATIVO método Quantofix para cianuro ref 91318

### **Introducción.**

El contenido de glucósido cianogénico es uno de los compuestos más sobresalientes tanto para la caracterización de la yuca como para su utilización, estos glucósidos son generados por la enzima linamarasa en presencia de alguna combinación de ácidos que son hidrolizados para generar ácido cianhídrico en los tejidos descompuestos de la planta o en el tracto digestivo de los animales.

El método descrito a continuación, es llevado a cabo mediante el uso de un kit para determinación de ácido cianhídrico en agua marca MACHEREY-NAGEL tipo Quantofix para cianuro ref 913 18, el método indirecto genera un cambio en la coloración e intensidad de una barrilla de prueba proporcionada por el producto que interactúa con Cloramina T y las soluciones del kit.

### **Aplicación**

- Procedimiento utilizado para identificar el contenido de ácidos cianogénicos en raíces y aguas.
- Al realizar la extracción de los jugos puede realizarse algún tipo de medida en frutas y legumbres.

### **Significado y usos**

- Caracterización de materiales celulósicos y aguas.

### **Adicionales:**

El análisis ha sido modificado, basado en los requerimientos y equipos utilizados en el laboratorio poscosecha del **Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI** sede Bogotá.

### **Equipos**

- Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg
- Triturador de cuchillas

### **Reactivos y materiales**

#### **Reactivos**

- Agua destilada y desionizada grado HPLC
- Ácido sulfúrico 5mM

- 1 botella de Cianid(e) 1 (producto en el kit)
- 1 botella de Cianid(e) 2 (producto en el kit)

### **Materiales**

- Vaso graduado con marca de 5 ml (producto en el kit)
- Cuchara de medición (producto en el kit)
- Tubos de ensayo de 15 mL con tapa rosca
- Cuchillo
- Tabla para cortar muestras
- Gradillas para tubos
- Pinza de acero inoxidable
- Tijeras

### **Consideraciones y recomendaciones**

- No se debe tocar las muestras con la mano ya que pueden generar daños a la piel
- No oler ni probar tanto los reactivos como las muestras reaccionantes ya que pueden causar intoxicación en caso de esto retirar a la persona de la zona de gases.
- Tener cuidado con los ojos y la piel frente a salpicaduras de los reactivos y los reactantes, para la cual el uso adecuado de los implementos de laboratorio son recomendados.
- Una mala manipulación del kit puede proporcionar medidas erróneas de los datos.

### **Procedimiento**

Extraer la corteza de la muestra y separa 15 gr que deben ser picado en trozos aproximados de 0.5 cm en el menor tiempo posible. Agregar 50 ml de agua destilada y desionizada tipo HPLC y llevar a la trituradora de cuchillas por 4 minutos a 180 rpm.

Llenar el vaso graduado con la suspensión (producto en el kit) hasta la primera marca de 5 ml para determinar el valor de pH con el fin de llevarlo a a pH 6 mediante la acidificación con ácido sulfúrico diluido a 5mM o hidróxido de sodio 0.1 N

Añadir una cucharada de Cianid-1 (mezcla reguladora del kit) y dar la vuelta cuidadosamente. Extraer únicamente la cantidad de varillas de prueba que se va a utilizar. Después de coger las varillas necesarias, cerrar correctamente la lata contenedora de aluminio. No tocar el campo de prueba con los dedos.

Añadir a la solución 5 gotas de Cianid-2 e invertir el vaso ligeramente. Inmediatamente después introducir la varilla de prueba en la solución durante 45 segundos.

### **Cálculos**

Basado en la carta de color.

### 13.2 ANEXO B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los análisis estadísticos fueron realizados por el programa Statistix 9 basados en el diseño experimental seleccionado para cada etapa del proyecto.

- **ALMIDÓN TOTAL.**

Source	DF	SS	MS	F	P
VARIEDAD	21	570.314	27.1578	20.05	0.00001
Error	26	35.222	1.3547		
Total	47	605.536			
Grand Mean	92.606	CV	1.26		
Homogeneity of Variances	F	P			
Levene's Test	28.2	0.00001			

- **ALMIDÓN LIBRE; RELACIÓN AMILOSA/AMILOPECTINA; SUSCEPTIBILIDAD A LA HIDRÓLISIS.**

El análisis estadístico fue realizado por separado para cada variable mediante un diseño experimental basado en el análisis de varianza de una sola vía.

#### **Almidón Libre**

One-Way AOV for ALMID by VARIEDAD

Source	DF	SS	MS	F	P
VARIEDAD	23	0.06128	0.00266	2.45	0.0052
Error	44	0.04776	0.00109		
Total	67	0.10904			
Grand Mean	0.1365	CV	24.14		
Homogeneity of Variances	F	P			
Levene's Test	2.30	0.0088			

#### **Relación amilosa/amilopectina**

One-Way AOV for AMILOSA by VARIEDAD

Source	DF	SS	MS	F	P
VARIEDAD	23	0.01529	6.646E-04	243.62	0.00001
Error	48	0.00013	2.728E-06		
Total	71	0.01542			
Grand Mean	0.0381	CV	4.34		
Homogeneity of Variances	F	P			
Levene's Test	1.90	0.0302			

## Susceptibilidad a la hidrólisis

One-Way AOV for HIDROLISIS by VARIEDAD

Source	DF	SS	MS	F	P
VARIEDAD	23	1.476e+07	641973	23.61	0.00001
Error	33	897445	27195		
Total	56	1.566e+07			
Grand Mean	685.94	CV	24.04		
Homogeneity of Variances	F	P			
Levene's Test	26.3	0.00001			

- CORRELACIÓN ENTRE FACTORES**

One-Way AOV for CORRELACION by VARIEDAD

Source	DF	SS	MS	F	P
VARIEDAD	23	0.44254	0.01924	1.60	0.0862
Error	47	0.56581	0.01204		
Total	70	1.00835			
Grand Mean	0.3860	CV	28.43		
Homogeneity of Variances	F	P			
Levene's Test	2.81	0.0013			

- SELECCIÓN DEL TIEMPO DE PROCESO CON LAS ENZIMAS EN ESTADO LIBRE.**

El diseño experimental implementado se realizó por separado para cada tratamiento mediante un diseño experimental basado en el análisis de varianza de una sola vía. (\* no hay diferencia entre medias)

**Análisis realizado sobre E1 (GC626)**

TIEMPO	Mean	0	1	2	3	4	8	12	16
0	475.39								
1	10209	9733*							
2	11997	11521*	1788*						
3	19150	18674*	8941*	7153*					
4	22811	22335*	12602*	10814*	3661*				
8	26240	25764*	16031*	14243*	7090*	3429*			
12	30964	30488*	20755*	18967*	11814*	8153*	4724*		
16	34380	33904*	24171*	22383*	15230*	11569*	8140*	3416*	
24	35559	35084*	25350*	23562*	16409*	12748*	9319*	4595*	1179
Alpha	0.01	Standard Error for Comparison			256.91				
Critical Q Value		7.328	Critical Value for Comparison			1331.3			

### Análisis realizado sobre E2 (G-ZYME® 480)

TIEMPO	Mean	0	1	2	3	4	8	12	16
0	439.38								
1	8641	8202							
2	14006	13567	5365						
3	24446	24007*	15805	10440					
4	25559	25119*	16918	11553	1113				
8	46106	45667*	37465*	32100*	21660*	20547*			
12	54825	54386*	46184*	40819*	30379*	29266*	8719		
16	55856	55417*	47215*	41850*	31410*	30298*	9750	1031	
24	54527	54087*	45886*	40521*	30081*	28968*	8421	298	1330
Alpha	0.01	Standard Error for Comparison			3742.4				
Critical Q Value		7.328	Critical Value for Comparison			19393			

### Análisis realizado sobre E3 (STARGEN™001)

TIEMPO	Mean	0	1	2	3	4	8	12	16
0	449.05								
1	1186.9	738							
2	1524.7	1076	338						
3	2318.6	1870	1132	794					
4	2256.7	1808	1070	732	62				
8	6147.9	5699*	4961*	4623*	3829*	3891*			
12	6043.8	5595*	4857*	4519*	3725*	3787*	104		
16	6938.4	6489*	5752*	5414*	4620*	4682*	790	895	
24	11429	10980*	10242*	9904*	9110*	9172*	5281*	5385*	4491*
Alpha	0.01	Standard Error for Comparison			681.06				
Critical Q Value		7.328	Critical Value for Comparison			3529.1			

#### • COMPARACIÓN CINÉTICA ENTRE ENZIMAS

Diseño: Análisis de varianza completamente aleatorio por comparación de Tukey triangular (\* no hay diferencia entre medias) utilizando un Alpha de 0.05

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T0 by TIEMPO

T0=	0	Horas	
TIEMPO	Mean	E1	E2
E1	475.39		
E2	439.38	36.00	

E3	449.05	26.34	9.66
Standard Error for Comparison	78.688		
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	328.78

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T1 by TIEMPO

<b>T1=</b>	<b>1</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	10209		
E2	8641.0	1186.9	
E3	1568	9022*	7454*
Standard Error for Comparison	1069.3		
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	4468.0

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T2 by TIEMPO

<b>T2=</b>	<b>2</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	11997		
E2	14006	2009	
E3	1524.7	10472*	12482*
Standard Error for Comparison	2444.3		
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	10213

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T3 by TIEMPO

<b>T3=</b>	<b>3</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	19150		
E2	24446	5297	
E3	2318.6	16831*	22128*
Standard Error for Comparison	3990.4		
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	16673

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T4 by TIEMPO

<b>T4=</b>	<b>4</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	22811		
E2	25559	2748	

E3	2256.7	20554*	23302*
Standard Error for Comparison		3181.1	
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	13292

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T5 by TIEMPO**

<b>T5=</b>	<b>8</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	26240		
E2	46106	19866*	
E3	6147.9	20092*	39958*
Standard Error for Comparison		842.97	
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	3522.2

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T6 by TIEMPO**

<b>T6=</b>	<b>12</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	30964		
E2	54825	23861*	
E3	6043.8	24920*	48781*
Standard Error for Comparison		583.06	
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	2436.2

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T7 by TIEMPO**

<b>T7=</b>	<b>16</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	34380		
E2	55856	21477*	
E3	6938.4	27441*	48918*
Standard Error for Comparison		2514.2	
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	10505

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T8 by TIEMPO**

<b>T8=</b>	<b>24</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	35559		
E2	54527	18968*	

E3	11429	24130*	43098*
Standard Error for Comparison		1751.6	
Critical Q Value	5.909	Critical Value for Comparison	7318.8

- **IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADICIÓN**

Diseño: Análisis de varianza completamente aleatorio por comparación de Tukey triangular (\* no hay diferencia entre medias). Con un Alpha 0.05 y un Critical Q Value 5.909

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T0 by TRATAMIEN**

<b>T0=</b>	<b>0</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	438.39		
E2	479.36	41.0	
E3	4054.7	3616.3*	3575.3*
Standard Error for Comparison		839.69	
Critical Value for Comparison		3508.5	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T1 by TRATAMIEN**

<b>T1=</b>	<b>1.5</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	11560		
E2	10726	834	
E3	29341	17781	18615
Standard Error for Comparison		5367.7	
Critical Value for Comparison		22428	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T2 by TRATAMIEN**

<b>T2=</b>	<b>3</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	17125		
E2	21429	4303	
E3	38067	20942*	16639*
Standard Error for Comparison		3951.8	
Critical Value for Comparison		16512	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T3 by TRATAMIEN**

<b>T3=</b>	<b>4.5</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	22065		
E2	29647	7582*	

E3	40087	18022*	10441*
Standard Error for Comparison		1059.2	
Critical Value for Comparison		4425.8	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T4 by TRATAMIEN**

<b>T4=</b>	<b>6</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	25329		
E2	40049	14720*	
E3	39742	14413*	307
Standard Error for Comparison		3158.7	
Critical Value for Comparison		13198	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T5 by TRATAMIEN**

<b>T5=</b>	<b>15</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	31919		
E2	53171	21252	
E3	49977	18058	3194
Standard Error for Comparison		10883	
Critical Value for Comparison		45475	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T6 by TRATAMIEN**

<b>T6=</b>	<b>16.5</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	49128		
E2	55477	6349	
E3	55477	6349	0
Standard Error for Comparison		8608.8	
Critical Value for Comparison		35970	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T7 by TRATAMIEN**

<b>T7=</b>	<b>18</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	58499		
E2	60055	1556	
E3	60055	1556	0
Standard Error for Comparison		6649.7	
Critical Value for Comparison		27784	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T8 by TRATAMIEN**

<b>T8=</b>	<b>19.5</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>

E1	59839		
E2	60601	761	
E3	60601	761	0
Standard Error for Comparison		23748	
Critical Value for Comparison		99228	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T9 by TRATAMIEN**

<b>T9=</b>	<b>21</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	61552		
E2	62398	846	
E3	62398	846	0
Standard Error for Comparison		13550	
Critical Value for Comparison		56614	

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of T10 by TRATAMIEN**

<b>T10=</b>	<b>30</b>	<b>Horas</b>	
<b>TIEMPO</b>	<b>Mean</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
E1	85476		
E2	73081	12395	
E3	73081	12395	0
Standard Error for Comparison		8292.7	
Critical Value for Comparison		34650	

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R.A., Conway, H.F. & Peplinski, A.J., 1970. Gelatinization of Corn Grits by Roll Cooking, Extrusion Cooking and Steaming. *Starch - Stärke*, 22(4), págs.130-135.
- Aristizábal, J. & Sánchez, T., 2007. *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca*, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Bernfeld, P., 1955. Amylase, alfa and beta. *Methods Enzymol*, (1).
- GENENCOR, 2007. Method Number. C100C-00 Fungal Glucoamylase, GAU/g Activity.
- GENENCOR, 2004. Method Number. C113C-00 Alpha-Amylase, AAU Activity.
- GENENCOR, 1999. Method Number: C100C-02, GAU Activity.
- Grace, M., 1977. *Analisis de la yuca.*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Shariffa, Y. et al., 2009. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, 23(2), págs.434-440.
- Sluiter, A. et al., 2008. *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy.
- Sluiter, A. et al., 2005. *Determination of Ash in Biomass*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute • Battelle.
- Sluiter, A. & Sluiter, J., 2005. *Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC*, Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute • Battelle.
- Tanaka, A., 2002. Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with *Bacillus*  $\alpha$ -amylases in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(5), págs.485-490.
- Tester, R.F., Karkalas, J. & Qi, X., 2004. Starch--composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), págs.151-165.
- Whitaker, J., 2003. *Handbook of food enzymology*, New York: Marcel Dekker.
- Wrolstad, R., 2000. *Handbook of food analytical chemistry [vol.1] water, proteins,*

*enzymes, lipids, and carbohydrates [vol.2] pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.

Wrolstad, R.E. et al., 2005. *Handbook of food analytical chemistry*, Hoboken N.J.: J. Wiley.