

Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de almidón de papa*

M. Pardo**, P. Rivera**,
O. Castellanos**, G. González**

Kinetic study of enzymatic hydrolysis of potato starch

RESUMEN

A lo largo del artículo se describe el estudio cinético de la hidrólisis enzimática del almidón de papa utilizando enzimas en forma soluble de la firma fabricante Novo Nordisk. Para ello se efectuaron diversos ensayos, divididos en cuatro grupos: estudio del tiempo de reacción, con el cual fue posible disminuir su duración de 48-72 horas reportadas por la literatura, a 16 horas, con niveles de productividad comparables; selección del conjunto de enzimas que se van a utilizar en el cual se evaluaron diversos tipos -BAN y Termamyl como alfa-amilasas en la etapa de dextrinización, y AMG, Promozyme y Fungamyl para la reacción de sacarificación-, identificando aquellas que presentaran mejor desempeño en la hidrólisis.

Se optimizaron las condiciones de reacción para las dos etapas del proceso: dextrinización y sacarificación. Para la primera se estudiaron la dosis enzimática, la concentración de cofactor calcio, el pH, la temperatura y la velocidad de agitación, mientras que para la sacarificación se contemplaron la relación de enzimas, el pH y la velocidad de agitación; este último parámetro reportó valores sin antecedentes en la literatura, 60 r.p.m. y 30 r.p.m. para la primera y segunda reacciones, respectivamente. Con las condiciones optimizadas se realizó por último la cinética de Michaelis Menten, variando el sustrato de 10-50%P/V, obteniéndose los parámetros cinéticos k_m y $V_{máx}$, para cada reacción, encontrando un modelo cinético acorde con las condiciones locales de trabajo, capaz de explicar la conversión del almidón de papa a jarabe de glucosa y logrando equivalentes de dextrosa de 96 al final de la reacción, que se encuentran dentro del rango máximo reportado en la literatura (94-98).

Para la realización de los ensayos se construyó previamente un equipo de laboratorio tipo banco, capaz de reproducir y mejorar condiciones de la literatura, convirtiéndose en una herramienta útil y confiable para realizar ensayos con buenos resultados.

PALABRAS CLAVES

Hidrólisis enzimática, almidón, jarabe de glucosa, cinética, dextrinización, sacarificación.

ABSTRACT

This article describes the kinetic study of potato starch enzymatic hydrolysis using soluble enzymes (Novo Nordisk). Different assays divided into four groups were used: reaction time (with which it was possible to reduce the 48-72 hour duration reported in the literature to 16 hours with comparable productivity levels); selecting the set of enzymes to be used (different types were evaluated -BAN and Termamyl as alfa-amylases during dextrinisation stage, and AMG, Promozyme and Fungamyl for saccharification reaction- identifying those presenting the best performance during hydrolysis).

Reaction conditions were optimised for the process's two stages (dextrinisation and saccharification). Enzyme dose, calcium cofactor concentration, pH, temperature and agitation speed were studied for the first stage. Enzyme ratio, pH and agitation speed were studied for saccharification; the latter parameter reported values having no antecedents in the literature (60 rpm and 30 rpm for first and second reactions, respectively). Michaelis Menten kinetics were calculated once conditions had been optimised, varying substrate from 10%-50% P/V, obtaining k_m and V_{max} kinetic parameters for each reaction. A kinetic model was found according to local working conditions which was able to explain potato starch conversion to glucose syrup, achieving 96 dextrose equivalents by the end of the reaction, being well within the maximum range reported in the literature (94-98).

Laboratory equipment was constructed prior to carrying out assays which was able to reproduce and improve the conditions reported in the literature, making it a useful, reliable tool for use in assays returning good results.

KEY WORDS

Enzymatic hydrolysis, starch, glucose syrup, kinetics, dextrinisation, saccharification.

* Basado en el proyecto de grado "Diseño de un biorreactor piloto para hidrólisis enzimática de almidones", requisito para optar al título de ingeniero químico de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C.

** Ingenieros químicos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C. ocasta@ing.unal.edu.co.

INTRODUCCIÓN

La utilización de las enzimas en procesos industriales biotecnológicos adquiere cada vez mayor importancia en la medida en que se requieren nuevos y mejores productos destinados a satisfacer necesidades y mercados altamente exigentes. En el país, sectores como panadería, cervecera, detergentes, vinos y zumos de frutas están desarrollando ampliamente las bondades de la tecnología enzimática, mientras que otros, como la hidrólisis del almidón, presentan una aplicación mínima pese a la disponibilidad comercial de las enzimas, su eficiencia, especificidad, comodidad, economía y demanda actual de la industria alimentaria.

Los hidrolizados enzimáticos surgen de la necesidad de sustituir ciertas materias primas para ofrecer productos de gran competitividad que generen diversas opciones en el mercado; sus aplicaciones –jarabes con azúcares de mayor poder de disolución, sustancias en la preparación del color caramelo que aportan resistencia a la decoloración térmica, dan cuerpo, acentúan los sabores a frutas y mejoran el color y las texturas–, así como la existencia de un mercado potencial, son algunas de las razones por las cuales cobran importancia hoy en día.

González y Castellanos (2000), al estudiar la incidencia del análisis de mercados en el desarrollo de la ingeniería de enzimas en Colombia, afirmaron que existe en el país una demanda fuerte de jarabes de glucosa, abastecida en su totalidad por mercados internacionales: «De los estudios se concluye que en Colombia actualmente los mercados de glucosa, jarabe de glucosa, la combinación de los anteriores y glucosa con todos los jarabes están en crecimiento (5,1%, 0,2%, 5,95% y 1,57%, respectivamente), el mercado de jarabe invertido se está reactivando. Por lo que se recomienda la producción de glucosa y su jarabe» (González y Castellanos, 2000).

Por esto se ha visto la necesidad de estudiar el desarrollo de alternativas de ingeniería para la producción en Colombia de los hidrolizados enzimáticos, dirigidos a procesos que se adecuen a las necesidades del país y puedan implementarse en la industria nacional.

Para establecer un proceso estructurado, con miras a la producción industrial de jarabes, es necesario contemplar el estudio de condiciones y parámetros de ob-

tención adecuados para el entorno colombiano. En diversas partes del mundo se han realizado investigaciones enfocadas a encontrar modelamientos específicos que describen el comportamiento de las reacciones enzimáticas involucradas, desarrollando metodologías capaces de mejorar y optimizar la producción de estos jarabes.

En el país se han realizado trabajos sobre el aprovechamiento de harinas y almidones mediante la utilización de enzimas para la generación de nuevos productos, realizando importantes aportes para la elaboración de jarabes de glucosa, que son la base de este estudio; sin embargo, no se ha llegado a un modelamiento estructurado que permita establecer, entre otros, los parámetros cinéticos con el fin de diseñar equipos donde se lleven a cabo las reacciones de hidrólisis enzimática.

En el artículo se resume el estudio de las reacciones en la hidrólisis enzimática del almidón –dextrinización y sacarificación– hasta su conversión en glucosa, seguido de un análisis cinético detallado, para culminar con la presentación del modelamiento teórico.

METODOLOGÍA

Materias primas

Para efectuar la hidrólisis enzimática del almidón se tomó como materia prima el almidón de papa, con el propósito de aprovechar los subproductos de la industria de procesamiento de papa.

Los ensayos se realizaron con enzimas específicas para dextrinización y sacarificación provistas por Coldoenzimas, empresa distribuidora en el país de la marca Novo Nordisk. Para la etapa de dextrinización se utilizaron dos enzimas de tipo α -amilasa, BAN y Termamyl, las cuales hidrolizan endolíticamente los enlaces glucosídicos α -(1-4). En la sacarificación se utilizaron tres enzimas: AMG (glucoamilasa), Promozyme y Fungamyl. La primera es de tipo glucoamilasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -(1-4) mediante la remoción de unidades de glucosa a partir de una molécula no terminal reducida. Promozyme es una enzima desramificante que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -(1-6) en pululan y amilopectina, mientras que Fungamyl es una α -amilasa, capaz de hidrolizar los enlaces α -(1-4) en amilosa y amilopectina.

Otros reactivos. La fuente de iones calcio que se uso como cofactor para las enzimas dextrinizantes fue $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en tanto que las soluciones *buffer* utilizadas en la hidrólisis se prepararon con $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M y ácido cítrico 0,1 M; estas soluciones se ajustaron en el rango de pH requerido para trabajar los ensayos, mezclándolas en cantidades diferentes.

Procedimiento experimental

Diversas fuentes bibliográficas (Chica, 1996; Benavidez et al., 1983;) y la casa fabricante de las enzimas (Novo Nordisk) recomiendan un proceso de obtención de jarabes de glucosa y maltosa por vía enzimática en dos etapas. Con base en esta información se tomó el siguiente procedimiento generalizado para llevar a cabo en el laboratorio. Es de aclarar que las condiciones de operación referenciadas se sometieron posteriormente a un proceso de optimización:

El almidón de papa se licuefactó inicialmente bajo la acción de las enzimas dextrinizantes, dispersándolo en agua y formando una solución de 35%p/v en un volumen de solución de 100 ml; luego se adicionó la cantidad de iones calcio (como solución de CaCl_2) y se ajustó el pH a 6,2 con la solución *buffer* (fosfato ácido de sodio 0,2 M y ácido cítrico 0,1 M). Una vez ajustado el pH, se adicionó la enzima dextrinizante diluida (BAN o Termamyl), se calentó la solución a temperatura de 85-95 °C con agitación constante y se dejó actuar por un periodo de 2-4 horas, manteniendo constantes las condiciones. Al cabo de este tiempo se detuvo la acción enzimática mediante adición de HCl 0,1 N para bajar el pH de la solución a 4,5, y luego se dejó enfriar hasta una temperatura de 60 °C. Posteriormente se adicionaron las enzimas sacarificantes y se dejaron actuar por un periodo de 48 a 72 horas (tiempo referenciado por Novo Nordisk), con agitación constante y temperatura de 60 °C. Una vez pasado el tiempo de reacción se elevó la temperatura a 80 °C para inactivar la enzima.

Paralelamente se tomaron muestras de la solución en los tiempos de reacción de la dextrinización y sacarificación, para realizar un seguimiento por medio de la cantidad de azúcares reductores formados. Las condiciones utilizadas en este procedimiento no son las óptimas, pero para esto se realizó un ensayo de optimización de variables de cada etapa del proceso, posteriormente.

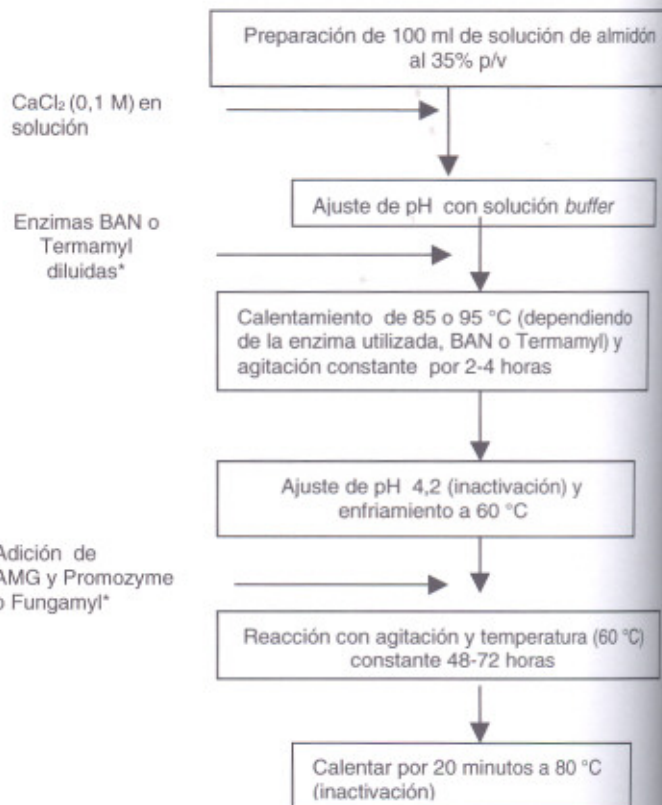


Figura 1. Procedimiento experimental.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Para la detección de azúcares reductores se contó con el método analítico de Somogyi - Nelson, el cual se sometió a una estandarización previa en el laboratorio de bioquímica de la planta piloto para adaptarlo a las condiciones propias de los reactivos empleados. La detección de glucosa se realizó por el método enzimático de glucosa oxidasa peroxidasa, de acuerdo con las condiciones recomendadas por la firma Biomérieux, distribuidora de la enzima.

Determinación del equivalente de dextrosa. El grado de hidrólisis de un almidón se expresa, generalmente, en función del equivalente de dextrosa (ED), el cual está directamente relacionado con la cantidad de grupos reductores libres o azúcares reductores presentes en ese almidón. Generalmente, la literatura reporta resultados de conversión de almidones mediante este método y el presente caso no puede ser la excepción.

El ED se determinó por la siguiente ecuación (Benavidez *et al.*, 1983):

$$ED = (AR/PM) \times 100$$

donde AR es la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra, determinados por el método de Somogyi -Nelson y expresados en g/ml. PM es el peso de la muestra seca en gramos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En el desarrollo de la fase experimental, se identificaron las variables de interés para determinar las condiciones de proceso: tiempo de reacción, selección del conjunto de enzimas, temperatura, pH, dosis enzimática, concentración de iones calcio, velocidad de agitación, concentración de sustrato. Debido a la cantidad de variables, se necesitó dividir los ensayos en cuatro grandes grupos y estudiar las dos reacciones de manera independiente; una vez analizadas las condiciones de la dextrinización, se procedió a estudiar la sacarificación. Por tanto, el diseño de experimentos se dividió en:

- Estudio del tiempo de reacción
- Selección de conjunto de enzimas que se van a utilizar
- Estudio de la optimización de las condiciones de operación
- Estudio de la cinética.

Tiempo de reacción. Se estudió esta variable en la reacción de las enzimas, con el fin de poder evaluar la posibilidad de disminuir los grandes valores reportados en la literatura. Para estudiarlo se realizaron dos ensayos en la etapa de dextrinización: el primero con la enzima BAN y el segundo con Termamyl. Los tiempos empleados como punto de partida se encuentran muy por encima de los reportados por Benavidez en 1983 (2,5 horas) y Chica en 1996 (1 hora), debido a que se realizó un barrido completo y confiable que permitió establecer criterios para seguir adelante, sobre todo sabiendo que los siguientes pasos dependen del tiempo empleado en cada ensayo. De este modo, todos los ensayos se demoraron hasta ocho horas, utilizando las condiciones promedio de la firma fabricante y haciendo réplicas de los mismos.

En el estudio de sacarificación, Novo Nordisk reporta tiempos de reacción para la conversión de

dextrinas a glucosa de 48-72 h, utilizando las enzimas AMG 300L, Promozyne 300L, y Fungamyl 800L. Las dos primeras tendientes a transformar el sustrato preferiblemente a glucosa, y la tercera a maltosa y maltodextrinas. Benavidez (1983) demostró que era suficiente llevar a doce horas la reacción, ya que en este intervalo se encuentra el mayor porcentaje de azúcares reductores y que por encima, si bien se obtienen más azúcares, se pierde viabilidad por altos costos energéticos; para almidón de papa, Chica (1996) propuso investigar las productividades desde las 8 hasta las 72 h, recomendando el valor de 24 h como punto óptimo.

Con base en estas informaciones se optó por llevar a cabo reacciones de 72 h que permitieran conocer el comportamiento total del sistema y arrojaran criterios para la toma de decisión. Para este fin se utilizó BAN en el proceso de licuefacción por la facilidad en su manejo debido a que utiliza temperaturas de trabajo más bajas que Termamyl, y en la sacarificación se emplearon AMG-Promozyne. El criterio para escoger el tiempo en ambas reacciones fue la curva de saturación de la enzima, pues una vez alcanzado el nivel de saturación la producción no aumenta considerablemente.

Cada ensayo se realizó por triplicado, la enzima se adicionó en solución del 10%v/v y el CaCl₂ en solución de 0,1 M. Se utilizó el método de Somogyi-Nelson para cuantificar los azúcares reductores liberados durante el proceso de hidrólisis.

Selección del conjunto de enzimas que se va a utilizar. Cuando se estudiaron los tiempos de reacción óptimos de cada etapa del proceso se procedió a seleccionar el conjunto de enzimas que se va a utilizar en la hidrólisis enzimática del almidón de papa. Para ello se plantearon las opciones mostradas en la figura 2, combinando diferentes juegos de enzimas dextrinizantes y sacarificantes.

La primera opción corresponde al conjunto de enzimas Termamyl (en dextrinización), AMG-Promozyne¹ (en sacarificación).

La tercera opción corresponde a BAN, AMG-Promozyne, es decir, sólo difiere con el anterior en la enzima utilizada para la reacción de dextrinización. Las

1. La enzima promozyne no es de carácter sacarificante, sólo ayuda en el proceso de desramificación de las cadenas de amilopectina enlazadas a las cadenas de amilosa por enlaces α -(1-6)-glucosídicos.

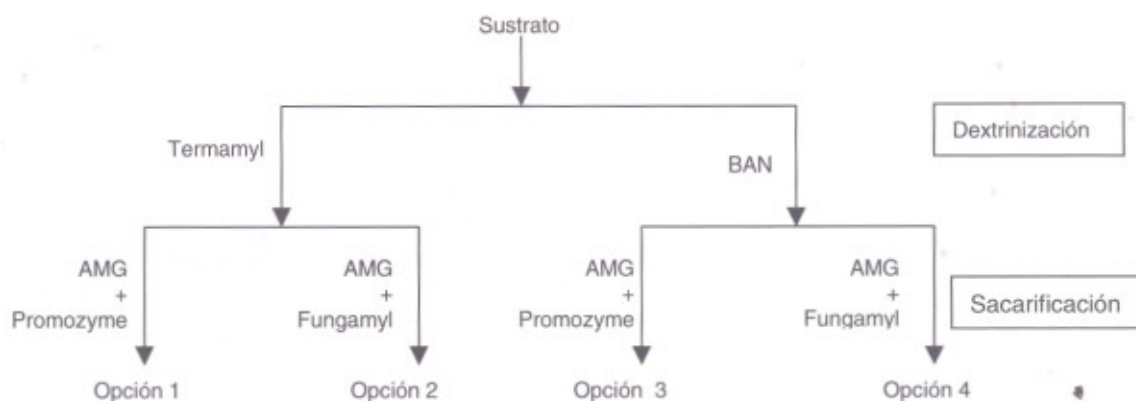


Figura 2. Ensayos realizados para seleccionar el conjunto de enzimas que se van a utilizar en la hidrólisis enzimática de almidones.

opciones 2 y 4 cambian en la sacarificación Promozyme por Fungamyl, una enzima de carácter fúngico de tendencia a transformar sustratos a maltosas, pero que desde el punto de vista de los azúcares reductores es importante estudiar.

En todos los casos, el seguimiento de la reacción se realizó determinando los azúcares reductores con el método de Somogyi - Nelson. El criterio de selección del conjunto de enzimas por utilizar fue el de mayor productividad.

Optimización de las condiciones del proceso. Cubierto el estudio de los tiempos de reacción y seleccionado el conjunto de enzimas utilizado para la hidrólisis enzimática del almidón de papa, se procedió a optimizar las condiciones de operación tanto en el proceso de dextrinización como en el de sacarificación.

Optimización de las variables en la etapa de dextrinización. Las variables de estudio para la dextrinización fueron concentración de cofactor calcio expresado como cloruro de calcio, dosis enzimática, pH, temperatura y velocidad de agitación. El estudio se llevó a cabo de una manera escalonada, es decir, se optimizó una de las variables de interés, dejando fijas las demás; una vez definida ésta, se tomó la siguiente y así sucesivamente hasta llegar a la última. Esto se puede apreciar más claro en la figura 3, al igual que el orden de estudio de las variables.

Se escogió el sistema escalonado porque éste estudia el comportamiento de las variables que no presentan una fuerte dependencia entre sí, encontrando un máximo o una curva (Juran, 1986), como es el caso de las variables en la hidrólisis enzimática de almidones.

Además no tiene la misma incidencia probar distintas concentraciones de calcio a varias velocidades de agitación² (datos dispersos sin ninguna dependencia y poca variación que permitan concluir algo concreto), que a una velocidad ya optimizada encontrar la mejor dosis de iones calcio, que reflejen productividades marcadas de modo diferente y que sirvan como criterio de decisión.

Para cada variable se tomaron 3-5 niveles –cerca a lo recomendado por Novo Nordisk–, con el fin de obtener una curva de producto formado vs variable, donde se obtuvo un máximo, es decir, un óptimo. Las curvas de optimización se elaboraron con base en la formación de azúcares reductores, los cuales se determinaron por el método de Somogyi-Nelson. Los ensayos se realizaron por triplicado, permitiendo mayor confiabilidad de los datos y reportando el valor promedio.

Optimización de las variables en la etapa de sacarificación. Optimizadas las condiciones de reacción en la etapa de dextrinización, se procedió a evaluar las de la etapa de sacarificación; se tomó un sistema escalonado, al igual que en la dextrinización. Las variables que se evaluaron fueron pH, relación de enzimas sacarificantes (AMG/Promozyme) y velocidad de agitación.

Los ensayos se efectuaron a la temperatura recomendada por la casa fabricante³, puesto que a tempe-

- O. F. Castellanos, A. P. Sinitsyn, E. Yu Vlasenko (1994). Optimal conditions for hydrolysis of cellulosic materials by cellulases from *Penicillium verruculosum*. *Pril. Biokhim. Mikrobiol.*, 23, 6, 801-809.
- O. F. Castellanos, A. P. Sinitsyn, E. Yu Vlasenko (1995). Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *Penicillium* cellulases. *Bioresource technology*, 2, 109-118.
- Novo Nordisk recomienda para la sacarificación 55 °C con AMG-Fungamyl y 60 °C con AMG-Promozyme.

raturas menores se corre el riesgo de contraer una infección microbiana, además, la actividad de la enzima AMG decrece notablemente y a temperaturas mayores se ve afectada la estabilidad de la enzima. Al igual que en la dextrinización, en la sacarificación se manejan varios niveles para obtener una curva de optimización. El producto se reportó con base en la formación de azúcares reductores y la glucosa obtenida, la cual se determinó por medio del método de la glucosa enzimática. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cinética y estudio de la concentración de sustrato.

Una vez examinadas las condiciones de operación de dextrinización y sacarificación, se procedió a estudiar la cinética de reacción, para cada una de las etapas, con el fin de proponer un diseño del reactor para llevar a cabo la conversión del almidón a jarabe de glucosa.

La cinética obtenida fue la que corresponde al modelo de Michaelis - Menten, donde se graficó la concentración de sustrato vs la velocidad inicial de reacción. El seguimiento del proceso se realizó midiendo

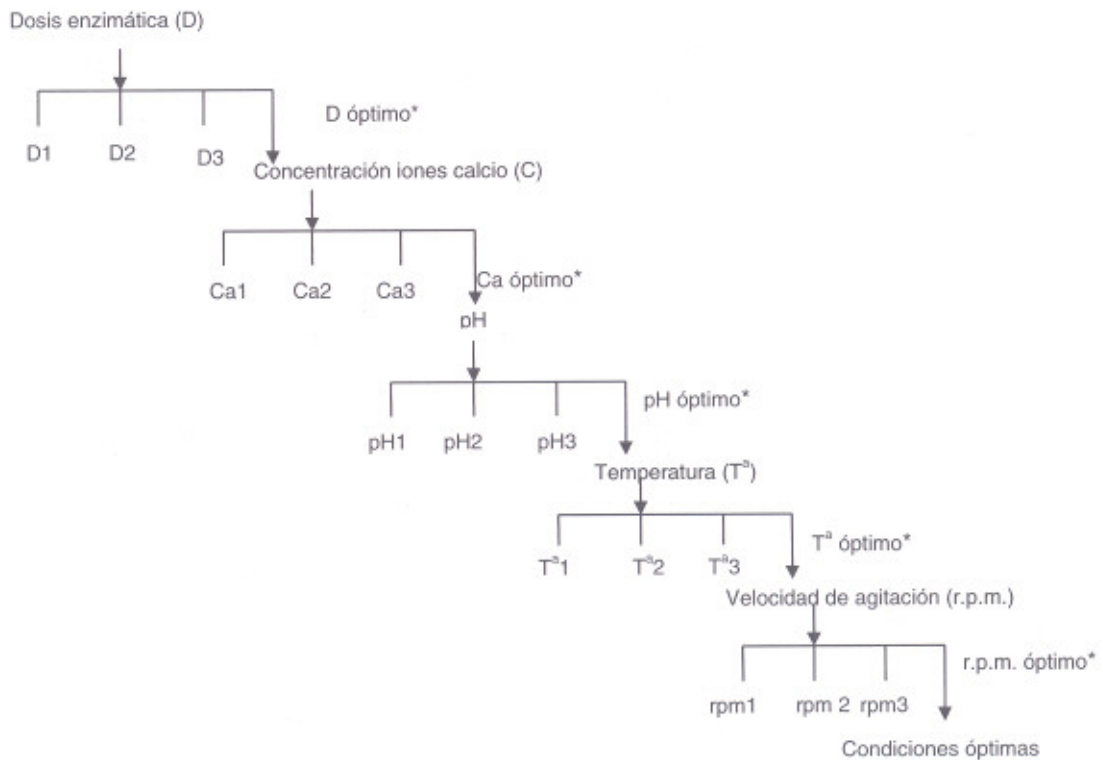
azúcares reductores, a diferentes concentraciones de sustrato. Primero se construyeron las curvas de avance de reacción (producto vs tiempo) y luego se calcularon los valores de $V_o = \Delta P/\Delta t$, es decir, la pendiente de la curva de reacción obtenida durante las primeras horas de reacción, tal como se observa en la figura 4 (a).

Cuando se hallaron los valores de V_o a diferentes concentraciones de sustrato, se graficó S vs V_o .

El criterio de selección para escoger la concentración de sustrato fue la cinética de Michaelis Menten, que se encuentra al alcanzar la saturación de la enzima (figura 4(b)), es decir, es dos a tres veces el valor de la constante de Michaelis k_m (Castellanos, 1994).

EQUIPOS

Teniendo claros los ensayos por efectuar, se procedió a montar un equipo donde pudieran realizarse las pruebas para el estudio de la hidrólisis enzimática del almidón de papa. Dicho equipo debe garantizar ciertas condiciones de operación:



* Es la condición óptima después de evaluar los tres niveles.

Figura 3. Esquema escalonado para la optimización de las variables.

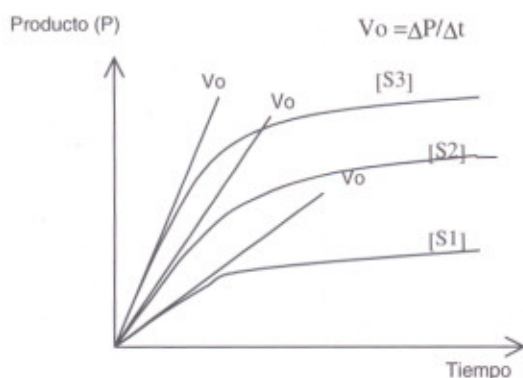


Figura 4a. Curva de avance de reacción.



Figura 4b. Cinética de Michaelis-Menten.

- Sistema de agitación
- Sistema de calentamiento
- Control de temperatura.

Dada la gran cantidad de ensayos planteados, se diseñó y construyó un dispositivo en el cual fuera posible realizar varias reacciones simultáneas de hidrólisis de almidón, garantizando en cada una de ellas el mismo desempeño y comportamiento para de esta manera cubrir en un menor tiempo un considerable rango de experimentos. De los aportes más significativos del trabajo se resalta precisamente haber diseñado y montado este sistema en cuatro meses de la fase inicial del proyecto y del cual no existían precedentes en el laboratorio, convirtiéndolo en una herramienta útil, versátil y de primera mano. El hecho de construir un equipo per-

mite, además, conocer y controlar las variables de temperatura y agitación para un sistema en particular, sin tener que pensar en la adaptabilidad de los ya existentes.

Montaje. Contando con un sistema de agitación de jarras (en serie) y un baño termostato, se hizo un diseño del equipo tipo banco.

En la figura 5 se observa el diseño del equipo tipo banco. El baño termostato posee una bomba que impulsa el fluido calefactor por las chaquetas de los reactores mediante tubería flexible resistente al calor (manguera Tygon cristal), los que se colocan en serie debido a la facilidad de diseño. Se pensó en realizar un sistema en paralelo cambiando sólo las conexiones en las boquillas de los reactores, pero esto significaba más complejidad a la hora de construcción; además, la capacidad de la bomba alcanzó para colocar el sistema del calentamiento en serie sin que existiera el riesgo de cavitación por ausencia de fluido en el interior del baño. Los cinco reactores tienen un volumen de reacción de 100 ml y cada uno posee su sistema de agitación. Cabe aclarar que el sistema de jarras es simplemente un dispositivo de engranajes unidos a un eje central que transmite el movimiento generado por el motor eléctrico que posee.

Los reactores se construyeron con los siguientes materiales:

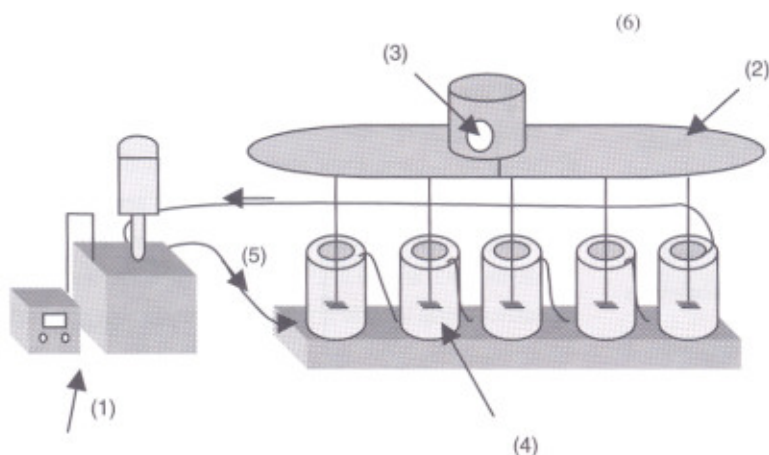


Figura 5. Esquema del equipo. (1) Baño termostato. (2) Sistema de agitación de jarras. (3) Controlador de agitación. (4) Reactores enchaquetados. (5) Fluido calefactor engranajes ejes.

- Recipiente metálico
- Recipiente de vidrio (vaso precipitado 250 ml)
- Boquillas de vidrio
- Fibra de vidrio
- Tapa

El recipiente de vidrio se introdujo dentro del recipiente metálico, formando una chaqueta por donde circula el fluido calefactor (aceite). Se hizo un recubrimiento de fibra de vidrio para evitar pérdidas de calor. El esquema del montaje de los reactores se puede apreciar en la figura 6.

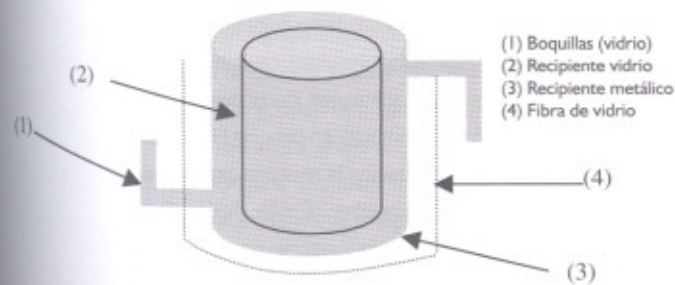


Figura 6. Esquema de los reactores enchaquetados.

Una vez que se enchaquetaron los cinco reactores, se realizó el montaje del equipo –el cual duró tres meses– y posteriormente se hicieron los ensayos planteados en la metodología.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Determinación de los rangos de tiempo óptimos de las reacciones

Dextrinización. Como ya se mencionó, para el estudio de las reacciones se contó con dos tipos de enzimas encargadas de hidrolizar parcialmente el almidón de papa y transformarlo en dextrinas: Termamyl 120L y BAN 120L.

Los resultados se ilustran en la figura 7, en la que se pueden apreciar las curvas de saturación de las enzimas dextrinizantes. En los resultados obtenidos con Termamyl 120L, en condiciones referenciadas por la literatura, se observa que la producción máxima de dextrinas se encuentra en el punto de las seis horas

(26,02 g/l), aunque el tiempo óptimo se ubica en las dos horas (23,9 g/l) puesto que no se justifica duplicar el tiempo de reacción para tener un aumento de tan sólo 3 g/l; además, si se continúa con la reacción más de seis horas, la producción tiende a bajar por la repolimerización de los azúcares hidrolizados debido al prolongado tiempo de reacción.

Cuando se utiliza enzima BAN 120L, se observa la similitud con el modelo enzimático ubicando la zona de saturación después de tres horas de crecimiento exponencial y encontrando como el resultado más sobresaliente un tiempo óptimo de dos horas. Al superar éste la concentración de azúcares reductores no varía sustancialmente (15,63 g/l a las dos horas, 17,47 g/l a las cuatro horas); al contrario, se empieza a observar una leve disminución en la cantidad producida (16,74 g/l a las ocho horas) a causa de la repolimerización de los azúcares reductores hidrolizados, fenómeno presentado también con Termamyl.

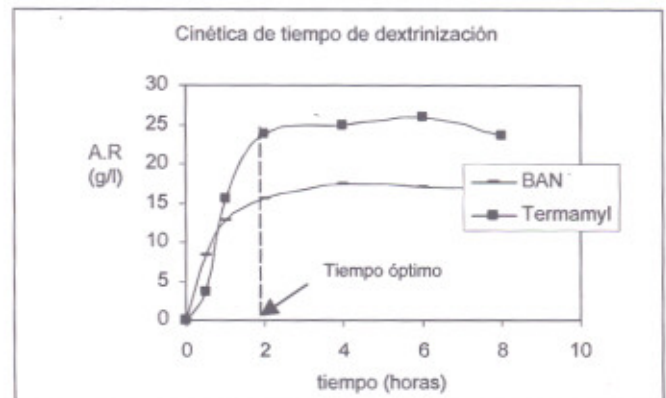


Figura 7. Curva de avance de dextrinización para encontrar el tiempo óptimo de reacción. Condiciones para BAN: T_a 85 °C, 125 ppm de iones calcio, pH 6,25, dosis 1,25 kg/ton. Condiciones para Termamyl: T_a 95 °C, 45 ppm de iones calcio, pH 6,25, dosis 0,6 kg/ton. Velocidad de agitación 30 r.p.m.

Se concluye entonces que el tiempo óptimo de dextrinización es de dos horas, utilizando BAN o Termamyl; pasado este tiempo, no se justifica seguir la reacción porque la producción no aumenta considerablemente.

Sacarificación. Para la sacarificación se contó con las enzimas AMG y Promozyme, pero previamente la

solución de almidón se trató con BAN, enzima que se usó debido a que trabaja a temperaturas menores que las utilizadas por Termamyl, por lo que hizo más fácil su manejo. Este ensayo se trabaja en condiciones de reacción no optimizadas, por lo que se escogió una combinación de enzimas y unos valores referenciados por la literatura. Más adelante se muestra la optimización de éstas y la selección del conjunto de enzimas. La reacción de sacarificación tardó hasta 72 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8.

La curva obtenida presentó un buen desempeño en cuanto a productividades de azúcares reductores, arrojando una cantidad máxima a las 16 horas (246,05 g/l), tendiente después de ésta a la disminución leve, lo que se explica desde el punto de vista de la saturación alcanzada por haber llegado a la velocidad máxima de conversión, la cual indica que las cantidades de producto, a pesar del aumento de las horas de reacción, no varían sustancialmente; si a esto se suma el error experimental se concluye que la información obtenida fue lo suficientemente clara para afirmar que el tiempo óptimo de reacción se encontró entre las 16 y 20 horas.

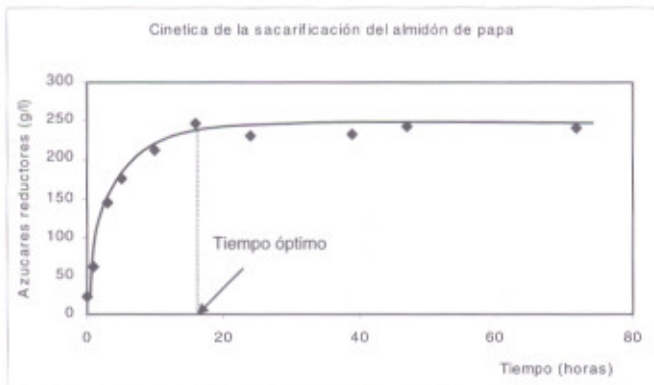


Figura 8. Determinación del tiempo óptimo de sacarificación. Enzimas sacarificantes AMG y Promozyme, previo tratamiento con BAN 240L. Promedio de cinco réplicas. Ta 60 °C, pH 4,25, dosis AMG 0,75 l/ton, Promozyme 0,75 kg/ton, r.p.m. 60.

Los ensayos realizados para encontrar los tiempos óptimos de las reacciones fueron importantes desde el punto de vista del proceso y de los costos del mismo, pues se logró disminuir sustancialmente el tiempo de reacción comparado con la literatura. Chica (1996) reportó tiempos de 48 horas y Novo recomienda tiem-

pos entre 48 y 72 horas de reacción para alcanzar la máxima productividad, implicando menos gasto energético por suministro de calor, y haciendo técnicamente más viable la producción de glucosa y otros azúcares reductores a nivel banco. De esta manera, los ensayos siguientes se llevaron a tiempos de reacción de dos horas para dextrinización y de 16 -20 horas en sacarificación.

Selección del conjunto de enzimas por utilizar

Conocido el rango óptimo de cada una de las reacciones, el siguiente paso fue escoger entre las enzimas de trabajo el grupo que mejor desempeño presentaba para el módulo y así descartar las otras para continuar en la búsqueda de las mejores condiciones de proceso.

La selección siguió cuatro rutas en las que la secuencia de reacciones es exactamente la misma, cambiando únicamente las enzimas utilizadas. En la figura 9 se muestran los resultados de las cuatro opciones su-puestas.

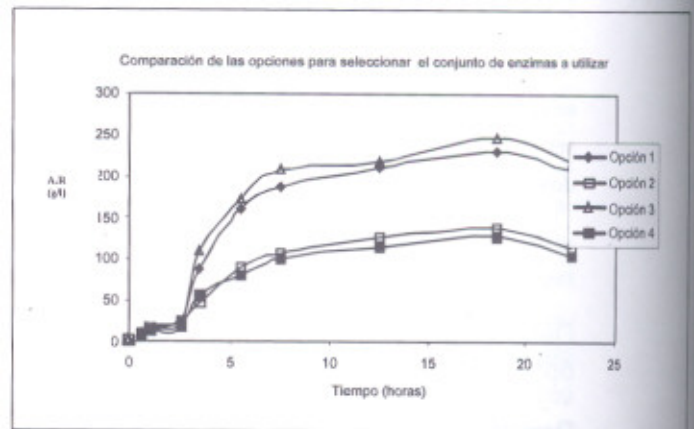


Figura 9. Comparación de los opciones para seleccionar el conjunto de enzimas.

Opción 1. Termamyl - AMG - Promozyme	Opción 3. BAN - AMG - Promozyme
Opción 2. Termamyl - AMG - Fungamyl	Opción 4. BAN - AMG - Fungamyl

En la figura 9, las opciones 2 y 4 muestran rendimientos más bajos comparados con los demás caminos, comprobando de esta manera lo propuesto por

Novo Nordisk, ya que la enzima Fungamyl es estereoespecífica para la formación de maltosa más que para la formación de glucosa, y esto equivale a rendimientos bajos de azúcares reductores. Para las opciones 1 y 3 se alcanzó un ED de 80 y 86, respectivamente, cercanos a los valores recomendados por la literatura. Novo Nordisk recomienda usar AMG y Promozyme para alcanzar valores de ED iguales a 95, hidrolizando el almidón de yuca. Benavidez (1983) obtuvo valores de 95, hidrolizando la harina de arroz. Caro (1986) alcanzó valores de ED de 81 para la sacarificación del almidón de yuca utilizando sólo AMG y Chica (1996) logró rendimientos de 85-90% hidrolizando almidón de papa.

Por consiguiente, el conjunto de enzimas seleccionado corresponde a BAN-AMG-Promozyme (opción 3), el cual presentó el mayor valor de ED (86), cercano al de la literatura (Novo Nordisk presenta valores de ED 95-98 para la sacarificación del almidón de yuca), indicando un nivel alto del grado de hidrólisis, el cual puede mejorarse cambiando las condiciones de operación. El conjunto de enzimas se encuentra acorde con lo recomendado por Novo Nordisk; en cambio, Chica (1996) utiliza sólo AMG en la sacarificación, al igual que Benavidez (1983) y Caro (1986). La utilización de Promozyme (pululanasa) fue necesaria para facilitar el proceso de desramificación, donde el empleo conjunto de glucoamilasa y pululanasa mejora la calidad del producto obtenido.

Optimización de las condiciones de reacción

Los ensayos se efectuaron a las condiciones suministradas por la casa fabricante y los resultados arrojados fueron buenos y comparables con los de la literatura; sin embargo, es de especial interés adecuar estas condiciones a las propias de este estudio.

Dextrinización. En el diseño de experimentos es claro que la optimización se llevó a cabo de una manera escalonada, estudiando cada variable independientemente. Las variables de estudio para este caso fueron concentración de cofactor calcio expresado como cloruro de calcio, dosis enzimática, pH, temperatura y velocidad de agitación.

Optimización de la dosis enzimática. Se probó un número considerable de valores para esta variable: 1,5, 3, 4, 5, 7, 9, 16 (g/l), todos por encima del referenciado por Novo Nordisk (1,25 kg/ton almidón). No se tuvieron en cuenta valores inferiores, dado que el ED logrado al valor recomendado no se encontraba en el intervalo alcanzado por los estudios de la literatura, como se explicó en la sección anterior. La hipótesis consistió en encontrar un máximo, es decir, que al graficar datos de azúcares reductores contra las dosis enzimáticas existiera un pico que permitiera establecer el criterio de selección; con todo, no fue así, sino que, por el contrario, a medida que aumentaba la concentración de la enzima, la cantidad de azúcares reductores se incrementaba de la misma manera (figura 10).

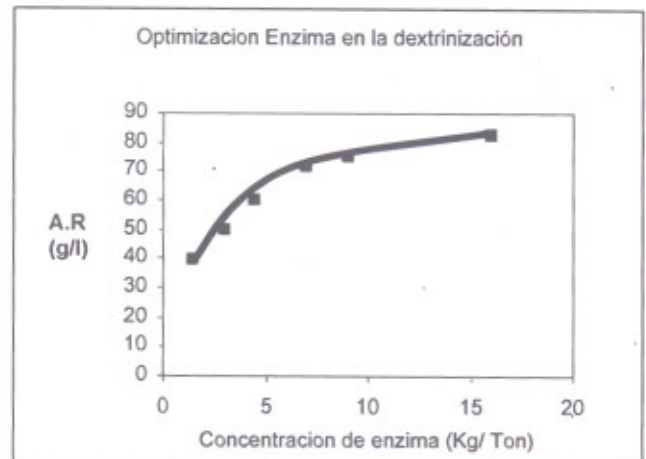


Figura 10. Optimización de la dosis de enzima en la dextrinización con BAN del almidón de papa. T_a 85 °C, pH 6,25, r.p.m. 60, concentración de iones calcio 125 ppm.

En la figura 10 se observa que al aumentar la cantidad de enzima sin modificar el sustrato, los azúcares reductores se incrementaron considerablemente; no obstante, desde el punto de vista de consumo de enzima no se justifica aumentar casi 16 veces la cantidad para tan sólo duplicar el producto. Como no se obtuvo la curva de optimización, se optó por llevar la reacción hasta la sacarificación; si la dextrinización mostraba grandes valores de azúcares reductores para dosis de enzima altas, también reportaría valores en la sacarificación considerables al ser las dextrinas el sustrato apropiado;

si, por el contrario, se observa que es independiente entonces será otro el criterio de elección. Incluso se realizó un ensayo sin adición de BAN para ver el significado de lo planteado.

Se efectuaron de este modo cinco ensayos ilustrados en la figura 11, los extremos (1,5 kg/ton y 16 kg/ton), un valor intermedio (7 kg/ton) y un ensayo sin adición de enzima dextrinizante.

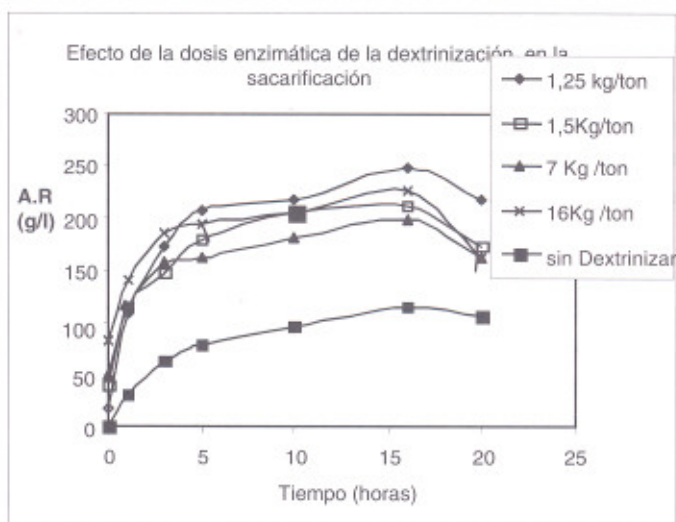


Figura 11. Sacarificación del almidón de papa a diferentes dosis enzimáticas en la etapa previa de la dextrinización. Condiciones de la sacarificación T_a 60 °C, pH 4,25, dosis AMG 0,075l/ton, Promozyme 0,75 kh/ton, r.p.m. 60.

En la figura 11 se registra que el ensayo de 16 kg/ton presentó la mayor productividad de todos (138,7 g/l), pero su crecimiento exponencial no es tan pronunciado como los de 1,25 kg/ton y 1,5 kg/ton, los cuales a pesar de partir de concentraciones inferiores (23 y 39 g/l respectivamente) ascienden alrededor de los 110 g/l, para luego seguir en incremento hasta obtener un máximo de 240 g/l en el caso de 1,25 kg/ton a las 16 horas, superando de esta manera lo hecho por la dosis más alta (226,3 g/l).

Entonces, la cantidad de enzima dextrinizante no afectó directamente la producción de glucosa en la sacarificación; por el contrario, la tendencia fue disminuir la producción al aumentar la dosis. Sin embargo, el ensayo al cual no se adicionó BAN tuvo los rendimientos más bajos, con lo que se descarta la idea de no requerir el proceso dextrinizante previo a la sacarificación, es decir, se necesitan dextrinas como sustrato para obtener grandes cantidades del producto deseado.

Con estos resultados se determinó que la dosis enzimática adecuada era 1,25 kg/ton, realmente la que aconsejan la casa fabricante (1,0-1,5 kg/ton) y Caro (1986); Chica (1996), en cambio, utiliza dosis menores (100-400 ppm) sin producir azúcares reductores detectables por el método empleado en su investigación y concluyendo que el almidón fue convertido principalmente a maltodextrinas; Benavidez (1983) empleó concentraciones superiores (2,1 kg/ton), obteniendo

Tabla 1. Resultados de la optimización de las variables de la etapa de la dextrinización

Ca+2 (ppm)	pH	Temperatura (°C)	r.p.m.	Azúcares reductores (gl)	ED
125	6,2	85	60	19,3	6,7
150	6,2	85	60	31,29	11,5
175	6,2	85	60	21,5	7,5
150	5,2	85	60	23,36	8,2
150	6,2	85	60	33,93	11,8
150	7	85	60	27,74	9,7
150	6,2	70	60	28,89	10,1
150	6,2	85	60	33,93	11,8
150	6,2	95	60	22,14	7,7
150	6,2	85	10	6,36	2,2
150	6,2	85	30	15,56	5,4
150	6,2	85	60	33,93	11,8
150	6,2	85	90	27,07	9,4

cantidades similares a las reportadas en el presente trabajo.

Para las variables de temperatura, pH, concentración de iones calcio y velocidad de agitación, se encontraron valores máximos de producción de 33 g/l. En la tabla 1 se muestran los resultados de la optimización de estas variables.

Así mismo, en dicha tabla se encuentra sombreado el esquema de trabajo, en donde se aprecia claramente la manera escalonada de encontrar los valores óptimos (negrilla) para cada una de las variables. Además, se corroboró la independencia de las variables realizando un esquema de estudio factorial entre la temperatura y el pH, cuyos resultados se pueden observar en el proyecto de grado referenciado al comienzo de este artículo, en donde lo más relevante fue el hecho de encontrar los valores óptimos en el mismo intervalo abarcado por el sistema escalonado.

Para la concentración de iones calcio (éste fue adicionado en forma de cloruro de calcio dihidratado R.A.), los valores probados fueron 125, 150 y 175 ppm, todos por encima de la cantidad mínima recomendada. En la tabla 1 se aprecia claramente que la cantidad de azúcares reductores formados va en aumento en la medida en que hay más cantidad de calcio, pero sólo hasta cierto punto (150 ppm) en el cual la disminución es drástica, ya que se puede presentar una saturación que no le permite a la enzima actuar en su mayor punto de actividad. Por tanto, 150 ppm es la cantidad óptima, variando así la información suministrada anteriormente en donde el valor empleado había sido 125 ppm, logrando tener un aumento en el valor de ED de 6,73 (obtenido a 125 ppm) a 11,47, valor muy cercano y comparable con la firma fabricante (12-20) en la dextrinización del almidón de yuca, con las dosis de calcio utilizadas por Benavidez (1983) en la dextrinización del almidón de arroz y también con la dosis utilizada por Caro (1986) para la hidrólisis del almidón de yuca, así como con el trabajo de Chica (1996) en la dextrinización del almidón de papa.

Optimizada la concentración de iones calcio, se estudió el pH; para éste se probaron valores de 5,2, 6,2 y

7, encontrando la mayor productividad con un pH de 6,2, en el que se halla el mayor grado de hidrólisis ED 11,83. Valores de pH superiores e inferiores disminuyen notablemente la productividad. El pH se encuentra en los valores recomendados por la firma Novo Nordisk (6-6,5) y en los utilizados por Chica (1996) y Benavidez (1983).

Una vez estudiado el pH, se procedió a analizar la temperatura y la velocidad de agitación. Para la temperatura se probaron valores de 70, 85 y 95 °C, encontrando un óptimo en 85 °C, con un valor de ED de 11,83, lo que indica un buen rendimiento en la reacción. Para temperaturas por encima de los 90 °C no es conveniente trabajar debido a las cantidades bajas obtenidas, además de que se puede tener un gasto energético innecesario ya que en lugar de aumentar la producción ésta se disminuye, por lo que se concluye que la temperatura óptima para trabajar es de 85 °C y está acorde con los lineamientos de Novo Nordisk.

Para la velocidad de agitación no existen mayores datos informados por la bibliografía referente, por lo cual se tomaron valores altos y bajos de velocidad de agitación para abarcar un amplio rango sobre el comportamiento de la enzima. Los valores aquí estudiados se encuentran desde las 90 hasta las 10 r.p.m., así como valores intermedios de éstos.

Velocidades inferiores a 60 r.p.m. no permitieron un buen desempeño de la reacción, pues no facilitan la homogeneización de la mezcla debido al efecto de la viscosidad presente en este tipo de reacciones, dificultando que el sustrato se ponga en buen contacto con la enzima para la hidrólisis; es decir, hay dificultad en la formación del complejo enzima-sustrato. Velocidades superiores a 60 disminuyen la productividad por efecto del inicio de una inactivación por agitación, ya que si se encuentra más homogéneo el sustrato, existe mayor facilidad de formación del complejo mencionado, cayendo todo el peso sobre dicha inactivación.

En la tabla 2 se encuentran los valores optimizados en el presente trabajo y su comparación con los datos reportados en otros estudios.

Tabla 2. Comparación de los valores optimizados en el presente trabajo con la literatura existente

Condiciones de reacción	Optimizadas por el presente trabajo	Novo Nordisk (1994)	Benavidez (1983)	Chica (1996)	Caro (1986)
Almidón	Papa	Yuca	Arroz	Papa	Yuca
Dosis enzimática	1,25 kg de BAN/ton almidón	1-1,5 kg de BAN/ton almidón	2,1 mg de BAN/g almidón	100-400 ppm (Termamyl)	1,2 kg de Termamyl/ton almidón
pH	6,2	6-6,5	7,0	5,5-7,0	6,5
Temperatura	85 °C	70-90 °C	70 °C	100 °C	80 °C
Concentración de iones calcio	150 ppm	100-150 ppm	100-150 ppm	30-60 ppm (para Termamyl)	30-60 ppm (para Termamyl)
Velocidad de agitación	60 r.p.m.	-----	-----	-----	-----

Una vez estudiadas todas las condiciones de la dextrinización, se procedió a examinar la etapa de sacarificación.

Optimización de las variables de sacarificación

Para optimizar las condiciones de reacción en la sacarificación se utilizó un sistema escalonado, tal como en la dextrinización. Las variables estudiadas fueron el pH, la relación de enzimas sacarificantes y la velocidad de agitación; la concentración de iones calcio no se estudió debido a que las enzimas sacarificantes no necesitan iones calcio como cofactor.

Los ensayos se realizaron a temperatura constante de 60 °C⁴, puesto que para valores menores se corre el riesgo de una infección microbiana. A temperaturas mayores, además de verse afectada la estabilidad, es frecuente que la actividad de la enzima AMG disminuya hasta en 25% con tan sólo incrementar 4 °C (Novozymes, 2001).

El seguimiento de la reacción se realizó mediante la detección de azúcares reductores por el método analítico de Somogyi-Nelson, por un lado, y por otro, se determinó cuantitativamente la cantidad de glucosa con la ayuda del método glucosa oxidasa-peroxidasa. Este último emplea una gran cantidad de enzimas, que en el

mercado son de gran costo, por lo cual sólo se utilizó para el análisis de los datos concretos y no para el seguimiento de las reacciones.

Los resultados de la optimización se muestran en la tabla 3, en la que también se puede observar los niveles escogidos y el valor óptimo (negrilla) para cada variable.

Relación de enzimas. Se probaron cinco relaciones de enzimas, empleando valores por encima y por debajo de los promedios utilizados para los anteriores ensayos de sacarificación. Siempre para ver el efecto de una de las enzimas, se dejó quieta la otra en su valor estándar y así establecer la relevancia de dicha variación. La relación 1/1 corresponde a los valores recomendados por la casa fabricante, las relaciones 2/1 y 3/1 corresponden al doble y triple de la cantidad de enzima AMG, respectivamente, dejando constante la cantidad de enzima Promozyme, y las relaciones 1/2 y 1/3 corresponden al doble y triple de la cantidad de enzima Promozyme, dejando constante la cantidad de enzima AMG. Se halla un máximo cuando la relación de enzima es de 1/1, esto es, la recomendada por la casa fabricante. Relaciones por encima de ésta disminuyen la producción en razón de que se tiene bastante cantidad de enzima AMG y poca enzima desramificante, lo que hace que al inicio de la sacarificación la tasa de formación de dextrosa sea alta, pero disminuyendo hacia el final del proceso debido en parte a que el incremento de la formación de

4. Temperatura recomendada por Novo Nordisk.

Tabla 3. Optimización de las variables de la sacarificación

Relación de enzimas (AMG/Promozyme)	pH	Velocidad de agitación (r.p.m.)	Azúcares reductores (g/l)	Glucosa (g/l)
0,33	4,2	60	223,51	190,70
0,5	4,2	60	242,73	196,11
1	4,2	60	249,41	229,51
2	4,2	60	229,78	213,48
3	4,2	60	202,48	198,88
1	2,4	60	143,22	122,08
1	3,2	60	212,74	201,70
1	4,2	60	249,41	229,00
1	5,2	60	205,28	190,70
1	6,2	60	172,08	175,47
1	4,2	0	206,18	170,69
1	4,2	10	234,05	185,47
1	4,2	30	246,05	232,91
1	4,2	60	249,41	229,51

dextrosa acelera la reversión (repolimerización de dextrosa en isomaltosa y otros sacáridos). Relaciones por debajo de 1/1 presentan poca producción porque se halla mucha cantidad de enzima desramificante y poca cantidad de enzima AMG que pueda romper los enlaces α -1,4.

pH. Para optimizar el pH se probaron cinco valores: 2,2, 3,2, 4,2, 5,2, y 6,2. Esto con el fin de realizar un buen barrido y así obtener una curva donde se registre un máximo. Se observa (tabla 3) que la mayor producción de azúcares reductores –249,4 g/l– y de glucosa –229 g/l– se obtiene a pH 4,2. A valores superiores o inferiores a este pH, los resultados bajan notablemente. Con este resultado se comprueba que las enzimas trabajan en un rango promedio de pH 4,0 y 4,5, recomendado por la literatura.

Optimización de la velocidad de agitación. Para optimizar la velocidad de agitación se probaron tres valores: 10, 30 y 60 r.p.m., y se realizó un ensayo sin agitación, pues en esta etapa la reacción tiende a comportarse como un sistema homogéneo, ya que no se presentan cambios bruscos en la viscosidad, debido a que el almidón se trató previamente en la dextrinización. Los datos se reportan en la tabla 3.

Al aumentar la velocidad de agitación de 30 a 60, la producción no varía considerablemente. Con velocida-

des de 30 se obtiene una cantidad de azúcares reductores de 246 g/l y con velocidades de 60 r.p.m. es de 249,4 g/l; se aprecia que tan sólo se aumenta la producción en 3 g/l, esforzando el trabajo del motor de agitación del equipo el doble y aumentando así el gasto energético considerablemente. Si se comparan los resultados en cuanto a producción de glucosa, se encuentra el mismo comportamiento: a 30 r.p.m. se tiene una producción de glucosa de 232,9 g/l y a 60 r.p.m. ésta es de 229,5 g/l. A revoluciones menores de 30, la producción de azúcares disminuye levemente de 246,05 g/l a 234,04 g/l, la cual se obtiene al trabajar con 10 r.p.m. Si se comparan los resultados con respecto a la producción de glucosa, se observa una disminución más acentuada de 232,9 g/l a 185,4 g/l a 30 y 10 r.p.m., respectivamente.

En consecuencia, se puede encontrar un óptimo en 30 r.p.m. para la producción de jarabe de glucosa.

El ensayo que se trabajó sin agitación no dio una producción tan baja como se esperaba. Sin embargo, se recomienda que la enzima trabaje con agitación, pues esto permite poner en contacto el sustrato con la enzima.

Los ensayos de optimización permitieron establecer condiciones de reacción acordes con lo referenciado por la literatura (tabla 4). Hay que tener en cuenta que se partió de valores establecidos para otras fuentes de

Tabla 4. Comparación de las variables optimizadas de la sacarificación con la literatura existente

Condiciones de reacción	Optimizadas por el presente trabajo	Novo Nordisk (1994)	Benavidez (1983)	Chica (1996)	Caro (1986)
Relación de enzimas sacarificantes o dosis enzimáticas	0,75 l AMG/ton sustancia seca 0,75 kg Promozyme/ton sustancia seca	0,6-0,9 l AMG/ton sustancia seca 0,3-1,2 kg Promozyme/ton sustancia seca	3,75 mg de AMG/g sustrato	100-400 ppm (AMG)	1,93 mg de AMG/g sustrato
pH	4,2	4-4,5	4,5	4-5	4,5
Temperatura	60 °C	60 °C	65 °C	55-60 °C	65 °C
Velocidad de agitación	30 r.p.m.	-----	-----	-----	-----
Sustrato	Papa	Yuca	Arroz	Papa	Yuca

almidón y en este trabajo se lograron establecer unas condiciones propias óptimas para la hidrólisis del almidón de papa.

CINÉTICAS DE MICHAELIS MENTEN

Cinética de dextrinización. Considerando el recorrido efectuado hasta el momento, es importante resaltar que el estudio cinético ahora realizado es confiable desde el punto de vista experimental y que los resultados arrojados son fundamentales para tener parámetros claves y realizar así un modelamiento teórico.

Los datos para la realización de la cinética se reportaron con base en la cantidad de azúcares reductores formados. Se probaron concentraciones de sustrato cercanas a las referenciadas por la casa fabricante. Es de anotar que a concentraciones superiores la mezcla no presentó un comportamiento reológico aceptable, haciendo difícil su manejo (insolubilidad del almidón en agua a altas concentraciones), incluyendo el seguimiento de la reacción por los métodos analíticos empleados; además, la enzima no es homogeneizada e incorporada completamente al sustrato, presentándose pérdida de eficiencia en la reacción y aumentos en los tiempos de contacto para la formación de productos.

Se plantearon así siete ensayos con las condiciones de reacción optimizadas anteriormente: temperatura

85 °C, pH 6,2, concentración de calcio 150 ppm, velocidad de agitación de 60 r.p.m. y dosis enzimática de 1,25 kg/ton de almidón. Las concentraciones de sustrato iniciales por probar fueron 10, 20, 30, 35, 40, 45 y 50% p/v.

Para cada cinética de tiempo se halló la velocidad inicial de reacción designada por V_0 , la cual es la pendiente de la curva de avance de la reacción al tiempo cero. Graficando luego V_0 contra la concentración inicial de sustrato (S_0) se obtuvo la cinética de reacción de Michaelis Menten. Los parámetros cinéticos k_m y $V_{máx}$ se hallaron mediante la regresión lineal de Lineweaver-Burk (figura 12).

Tabla 5. Resultados de la cinética de Michaelis Menten para la dextrinización del almidón de papa

Sustrato (g/ml)	V_0 (g/ml*min)
0	0
0,1	0,000174141
0,2	0,000253462
0,3	0,000300537
0,35	0,000312481
0,4	0,000321509
0,45	0,000332464
0,5	0,000331902

$$k_m = 0,156 \text{ g/ml}$$

$$V_{máx} = 0,00044 \text{ (g/ml*min)}$$

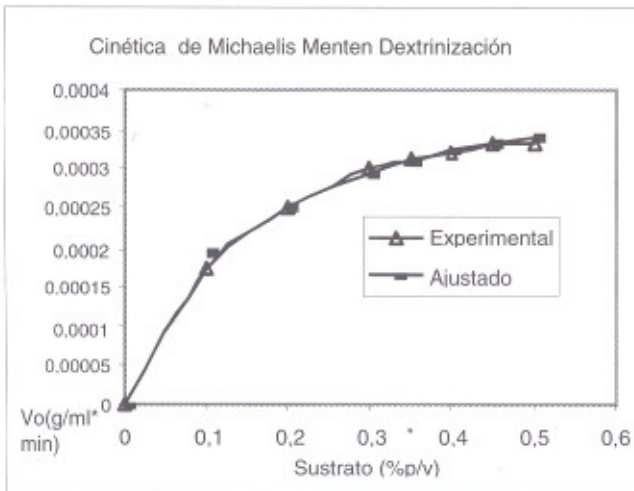


Figura 12. Cinética de Michaelis Menten para la dextrinización con enzima BAN. Condiciones de reacción: temperatura 85 °C, pH 6,2, concentración de iones calcio 150 ppm, dosis enzimática 1,25 kg/ton de almidón.

Como se observa en la figura 12, el comportamiento de la cinética se ajustó al modelo de la ecuación de Michaelis Menten, descrito anteriormente. Al aumentar la concentración de sustrato inicial (S_0) la velocidad de formación de producto (V_0) se incrementó hasta hacerse independiente. Para concentraciones altas, la enzima se saturó por la gran cantidad de almidón presente en el medio; en este punto, un incremento de la concentración no aumentó la velocidad, por lo cual se encuentra un máximo en V_0 tal como Rawn y otros autores lo afirmaron en sus recopilaciones. Esta velocidad se encuentra a concentraciones de 30 y 40%p/v, logrando establecer un óptimo de la concentración inicial de sustrato en este rango, es decir, 2-3 km, el cual es el recomendado por Novo Nordisk, y está acorde con los valores reportados por la literatura; Chica (1996) empleó concentraciones de 25-40%p/v y Caro (1986) de 30%p/v, al igual que Benavidez (1983).

Cinética de sacarificación. Al igual que en la dextrinización, los resultados se reportaron con base en la cantidad de azúcares reductores, ya que se comprobó la similitud con los arrojados por los de glucosa; esto desde el punto de vista de ahorro de reactivos es apropiado, pues el método enzimático para la determinación de glucosa utiliza gran cantidad de enzimas que en el mercado son de un alto costo, contrario al de azúcares reductores que posee reactivos siempre disponibles.

Las condiciones para la realización de estos ensayos correspondieron a las ya optimizadas en cada una de las etapas anteriores. Las concentraciones de sustrato empleadas corresponden a la cantidad de sustancia seca al inicio de la sacarificación. Se emplearon diferentes concentraciones para hacer un barrido en el intervalo en el cual se ha alcanzado la velocidad máxima de producción de jarabe para la etapa de dextrinización: 8,19, 16,4, 24,58, 28,67, 32,77, 36,87, 40,96, 50% D.S (sustancia seca $g/g \cdot 100$). Se muestra en la figura 13 el comportamiento de los sustratos iniciales (S_0) con las respectivas velocidades iniciales de reacción (V_0). La tendencia de nuevo se aproximó al modelo planteado por Michaelis Menten, encontrando una saturación de producción de jarabe en intervalos de 28-38%DS. Por encima de éstas la velocidad de formación de producto se hace independiente y permanece en un valor constante. Dicho intervalo es el rango de concentración de sustrato óptimo, es decir, 2-3 km. Benavidez (1983) empleó concentraciones de 30%p/v, Chica (1996) de 24-40%p/v, Caro (1986) de 30%p/v y Novo Nordisk (1994) de 30-40% DS (sustancia seca).

Tabla 6. Cinética de Michaelis Menten para la sacarificación del almidón de papa

Sustrato (%DS)	V_0 (g/ml*hora)
0	0
8,19	0,01240
16,4	0,01897
24,58	0,02240
28,67	0,02284
32,77	0,02332
36,87	0,02396
40,96	0,02406
50	0,02359

Hasta el momento, el rango óptimo de concentración de sustrato ha sido determinado por la saturación encontrada en la curva de velocidad inicial de reacción vs DS con base en la formación de azúcares reductores. Si se tiene en cuenta la conversión de sustancia seca expresada como ED (figura 14), el rango 28-38% DS sólo alcanzó valores de 80-87, respectivamente, que no corresponden al valor máximo logrado por la cifra de 24%, el cual supera un 95 de ED y satisface los re-

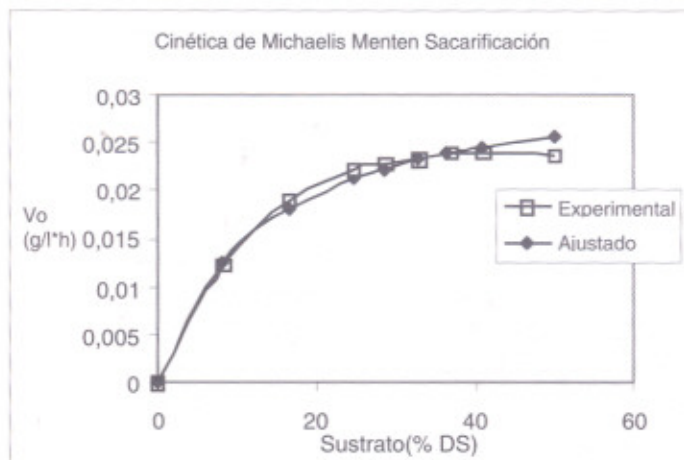


Figura 13. Cinética de Michaelis Menten para la sacarificación del almidón de papa. Condiciones de reacción pH 4,2, temperatura 60 °C, r.p.m. 30.

querimientos encontrados por la casa Novo Nordisk, que contempla valores en el rango de 94-98 y con el cual se garantizan las altas formaciones de dextrosa; por tanto, el rango de sustrato óptimo va de 24 a 38% DS. Para asegurar esta condición se requiere cargar al inicio de la dextrinización concentraciones de almidón dentro del 30-40% p/v, corroborando los valores obtenidos en la curva de saturación de sustrato en la etapa previa a la sacarificación.

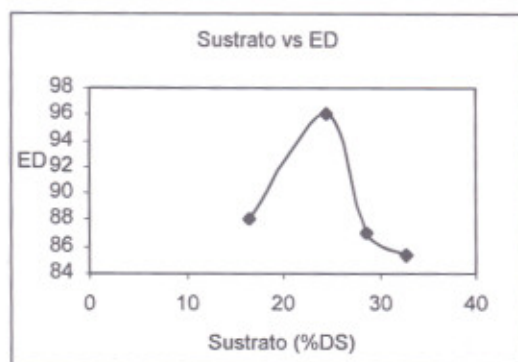


Figura 14. Sustrato inicial vs ED para condiciones de sacarificación.

Con estos ensayos se consiguieron las condiciones de reacción para cada una de las etapas, permitiendo obtener un jarabe de glucosa de características propias

al entorno de trabajo que satisfacen y en algunos casos mejoran lo reportado por la literatura. En resumen, éstas son:

Tabla 7. Condiciones optimizadas de la hidrólisis del almidón de papa

Etapas	Condiciones de operación
Dextrinización (enzima BAN 120L)	Dosis enzimática 1,25 kg/ton de almidón. Concentración de iones calcio 150 ppm Concentración de sustrato 30-40% p/v Temperatura 85 °C pH 6,2 Velocidad de agitación 60 r.p.m.
Sacarificación (enzimas AMG / Promozyme)	Dosis enzimática AMG 0,75 l/ton de sustancia seca Promozyme 0,75 kg/ton de sustancia seca Concentración de sustrato 24-38% DS pH 4,2 Temperatura 60 °C Velocidad de agitación 30 r.p.m.

CONCLUSIONES

- En la hidrólisis enzimática del almidón de papa realizada en laboratorio en el sistema de reactores tipo banco, el conjunto de enzimas que tuvo el mejor desempeño de producción de azúcares reductores y en particular de glucosa fue BAN-AMG-Promozyme, donde la dextrinización permitió para concentraciones iniciales de almidón de 30% p/v, una producción máxima de dextrinas del orden de 28,129 g/l. AMG junto con Promozyme en el proceso de sacarificación produjeron azúcares reductores que alcanzaron los 236 g/l. Los valores mencionados determinaron un equivalente en dextrosa de 96, el cual se encuentra en el rango óptimo reportado por la literatura (DE = 94-98).
- Los tiempos de reacción de cada una de las etapas fueron optimizados considerablemente. La dextrinización empleó un tiempo de dos horas para maximizar la producción y en el proceso de sacarificación se logró establecer el tiempo en 16 horas, con lo cual se disminuye casi en cinco veces (4,5 exactamente) el tiempo máximo establecido para la reacción, que se encontraba en 72 horas. Esto a escala industrial es muy representativo, ya que se pueden procesar más lotes o cochadas en menores tiempos.

- Las condiciones de operación en la reacción de dextrinización encontradas en el laboratorio fueron las siguientes: temperatura: 85 °C, pH: 6,25, concentración de cofactor calcio: 150 ppm, dosis enzimática: 1,25 kg/ tonelada almidón y velocidad de agitación: 60 r.p.m.
- En el proceso de sacarificación también se optimizaron algunas condiciones: relación enzima sacarificante / enzima desramificante: 1:1, pH: 4,2 y velocidad

de agitación: 30 r.p.m. Es de anotar que la velocidad de agitación se bajó a la mitad de la requerida en la dextrinización, lo que desde el punto de vista energético permite un ahorro de siete veces el costo requerido por potencia de agitador a 60 r.p.m. Las condiciones se muestran a continuación.

- La concentración de sustrato que maximiza la producción de azúcares reductores corresponde al 30% p/v de almidón de papa inicial. Se descarta la concentración de 10% debido al aumento de procesos de purificación y separación en etapas posteriores dada la gran cantidad de agua presente en el jarabe crudo.
- El diseño experimental empleado desde la reproducibilidad del equipo construido hasta la elaboración de las constantes cinéticas constituye un aporte importante que permite estudiar un considerable número de variables, garantizando el hallazgo de valores óptimos.
- La glucosa es el componente de mayor presencia dentro de los azúcares reductores cuantificados durante el seguimiento de las reacciones, pero no corresponde a la totalidad; en el trabajo se encontró que de 100% de los azúcares, 94,6% es glucosa y el resto son otros sacáridos. Esto permite establecer una diferencia tangible entre los dos conceptos, identificada gracias a los métodos analíticos Somogyi-Nelson y de glucosa determinada por vía enzimática, adaptados durante el desarrollo de la fase experimental del proyecto.
- Se encontró un modelo cinético acorde con las condiciones locales de trabajo que describe el compor-

tamiento real de la reacción con una aproximación de 90%. Efectivamente, éste correspondió al tipo Michaelis Menten, propio de reacciones enzimáticas, encontrando valores cinéticos experimentales de k_m y V_{max} para cada una de las reacciones involucradas y que se reportan en la tabla

Etapa	K_m	V_{max}	Concentración óptima de sustrato	Tiempo	
				Experimental	Teórico
Dextrinización	0,156 g/ml	0,00044 g/ml*min	30-40% p/v	2 horas	1,8 horas
Sacarificación	0,1428 g/ml	0,03219 g/ml*h	24-38% DS	16 horas	15 horas

- Se construyó un equipo de laboratorio capaz de reproducir y mejorar condiciones de la literatura (velocidad de agitación, tiempo), convirtiéndose en una herramienta útil y confiable para realizar ensayos con buenos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, J.E and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., Editorial McGraw Hill, 1986.
- Banks, W., Greenwood, C.T., *Starch and its Components*, Edinburgh, Edinburgh University Press, 1975.
- Benavidez, M., Cabrera, I. y Zapata, L., Modificación enzimática de almidones y proteínas. Proyecto multinacional de tecnología de alimentos OEA-IIT. Ministerio de Desarrollo Económico, Colombia, 1982-1985.
- Berrueta, Labajos, *Alimentación: equipos y tecnología*, 1992.
- Bohinski, Robert, *Bioquímica*, 5^a ed., Estados Unidos, Addison-Wesley Iberoamericana, 1991.
- Bryan, P. N., *Protein Engineering. Biotechnol. Adv.* 5, 1987, 221-234.
- Caro, Antonio José, *Hidrólisis enzimática del almidón de yuca*, Bogotá, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, 1986.
- Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., Vlasenko, E. Yu, Optimal conditions for hydrolysis of cellulosic materials by cellulases from *Penicillium verrucosum*, *Prikl.Biokhim.Mikrobiol.*, 23, 6, 1994, 801-809.
- Castellanos, O. F., Sinitsyn, A. P., Vlasenko, E. Yu, Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *Penicillium cellulases*. *Bioresource technology*, 2, 1995, 109-118.

- Castellanos, Óscar, "Propuesta para la relación del proyecto de investigación sobre la relación entre las particularidades bioquímicas (enzimáticas) de la interacción del hongo *Beauveria bassiana* y la broca del café con el grado de patogenicidad del hongo", Bogotá, Universidad de La Salle, 1995.
- Castellanos, Óscar y González, Gloria, "Incidencia del análisis de mercados en el desarrollo de la ingeniería de enzimas en Colombia. Caso hidrólisis enzimática del almidón", Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 1998.
- Chica Loaiza, Nicolás Ernesto, "Sacarificación del almidón de papa. Tesis para optar al título de especialista en ciencia y tecnología de alimentos", Manizales, Universidad Nacional de Colombia, 1996.
- Duarte Torres, Alberto, *Introducción a la ingeniería bioquímica*, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Unidad de Publicaciones, 1998.
- Ennis, B.M. y Maddox, I.S., The Effect of pH and Lactose Concentration on Solvent Production from Whey Permeate Using *C. Acetobutylicum*, *Biotechnology Bioengineering*, 29:329-334, 1987.
- Fersht, Alan, *Estructura y mecanismo de las enzimas*, España, Editorial Reverte, 1980.
- Gacesa, Peter y Hubble, John, *Tecnología de enzimas*, España, Editorial Acribia, 1990.
- García Garibay, Mariano; Quintero Ramírez, Rodolfo y López Munguía, Agustín, *Biología alimentaria*, México, Editorial Limusa, 1993.
- Herthford, R. y Espinal, C., *Desempeño de la agricultura colombiana. Implicaciones para la competitividad*. Bogotá, IICA, Ifpri, Departamento Nacional de Planeación, pp. 292-310.
- Nouri, Mohamed, Catálisis ácida vs hidrólisis enzimática en la industria almidonera. Consideraciones cualitativas y energéticas, octubre de 1991.
- Novo Nordisk A/S, B 552f, junio, 1997.
- Osorio, José y Riveros, Rocio, Determinación de parámetros cinéticos, con modelos no estructurados a partir de datos experimentales en ingeniería bioquímica. Bogotá, 1994. Trabajo de grado (ingeniero químico), Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química.
- Pardo, Mariela y Rivera, Pedro, Diseño de un biorreactor piloto para hidrólisis enzimática de almidones. Bogotá, D.C., 2001. Trabajo de grado (ingeniero químico), Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química.
- Pinto, Martha y Salgado, Viviana, Mejoramiento del proceso de obtención de jarabes de alta maltosa a partir de almidón de maíz. Santiago de Cali, 1996. Trabajo de grado (ingeniero químico), Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Rakoff, Henry, *Química orgánica fundamental*, México, Editorial Limusa, 1980.
- Rawn, David, *Bioquímica*, Madrid, España, Editorial McGraw Hill, 1989.
- Reilly, P. J., Starch Hydrolysis with Soluble and Immobilized Glucoamylase. In: *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 2, Enzyme Technology (Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E., and Goldstein, L., eds.), pp. 185-207, Nueva York, Academic Press, 1979.
- Schenck, Fred, *Starch hydrolysis products*, Nueva York, VCH Publishers, Inc., 1965.
- Wiseman, Alan, *Manual de biotecnología de las enzimas*, España, Acribia, 1991.

www.novozymes.com

www.med.monash.edu.au/biochem/thcm