

QUALITY ASSESSMENT OF GLUCOSE SYRUP PRODUCED BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ALPHA-AMYLASE AND AMYLOGLUCOSIDASE FROM STARCH OF MANIHOT ESCULENTA (YUCA)

Susana Huanca López, Christian Espinal, Patricia Mollinedo*

Department of Chemistry, Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Investigaciones en Productos Naturales IIPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, Tel. 59122792238, La Paz, Bolivia. pattymollinedo@gmail.com

Keywords: *Enzymatic hydrolysis, Manihot esculenta, reducing sugar.*

ABSTRACT

Quality assessment of glucose syrup produced during enzymatic hydrolysis of alpha-amylase and amyloglucosidase Dextrozyme BAN 480L 1.5x DX by three methods: polarimetric, spectrophotometric and Nuclear Magnetic Resonance from cassava (*Manihot esculenta*). *Spanish title: Evaluación de la calidad de jarabe de glucosa producido por hidrólisis enzimática a partir de almidón de yuca (Manihot esculenta)*

*Corresponding author: pattymollinedo@gmail.com

RESUMEN

Evaluación de calidad de jarabe de glucosa, producido durante la hidrólisis enzimática de alfa-amilasa BAN 480L y amiloglucosidasa Dextrozyme DX 1.5x, por tres métodos: polarimétrico, espectrofotométrico y de Resonancia Magnética Nuclear, a partir de yuca (*Manihot esculenta*).

INTRODUCCION

La hidrólisis enzimática de almidones ha tenido un desarrollo acelerado, ya que desde 1920 se han realizado numerosos ensayos y técnicas sobre ella. En 1945 se desarrollaron técnicas industriales novedosas que permitieron la obtención de un producto de gran pureza, estudios en base a diferentes enzimas demostraron que el uso de maltasa, glucoamilasa, amilasas tiene gran extensión específica y selectiva para la obtención de glucosa. [1]. Las amilasas principalmente la α - amilasa, β - amilasa, amiloglucosidasa y pulunanasa son producidas por bacterias y hongos, son enzimas que degradan el almidón y tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas, un ejemplo de ello es la producción de jarabes, que contiene oligosacáridos como maltosa y glucosa. [2]

Una de las propiedades químicas importantes del almidón de yuca está relacionada con la facilidad con que el enlace polimérico se hidroliza con enzimas convirtiéndose en D - glucosa, como ocurre en la producción comercial de los jarabes de almidón [3], sus gránulos son más blandos que los gránulos de maíz, su estructura es más rígida y compacta, se rompen al alcanzar los 70°C, siendo menos estables que los gránulos de arroz, maíz, trigo, cebada y papa. [4]

Los jarabes de D-glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D - glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas [5]. En la industria se consideran jarabes glucosados a hidrolizados a partir de un DE de 20 un jarabe que presenta un poder reductor similar al de una solución con 20% de glucosa [6].

Métodos de determinación de azúcares

Método de Polarimetría

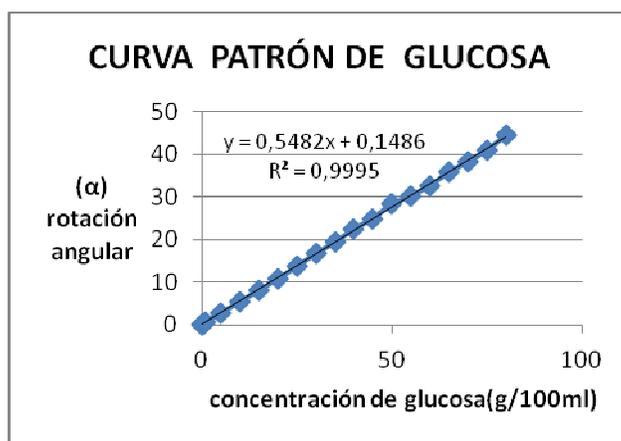
Emplea el uso del polarímetro, instrumento que mide la rotación del plano de la luz polarizada, tiene una celda que contiene una solución del material ópticamente activo y un sistema para pasar a luz polarizada a través de la solución, para medir la rotación de la luz que emerge se lee la rotación observada en la escala. Esta se simboliza mediante la letra griega alfa (α) [7].

Método del Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

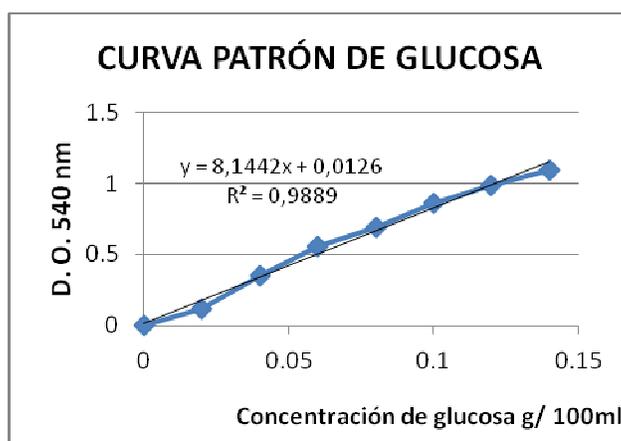
Es uno de los diversos métodos espectrofotométricos existentes para la estimación de azúcares reductores, el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540 – 570 nm [8], [9].

Obtención de la Curva Patrón de Glucosa

La curva de calibración de glucosa fue obtenida usando dos métodos: por polarimetría (Gráfica N°1) y por el método DNS (Gráfica N°2), ambas curvas presentan una tendencia lineal, con un coeficiente de correlación (R) igual a 0,99, valor elevado que nos indica que los datos se ajustan a una línea recta. En el caso del segundo método el valor de R también nos indica que la absorbancia varía en forma lineal con respecto a la concentración.



Gráfica N° 1. Curva patrón de glucosa obtenida mediante polarimetría.



Gráfica N° 2. Curva patrón de glucosa obtenida a través del método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico)

Comparando ambos métodos se determinó que el método espectrofotométrico DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico) es adecuado para determinar concentraciones de glucosa en un rango de 0.02 % – 0.14 % y el método polarimétrico es recomendable para determinar concentraciones de glucosa dentro de un intervalo de 0.1 % - 80 %. Motivo por el cual se utilizó el polarímetro para determinar la concentración de glucosa en las muestras hidrolizadas ya que estas presentan concentraciones mayores al 0.2%.

Determinación de la Concentración de Azúcares Equivalentes de Glucosa

En la primera etapa de la hidrólisis (licuefacción) se llegó a obtener oligosacáridos (ver Tabla N°1), en la cual se observa que la muestra 4 presenta la mayor concentración de este producto igual a 89.8% en un tiempo de reacción de 90 minutos. En la etapa de sacarificación la muestra 20 presenta la mayor concentración de glucosa (95.9%) lo que indica que la mayor actividad de la segunda enzima se logra en un tiempo de 72 horas, dentro del intervalo de tiempo tomado para la incubación (ver Tabla N°2).

Tabla N° 1. Concentración de oligosacáridos (%) en muestras obtenidas durante el proceso de hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) tratado con la enzima BAN 480L.

Muestra	1	2	3	4
Tiempo de reacción (minutos)	0	30	60	90
[Oligosacáridos] %	12.3	24.4	73.6	89.8

Tabla N° 2. Concentración de glucosa (%) de muestras obtenidas durante el proceso de hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) tratado con la enzima DEXTROZYME DX 1.5x

Muestra	5	6	7	8	9	10	11	12
Tiempo de incubación (Horas)	0	13	15	18	21	24	37	39
[Glucosa] %	30.5	25.9	24.4	24.4	27.5	25.9	38.1	53.3

Muestra	13	14	15	16	17	18	19	20
Tiempo de incubación (Horas)	42	45	48	61	63	66	69	72
[Glucosa] %	38.2	38.2	51.8	38.2	35.0	56.4	57.9	95.9

Determinación del DE (Equivalente de Dextrosa) en el Jarabe de Glucosa

El contenido de dextrosa correspondiente a la última muestra tomada del proceso de hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) fue $DE = 72.7 \pm 0.2$, lo que nos indica que el jarabe obtenido es del tipo III, de alta conversión ($DE > 55$), dentro de la clasificación de jarabes de glucosa según su equivalente de dextrosa [10], [11].

Identificación Estructural del Producto Final de la Hidrólisis Enzimática por RMN

Se realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear 1H y ^{13}C (Ver Figura N° 1, 2, 3 y 4) a una muestra de glucosa p.a. y al producto final obtenido a las 72 horas del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de yuca. Los espectros se registraron en un equipo Bruker 300 MHz, se empleó D_2O (agua deuterada) como disolvente y se trabajó a una temperatura de 20 °C.

La comparación entre los valores de desplazamiento químico asignado a cada señal presente en el espectro de ^{13}C -RMN de la glucosa p.a. y de la muestra 20, se muestra en la Tabla N°3, observando de esta manera que los valores coinciden por tanto con este análisis llegamos a verificar que efectivamente en el producto final de la hidrólisis de almidón de yuca empleando enzimas se llegó a obtener glucosa.

EXPERIMENTAL

Hidrólisis enzimática de almidón de yuca

Se preparó una solución de almidón de yuca al 30%, a esta solución se añadió Ca^{2+} (100ppm). En la etapa de licuefacción se trabajó con la enzima BAN 480L en la siguiente condiciones: pH=6.0, temperatura 70°C y tiempo de reacción 90 minutos. Posteriormente se descativo esta enzima para dar paso a la etapa de sacarificación, en la cual se trabajó con la enzima Dextrozyme DX 1.5x, en las siguientes condiciones: pH=4.02-4.05, temperatura de incubación 60°C y un tiempo de reacción de 72 horas.

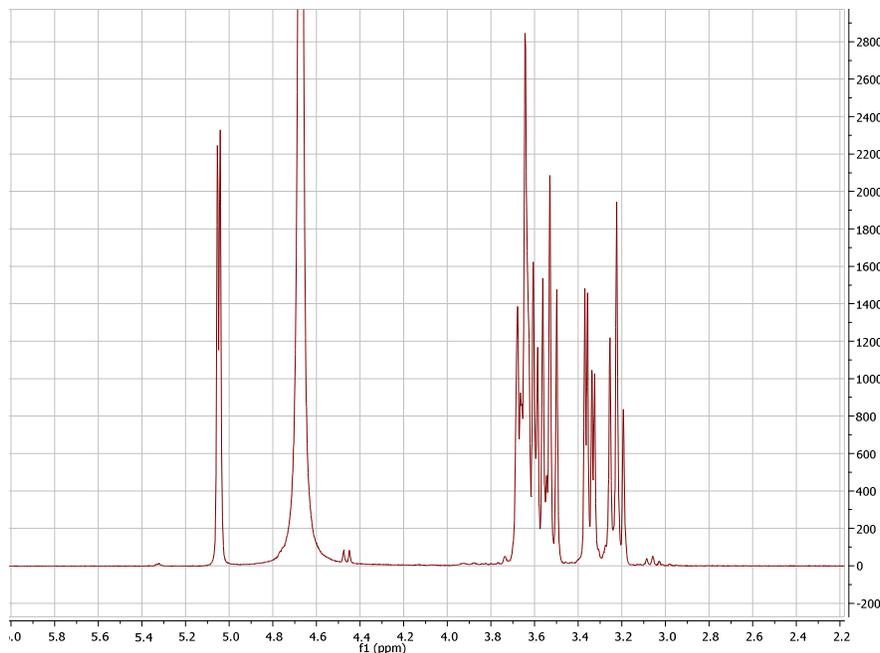


Figura N° 1. Espectro ^1H – RMN Glucosa p.a. 99.9%, marca Biopack (D_2O , 300 MHz)

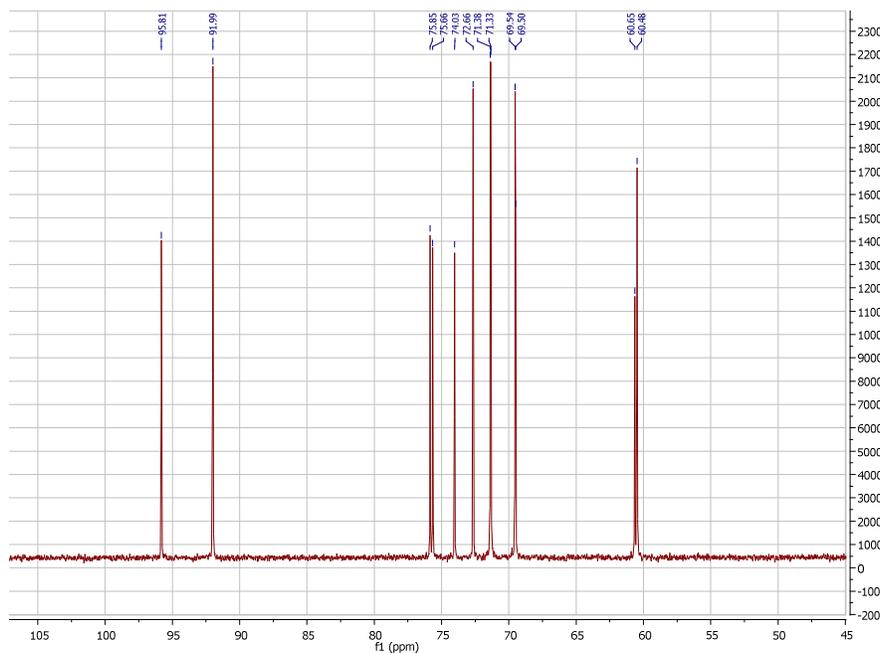


Figura N° 2. Espectro ^{13}C – RMN Glucosa p.a. 99.9%, marca Biopack (D_2O , 75 MHz)

Determinación de concentración de azúcares equivalentes a glucosa

Esta determinación se realizó por el método polarimétrico, usando el polarímetro se obtuvo las lecturas del ángulo de rotación de las muestras hidrolizadas y con ayuda de la curva patrón de glucosa se determinó la concentración de azúcar.

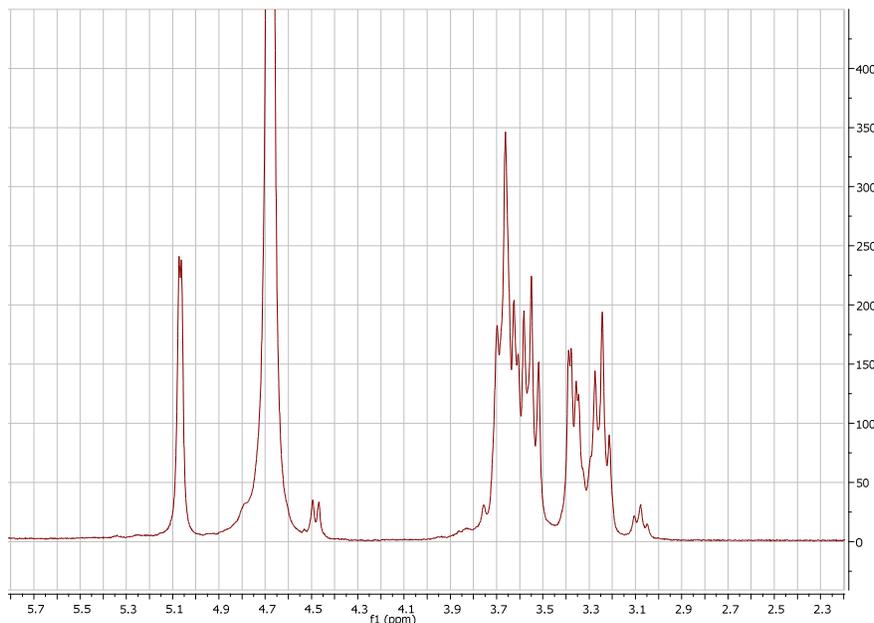


Figura N° 3. Espectro ^1H – RMN Muestra 20 (D_2O , 300 MHz)

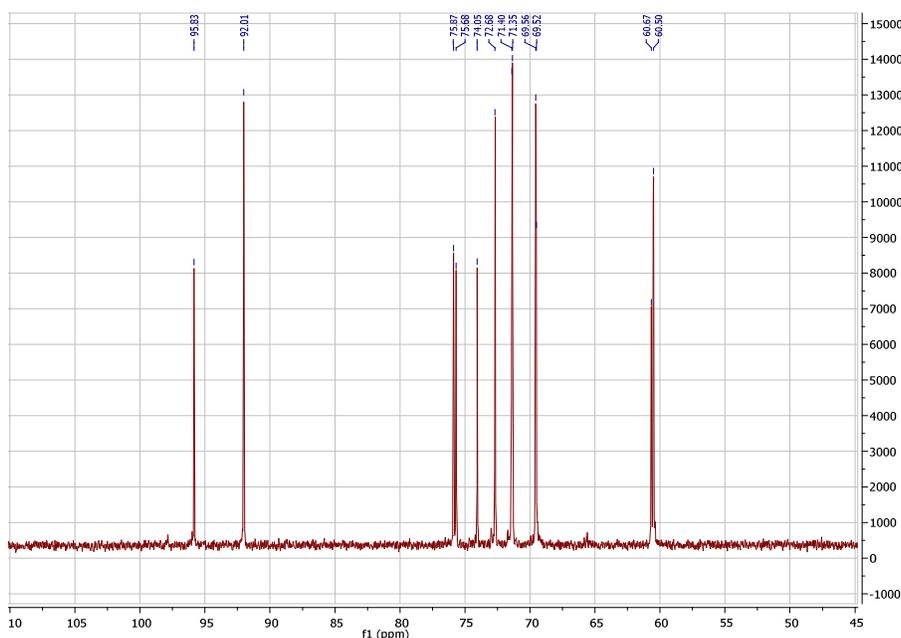


Figura N° 4. Espectro ^{13}C – RMN Muestra 20 (D_2O , 75 MHz)

Determinación del Equivalente de Dextrosa

La determinación de glucósidos reductores se realizó por el método de DNS. Para la determinación de sólidos totales primero se registró el peso de una caja Petri seca, vacía y limpia. Luego se pesó de 2 a 3 gramos del jarabe y se llevó a la estufa a 100°C por tres horas, posteriormente se depositó en un desecador y se pesó cada media hora hasta obtener un peso constante.

Tabla N° 3. Asignación de las señales del espectro de ^{13}C – RMN de la muestra 20.

ASIGNACION					
α - Piranosa			β - Piranosa		
	δ (ppm) Glucosa p.a.	δ (ppm) Muestra 20		δ (ppm) Glucosa p.a.	δ (ppm) Muestra 20
C1	91.99	91.81	C1	95.81	95.68
C2	71.38	71.46	C2	74.03	74.44
C3	72.66	72.61	C3	75.66	76.10
C4	69.54	69.83	C4	69.50	69.22
C5	71.33	71.39	C5	75.85	76.60
C6	60.48	60.36	C6	60.65	60.60

CONCLUSIONES

Las enzimas alfa-amilasa BAN 480L y amiloglucosidasa Dextrozyme DX 1.5x hidrolizan efectivamente las cadenas de almidón de yuca, llegando a obtener una concentración de oligosacáridos igual a 89.8% en la etapa de licuefacción, con respecto a la etapa de sacarificación se llegó a obtener una concentración de glucosa igual a 95.9%, resultados obtenidos empleando el método polarimétrico. Para la hidrólisis las condiciones experimentales de operación fueron: de almidón con la primera enzima temperatura de 70°C, pH 6.0 y tiempo de reacción 90 minutos para la enzima BAN 480L y de 60-62°C, pH 4.02 – 4.05 y tiempo de incubación 72 horas para la enzima Dextrozyme DX 1.5x. De esta manera se llegó a obtener un jarabe de glucosa de alta conversión con un DE = 72.7 \pm 0.2.

REFERENCIAS

1. Soto Ibañez, R. **1976**. Aplicación de hidrólisis enzimática de almidones para producción de glucosa. Memoria de grado, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz - Bolivia, p. 4.
2. Vargas Apaza, S. L. **1983**. Selección y evaluación de bacterias del género Bacillus productoras de amilasa en cultivo sumergido. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
3. Fermenta, O. **2000**. Química de los alimentos. 2da ed. Editorial ACRIBTA, Zaragoza, España 2000. pp. 228-240.
4. Peña Piza, A. **2009**. Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (Aspergillus Níger). Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, pp. 30-32, 38-39.
5. Sánchez, Alberto L. **2002**. Obtención de jarabe de glucosa por hidrólisis enzimática de almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenta y Chile) cultivadas en la provincia de Guantánamo (Santander). Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, pp. 40 – 43
6. García, Mariano G. Quintero, Rodolfo, R. López, Agustín M. Biotecnología Alimentaria. Primera edición. Editorial Limusa, México **1993**, pp. 525- 534A. J. Rodríguez, Estudios Electroquímicos de la interacción del Complejo cis- diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) con Bases Nitrogenadas. Tesis para optar el título de Magister en química, Universidad de Puerto Rico- Recinto Universitario de Mayagüez, 2001.
7. Wade JR, L.G., Química Orgánica, Segunda edición. Editorial Pearson. **1993**, pp. 256-257.
8. Tena Aldave, M. Jorrín Novo, J. V. **2008**. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Curso académico: Industria de alimentos – productos de panadería, departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Argentina.
9. Fajardo Castillo, E. E. Sarmiento Forero, S. C. **2007**. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., pp. 48-49.
10. Ruiz Camacho, M. I. **2009**. Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca por hidrólisis enzimática, para ser usados como sustrato en la producción de bioetanol. Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, p. 24.
11. Vidal Tovar, C.R. **2010**. El ñame espino (Dioscorea rotundata Poir.): una opción en la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) – Colombia, p. 21.