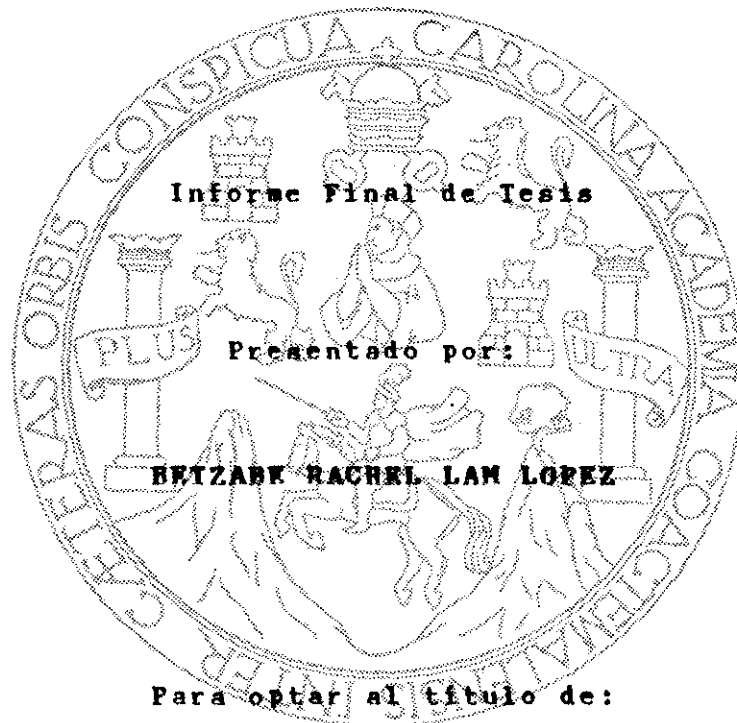


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

OBTENCION DE GLUCOSA CRISTALIZADA MEDIANTE LA HIDROLISIS
ENZIMATICA DEL ALMIDON DE YUCA PARA USOS INDUSTRIALES Y
FARMACEUTICOS.



Para optar al título de:

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala marzo de 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
†(1476)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	Licda. Clemencia del Pilar Galvez de Avila
SECRETARIO	Lic. Jose Francisco Monterroso Salinas
VOCAL I	Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar
VOCAL II	Licda. Thelma Esperanza Alvarado de Gallardo
VOCAL III	Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume
VOCAL IV	Br. Jorge Luis Galindo Arévalo
VOCAL V	Br. Edgar Antonio Garcia del Pozo

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS** Fuente inagotable de sabiduría, rogándole siga guiando mi vida.
- A MIS PADRES** Belizario Law Monzón y Zoila López de Law por las enseñanzas apoyo y amor que me han dado durante toda mi vida, y a quienes debo este triunfo.
- A MIS HERMANOS** Danilo, Darquis, German, Julio, Febe, Moises y Rebeca; por el cariño y estímulo que me han brindado.
- A MI ESPOSO** Orly Leiva Law, por la paciencia apoyo y amor que me ha brindado en todo momento.
- A MI HIJO** Orly Leiva Law Jr., por ser la alegría diaria en mi vida.
- A MI FAMILIA** A todos con mucho cariño

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

A MIS PADRES

A MI ESPOSO E HIJO

A MI PATRIA GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

A TODOS MIS AMIGOS

**A MIS COMPANEROS Y AMIGOS DE PROMOCION, ESPECIALMENTE A:
Silvia Chuy, Miriam Rivera, Patricia Torres, Ingrid
Tabarini, Irma Juarez y Norma Castillo.**

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, a mis padres, a mi esposo y a todas las personas que me brindaron su colaboración para la realización de este trabajo, especialmente:

Licda. Tamara Velasquez
Lic. Raúl Paniagua
Lic. Jorge Luis de León
Licda. Diana Freire de Nave
Lic. Miguel Angel Herrera
Lic. Luis Fernando Girón
Br. Giovany Escot Lam
Sr. Carlos Pineda
Sr. German López

Mi reconocimiento a la Dirección General de Investigación (DIGI), por el financiamiento otorgado en favor de la realización de este trabajo.

Y un agradecimiento muy especial, al Dr. José Héctor Aguilar, por su valiosa asesoría y sincera amistad brindada en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	3
IV. Justificación	13
V. Objetivos	14
VI. Hipótesis	15
VII. Materiales y Métodos	16
VIII. Aspectos Económicos	22
IX. Resultados	23
X. Discusión de Resultados	24
XI. Conclusiones	26
XII. Recomendaciones	27
XIII. Referencias	28
XIV. Anexos	31

I. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención, mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca de una glucosa cristalizada que cumpliera con las especificaciones de la Farmacopea Americana (USP) y la Farmacopea Internacional, para uso industrial y farmacéutico. Se utilizó el almidón de yuca, ya que en Guatemala esta raíz sólo se utiliza como alimento o para preparar yuquilla, por lo que su empleo para la obtención de glucosa cristalizada podría traer beneficios económicos a las personas que se dedican a su cultivo, el cual constituye la principal fuente de ingresos existiendo incluso la posibilidad de que este producto se pueda preparar en las localidades donde se cultiva.

El trabajo consistió en la obtención del jarabe de glucosa, mediante la hidrólisis del almidón de yuca con la enzima amiloglucosidasa. Este jarabe se purificó y concentró. El jarabe concentrado se dejó cristalizar y los cristales obtenidos fueron caracterizados. Este procedimiento se realizó en duplicado, para asegurar la veracidad de los resultados.

Los resultados obtenidos muestran que la glucosa cristalizada es monohidratada, y además que cumple con los requerimientos de la USP XXII y la Farmacopea Internacional para la manufactura de productos industriales y farmacéuticos. Por lo tanto, la glucosa obtenida puede substituir a la comercial de origen importado.

Las condiciones para obtener la cristalización fueron: concentración a 40°C del jarabe obtenido por hidrólisis enzimática, hasta llevar su concentración a 84° Brix, dejando posteriormente que cristalizara espontáneamente a temperatura ambiente, durante dos días aproximadamente.

II. INTRODUCCION

Existe un interés cada vez mayor por la fabricación de jarabe de glucosa y dextrosa (glucosa cristalizada) a partir de raíces amiláceas o granos en vez del almidón separado, con el fin de ahorrar capital invertido en la producción y purificación de almidón a partir de dichas materias primas (1).

La obtención de dextrinas, jarabe de glucosa, fructosa y maltosa a partir de la hidrólisis del almidón, la cual se hacía hasta hace unos pocos años con ácido clorhídrico, fue totalmente transformada con la aparición del sistema múltiple enzimático. Este sistema no solo permite efectuar una producción más controlada y variada de tales productos sino que también eliminar el uso de ácido, lo que reduce notablemente los costos (1).

El presente trabajo pretendió producir glucosa cristalizada, mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca, que cumpliera con las especificaciones de la Farmacopea Americana y la Farmacopea Internacional, para ser usada en la manufactura de productos farmacéuticos e industriales.

Se utilizó el almidón de yuca y no el de otra raíz amilácea, porque en Guatemala la yuca solo se utiliza como alimento o como yuquilla, por lo que su empleo para la preparación de jarabe de glucosa y glucosa cristalizada, podría traer mayores beneficios económicos a las personas que se dedican a su cultivo, existiendo incluso la posibilidad de que estos productos se puedan preparar en las localidades donde se cultiva la yuca.

III. ANTECEDENTES

3.1 LA YUCA

3.1.1 Características de la planta

La planta de yuca ha sido clasificada por los botánicos como Manihot utilissima polil de la familia Euphorbiacea. Sin embargo, en publicaciones recientes, se está empleando cada vez más el nombre de Manihot esculenta crantz (1).

La yuca es una planta perenne que crece bajo cultivo hasta una altura de 2 a 4 metros. Las hojas anchas palmeadas tienen corrientemente de 5 a 7 lóbulos, soportadas sobre un peciolo largo y delgado. Crece solamente hacia el extremo de las ramas. Las raíces o tubérculos irradian desde el tallo por debajo de la superficie del terreno. Las raíces de alimentación penetran en el suelo hasta una profundidad de 50 a 100 centímetros y esta capacidad de la planta de yuca para conseguir nutrimentos a una cierta distancia por debajo de la superficie puede contribuir a explicar su crecimiento sobre suelos de baja calidad (1-3).

La yuca es una planta tropical típica, se puede esperar la máxima producción de raíz en tierras bajas tropicales. La planta puede resistir períodos prolongados de sequía en los que la mayoría de las otras plantas alimenticias perecen (1,2).

En su calidad de planta tropical, la yuca es una planta de día corto. Experimentos realizados en invernaderos han demostrado que el período óptimo de luz es de unas 12 horas y que períodos de luz más prolongados inhiben la acumulación del almidón (1,2).

Aunque la planta de yuca crece mejor sobre suelos franco arenosos ligeros, crece bien sobre suelos con textura entre arenosa y arcillosa y sobre suelos de fertilidad relativamente baja (2).

Como la yuca es una planta de crecimiento rápido, productora de carbohidratos, es muy exigente en cuanto a nutrientes y deja agotado el suelo muy rápidamente (1,2).

Aunque la yuca es un cultivo comercial establecido en muchos países tropicales y existen centenares de variedades, se sabe generalmente poco de la nomenclatura e identificación de las variedades. Algunas de éstas se diferencian entre sí por sus características morfológicas, tales como color de tallos, peciolos, hojas y tubérculos; pero en muchos casos, la misma variedad se conoce en varios sitios con diversos nombres (1,2).

Las numerosas variedades de yuca suelen agruparse en dos clases principales: Manihot palmata y Manihot aipi o yuca amarga y dulce respectivamente. Esta división tiene utilidad desde el punto de vista económico y es difícil diferenciar los dos grupos por características botánicas (1).

En Guatemala la yuca Manihot sp es común, especialmente cultivada en las zonas consideradas cálidas (4).

3.1.2 Desarrollo y Cultivo

Antes del descubrimiento de América, la yuca era desconocida en Europa. Las pruebas arqueológicas indican que hay dos centros principales originarios para este cultivo, uno en México y Centro América y el otro en el noroeste de Brasil (1,2,5).

El cultivo de la yuca aumentó después de 1850 en los territorios de África Oriental como consecuencia de los esfuerzos realizados por quienes se dieron cuenta de su valiosa utilidad como salvaguardia contra los frecuentes períodos de escasez de alimentos (1,4,6,7).

En el lejano oriente, la yuca no se conoció como planta alimenticia sino hasta 1833 (1,4,6,7).

En la actualidad, la yuca se cultiva en todo el trópico y ocupa el segundo lugar en importancia, siendo solo superado por la papa, como raíz feculenta (1,2).

Como crece con facilidad, tiene gran rendimiento y apenas es afectada por enfermedades y plagas, las zonas dedicadas a su cultivo están aumentando constantemente. La planta de yuca se cultiva por sus tubérculos comestibles, que sirven como alimento básico en muchos países tropicales y también es fuente valiosa de almidón. Actualmente, la yuca se está cultivando ampliamente en todo el mundo tropical como planta alimenticia o para fines industriales (1,2).

Las raíces de yuca por sí mismas no constituyen un producto alimenticio balanceado. En el análisis de su composición se observa que la mayor parte del material seco consiste en carbohidratos, los cuales contienen de 64 a 72% de almidón. El contenido de Sacarosa puede llegar hasta 27% en las variedades de yuca dulce. También se han reportado cantidades relativamente altas de fructosa, dextrosa y dextrinas. El contenido de proteína en las raíces frescas de yuca varía entre 0.7 y 2.6%, siendo esta proteína deficiente en aminoácidos esenciales (Anexo No. 1) (1,2).

El contenido vitamínico de la raíz de yuca en comparación con otros productos alimenticios, muestra ser deficiente en vitaminas A y B (Anexo No. 2) (1, 2).

En Guatemala se cultiva la yuca para usarse como alimento y para la elaboración de yuquilla. Se sabe de dos zonas importantes productoras de yuca: la Costa Sur (Tiquisate, Escuintla) y la otra zona localizada en el departamento de El Progreso (Sansare y Sanarate) (4).

3.2 ALMIDON

3.2.1 Estructura y Composición Química

El almidón es un polisacárido constituido por monómeros de α -D-glucopiranosido, unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ en las cadenas y por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en los puntos de ramificación.

El almidón es un compuesto que solo produce glucosa al hidrolizarse, por lo que se considera como un homopolímero denominado glucosano o glucano (8-11).

El almidón puede ser aproximadamente descrito por la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, y se encuentra en los cereales, la papa, la yuca, las legumbres y en otros vegetales. Los dos principales constituyentes del almidón son la amilosa y la amilopectina (8-10,12).

3.2.1.1 Amilosa

La amilosa es la fracción del almidón que es soluble en agua, y es una cadena molecular lineal flexible de 500 o más unidades de glucosa, la cual es capaz de enrollarse tridimensionalmente en el espacio, que por hidrólisis da D-maltosa como único disacárido y da D-glucosa como único monosacárido. Los residuos de glucosa están unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glicosídicos y su tamaño molecular varía con la fuente del almidón (8,11-14).

Los gránulos de almidones comunes contienen de 15 a 30% de amilosa. La amilosa forma complejos con ácidos grasos, alcoholes orgánicos y yodo; produciendo con éste último un complejo de color azul, lo que sirve para su determinación cuantitativa (8,11,14).

3.2.1.2 Amilopectina

La amilopectina es un polímero de glucosa altamente ramificado, compuesto de cadenas lineales similares a la amilosa, pero conectadas a la ramificación por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. Se

cree que estos puntos de ramificación ocurren a intervalos alrededor de 20 a 30 unidades de glucosa (8,11-14).

La hidrólisis de la amilopectina produce D-maltosa como único disacárido, la metilación e hidrólisis da principalmente 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa (8,11-14).

En contraste con la amilosa, la amilopectina no forma complejos con el yodo, produciéndose un color rojo (8,11-14).

3.2.2 Propiedades del Almidón

Las propiedades que el almidón debe tener para aplicaciones sofisticadas son: estabilidad viscosimétrica a altas o bajas temperaturas, resistencia a ruptura mecánica, poder espesante bajo condiciones ácidas o durante la esterilización (12,15).

Las propiedades del almidón se pueden ver afectadas por factores físicos y químicos como: la ruptura mecánica, pH y concentración de sales. La temperatura elevada (mayor de 100°C) acelera el proceso de disolución, por ruptura de los enlaces glucosídicos, lo que hace disminuir la viscosidad. La temperatura baja produce reasociación de moléculas del almidón debido a la reorganización de las cadenas moleculares, las cuales se alinean; a este fenómeno se le llama retrogradación. La ruptura mecánica que ocurre durante la agitación de las pastas de almidón y transporte a través de bombas y tubos, causa la disminución de la viscosidad. La disminución del pH produce la rápida hidrólisis de los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Los electrolitos pueden aumentar o disminuir la viscosidad dependiendo de la concentración de la sal (8,14).

3.2.3 Obtención del Almidón

La obtención del almidón puede dividirse en las siguientes fases:

a) Preparación y Extracción:

Trituración de las células y separación de los gránulos de las demás sustancias insolubles, es decir, de las impurezas adheridas y del material que forma las paredes de la célula. Esta fase comprende las operaciones preparatorias del lavado y mondado de las raíces, de su rallado y del prensado de la pulpa, agregándole agua (2,16).

b) Purificación:

Sustitución por agua pura de la solución acuosa que rodea los gránulos de fécula o almidón en la masa que se obtiene en la fase anterior. Esta fase comprende la sedimentación y lavado de la fécula (2,16).

c) Deshidratación y secado:

Eliminación del agua mediante centrifugación y desecación (2,16).

d) Acabado, molienda, cernido y otras operaciones para completar la obtención.

3.2.3.1 Obtención del Almidón de Yuca

Para la obtención del almidón de yuca es esencial separar los gránulos del almidón del tubérculo en la forma más pura posible. Los gránulos están encerrados en células, junto con todos los demás componentes del protoplasma, es decir proteínas, hidratos de carbono solubles, grasas, etc, que solamente pueden separarse mediante un proceso de purificación, durante la fase de su tratamiento con agua (2,16).

3.2.4 Gelatinización del almidón

En la gelatinización la distribución molecular de la fécula del almidón experimenta una alteración radical, con el consiguiente cambio de sus propiedades. De producto casi insoluble, de estructura semicristalina, se convierte en una sustancia amorfa que puede mezclarse con agua en cualquier proporción a temperaturas suficientemente elevadas, y que produce soluciones viscosas que, a temperaturas más bajas, se convierten en una masa semisólida y elástica de consistencia gelatinosa.

La gelatinización se logra calentando a una temperatura de 68 a 92 °C (11,17-20).

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría; si se rompe su membrana externa al ser molidos, estos gránulos se hinchan en agua fría y forman un gel. Cuando se tratan los gránulos enteros con agua tibia, ésta se difunde a través de sus membranas y saca una parte del almidón. En agua caliente se hinchan a tal extremo que revientan (11).

Cuando el almidón es suspendido en agua y calentado hasta la "temperatura de gelatinización", la energía del calor empieza a disociarlo en las regiones de enlaces más débiles dentro de los gránulos y empieza la hinchazón. Los gránulos de almidón en su estado nativo son resistentes a la acción de químicos y enzimas y tienen una baja capacidad de retener agua. Cuando los gránulos de almidón están hinchados se vuelven susceptibles a la acción química, mecánica y enzimática. Algunas moléculas lineales cortas, se disuelven y difunden fuera de los gránulos hinchados; las más largas, las cadenas lineales de amilosa refuerzan la estructura de los gránulos (18-20).

El proceso de gelatinización puede lograrse con el empleo de productos químicos o por el calentamiento en un medio acuoso.

Varios almidones tienen diferentes rangos de gelatinización (Anexo No. 3) (11).

3.2.5 Usos Industriales del Almidón

El primer almidón fue probablemente obtenido por los egipcios a partir del trigo, el cual se usó como alimento, para pegar fibras y para la fabricación de papiros (6).

El almidón y los productos amiláceos se usan en muchas aplicaciones, por ejemplo: plásticos, curtidos de pieles y otras. El uso no alimenticio de almidones, como revestimientos, adhesivos y colas, representa aproximadamente 75% de la producción de la industria del almidón comercial (6,21).

Las industrias alimenticias son uno de los consumidores más importantes del almidón en forma de productos en envases pequeños para usos culinarios (6).

En la industria alimenticia se usa tanto el almidón sin modificar como el almidón modificado para uno o más de los siguientes fines: directamente como alimento amiláceo cocinado, flanes y otras formas; como espesante aprovechando las propiedades pastosas del almidón (sopas, alimentos para bebés, salsas etc.); como carga contribuyendo al contenido de sólidos, píldoras, tabletas y otros productos farmacéuticos, mantecados-helados, etc y como aglutinante en adhesión de los productos y prevención del secado de la masa durante el cocinado (en salchicha y carnes elaboradas). Otro de los usos del almidón es como estabilizador utilizando su elevada capacidad de retención de agua (mantecados-helados). Además el almidón es utilizado para la producción de glutamato monosódico (1,6,21).

3.2.6 Hidrólisis del Almidón

Hay dos métodos básicos para llevar a cabo la hidrólisis del almidón: la hidrólisis ácida o química y la hidrólisis enzimática (6,7,17,22,23).

3.2.6.1 Hidrólisis Química

La hidrólisis química del almidón es también llamada hidrólisis ácida y consiste en la conversión del almidón a glucosa por medio de un ácido que puede ser el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico (23-25).

3.2.6.2 Hidrólisis enzimática

Básicamente la modificación enzimática del almidón consiste en una hidrólisis parcial o total de las moléculas de amilosa y amilopectina según el tipo de producto que se desee obtener, utilizando para ello una enzima del tipo carbohidratasa (2,26).

Las enzimas responsables de la ruptura del almidón están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Entre éstas están las amilasas, las cuales actúan sobre el almidón, glucógeno y derivados del polisacáridos, hidrolizando los enlaces α -1,4 glucosídicos.

Las amilasas se clasifican en α -amilasas, las cuales rompen los enlaces en el interior del sustrato (endoamilasas), β -amilasas, las cuales hidrolizan unidades de las terminaciones no reductoras de el sustrato (exoamilasas) y glucoamilasas, las cuales rompen unidades de glucosa del extremo no reductor de las moléculas del sustrato (9,10,26).

3.2.6.2.1 Amilasas

Las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa), pueden ser de origen animal y vegetal. Estas enzimas actúan sobre los componentes del almidón con producción de azúcares reductores. El modo de acción, las propiedades y la degradación de productos depende de la fuente de la enzima (8-10,17).

La α -amilasa altamente purificada se ha obtenido de numerosas fuentes tales como: malta, saliva de humano, páncreas, Aspergillus oryzae, y Bacillus subtilis (8-10,17).

La acción de la α -amilasa sobre la fracción de amilosa del almidón procede en dos etapas: inicialmente una completa y rápida degradación de la amilosa en maltosa y maltotriosa. Este paso de α -amilólisis es esencialmente el resultado de un ataque fortuito sobre el sustrato por la enzima. Típico de esta ruptura es una rápida pérdida de la viscosidad y del poder de reaccionar con yodo de la amilosa.

La segunda etapa es mucho más lenta que el primer paso, dándose una hidrólisis de los oligosacáridos con la formación de glucosa y maltosa como productos finales (1,17).

Las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática del almidón de yuca empleando α -amilasa comercial son las siguientes:

- pH óptimo = 5.5
- relación enzima / sustrato = 0.1 ml/100g
- concentración de sustrato = 20%
- temperatura = 60°C

Estas condiciones permiten obtener un producto con mayor grado de modificación enzimática de almidón, y mayor rendimiento de equivalente de dextrosa final por hidrólisis con amiloglicosidasa (7,24).

Los polisacáridos de longitud de cadena intermedia que se forman durante la acción de las amilasas reciben el nombre de dextrinas. Puesto que las α y β -amilasas no pueden hidrolizar los enlaces α (1->6) de los puntos de ramificación de la amilopectina, el producto final de la acción exhaustiva de la amilasa sobre la amilopectina, es un núcleo grande y muy ramificado llamado dextrina límite, cuya designación indica que representa el límite del ataque de las amilasas. Una

enzima desramificadora ($\alpha(1\rightarrow6)$ -glucan-6-glucanohidrolasa) hidroliza los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en los puntos de ramificación (7,17).

3.2.6.2.2 Glucoamilasas

La glucoamilasa es una enzima clasificada como exohidrolasa, debido a que se adhiere primariamente al enlace $\alpha(1,4)$, exclusivamente en las puntas no reducidas de la glucosa y de los fragmentos provenientes de la hidrólisis por la α -amilasa (13).

En relación con las enzimas industriales la glucoamilasa es relativamente nueva, por lo que su uso no se ha expandido (13).

Debido a que su especificidad y su producción de glucosa es más grande comprada con la hidrólisis ácida, fue rápidamente adoptada para la producción de jarabes de glucosa (13).

La glucoamilasa es producida por un gran número de hongos y algunas especies de animales, sin embargo, solo aquellos provenientes de Aspergillus sp y Rhizopus sp son de importancia comercial.

La glucoamilasa proveniente de Aspergillus sp (específicamente Aspergillus niger) es la enzima de elección para procesos industriales en los Estados Unidos (13).

El hongo Aspergillus niger produce dos importantes isoenzimas de glucoamilasa, y es común encontrar ambas en preparaciones comerciales (13).

3.2.6.2.3 Enzimas Desramificantes

Para la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosídicos se utilizan enzimas desramificantes como la isoamilasa y la polulanasa. La isoamilasa es obtenida principalmente de Pseudomonas sp; la polulanasa se obtiene a partir de Klebsiella aerogenes; ésta última es usada comercialmente para incrementar el producto en la manufactura de dextrosa cristalina (7,20,28-32).

La desramificación de esta dos enzimas incrementa el porcentaje de glucosa producido durante la hidrólisis efectuada por la amiloglucosidasa (7,32,29). La acción combinada de una α -amilasa y una ($\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidasa) puede, por lo tanto, degradar completamente la amilopectina a glucosa y maltosa (7,32).

3.3 GLUCOSA

3.3.1 Generalidades

La glucosa es un azúcar obtenido generalmente por hidrólisis del almidón, es también denominada dextrosa por ser dextrorrotatoria; se presenta como cristales incoloros o polvo blanco, inodoros y de sabor dulce. La glucosa puede encontrarse en forma anhidra ($C_6H_{12}O_6$) y monohidratada ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$). Es soluble en una parte aproximadamente de agua, ligeramente soluble en etanol, pero es más soluble en agua hirviendo y etanol en ebullición (33,34).

3.3.2 Obtención de Glucosa

3.3.2.1 Hidrólisis del Almidón

En 1811, Kirchoff descubrió que podía producirse azúcar por hidrólisis ácida del almidón (6).

En la actualidad, la glucosa se suele fabricar en forma de jarabe o de un sólido, y las propiedades físicas del jarabe varían según el equivalente de dextrosa y el método que se haya seguido en la fabricación. La glucosa es el nombre corriente para el jarabe y la dextrosa para el azúcar sólido. La dextrosa, que a veces se llama también azúcar de uva, es la D-glucosa obtenida por la hidrólisis completa del almidón (6,35).

Hay dos métodos para la hidrólisis del almidón que se emplean actualmente para la fabricación de glucosa en escala comercial: hidrólisis ácida e hidrólisis ácida parcial seguida en una conversión enzimática (6).

La acidificación es la conversión del almidón en glucosa por hidrólisis ácida. Esta operación se realiza en proceso discontinuo o continuo. En el primer caso, la papilla de almidón de 20-21 °Bé se mezcla con ácido clorhídrico (algunas veces se emplea ácido sulfúrico) para llevar el pH alrededor de 1.8-2.0 en un convertidor de vapor y se calienta a unos 160°C hasta que se alcanza el equivalente de dextrosa deseado. El proceso continuo está sustituyendo al discontinuo y comprende la carga de la mezcla de papilla de almidón y ácido clorhídrico en un cambiador de calor tubular. El tiempo y la temperatura de la operación se ajustan al equivalente de dextrosa que se desee en el producto final. La muestra acidificada se neutraliza con carbonato sódico o cenizas de soda para separar el ácido libre y se lleva el pH a 5.0-7.0. Se forma cloruro sódico en el jarabe en pequeñas cantidades como resultado de la neutralización del ácido clorhídrico con el carbonato sódico y queda en solución (6,10,17,26,36).

En el procedimiento enzimático-ácido la papilla de almidón se trata por acidificación, neutralización y filtración como en el proceso de hidrólisis ácida y luego se carga en el convertidor enzimático. La temperatura y el pH se ajustan a las condiciones óptimas y se agrega la enzima agitando lentamente. El tiempo de conversión depende del tipo y la concentración de la enzima y del equivalente de dextrosa requerido. Una vez terminada la transformación, se inactiva la enzima elevando la temperatura y ajustando el pH.

El empleo de algunas enzimas da como resultado valores de equivalentes de dextrosa que llegan hasta 98-99%, lo cual significa mayor rendimiento de dextrosa a partir del almidón, o conversión casi completa de almidón en dextrosa (6).

3.3.2.2 Purificación del Jarabe

La purificación consiste en la eliminación de sólidos (impurezas, proteínas precipitadas y grasa coagulada) por separación centrífuga. Las impurezas dependerán principalmente del almidón que se emplee y de su pureza. La solución se hace pasar luego por filtros de tipo adecuado (filtros-prensa o filtros cerámicos de tipo bujía) (3,37).

El filtrado claro de color pardo se decolora haciéndolo pasar por carbón activado. La purificación puede hacerse por intercambio iónico, en lugar de carbón activado o conjuntamente (6).

3.3.2.3 Concentración del Jarabe

El jarabe purificado se concentra finalmente al vacío, hasta que el jarabe concentrado llega a 80-85% de sólidos o 43-45 °Bé (6).

Los jarabes de glucosa comerciales se venden tomando como dimensionales de concentración los grados Baumé, que es una medida del contenido de sustancia seca y el peso específico (6).

3.3.2.4 Cristalización de la Dextrosa

En la actualidad, la mayor parte de la dextrosa comercial se prepara en forma de dextrosa monohidrato puro, por un proceso de combinación ácido-enzima. El jarabe espeso caliente de glucosa, de una concentración de 70-80% de dextrosa, pasa desde el evaporador a pailas de cristalización. La formación de cristales se controla principalmente por la cantidad de dextrina que queda con la glucosa. La separación de cristales del jarabe se realiza en centrífugas y las impurezas se quedan en el licor madre. La dextrosa cristalina se seca luego en secadores rotatorios de aire caliente en vacío, se empaqueta en materiales impermeables a la humedad (6,37).

La recristalización de dextrosa da prácticamente 100% de dextrosa pura en cristales, que se utilizan como azúcar de calidad farmacéutica (6,17).

El almidón empleado en la fabricación de jarabe de glucosa tiene que ser lo más puro posible, con un contenido bajo de proteína soluble. A este respecto el almidón de yuca puede ser preferible a otros almidones (1,23).

3.3.2.4.1 Formas Cristalinas de la Glucosa Anhidra y la Glucosa Monohidratada

Existen tres formas cristalinas de la D-glucosa: α -D-glucosa anhidra, α -D-glucosa monohidratada y β -D-glucosa las cuales muestran diferencias con respecto a solubilidad, obtención y condiciones de almacenamiento (38-40).

A temperatura de 25°C y en atmósferas arriba de 80% de humedad relativa (HR), la dextrosa anhidra permanece sin cambio; pero puede absorber humedad de la atmósfera cuando la HR se eleva entre 85-89% (39).

Cuando la dextrosa anhidra absorbe humedad se hidrata, que es la forma monohidratada, esta absorbe más humedad cuando es expuesta a atmósferas con HR de 90%. Estas dos formas son estables bajo condiciones razonables de almacenamiento (39).

La forma β -D-glucosa es muy sensible a las atmósferas húmedas, y la presencia de solamente unas pocas partes por mil de humedad la convierten a la forma α -D-glucosa (39).

Las tres formas tienen diferentes solubilidades en agua y las soluciones sufren mutarrotación a la forma de equilibrio conteniendo alrededor de 62% de la forma α -D-glucosa. La solubilidad de la mezcla en equilibrio es de 51.2% a 25°C (Anexo No. 4) (38-40).

3.3.2.4.2 Producción de Glucosa Monohidratada y Glucosa Anhidra

Los cristales de azúcar conteniendo D-glucosa pueden contener una o más de las tres formas cristalinas, α -D-glucopiranososa monohidratada, α -D-glucopiranososa anhidra y β -D-glucopiranososa anhidra. De éstas, el producto primario de comercio es α -D-glucopiranososa monohidratada, la cual es referida comúnmente como dextrosa monohidratada a solo dextrosa (38-41).

Un proceso patentado por Black describe la cristalización de un hidrolizado de almidón con alto equivalente de dextrosa (ED) para un rendimiento de azúcar total conteniendo predominantemente α -D-glucosa monohidratada. En un convertidor enzimático el hidrolizado de almidón de 96 ED es concentrado a

70% de sólidos a 40°C y enfriado a 25°C agregando cristales de dextrosa monohidratada utilizados como núcleo, y cristalizada hasta que el equilibrio es establecido entre los cristales de dextrosa monohidratada y la solución saturada. Para purificar el licor de D-glucosa previo a la cristalización debe realizarse tratamiento de desionización para remover impurezas iónicas y mejorar el color y estabilidad (38-41).

Después de la purificación y concentración de la sustancia conteniendo 70-78% de sólidos, el hidrolizado es entonces enfriado lentamente y pasado a pailas de cristalización con rotación lenta y constante 3 a 4 días (38,39).

Al final del período de cristalización alrededor del 50% de D-glucosa es cristalizada como cristales de la forma monohidratada (38,39).

La producción comercial de α -dextrosa anhidra es substancialmente baja en comparación con la de dextrosa monohidratada. La α -dextrosa anhidra es generalmente hecha por redisolución y recristalización de los cristales de α -D-glucopiranososa hidratada en un evaporador/cristalizador al vacío. Durante la evaporación para la cristalización es requerida supersaturación por lo que debe añadirse solución de D-glucosa. La cristalización se da alrededor de los 60-65°C. El tiempo de cristalización es corto comparado con la cristalización de la α -dextrosa hidratada, usualmente de 4 a 5 horas. El rendimiento del producto de la cristalización es alrededor de 50% y el licor madre puede ser usado para la manufactura de α -D-glucosa hidratada (38-40).

3.3.3 Caracterización de la Glucosa Cristalina

Según las normas dadas por la Farmacopea Americana (USP) y la Farmacopea Internacional, la glucosa utilizada para la elaboración de productos farmacéuticos e industriales, debe llenar ciertos requisitos, los cuales son: (33,34)

- La glucosa no debe contener menos de 99.0% ni más del 101.5% de $C_6H_{12}O_6$, calculado en relación con la sustancia anhidra.
- Cuando se calienta, se funde, se hincha y arde, desprendiendo olor a azúcar quemada.
- Al añadirse algunas gotas de una solución de 0.05 g/ml a 5 ml de tartrato cúprico potásico caliente, se forma un abundante precipitado rojo.
- Debe de contener no más de 5mg/g o 5 ppm de metales pesados. No más de 2 ppm de plomo, no más de 1mg/g o 1 ppm de arsénico, para cloruros no más de 0.2 mg/g, y para sulfatos no más de 0.2 mg/g.
- No debe contener dextrinas y azúcares menos solubles, así como debe estar libre de almidón y sulfitos sin hidrolizar.
- El contenido de agua en la forma anhidra no debe exceder de 10 mg/g y en el caso del monohidrato el contenido de agua no debe ser menor de 70 mg/g ni mayor de 95 mg/g.
- La acidez no debe ser tal que se requiera más de 0.5 ml de hidróxido sódico 0.02 N para titular 5.0 g de glucosa disueltos en 50 ml de agua.
- Su rotación específica no debe ser menor de +52.0 y no más de +53.0 calculado en base a la forma anhidra, determinado a 20°C en una solución acuosa al 10% de la sustancia desecada a 100°C hasta peso constante y con adición de algunas gotas de amoníaco diluido.

3.3.4 Usos Industriales y Farmacéuticos de la Glucosa

El mayor uso de la dextrosa es para la elaboración de cerveza baja en calorías, confección de mezclas de comidas secas, comidas fermentadas, carnes y como componente en tabletas (17).

Es utilizada en la industria farmacéutica como componente en soluciones intravenosas. En el comercio químico se usa en forma hidrogenada para la elaboración del sorbitol, y en forma fermentada para la elaboración del ácido cítrico; además es usada en procesos de fermentación para la producción de penicilina y otros antibióticos (17,35,36,42-45).

La industria de la conversión de almidón (glucosa y dextrosa) es el mayor consumidor independientemente del almidón, utilizando alrededor del 60% del total de la producción de almidón. El jarabe de glucosa y la dextrosa cristalizada compiten con la sacarosa y se usan en grandes cantidades en la industria de frutas de conserva, confitería, compotas, jaleas, mermeladas, mantecados-helados, productos farmacéuticos, bebidas y fermentaciones alcohólicas (17,35,36,42-45).

El objeto funcional de la glucosa y la dextrosa en la industria de confitería es impedir la cristalización de la sacarosa; en la industria de productos de panadería es suministrar carbohidratos fermentables; y en las conservas de frutas, mantecados-helados e industrias similares es aumentar los sólidos sin causar un incremento indebido del dulzor total, aumentando así el aroma natural de la fruta, y también previniendo la formación de cristales de hielo grandes que destruyen la textura (17,40-45).

IV. JUSTIFICACION

Guatemala importa cantidades considerables de glucosa como materia prima para la manufactura de productos industriales y farmacéuticos, pudiendo ésta obtenerse localmente, debido a que se cuenta con los recursos para realizarlo; por tal razón es necesario llevar a cabo estudios que permitan determinar si la glucosa cristalizada obtenida mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca cumple con los requerimientos establecidos por la USP y la Farmacopea Internacional, así como si los costos para la producción de la misma son menores. De ser aceptable se podrá producir glucosa cristalizada localmente a un costo menor que si se importara y además dando la seguridad de que se elaboran con ésta, productos de calidad para el consumidor.

La obtención de glucosa cristalizada a partir del almidón de yuca vendría a ser una nueva aplicación de esta raíz en la industria guatemalteca, pudiendo así los cultivadores de yuca aumentar su producción y por consiguiente sus ingresos económicos, lo cual es importante, ya que la yuca, en las regiones áridas de Guatemala, constituye la principal fuente de ingresos.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Obtener glucosa cristalizada mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

5.2 Objetivo Específico

Determinar si la glucosa cristalizada, obtenida mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca, cumple con los requerimientos de la Farmacopea Americana y la Farmacopea Internacional para la elaboración de productos industriales y farmacéuticos.

VI. HIPOTESIS

La glucosa cristalizada obtenida mediante la hidrólisis del almidón de yuca cumple con los requerimientos de la Farmacopea Americana (USP) y la Farmacopea Internacional, por lo que puede sustituir a la glucosa cristalizada importada, para la elaboración de productos industriales y farmacéuticos.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de Trabajo

El universo de trabajo lo constituyeron muestras de almidón de yuca no purificado (yuquilla) obtenidas en un expendio comercial en el municipio de Sansare, departamento de El Progreso.

7.2 Medios

7.2.1. Recursos Humanos

El presente trabajo fue realizado por Betzabe Rachel Lam López con la asesoría del Dr. José Hector Aguilar.

7.2.2. Recursos Materiales

7.2.2.1 Instalaciones

Para la revisión bibliográfica del trabajo se contó con la biblioteca del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) y la biblioteca del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI).

Para la realización de la parte experimental se utilizaron las instalaciones del laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

7.2.2.2 Equipo

El equipo que se utilizó para realizar la parte práctica del presente trabajo fue:

- balanza analítica Mettler, modelo H35AR
- espectrofotómetro Spectronic 20, Bausch & Lomb
- baño de María Thelco, modelo 84
- estufa Thermolyne, modelo 56
- potenciómetro Fischer Accunet, modelo 230 A
- horno W.H. Curtin modelo C's
- mechero de Bunsen
- columna de vidrio para empacar resina aniónica
- columna de vidrio para empacar resina catiónica
- polarímetro

7.2.2.3 Cristalería

- 15 frascos de 500 gramos con tapadera plástica
- 10 pipetas de 2 ml Hirschmann
- 20 tubos de ensayo Pyrex
- 1 probeta de 100 ml, TKK
- 5 agitadores de vidrio
- 5 vasos de precipitar de 200 ml
- 3 cilindros de Nessler, Pyrex
- 1 erlenmeyer de 125 ml
- 1 cápsula de porcelana
- 1 picnómetro de 25 ml
- 1 filtro Buchner

7.3 Reactivos

6.3.1 Reactivos para la Hidrólisis Enzimática

- 1.a amiloglucosidasa comercial de la casa Enmex, S.A. utilizada se conoce como Diazime L-200 (# de catálogo R8043) proveniente de cultivos de *Aspergillus niger* (30).

- Mezcla de cloruros : Se mezcla 1 gramo de cloruro de calcio (CaCl_2) y 12 gramos de cloruro de sodio (NaCl) diluido en 2000 ml de agua destilada.
- Acido clorhídrico (HCl) 0.5N, hidróxido de sodio (NaOH) 1N y 4N, buffer de fosfatos (NaH_2PO_4) 0.036 M a pH 7.

7.3.2. Reactivos para la Determinación de Equivalente de Dextrosa con Acido Dinitrosalicílico

- ácido dinitrosalicílico (DNS)* 0.63 g
- tartrato de sodio y potasio* 18.20 g
- fenol* 0.50 g
- bisulfito de sodio* 0.50 g
- hidróxido de sodio* 2.14 g
- solución patrón de glucosa 100 mg/dl

* disolver en agua destilada a 37°C a 100 ml

7.3.3 Reactivos para la Purificación del Jarabe de Glucosa

- carbón activado
- tierra de diatomeas R (grado reactivo)
- resina intercambiadora de cationes, fuertemente ácida macroporosa, en forma de H^+ (20-50 Mesh), llamada comercialmente Amberlite IRA 118H de Sigma (# de catálogo A-4025).
- resina intercambiadora de aniones fuertemente alcalina macroporosa, en forma de Cl^- (20-50 Mesh), llamada comercialmente IRA 400 de Sigma (# de Catálogo A-2523).
- soluciones activadoras NaOH 4N y HCl 5N

7.3.4 Reactivos para la Caracterización de la Glucosa Cristalina

- Tartrato cúprico TS (solución test)
- Solución patrón de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ácido acético 1N, ácido sulfhídrico TS
- Yodo 0.1 N
- Acido sulfúrico 2N y concentrado, yoduro de potasio KI TS, cloruro de estaño SnCl_2 TS, dietilditiocarbamato de plata TS, Zinc (Zn^{+2}) gránulos, almidón TS.
- Fenoltaleína, hidróxido de sodio 0.02 N.
- Reactivo de Karl Fischer
- Acido nítrico, nitrato de plata TS, ácido clorhídrico 0.020 N
- Acido clorhídrico 3 N, cloruro de bario TS, ácido sulfúrico 0.020 N

7.4 Procedimientos

7.4.1 Producción de Jarabe de Glucosa

7.4.1.1 Hidrólisis Enzimática del Almidón de Yuca

- Se pesó 200 gramos de almidón y se disolvió en 1,000 ml de buffer de fosfatos 0.036 M, para obtener una solución al 20%
- Se ajustó el pH a 4 con HCl 0.5N
- Se gelatinizó a 80 °C por 15 minutos
- Se bajó la temperatura a 60 °C
- Se agregó 1 ml de amiloglucosidasa al 0.125% (v/v) y se dejó hidrolizar por 6 horas a 60°C
- Se agregó NaOH 4.0N para inactivar la enzima (hasta pH 10)
- Se diluyó 0.1 ml de hidrolizado en 250 ml de agua destilada y se determinó el equivalente de dextrosa (ED) (20).

7.4.1.2 Determinación de Equivalente de Dextrosa (ED) con Acido Dinitrosalicílico (DNS)

7.4.1.2.1 Curva de Calibración

- Se preparó una solución patrón de glucosa (100mg/dl)
- Se preparó las diluciones necesarias para lograr concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg/dl
- Se tomó 2 ml de cada dilución y se agregó 2 ml del reactivo DNS y luego se mezcló
- Se calentó por 10 minutos a ebullición
- Se sacó los tubos y se colocó en agua fría
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm (32).

7.4.1.2.2 Análisis de la Muestra

- Se realizó diluciones adecuadas de la muestra, para que el valor de la lectura espectrofotométrica se encontrara dentro de los valores de la curva de referencia
- Se tomó 2 ml de la dilución de la muestra y se agregaron 2 ml de reactivo DNS
- Se calentó por 10 minutos en agua a ebullición
- Se sacó los tubos y se colocó en agua fría
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm
- Se expresó los resultados como ED (porcentaje de almidón hidrolizado)
- Cálculos:

ED = miligramos de azúcares reductores/ miligramos de almidón X 100 (32).

7.4.2 Purificación del Jarabe de Glucosa

- Se centrifugó el jarabe de glucosa a 3000 rpm durante 30 minutos
- Se agregó 0.5 gramos de carbón activado por cada 100 ml de sobrenadante o jarabe de glucosa, para eliminar aromas y colores, se mezcló 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se filtró el jarabe de glucosa utilizando una capa de tierra de diatomeas colocada sobre un filtro Buchner utilizando vacío.
- El jarabe obtenido se trató sucesivamente con resinas de intercambio iónico y catiónico (20).

7.4.2.1. Preparación de las Resinas

- Se pesó 169.72 g de resina aniónica y 254.47 g de resina catiónica.
- Se lavó las resinas varias veces con agua destilada, hasta que se obtuvo un sobrenadante incoloro.
- Cada una de las resinas se dejó reposar en un vaso de precipitar de 500 ml con agua destilada y durante dos horas.
- Después se descartó el agua y se procedió a activar las resinas utilizando NaOH 4 N para la resina aniónica y HCl 5 N para la resina catiónica, dejando las resinas en contacto con estas soluciones durante una hora, con agitación periódica.
- Se decantó las soluciones activadoras y se volvieron a lavar las resinas con agua destilada hasta eliminar el exceso de ácido y base, lo cual se determinó por medio de medir el pH que tenía cada resina.

7.4.2.2. Tratamiento del jarabe de glucosa con resinas de intercambio iónico, por medio del proceso en capa.

- El procedimiento en capa consistió en dejar por dos horas el jarabe con la resina activada dentro de un vaso de precipitar de 500 ml, con agitación constante, para que se alcanzara un estado de equilibrio entre los iones intercambiables ligados a la resina y los iones de la solución.
- Se separó el jarabe de la resina por medio del paso a través de un colador.

7.4.2.3. Tratamiento del jarabe de glucosa con resinas de intercambio iónico, por medio del proceso en columna.

- Cada resina activada se empacó en una columna de vidrio.
- Se trasvasó el jarabe de glucosa proveniente del tratamiento en capa, por medio del siguiente procedimiento: primero se pasó el jarabe de glucosa por la resina aniónica y luego por la resina catiónica.
- Se lavaron las resinas y se dejaron en la columna (20-46).

7.4.3 Concentración del Jarabe de Glucosa

La concentración se realizó por medio de evaporación a 40 °C, hasta obtener una concentración de 84° Brix, determinada por medio de un picnómetro calibrado a 25 °C. Se determinó el peso específico del jarabe por medio del picnómetro y se buscó en una tabla a cuantos grados Brix equivalía (41).

7.4.4 Cristalización del Jarabe de Glucosa

- Para obtener cristales de dextrosa monohidratada el jarabe de glucosa concentrado a 84° Brix u 84% de sólidos, se dejó cristalizar espontáneamente a temperatura ambiente por aproximadamente dos días.

7.4.5 Caracterización de la Glucosa Cristalina

7.4.5.1 Identificación

- Se realizó una dilución 1:20 de la glucosa cristalizada
- Se agregó unas pocas gotas de la dilución a 5 ml de tartrato cúprico TS lo cual debió dar un precipitado rojo de óxido cuproso (resultado positivo).
- Se calentó los cristales, los cuales debieron fundir y arder desprendiendo un olor a azúcar quemada (33, 34).

7.4.5.2 Determinación de Metales Pesados

Determinación de Plomo:

- Se utilizó una solución patrón de $Pb(NO_3)_2$, la cual se diluyó con agua (10 ml de solución patrón con agua a un volumen de 100 ml)
- Se preparó tres tubos de Nessler: un patrón, una muestra y un control.
- En el tubo patrón se agregó 2 ml de solución diluida del patrón, y se diluyó con agua hasta 25 ml.
- En el tubo muestra se agregó 25 ml de la solución preparada de glucosa (2 gramos de muestra en 25 ml de agua destilada).
- En el tubo control se agregó 2 ml de solución de la dilución diluida del patrón.
- Se ajustó el pH de los tres tubos con ácido acético 1N, se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 40 ml y se mezcló
- A los tres tubos se les agregó 10 ml de H_2S TS, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos
- Se observó sobre una superficie blanca
- El color de la solución de la muestra no debió ser más oscuro que el del tubo patrón y la intensidad del color del control fue igual o más grande que la de la preparación del tubo patrón (33, 34).

7.4.5.3 Determinación de Cloruros

- Se disolvió 2 gramos de glucosa en 35 ml de agua y se pasó a un cilindro de Nessler.
- Se agregó 10 ml de ácido nítrico diluido R
- Se llevó hasta 50 ml con agua
- Se agregó 1 ml de nitrato de plata solución reactiva (SR)
- Se agitó inmediatamente con una varilla de vidrio, y se dejó reposar durante 5 minutos protegida de la luz directa del sol.

- La opalescencia producida no debió ser mayor que la opalescencia patrón, cuando se miraba transversalmente (33, 34).

Opalescencia Patrón

- Se midió 1 ml de ácido clorhídrico 0.01N en un cilindro Nessler
- Se agregó 10 ml de ácido nítrico diluido R
- Se llevó hasta 50 ml con agua
- Se añadió 1 ml de nitrato de plata SR
- Se agitó con varilla de vidrio y se dejó reposar 5 minutos (33,34).

7.4.5.4 Determinación de Sulfato

- Se disolvió 2 gramos de glucosa en 35 ml de agua y se pasaron a un cilindro Nessler
- Se añadió 3 ml de ácido clorhídrico diluido R
- Se diluyó hasta 45 ml con agua
- Se agregó 5 ml de sulfato bario reactivo
- Se agitó con una varilla de vidrio y se dejó reposar durante 5 minutos
- El enturbiamiento producido no debió ser mayor que el entubiamiento patrón cuando se miró transversalmente (33, 34).

Enturbiamiento Patrón

- Se midió 1.25 ml de ácido sulfúrico 0.01N y 3 ml de ácido clorhídrico diluido R en un cilindro Nessler
- Se diluyó hasta 45 ml con agua
- Se agregó 5 ml de reactivo de sulfato de bario.
- Se agitó con varilla de vidrio y se dejó reposar 5 minutos (33, 34).

7.4.5.5 Determinación de Almidón

- Se disolvió 5 gramos de glucosa cristalizada en 50 ml de agua
- Se mezcló por 1 minuto y se agregó 0.2 ml de I_2 0.1N
- La falta de color azul indicaba la ausencia de almidón (33, 34).

7.4.5.6 Determinación de Sulfitos

- Se disolvió 5 gramos de glucosa en 50 ml de agua, se agregó 0.2 ml de I_2 0.1N, después 0.5 ml de almidón TS. Un color azul indicó la ausencia de sulfitos (33, 34).

7.4.5.7 Determinación de Arsénico

La determinación de arsénico se realizó por medio de un método fotométrico basado en la reacción entre el dietilditiocarbamato de plata y la arsina.

- Se preparó tres tubos: el patrón, la muestra y el blanco
- Solución Patrón: Se pesó 132 mg de AsO_3 y se disolvió en 5 ml de una solución de NaOH 4N diluida (1:5), se neutralizó la solución con H_2SO_4 2N y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada. Cada ml de la preparación patrón contenía el equivalente de un μg de arsénico.
- Preparación de la Muestra: Se pesó 3 gramos de glucosa y se puso en el aparato generador de arsina (formado por un balón Pyrex con un embudo y un absorbedor, sostenido con pinzas sobre un baño de María). Se añadió 5 ml de H_2SO_4 concentrado y se calentó. Se mezcló cuidadosamente con H_2O_2 al 30%.
- Se agregó 20 ml de H_2SO_4 diluido (1:5), 2 ml de KI TS y 0.5 ml de solución ácida fuerte de $SnCl_2$ TS y se mezcló.
- Se transfirió 3 ml de dietilditiocarbamato de plata TS (al tubo absorbedor)
- Se añadió 3 gramos de gránulos de Zn^3
- Se conectó el embudo al frasco generador y se colocó éste en un baño María manteniendo una temperatura de 25 °C, lo que permitió la difusión de hidrógeno y el desarrollo del

color.

- Se desconectó el tubo absorbedor del generador y de la unidad de embudo y se transfirió a una celda de 1 cm
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda máxima entre 535 y 540 nm en un espectrofotómetro

Blanco: Se utilizó como blanco dietilditiocarbamato de plata TS (33, 34).

7.4.5.8 Determinación de Agua

- Se añadió 20 ml de metanol al recipiente de valoración, se valoró hasta el punto final con el reactivo de Karl Fischer.
- Se transfirió una cantidad conveniente de glucosa cristalizada exactamente pesada al recipiente de valoración.
- Se agitó durante un minuto y se valoró de nuevo con el reactivo de Karl Fischer, de conocida equivalencia en agua (33, 34)

7.4.5.9 Determinación de la Acidez

- Se disolvió 5 gramos de glucosa cristalizada en 50 ml de agua libre de dióxido de carbono.
- Se agregó fenoftaleína TS
- Se tituló con NaOH hasta neutralización (33, 34).

7.4.5.10 Rotación Específica

La rotación específica se calculó de la siguiente manera:

- Se diluyó la glucosa cristalizada al 10%
- Se agregó 0.2 ml de NH_4OH 6N
- Se colocó la glucosa ya diluida en el polarímetro
- Se leyó la rotación específica de la muestra
- Se comparó la lectura de la rotación específica del jarabe de glucosa con la que tiene una solución de Dextrosa al 10% (33, 34).

7.5 Diseño Experimental

No se utilizó un diseño experimental en el presente trabajo, porque la muestra de almidón de yuca utilizada fue obtenida comercialmente y se supuso que era homogénea. Además, trabajos anteriores no han encontrado diferencias significativas en la hidrólisis del almidón de yuca proveniente de diferentes muestras y variedades de yuca (6).

VIII. ASPECTOS ECONOMICOS

Los materiales y reactivos que se utilizaron, para la realización del presente trabajo, fueron proporcionados por el departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y financiado por la Dirección General de Investigación (DIGI).

IX. RESULTADOS

9.1 Hidrólisis del Almidón de Yuca

Al gelatinizar el almidón de yuca y realizar la hidrólisis del mismo con la enzima amiloglicosidasa, se obtuvo un jarabe amarillento de apariencia turbia, el cual contenía un equivalente de dextrosa (ED) de 96.29%.

9.2 Purificación del Jarabe de Glucosa

Debido a la apariencia turbia del jarabe de glucosa, se procedió a purificarlo, agregándole carbón activado, filtrándolo al vacío a través de una capa de tierra de diatomeas y finalmente pasándolo por resinas de intercambio iónico. Obteniéndose un jarabe transparente e incoloro, con una concentración de 10° Brix.

9.3 Concentración y Cristalización del Jarabe de Glucosa

Se concentró el jarabe de glucosa por evaporación a 40°C, hasta aproximadamente 84 °Brix, se dejó cristalizar espontáneamente a temperatura ambiente, por dos días; obteniéndose un sólido de color blanco, que se dejó secar a temperatura ambiente.

9.4 Caracterización de la Glucosa Cristalizada

Se procedió a realizar la caracterización de la glucosa cristalizada obtenida encontrándose en la siguiente tabla los resultados.

Tabla No. 1

Caracterización de la glucosa cristalizada según normas de la USP XXII y la Farmacopea Internacional (33, 34).

	Valores obtenidos	Valores de referencia
Identificación	glucosa positiva	glucosa positiva
Almidón	negativo	negativo
Sulfitos	negativo	negativo
Cloruros	< 0.2 mg/g	no > 0.2mg/g
Sulfatos	negativo	no > 0.2mg/g
Acidez	0.5 ml NaOH 0.1N	no > 0.6 ml NaOH 0.1N
Plomo	negativo	no > 2 ppm
Arsénico	negativo	no > 1 ppm
Humedad	84 mg/g	70 - 95 mg/g
Rotación Específica	+ 52.75	entre +52.5 y + 53.3

X. DISCUSION DE RESULTADOS

10.1 Hidrólisis del Almidón de Yuca

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo la hidrólisis del almidón de yuca, se pudo establecer, que después de 6 horas de hidrólisis a 60°C con la enzima amiloglicosidasa (0.125 % v/v); la transformación del almidón a glucosa se realizó en forma casi total, como lo indica el equivalente de dextrosa obtenido el cual equivale a más del 90% de conversión del almidón de yuca a productos reductores.

Previo a la hidrólisis se procedió a la gelatinización del almidón, lo cual permitió el desdoblamiento de la molécula del almidón, proporcionando una mayor superficie de acción para la enzima, con lo cual se obtuvo una mayor hidrólisis.

Se utilizó la enzima amiloglicosidasa, ya que con esta se reduce el tiempo y el costo de la hidrólisis. Esta enzima posee α -amilasa, por lo que no se tiene que hacer una primera hidrólisis con ésta.

10.2 Purificación del Jarabe de Glucosa

El proceso de purificación con carbón activado y tierra de diatomeas se realizó con el fin de eliminar colores y olores indeseables en el producto final. Además, el paso a través de resinas de intercambio aniónico y catiónico, permitió eliminar iones contaminantes provenientes de la solución buffer, en lo que se disolvió inicialmente el almidón.

El producto final de la purificación fue un jarabe transparente e incoloro, muy diluido. Esto último se determinó por su peso específico, y su equivalente en concentración en grados Brix.

10.3 Concentración y Cristalización del Jarabe de Glucosa

La concentración del jarabe se hizo a 40° C, ya que según el diagrama de fases de solubilidad de la dextrosa, es a esa temperatura que cristaliza la glucosa monohidratada (ver anexo No. 4). Se trató de obtener la glucosa monohidratada ya que es la que se utiliza comúnmente para la manufactura de productos industriales y farmacéuticos.

El sólido fue sometido a caracterización para asegurar que se tratara de glucosa que cumpliera con las especificaciones de la Farmacopea Americana y la Farmacopea Internacional.

10.4 Caracterización de la Glucosa Cristalizada según las normas de la USP XXII y la Farmacopea Internacional

Al someter el sólido obtenido a la caracterización, indicada por las normas USP XXII y la Farmacopea Internacional, se observó que al realizar la identificación del mismo por el método de Fehling, resultó ser positivo para glucosa, al formarse el óxido cuproso y dar un abundante precipitado rojo, que es lo que lo diferencia de la sacarosa. Además al determinar la rotación específica de la muestra se obtuvo un valor de + 52.75, lo cual está dentro de los límites establecidos para la dextrosa monohidratada.

Los resultados obtenidos para sulfitos y almidón fueron negativos, lo que cumple con lo establecido para una dextrosa monohidratada de calidad farmacéutica e industrial.

El método de determinación de sulfitos se basó en la reducción del yodo por el sulfito. Si el yodo se reduce ya no puede actuar con el almidón agregado a la muestra, lo cual no da el color azul en el caso de que existiera sulfitos.

La determinación de almidón se basó en la capacidad del yodo para fijarse en el interior de la estructura helicoidal de la amilosa; produciéndose un intenso color azul. La glucosa no reacciona con el yodo.

Al determinar la acidez, se necesitaron menos de 0.6 ml de NaOH 0.1 N para neutralizar la muestra de glucosa con lo cual cumple con la norma establecida.

La determinación de arsénico se hizo mediante un proceso fotométrico basado en la reacción entre el dietilditioicarbamato de plata y la arsina. El dietilditioicarbamato de plata en solución básica produce un color que va de amarillo a café al reaccionar con la arsina, pero esto es en el caso de que existiera arsénico; sin embargo fue negativo para la muestra de glucosa, cumpliendo así con esta norma.

La determinación de plomo se llevó a cabo en base a la reacción de éste con el ion sulfuro, formándose compuesto coloreados, sin embargo en la muestra fue negativo.

El contenido de arsénico y plomo fue también confirmado por espectrofotometría de rayos X, el cual es un método sensible, dando negativo para ambas pruebas.

La determinación de cloruros se llevó a cabo comparando la muestra contra una opalescencia patrón. La muestra presentó menor opalescencia por lo que su contenido en cloruros es inferior al límite máximo aceptado.

La determinación de sulfatos se hizo en base a una comparación con un enturbiamiento patrón, siendo el resultado para la muestra negativo.

La humedad de la muestra estuvo comprendida entre los 70 y 95 mg/g, lo que indica que se trata de glucosa monohidratada.

XI. CONCLUSIONES

- 11.1** Es factible la preparación de glucosa cristalizada mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca con amiloglicosidasa, obteniéndose una glucosa que cumple con las especificaciones de la USP XXII y la Farmacopea Internacional.
- 11.2** La glucosa cristalizada obtenida mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca puede substituir a la glucosa comercial en la manufactura de productos industriales y farmacéuticos.
- 11.3** La utilización de la enzima amiloglicosidasa reduce el costo y tiempo de la hidrólisis.
- 11.4** La purificación a través de resinas de intercambio iónico elimina los iones contaminantes, provenientes del buffer en el que se disuelve inicialmente el almidón.
- 11.5** La concentración del jarabe a 84° Brix es indispensable para la cristalización espontánea de la glucosa monohidratada.
- 11.6** La concentración a 40°C del jarabe de glucosa, proveniente del almidón de yuca, da como resultado la cristalización de dextrosa monohidratada.

XII. RECOMENDACIONES

- 12.1 Se recomienda efectuar estudios técnico-económicos que determinen la factibilidad de obtener glucosa cristalizada mediante la hidrólisis enzimática del almidón de yuca; dada la importancia que esto tendría para el país y las comunidades donde se cultiva la yuca.
- 12.2 Es necesario efectuar otros estudios, con respecto a las condiciones óptimas, para llevar a cabo la concentración y cristalización de la glucosa monohidratada.
- 12.3 Se recomienda determinar el rendimiento de la glucosa cristalizada a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

XIII. REFERENCIAS

- 1) Brautlecht C. Starch, its sources, production and uses. New York: Reinhold Publishings Corporation, 1983. III +408 p.
- 2) Grace MR. Elaboración de la Yuca. Producción y Protección Vegetal. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Colección FAO, 1987. p 91-97
- 3) Instituto de Investigaciones Tecnológicas de Colombia. Algunos Derivados de Almidones de Maíz, Yuca, Achira y Harina de Yuca. Bogotá: Nacional, Vol. 2, 1975. 526 p.
- 4) González Galdámez JA. Diagnósticos de la Producción e Industrialización de Yuca (Manihot sp). Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía), 1981. 66 p.
- 5) Holleman LW. Elaboración de la Yuca y sus Productos en las Industrias Rurales. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Cuadernos de Fomento Agropecuario No. 54, 1986. 26 p.
- 6) Gil Rodas NE, Perez Gallardo KL, Velasquez Calderón GC. Modificación Enzimática del Almidón de Yuca (Manihot esculenta Crantz). Universidad de San Carlos de Guatemala. (Cursó de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1989. 22 p.
- 7) Quintana Rizzo J. Utilización de Almidones de Yuca como Substrato para la Producción de Alfa-Amilasa a partir de Bacillus subtilis ATCC 63051. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1990. 45p.
- 8) Harper. Bioquímica. 11a ed. México D.F: Editorial El Manual Moderno 1988. (p. 359-360).
- 9) Stryer H. Bioquímica. 11a ed. Barcelona: Reverta, 1982. 871 p.
- 10) Lehninger AL. Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2a ed. Calvert F, Bozal J, trads, Espana: Ediciones Omega, 1981. XXIII + 1117 p. (p 267-270).
- 11) Morrison R, Boyd R. Química Orgánica. 2nd ed. en español. México D.F: Fondo Educativo Interamericano, 1985. XXIX + 1375 p.
- 12) Whistler RL. Starch Chemistry and Technology. New York: Borning INC, 1985. 967 p.
- 13) Beynumvan G. Starch Coversion Technology: New York, Marcel Dekker, Inc., 1985. 361 p.
- 14) Bhagaavan NV. Bioquímica. México D.F: Editorial Interamericana, 1978. 902 p.
- 15) Araulla EV, Nestel B, Campbell M. Cassava Processing and Storage. Proceedings of Storage and Interdisciplinary Workshop. Thailand: Calvert, 1984. 125 p. (p73-76)
- 16) Glicksman M. Gum Technology in the Food Industry. New York: Academic Press, 1989. XIII + 590 p.
- 17) Kulp K., Reed G. Carbohydrases in Enzymes in Food Processing. 2nd ed. New York: Academic Press, 1975. 573 p.
- 18) Mizuike, Enrichement Techniques for Inorganic Trace Analysis. Berlin: Merck, 1983. 8p.

- 19) Gerald A, Berman K, Murashige H. Syntetic Carbohydrate and Aid to Nutrition in the Future. Miami: Blackwell, 1986. XII + 244p. (p123-125).
- 20) Cabrera L, Benavides OM. Bases Técnicas para el Desarrollo de Alimentos de Baja Viscosidad usando Harina de Arroz Modificada con Enzimas. Tec 1983; 146: 7-23
- 21) Potter N. La Ciencia de los Alimentos. México: Edutex S.A., 1988. 749 p.
- 22) Lachman A. Starches and Corn Syrups. New Jersey: Noyes Data Corp., 1980. 275 p.
- 23) Allen JD, Thoma JA. Model for Carbohydrase Action. Aspergillus oryzae alfa-amylase Degradation of Maltotriose. Biochem, 1988; 12: 2345-2350.
- 24) Jones DW. Química Moderna de los Cereales. Pulido Cuch, trad. Madrid: Aguilar, 1986. 673 p.
- 25) Radley JA. Examination and Analysis of Starch and Starch Products. London: Applied Science Publishers, 1976. 220p.
- 26) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Norma Internacional recomendada para el Jarabe de Glucosa Deshidratada. Roma: FAO, 1989. (p 5-9).
- 27) Miles Biotech Products Division. Enzymes from Miles Products Information, TENASA (Bacterial Alpha Amylases from Starch Liquefaction). Elkhart Germany: Miles Inc, 1983.
- 28) Litwack G. Bioquímica Experimental. 2nd ed. Sanz Perez, trad. Barcelona: Omega, 1977. 342 p. (p. 27-35).
- 29) Barton R. Technical Information the Action and Characterization of Bacterial amylose. New Jersey: Inc Clifton, 1980. XII+ 230 p.
- 30) Miles Biotech Products Division. Enzymes from Miles, diazyme L-200 (Fungal Glucoamylase for Starch Hydrolysis). Elkhart Germany: Miles Inc, 1984. 5p.
- 31) Allen W. Amilasas. Argentina: Miles Laboratories, 1980. 20 p.
- 32) Gil Rodas N. Producción, Purificación y Caracterización de Jarabe de Glucosa a partir de Hidrólisis Enzimática del Almidón de Yuca Manihot esculenta Crantz. Universidad de San Carlos de Guatemala, - Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 50 p.
- 33) Organización Mundial de la Salud. Farmacopea Internacional. Normas de Calidad. 3ra ed. Ginebra: OMS, 1983, 378 p. (Vol. 2. 150 p.).
- 34) United States Pharmacopeia Covention. United States Pharmacopeia. XXI ed. Rockville, USA: The National Formulary, 1990. 1256 p.
- 35) Maiden AM. d Food and Fermentation Applications of Starch Hydrolysates. (In Birch GG, Green LF, Coulsen C. Glucose syrups and Related Carbohydrates) New York: Elsevier Publishing Company, Ltd, 1980. 118 p.
- 36) Palmer TJ. Enzyme Hydrolysis. (In Birch GG, Green LF, Coulsen CB. Glucose Syrups and Related Carbohydrates.) New York: Elsevier Publishing Company, Ltd, 1980. 118 p.

- 37) Johnson JM, Harris CH, Barbean WE. Effects of High Fructose Corn Syrup replacement for Sucrose on Browning Starch Gelatinization, and Sensory Characteristics of Cakes. *Cereal Chem* 1989; 155-157.
- 38) Knight JW. *The Starch Industry*. England, Oxford: Pergamon Press, 1989. XIII + 189 p. (109-115).
- 39) Radley JA. *Starch Production Technology* London: Applied Science Publishers, 1976. VIII + 587 p.
- 40) Thoma JA. The Oligo and Megalo Sacharides of Starch. In Whistler, Paschall. *Starch Chemistry and Technology*. New York: Academic Press, 1984. 718 p.
- 41) Instituto de Investigaciones Tecnológicas de Colombia. Estudio sobre la obtención de glucosa a partir de Harina de Arroz mediante Hidrólisis Enzimática. Bogotá: Nacional, vol XXVI, 1985.
- 42) James RW. *Industrial Starcher*. New Jersey: Noyes Data Corp., 1984. X + 342 p.
- 43) Rasin G, Birch GG. Calcium Chloride Complex Formation of Glucose Syrups and Their Fractions. *Food Chem* 1986; 19: 149-158.
- 44) Lachman A. *Starches and Corn Syrups*. New Jersey: Noyes Data Corp., 1980. 275 p.
- 45) MacDonal F. Some Effects of Consuming Glucose Syrups. (In Birch GG, Green LE, Coulsen CB. *Glucose Syrups and Related Carbohydrates*.) New York: Elsevier Publishings Company, Ltd., 1980. 118 p.
- 46) E. Merck, Ion Exchangers and Adsorber resing. *Reagentes Merck* 1984; 24: 3-10.

XIV. ANEXOS

14.1 Anexo No. 1

Tabla No. 1

Promedio de la composición de las raíces de Yuca y las Patatas
(Variedades comunes en el momento de la cosecha)

Composición	Yuca ¹	Patatas ¹
Humedad	70.25 ²	17.80
Almidón	21.45	19.90
Azúcares	5.13	0.40
Proteínas	1.12	2.80
Grasas	0.41	0.20
Fibra	1.11	1.10
Cenizas	0.54	0.92

¹ Por Ciento

² Las variedades amargas suelen contener un promedio del 30% de almidón.

Referencia

Grace M. Elaboración de la Yuca. Producción y Protección Vegetal. Roma: Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Colección FAO, 1987.

14.2 Anexo No. 2

Tabla No. 2

Contenido Vitamínico de la Raíz de la Yuca en Comparación con el de otros Productos Alimenticios

	Vitamina A (U. I)	Vitamina B (mg/100)	Vitamina C (mg/100)
Raíces tubulosas de yuca (peladas)	-	10	20
* Gapek	-	10	-
* Harina de tapioca	-	-	-
Patatas	40	30-80	13-15
Harina de patatas	-	-	-
Arroz descascarillado	-	100-150	-

* Derivados de raíces tuberosas de la yuca

Referencia

Grace M. Elaboración de la Yuca. Producción y Protección Vegetal. Roma: Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Colección FAO, 1987.

14.3 Anexo No. 3

Tabla No. 3

Algunas Propiedades de Almidón Entero y Fracciones de Amilosa de Almidón^a

Tipos de almidón	forma	tamaño (um)	A.I. ^b	Conversión β -amilacea%	Amilosa (%)	GI ^c	TG ^d (°C)
cebada	redondo	20	4.3		22	-	56-64
avena	"	25	5.1		27	-	-
trigo	"	30	5.0		26	-	65-67
amylomaiz	"	25	9.9		52	-	85-87
maxymaiz	"	15	0.1		0.1	-	66-69
papa	oval	40	4.3		23	-	62-65
guisante suave	"	30	6.6		35	-	98
amilosa de avena	-	-	-	73	-	1850	-
amilosa de avena	-	-	19.0	77	-	1300	-
amilosa de trigo	-	-	19.2	68	-	2100	-
amilosa de amilomaiz	-	-	19.2	77	-	1300	-
amilosa de papa	-	-	19.5	76	-	3000	-
amilosa de guisante suave	-	-	19.2	81	-	1300	-

^a de Green wood & Thomson 1962^b afinidad al yodo porcentaje (%)^c grados de polimerización^d temperatura de gelatinización

Referencia

Kulp K., Reed G. Carbohydases in Enzymes in Food Processing. 2nd. ed. New York: Academic Press, 1975. 573 p.

Figura No. 1

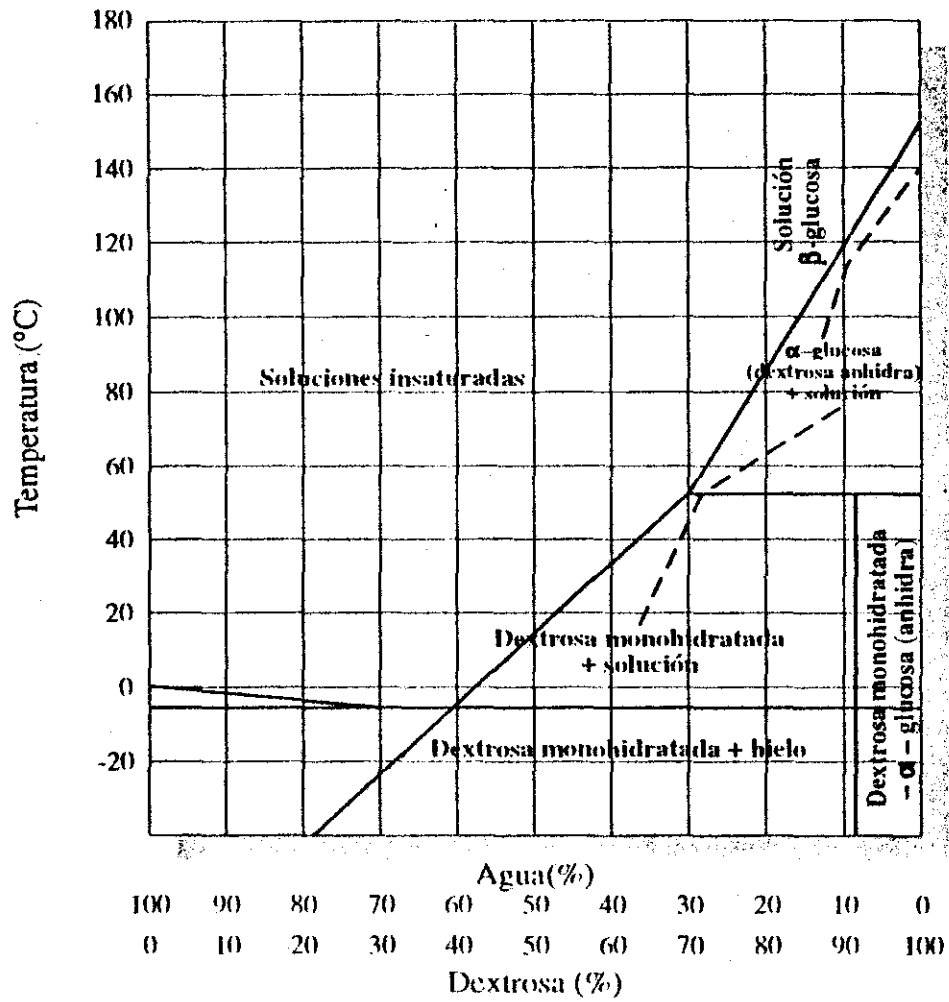



Diagrama de Fases de Solubilidad de la Dextrosa

Referencia

Radley JA. Starch Production Technology. London: Applied Science Publishers, 1976. VIII, 587 p.



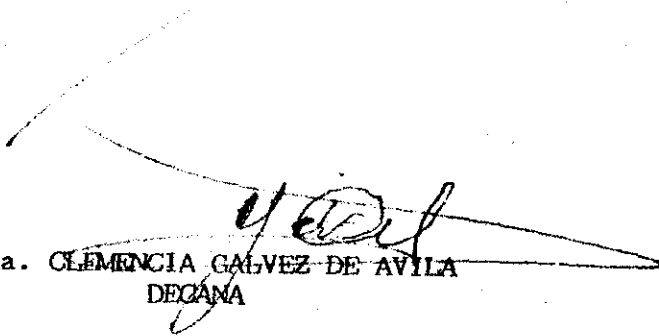
BETZABE RACHEL LAM LOPEZ
AUTORA



Dr. JOSE HECTOR AGUILAR
ASESOR



Lic. GUSTAVO GINI AGUILERA
DIRECTOR, ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA



Licda. CLEMENCIA GALVEZ DE AVILA
DECANA

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central