

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Pror. T. 13/106

*T
14
71*

Departamento de Ingeniería Química

HIDROLISIS ENZIMÁTICA
DE HARINA DE TRIGO

TESIS DOCTORAL

| | |
|--------------------------|------------------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA | |
| GRANADA | |
| Nº Documento | <i>619665701</i> |
| Nº Copia | <i>121216290</i> |

MOHAMED NOURI
GRANADA, 1993

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

HIDROLISIS ENZIMATICA
DE HARINA DE TRIGO

MOHAMED NOURI

ENERO 1993.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE HARINA DE TRIGO.

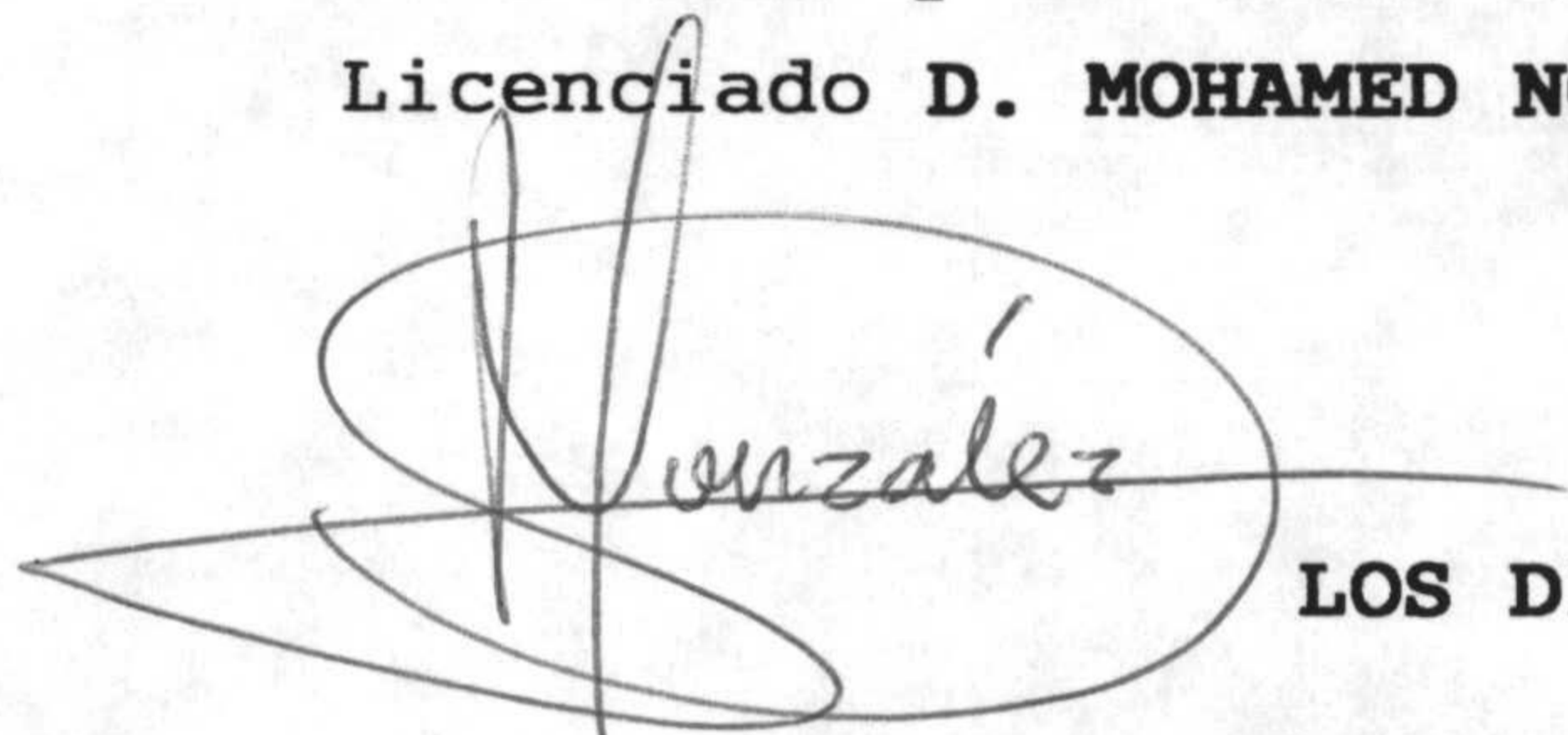
Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas), dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada "Tecnología Bioquímica y Agroalimentaria" (Bienio:1987-89).

Granada, 15 de Enero de 1993.

Fdo: Mohamed Nouri.

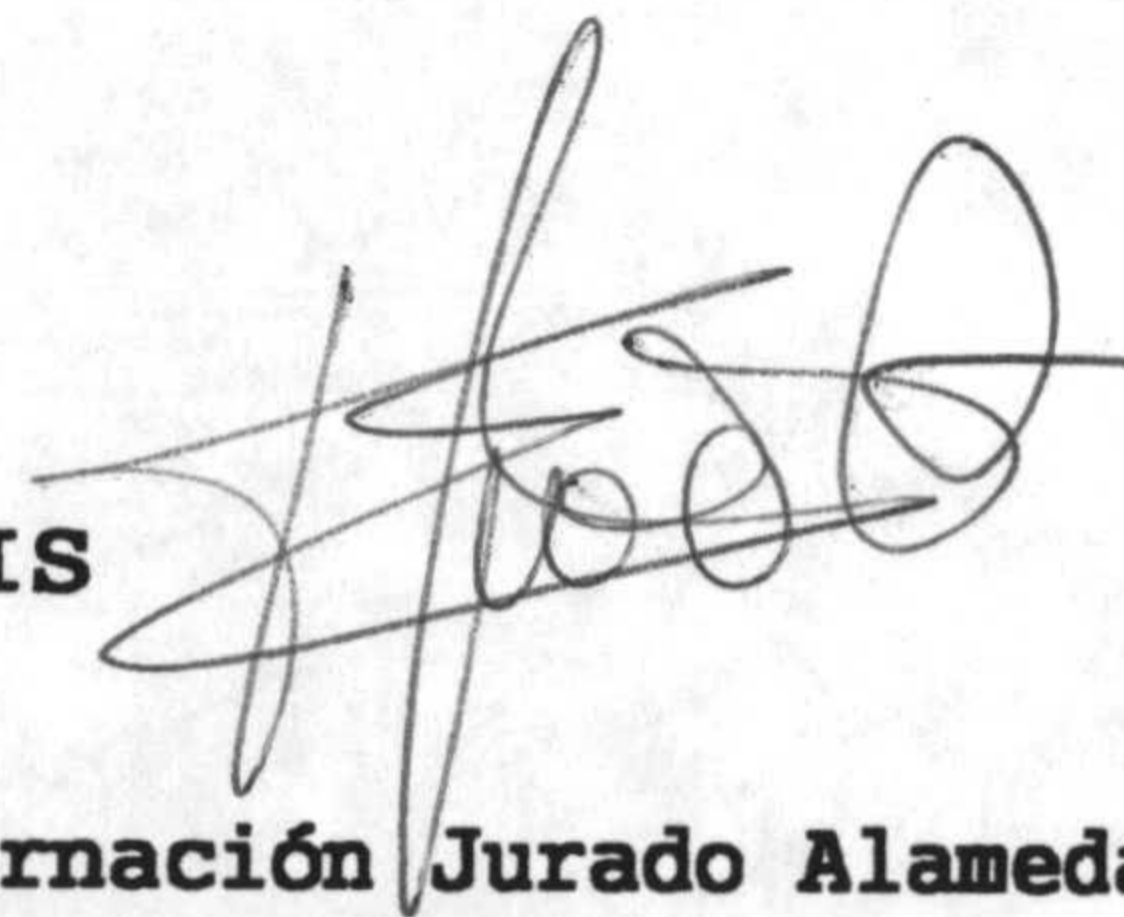
VICENTE BRAVO RODRIGUEZ, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre.

Certifica: Que el presente trabajo sobre "Hidrólisis enzimática de harina de trigo", ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección del **Dr. D. PEDRO GONZALEZ TELLO** y la **Dra. Dña. ENCARNACION JURADO ALAMEDA**, por el Licenciado **D. MOHAMED NOURI**.



LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. D. Pedro González Tello
Catedrático de Ingeniería
Química.



Dra. Dña. Encarnación Jurado Alameda
Profesor Titular de Ingeniería
Química.

Mi más sincero agradecimiento

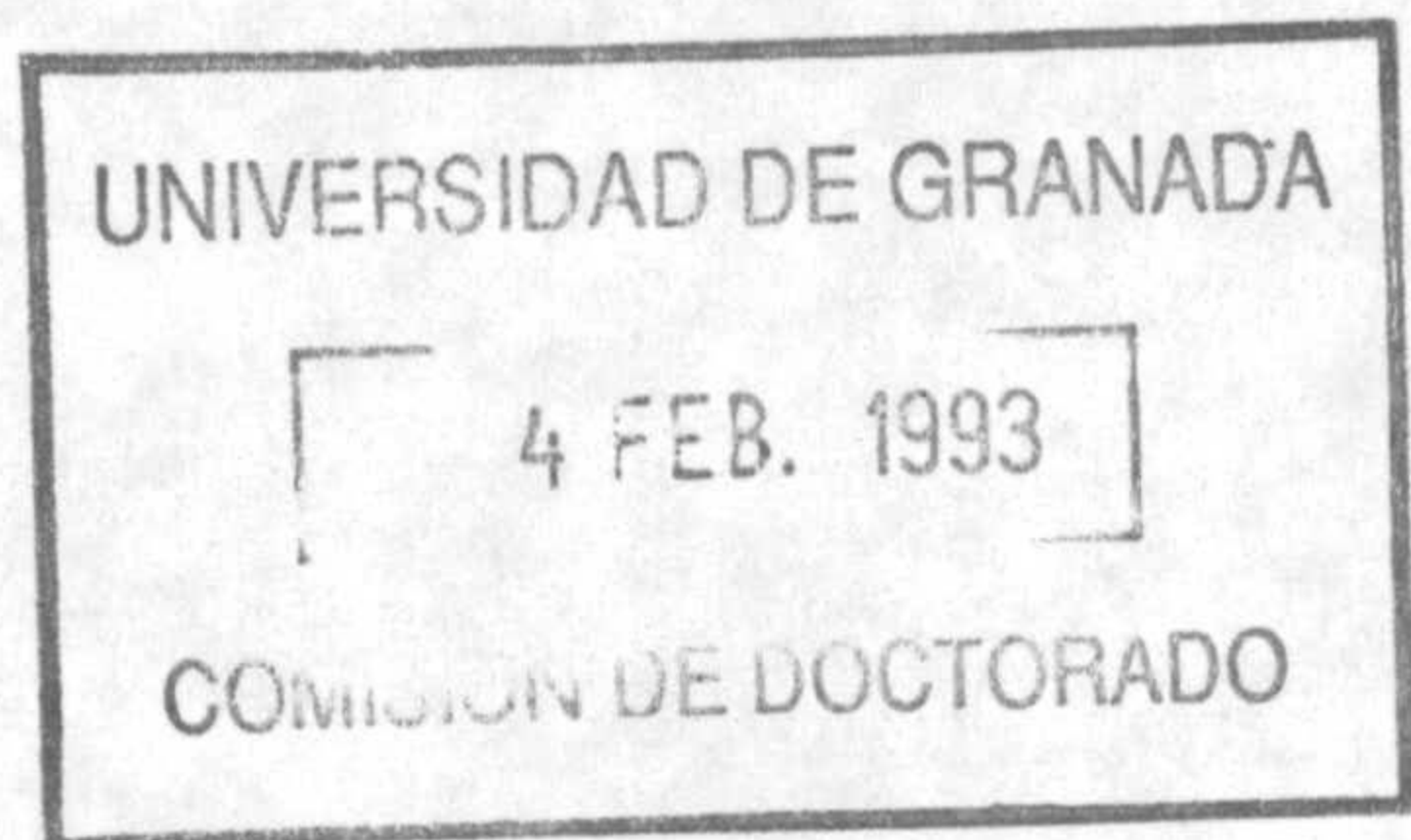
A D. Pedro González Tello y Dña. Encarnación Jurado Alameda por su dirección, interés, ejemplo, enseñanzas y gran dedicación a todos los aspectos relacionados con este trabajo y con mi formación.

A D. Fernando Camacho Rubio, director del grupo de Bio-reactores, por su enseñanza, su estrecha colaboración y sus consejos.

A D. Germán Luzón González, Emilia María Guadix Escobar y Gabriel Blázquez García por su ayuda incondicional e inestimable en la realización de este trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química por prestarme su ayuda desinteresada siempre que la necesitaba.

Al Departamento de I+D de UNIASA por su interés y colaboración en el desarrollo de este proyecto.



UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
DIVERSITY AND INCLUSION

The following information is provided for your reference. The information is intended to provide a general overview of the project and is not intended to be a substitute for the full report. The information is provided for your reference and is not intended to be a substitute for the full report.

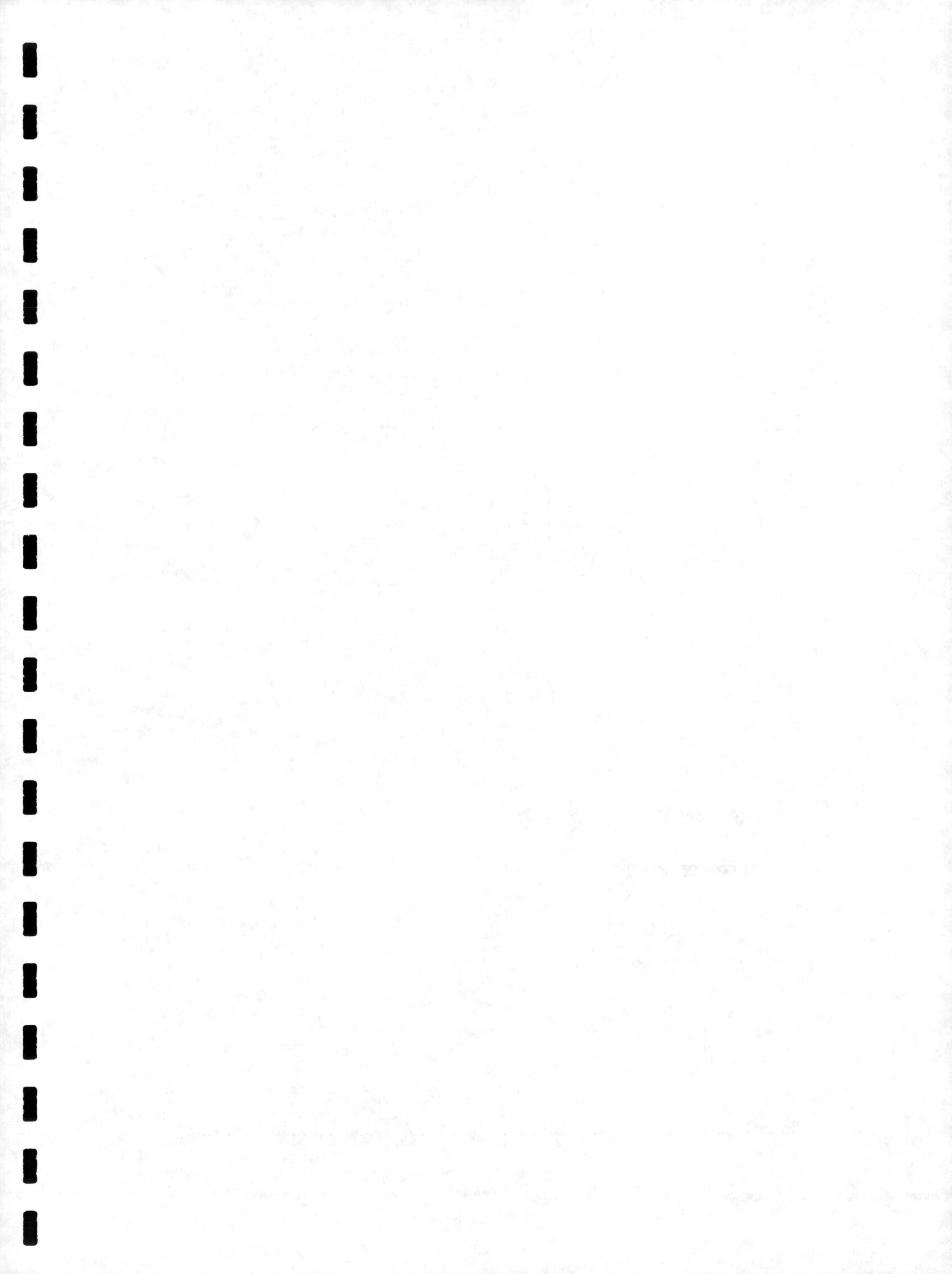
The project is a study of the impact of diversity and inclusion on organizational performance. The study is a quantitative study and is based on data collected from a survey of 1000 employees. The study is a cross-sectional study and is based on data collected from a single point in time. The study is a descriptive study and is based on data collected from a single point in time.

The study is a quantitative study and is based on data collected from a survey of 1000 employees. The study is a cross-sectional study and is based on data collected from a single point in time. The study is a descriptive study and is based on data collected from a single point in time.

The study is a quantitative study and is based on data collected from a survey of 1000 employees. The study is a cross-sectional study and is based on data collected from a single point in time. The study is a descriptive study and is based on data collected from a single point in time.

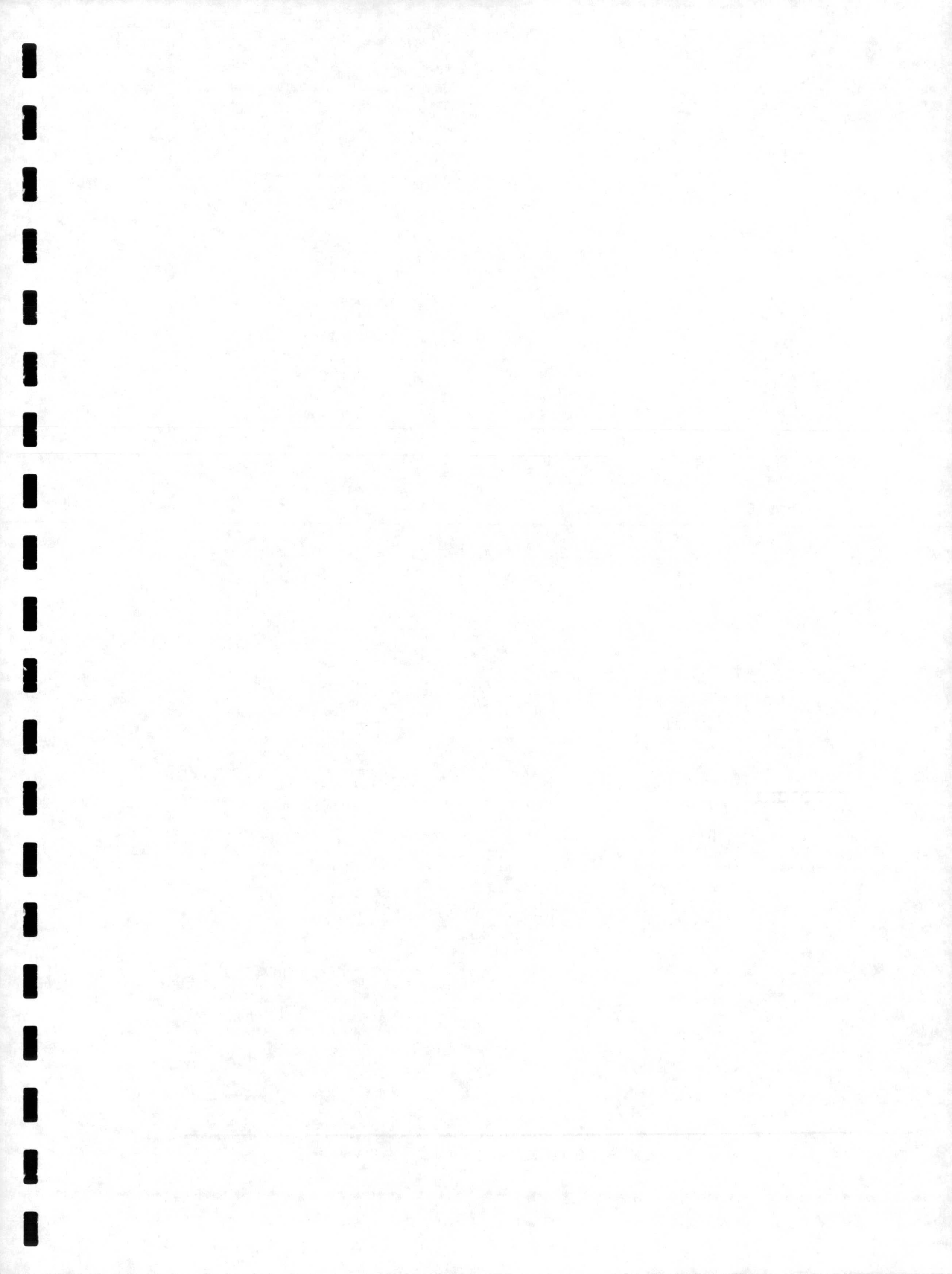
A Khadija.

A mis padres.



INDICE

INDICE



INDICE

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCION | 13 |
| 2.1. PROCESOS ENZIMATICOS DE MAYOR INTERÉS EN LA I.A.A. | 15 |
| 2.2. COMPOSICION Y ESTRUCTURA DEL ALMIDON. | 19 |
| 2.3. FUENTES DEL ALMIDON. | 23 |
| 2.4. HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON. | 25 |
| 2.4.1. Pretratamientos. | 25 |
| 2.4.2. Hidrólisis enzimática. | 30 |
| 2.4.2.1. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1,4)$. | 33 |
| 2.4.2.2. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1,6)$. | 38 |
| 2.4.2.3. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$. | 40 |
| 2.4.3. PROCESOS INDUSTRIALES. | 41 |
| 2.4.3.1. Producción de jarabes de glucosa. | 45 |
| 2.4.3.2. Producción de jarabes de fructosa. | 54 |
| 2.4.3.3. Hidrogenación de jarabes de glucosa. | 63 |
| 2.4.3.4. Obtención de cereales hidrolizados. | 68 |

INDICE

| | |
|--|-----|
| 2.5. CINETICA DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON. | 72 |
| 2.5.1. Hidrólisis enzimática del almidón con amiloglucosidasa. | 73 |
| 2.5.2. Hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa. | 76 |
| 2.5.3. Hidrólisis del almidón con mezclas enzimáticas. | 82 |
| 2.6. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION. | 87 |
| 3. TECNICA EXPERIMENTAL. | 89 |
| 3.1. MATERIALES. | 90 |
| 3.1.1. Sustrato. | 90 |
| 3.1.2. Enzimas. | 91 |
| 3.2. METODOS. | 95 |
| 3.2.1. Determinación de azúcares reductores. | 95 |
| 3.2.1.1. Método de Luff-Schoorl. | 95 |
| 3.2.1.2. Método del DNS. | 100 |
| 3.2.2. Distribución de sacáridos. | 104 |
| 3.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. | 122 |
| 3.3.1. Actividad de la α -amilasa. | 122 |
| 3.3.2. Actividad de la pululanasa. | 126 |
| 3.3.3. Estabilidad térmica de las enzimas. | 128 |
| 3.4. DISPOSITIVO Y TECNICA EXPERIMENTAL. | 131 |

INDICE

| | |
|--|-----|
| 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES. | 136 |
| 4.1. EXPERIMENTOS CINETICOS. | 136 |
| 4.1.1. Influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa, de sustrato y de temperatura. | 137 |
| 4.1.2. Hidrólisis del almidón con mezclas de α -amilasa y pululanasa. | 141 |
| 4.2. DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES. | 143 |
| 5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS. | 150 |
| 5.1. HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON. | 151 |
| 5.1.1. Hidrólisis del almidón con α -amilasa. | 151 |
| 5.1.1.1. Análisis de las velocidades iniciales. | 189 |
| 5.1.1.2. Modelo cinético. | 192 |
| 5.1.1.3. Influencia de la temperatura. | 202 |
| 5.1.2. Cinética de la hidrólisis de almidón con pululanasa. | 208 |
| 5.1.3. Cinética de la hidrólisis del almidón con α -amilasa y pululanasa. | 213 |
| 5.2. DISTRIBUCION DE SACARIDOS EN LOS HIDROLIZADOS | 223 |
| 5.2.1. Influencia de la concentración inicial de α amilasa. | 223 |
| 5.2.2. Influencia de la concentración inicial de sustrato. | 231 |

INDICE

| | |
|---|-----|
| 5.2.3. Utilización de mezclas de α -amilasa y pululanasa. | 236 |
| 5.2.4. Licuación parcial del almidón. | 249 |
| 6. CONCLUSIONES. | 259 |
| 7. NOMENCLATURA. | 265 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 269 |

1. RESUMEN

Los hidrolizados enzimáticos de almidón son ampliamente utilizados en la Industria Agroalimentaria, para la preparación de jarabes de dextrinas, de glucosa y de fructosa, así como para la obtención de cereales hidrolizados destinados a la formulación de papillas lacteadas. En este caso, el factor más importante a considerar es el tamaño medio de los sacáridos y su distribución en el hidrolizado, ya que su digestibilidad y características reológicas y de textura están íntimamente relacionadas con la distribución de tamaños moleculares.

Aunque los hidrolizados de almidón se pueden obtener también mediante hidrólisis ácida o alcalina, la poca selectividad de estos procesos (que usualmente conducen a productos de degradación), la necesidad de una neutralización posterior y el bajo costo relativo de las enzimas, han hecho que, en la actualidad, la mayor parte de los hidrolizados, y no sólo los de almidón, se obtengan por vía enzimática.

En esta memoria se da cuenta de los resultados obtenidos durante la hidrólisis del almidón de harina de trigo tostada durante 1 hora a 150°C. Se han ensayado diferentes tipos de enzimas (α -amilasa y pululanasa) y distintas mezclas enzimáticas de estas hidrolasas. En todo caso se ha procurado que la conversión siempre fuese inferior al 50%, ya que se pretendía

que los componentes mayoritarios en los hidrolizados fuesen maltodextrinas.

Las enzimas utilizadas son preparados comerciales de α -amilasa, FUNGAMYL 800L, y pululanasa, PROMOZYME 200L, suministrados por Novo Industri. La primera de ellas es una endoenzima que hidroliza los enlaces $\alpha(1,4)$ de las cadenas glucosídicas, mientras que la pululanasa es una enzima desramificadora ya que rompe los enlaces $\alpha(1,6)$ de las cadenas de amilopectina. Para ambas hidrolasas se ha determinado su actividad y se ha comprobado su estabilidad térmica, hasta 6 horas de incubación, en las condiciones usuales de operación, pH=5 y T=50°C.

Los experimentos de hidrólisis se han llevado a cabo en un reactor encamisado de 250 mL, con controles de pH, temperatura y grado de agitación. La cinética del proceso se ha seguido determinando, para distintos tiempos de hidrólisis, la concentración de azúcares reductores, expresados como dextrosa equivalente, D.E. La conversión o grado de hidrólisis alcanzado, X, se calcula mediante el cociente entre la concentración de D.E., g/L, evaluada a un tiempo dado, y la concentración potencial de D.E. contenida en el sustrato.

En el estudio cinético realizado con α -amilasa, se ha ensayado, a pH=5, la influencia de las concentraciones iniciales de enzima, E_0 g/L, de sustrato, S_0 g/L, y de la temperatura

sobre la velocidad de la hidrólisis. De los datos experimentales de X-t (a pH=5 y 50°C) se han obtenido las velocidades de hidrólisis mediante el cálculo de las pendientes, dX/dt , utilizando funciones spline cúbicas para el ajuste de los resultados experimentales de X versus t. Estos cálculos han puesto de manifiesto que

$$\frac{dX}{dt} = a \exp(-bX) \quad [1.1]$$

En todos los casos b es aproximadamente constante, mientras que los valores de a aumentan con las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato. Establecida la relación funcional [1.1], ésta se integra y por regresión no lineal se pueden calcular los mejores valores de a y b , evitando de esta forma los errores inherentes al cálculo de las derivadas.

De este estudio se ha obtenido que la conversión alcanzada, X, durante la hidrólisis del almidón de harina de trigo con α -amilasa, se puede calcular en función de las variables de operación, a pH=5 y 50°C, mediante la siguiente ecuación:

$$X = \frac{1}{7.72} \ln [0.072 E_0 \cdot t \cdot S_0^{1/3} + 1] \quad [1.2]$$

Esta expresión pone de manifiesto que el producto $E_0 \cdot t$, a S_0 g/L constante, se puede utilizar como variable intensiva del tratamiento enzimático.

La influencia de la temperatura se pone de manifiesto sobre la variación de a :

$$a = 1.048 \cdot 10^3 \cdot \exp\left(-\frac{3750}{T}\right) \cdot E_0 \cdot S_0^{1/3} \quad [1.3]$$

En cambio los valores de b , a las temperaturas ensayadas son prácticamente constantes, $b=7.72$. De las ecuaciones [1.1], [1.2] y [1.3] se obtiene que la velocidad global de la hidrólisis de harina de trigo con α -amilasa viene dada, a pH=5, por:

$$r = S_0 \frac{dx}{dt} = C_1 \cdot E_0 \cdot S_0^{1.33} \cdot \exp(-bX) \quad [1.4]$$

donde

$$C_1 = 1.048 \cdot 10^3 \cdot \exp\left(-\frac{3750}{T}\right) \quad [1.5]$$

Los experimentos realizados con pululanasa, a pH=5, T=50°C y S₀=210 g/L, ponen de manifiesto que con esta enzima sólo es posible alcanzar conversiones del 6-7%, por lo que se llevaron a cabo ensayos con distintas mezclas de α-amilasa y pululanasa. Los resultados de estos experimentos parecen indicar que no existe un efecto sinérgico apreciable durante la actuación conjunta de ambas enzimas, ya que las conversiones alcanzadas con las mezclas enzimáticas son prácticamente iguales a la suma de las conversiones obtenidas mediante la hidrólisis del almidón con cada una de ellas.

Se ha comprobado que la ecuación [1.1] también es válida para los experimentos realizados con mezclas de α-amilasa y pululanasa. Por tanto, los valores de X, a pH=5 y 50°C, se pueden estimar mediante la ecuación:

$$X = \frac{1}{7.72} \ln [7.72 \cdot a \cdot t + 1] \quad [1.6]$$

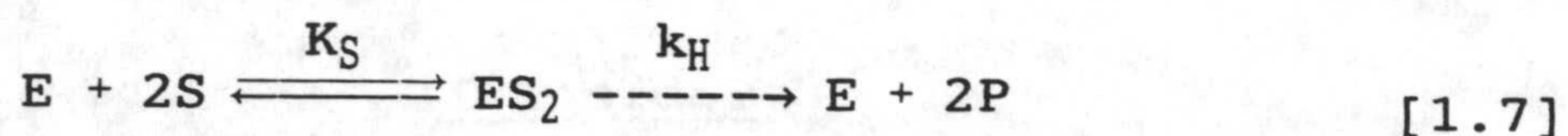
donde a es una función de las concentraciones iniciales de α-amilasa y pululanasa, tabla 1.1. En cambio, b es prácticamente constante e igual a 7.72 .

Tabla 1.1

Variación de a con las concentraciones iniciales de α -amilasa y pululanasa. $S_0=210$ g/L, pH=5 y $T=50^\circ\text{C}$.

| E_1 , g/L | E_0 , g/L | a , h^{-1} |
|-------------|-------------|-----------------------|
| 0.00 | 6.25 | 0.3357 |
| 6.25 | 6.25 | 0.4218 |
| 12.50 | 6.25 | 0.4854 |
| 25.00 | 6.25 | 0.6364 |
| 0.00 | 12.50 | 0.5956 |
| 6.25 | 12.50 | 0.6725 |
| 12.50 | 12.50 | 0.7962 |
| 25.00 | 12.50 | 1.1127 |

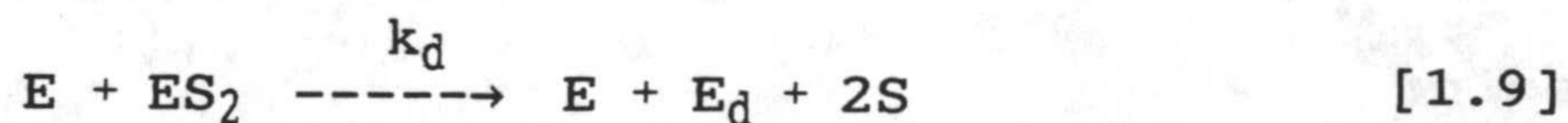
Para explicar los resultados experimentales obtenidos durante la hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa, a pH=5 y 50°C , se propone un modelo cinético que recoge la influencia de las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato. En este modelo se admite que la enzima se une simultáneamente a dos centros activos del sustrato, forma el complejo enzima-sustrato y a continuación se descompone dando lugar a enzima libre y sacáridos de cadena más corta. Es decir:



En [1.7] se admite que la mayor parte de la enzima está en disolución, libre, debido a la escasa superficie externa que presentan los gránulos de almidón y por tanto el fenómeno controlante es la fase heterogénea de la reacción de hidrólisis. En todo caso se supone que el tamaño de los flóculos de almidón y por tanto la superficie externa de las partículas es proporcional a $S_0^{2/3}$. De la ecuación [1.7] y estas hipótesis se deduce que

$$r = r_H \cdot [ES_2] = k_H \cdot K_S \cdot S_0^{1.33} \cdot e \quad [1.8]$$

Para la enzima se supone una desnaturalización de 2º orden provocada por el ataque de la enzima libre a la ligada al sustrato. Es decir:



De acuerdo con [1.9] y las hipótesis anteriores

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot [E] \cdot [ES_2] = k_d \cdot K_S \cdot S_0^{1.33} \cdot e^2 \quad [1.10]$$

Dividiendo [1.10] por [1.8], simplificando e integrando se obtiene que:

$$e = e_0 \cdot \exp(-bX) \quad [1.11]$$

donde

$$b = \frac{k_d}{K_H} \quad [1.12]$$

Por tanto, la velocidad de hidrólisis es:

$$r = k_H \cdot K_S \cdot S_0^{1.33} \cdot e_0 \cdot \exp\left(-\frac{k_d}{k_H} \cdot X\right) \quad [1.13]$$

Ecuación análoga a [1.4] con $b=k_d/k_H$ y $k_H \cdot K_S=C_1$.

Si bien este modelo no se ha aplicado a los experimentos realizados con pululanasa y mezclas enzimáticas, la forma de la ecuación [1.6] sugiere que también podría ser válido para estos ensayos.

Para determinar la distribución de los sacáridos en los hidrolizados se ha puesto a punto una técnica de HPLC que permite detectar azúcares solubles (desde glucosa hasta maltoheptaosa).

Mediante esta técnica se ha estudiado la influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa y de sustrato, a pH=5 y 50°C, sobre la composición de los hidrolizados. Los resultados indican que la distribución de los sacáridos depende de E_0 y S_0 , así como de la conversión alcanzada, X , si bien para una misma E_0/S_0 la distribución de sacáridos, a pH y temperatura constantes, es sólo función de la conversión. También se ha comprobado que en unas mismas condiciones experimentales, el contenido en glucosa y maltosa crece conforme lo hace la relación enzima/sustrato. Este hecho sugiere, como ya se ha puesto de manifiesto en la formulación del modelo cinético, que el fenómeno controlante es la escasa superficie externa de los granos del almidón, sobre los cuales debe fijarse la enzima para liberar cadenas glucosídicas, que pueden ser hidrolizadas, en fase homogénea o pseudohomogénea, a otros sacáridos más pequeños. En todo caso, llaman la atención los altos porcentajes de glucosa en el hidrolizado; este

hecho puede estar relacionado con el carácter comercial de la α -amilasa empleada.

La utilización de mezclas de α -amilasa y pululanasa en distintas proporciones, conduce a hidrolizados en los que la

proporción de glucosa y maltosa aumentan conforme lo hace la concentración inicial de pululanasa. En cambio, disminuye el contenido en dextrinas cuyo grado de polimerización es $D.P > 7$. Este hecho sugiere que la pululanasa hidroliza en fase pseudohomogenea las cadenas de almidón, por ruptura de los enlaces $\alpha(1,6)$, facilitando así la posterior acción de la α -amilasa.

Finalmente, se ha comprobado que la licuación previa del almidón, hasta $X=0.10$, no facilita significativamente la posterior acción de la pululanasa. En cambio, si ésta se acompaña de una gelatinización parcial, se potencia ligeramente la hidrólisis por parte de la pululanasa y se obtienen hidrolizados ricos en dextrinas y de escaso contenido en glucosa. En la siguiente tabla se compara, a título de ejemplo, la composición de distintos hidrolizados obtenidos con α -amilasa, $E_0=12.50$ g/L, con una mezcla de α -amilasa y pululanasa, $E_0=12.50$ g/L y $E_1=25.00$ g/L, y pululanasa, $E_1=6.25$ g/L, que se añade después de gelatinizar el almidón. En todos los casos la conversión es la misma y aproximadamente $X=0.39$.

Tabla 1.2*Composición de distintos hidrolizados.*

| Sacárido | % D.E. | | |
|-----------------------|-----------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | $E_0=12.50$ g/L | $E_0=12.50$ g/L $E_1=25.00$ g/L | Gelatinización $E_1=6.25$ g/L |
| Glucosa | 57.10 | 64.13 | 11.02 |
| Maltosa | 8.50 | 13.42 | 21.91 |
| Sacáridos de D.P=5 | 3.85 | 7.30 | 23.39 |
| Dextrinas D.P>7 | 30.53 | 15.15 | 43.68 |

En esta tabla, se pone de manifiesto que la distribución de sacáridos en los hidrolizados, para una misma conversión, cambia con el tipo de enzima y con los pretratamientos a que se haya sometido el almidón. Por tanto, si se pretende obtener un contenido alto en maltosa y maltodextrinas, parece aconsejable realizar una licuación previa con α -amilasa y a continuación gelatinizar el almidón en presencia de esta enzima.

2. INTRODUCCION

La hidrólisis enzimática de los biopolímeros y de la lactosa, contenidos en los alimentos tiene como objetivo mejorar las características físicas, químicas y organolépticas del alimento original, sin detrimento de su valor nutritivo. Es más, en la mayor parte de los casos se mejora la digestibilidad del alimento. En este sentido los procesos enzimáticos son cada vez más utilizados en la Industria Agroalimentaria para la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos y dietas especiales para lactantes y adultos enfermos. De hecho, la mayor parte de los hidrolizados del almidón disponibles en el mercado son de origen enzimático, *Coker y Van Katasubramanian (1985) y Leloup y col. (1991)*.

La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas, y algunos inconvenientes, frente a los tradicionales métodos ácido y alcalino. Entre ellas, cabe mencionar las siguientes:

- **Selectividad.** Las enzimas suelen ser específicas para un tipo determinado de enlace y por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control, conduce irremediablemente a la existencia de productos de degradación, que incluso pueden llegar a ser tóxicos.

- **Condiciones moderadas de temperatura y pH.** La hidrólisis enzimática transcurre a temperaturas próximas a la ambiente, 40°-60°C, y pH comprendido entre 5-8. Sólo en el caso

de algunas α -amilasas bacterianas, como Thermamyl de Novo, la temperatura supera los 60°C.

- **No se añaden sustancias extrañas.** Evidentemente este hecho no sucede en los procesos de hidrólisis ácida y alcalina, ya que en ambos casos la neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales. Esto suele ser un grave inconveniente sobre todo si el hidrolizado se va a destinar a la preparación de alimentos infantiles, dietéticos y para adultos enfermos.

- **Se mantiene o mejora el valor nutritivo.** Durante la hidrólisis alcalina de proteínas se suelen destruir los aminoácidos arginina y cisteína, mientras que la hidrólisis ácida hace lo propio con el triptófano, que es esencial para el hombre.

En cuanto a los inconvenientes, que en realidad no son tales, el más importante es que siempre es necesario separar o desnaturalizar la enzima, sobre todo en el caso de las proteasas. No obstante, la desnaturalización térmica de las enzimas o su separación por ultrafiltración son temas que están resueltos con la tecnología actual.

2.1. PROCESOS ENZIMATICOS DE MAYOR INTERES EN LA I.A.A.

Los hidrolizados enzimáticos más interesantes desde un punto de vista económico, son aquellos que utilizan como sustrato almidón (de harina de cereales), pectinas y celulosa

(de frutas), lactosa (de leche o del lactosuero) y proteínas. En la tabla 2.1 se indican estos procesos y se resumen las aplicaciones más importantes.

Tabla 2.1

Hidrolizados enzimáticos de mayor interés industrial

| <u>Sustrato</u> | <u>Aplicaciones</u> |
|--|---|
| - Harina de cereales (almidón) | - Nutrición infantil (papillas lácteas) - panadería, bollería - HFCS y bebidas no alcohólicas. |
| - Pectinas y celulosa (frutas) | - Industria de bebidas no alcohólicas y zumos |
| - Lactosa (leche o lactosuero) | - Dietas especiales - Preparación de leches concentradas. - Disminución de la DBO en los efluentes de queserías. |
| - Proteinas (caseina y lactoalbúmina) | - Preparación de dietas especiales para lactan- tes y adultos enfermos |

Los jarabes de dextrinas, de glucosa y sobre todo de fructosa, HFCS, son ampliamente utilizados en la Industria Agroalimentaria. En la actualidad se está trabajando en la obtención de hidrolizados enzimáticos para la preparación de alimentos infantiles, papillas lacteadas. En este caso, el factor más importante a considerar es el tamaño medio y su distribución en el hidrolizado, ya que su digestibilidad y sus características reológicas y de textura, para la formación de papillas, están íntimamente unidas a la distribución de tamaños moleculares.

Las pectinas y celulosa son los constituyentes mayoritarios de la pared celular, de frutos y verduras. Desde un punto de vista químico, las pectinas son heteropolisacáridos constituidos por cadenas de ácido D-galacturónico, a las que se encuentran unidos distintos carbohidratos; galactosa, arabinosa y xilosa, principalmente. La celulosa está constituida por cadenas lineales de glucosa. En ambos casos, un tratamiento con pectinasas y celulasas conduce a un mayor rendimiento de la extracción y los zumos obtenidos se clarifican y estabilizan más fácilmente.

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche y el lactosuero; es un dímero formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa. Su hidrólisis es interesante por las ventajas nutricionales, tecnológicas y medioambientales que proporciona. Respecto al primer punto, los problemas de

intolerancia a la lactosa que presenta una gran parte de la población humana no blanca y entre un 2-15% de los blancos, se eliminan mediante la hidrólisis de la lactosa. En todo caso, es un paso obligado para preparar dietas especiales. Además del problema de intolerancia ya comentado, la presencia de lactosa, tanto en la leche como en el lactosuero, causa dificultades importantes en la producción de leches concentradas y en polvo, debido a su tendencia a cristalizar. Desde un punto de vista medioambiental, es conveniente realizar la hidrólisis de la lactosa en vertidos de queserías y lecherías, para disminuir la DBO, ya que tanto la glucosa como la galactosa son más fácilmente fermentables por microorganismos.

De todas formas, la lactosa es un sacárido de débil poder edulcorante, 20% del correspondiente a la sacarosa, por tanto, su hidrólisis también aumenta esta característica, por lo que se disminuye la adición de sacarosa a los preparados lácteos.

Los hidrolizados de proteínas se utilizan, fundamentalmente, como saborizantes de alimentos y para la preparación de dietas especiales para lactantes y adultos enfermos. Para la primera aplicación, se utilizan generalmente hidrolizados ácidos de soja; para la segunda, la vía utilizada es la hidrólisis enzimática, debido a las características exigidas a estos productos, *Guadix Escobar (1992)*.

2.2. COMPOSICION Y ESTRUCTURA DEL ALMIDON.

El almidón es, junto con la celulosa, la principal sustancia de tipo glucídico sintetizada por los vegetales superiores a partir de la energía solar y es el constituyente principal de los cereales.

El almidón es un polímero de glucosa anhidra, formado por dos sustancias fundamentales: amilosa y amilopectina.

La amilosa es un polímero lineal formado de unidades de D-glucosa unidas por enlaces $\alpha(1,4)$. El contenido en amilosa de los diferentes tipos de almidón oscila entre el 17 y 35% en peso; *Munck y col. (1988)* , *Buléon y col. (1990)*.

La amilosa nativa contiene una mezcla de 500-6000 unidades glucosídicas repartidas en varias cadenas (1-20) de un grado de polimerización medio igual a 500 , *Colonna y Mercier (1984)*.

Debido a su carácter prácticamente lineal y a la presencia casi exclusiva del los enlaces $\alpha(1-4)$, la amilosa es susceptible de complejar las moléculas hidrófobas (yodo, ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas); su capacidad de fijación de iodo es del orden de 20 mg por 100 g de amilosa. Esta propiedad se debe a la conformación en hélice de esta macromolécula, en la cual todos los grupos hidrófilos están orientados hacia el exterior mientras que los grupos hidrófobos lo están hacia el interior. Esto forma una cavidad hidrófoba de un diámetro de 4.6 Å que puede ser ocupada por diver-

esos compuestos. Este fenómeno es la base de caracterización analítica de la amilosa con iodo, **Jhon y col. (1983)**.

La amilopectina es el principal constituyente glucídico del almidón ya que supone entre el 70-80% en peso. Se trata de una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa anhidra (D-glucosa) están principalmente unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ cuando forman parte de cadenas lineales y por enlaces $\alpha(1-6)$ cuando actúan como nexo de unión entre dos cadenas para formar ramificaciones. Los enlaces $\alpha(1-6)$ representan alrededor del 5-10% del número total de enlaces. El peso molecular de la amilopectina oscila entre 10^7-10^8 .

En el modelo establecido por **Hizukuri (1986)**, la amilopectina se presenta como un conjunto de racimos de cadenas cortas unidas a cadenas más largas, figura 2.1. La distribución trimodal establecida ha sido:

- Cadenas cortas de grado de polimerización medio comprendido entre 15 y 20. (S)
- Cadenas largas de grado de polimerización medio comprendido entre 40 y 45. (L)
- Cadenas de grado de polimerización medio superior a 60.

Las diferentes estructuras del almidón están relacionadas con su origen botánico y dependen del cociente L/S, que es del orden de 5 para las amilopectinas de los tubérculos y de 8-10 para las amilopectinas de los cereales. Utilizando la técnica de la difusión de la luz, **Thurn y Blanshard (1985)** confirmaron

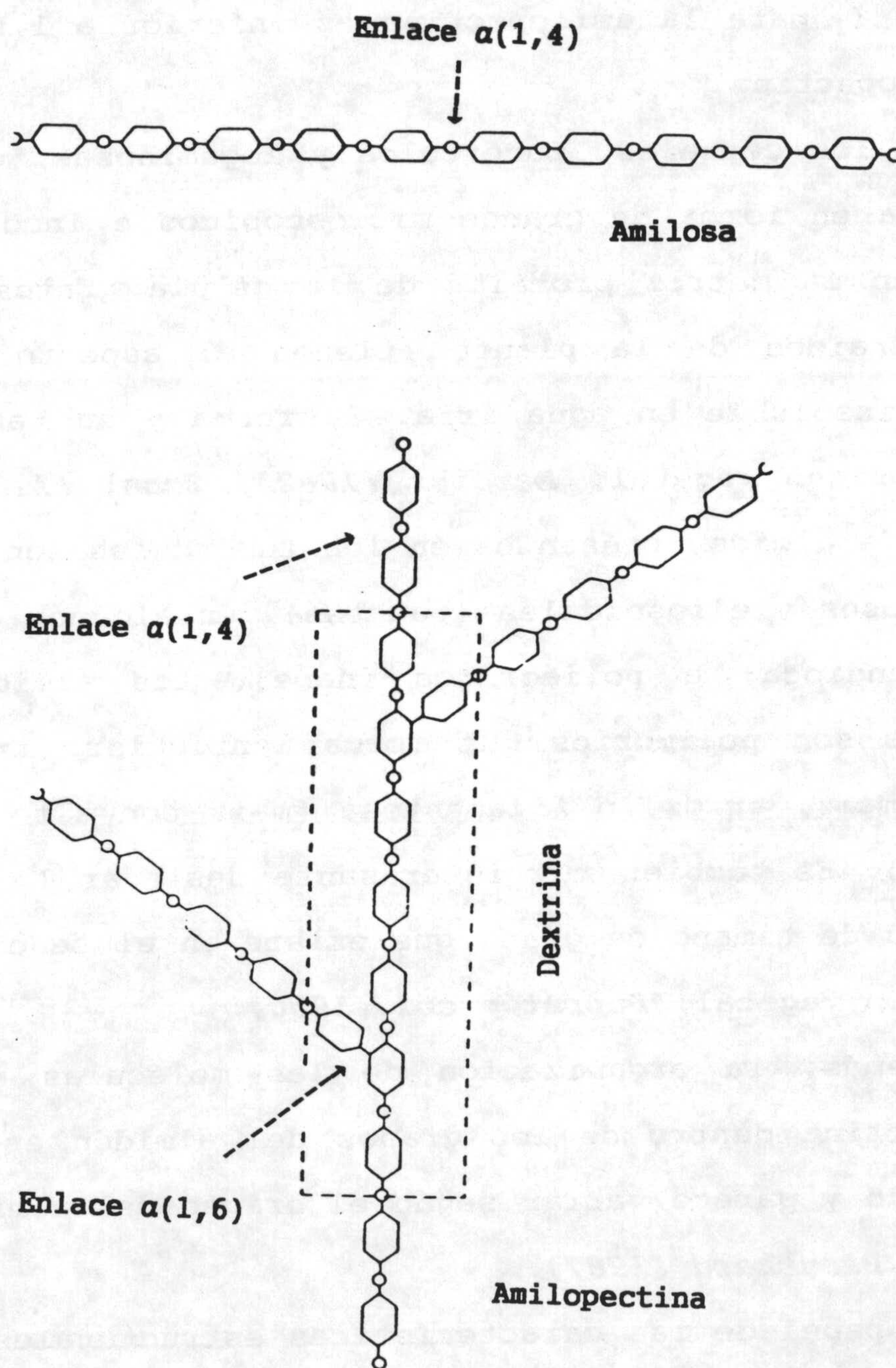


Figura 2.1: Los principales constituyentes del almidón.

este hecho con muy pocas diferencias. La capacidad de fijación de I_2 para la amilopectina es inferior a 1 mg por 100 mg de amilopectina.

En los cereales, tubérculos y leguminosas, el almidón se presenta en forma de granos microscópicos e incoloros dispersados en la matriz protéica de la célula. Estos granos, una vez extraídos de la planta, tienen el aspecto de un polvo blanco insoluble en agua fría. Su forma y su tamaño dependen de su origen vegetal, **Mercier (1982)**, **Zobel (1988)**. Así, los granos de almidón presentes en los tubérculos son generalmente voluminosos y elipsoidales (patatas), en algunos casos esféricos (mandioca) o poliédricos (ñame). Los almidones de los cereales son polimorfos, de forma lenticular (trigo), poliédrica (maíz, arroz) o filamentosa (maíz con alto contenido en amilosa). Es también muy interesante destacar la gran heterogeneidad de tamaño de grano que existe en el seno de una misma población vegetal, **Duprat y col. (1980)**.

Además, la organización de las moléculas de amilosa y amilopectina dentro de los granos del almidón es un tema muy discutido y parece variar según el origen del almidón, **Borglum (1981)**, **Blanshard (1987)**.

El papel de las características estructurales del almidón en la cinética de la licuación enzimática no ha sido estudiado y constituye por lo tanto, un campo muy abierto para la investigación.

2.3- FUENTES DE ALMIDON.

Los cereales, tubérculos y leguminosas constituyen desde hace milenios la fuente principal de alimentos para el hombre ya que son muy ricos en calorías, entre 300-350 cal/100g dependiendo de la variedad, geografía, estaciones, etc., *Vian Ortuño (1976)*, *Mercier (1982)* y *Bruenmer (1991)*, *Hoover (19-91)*. En la tabla 2.2 se indica el contenido medio en almidón para cereales, tubérculos y leguminosas, *Mercier (1982)*.

Tabla 2.2

Contenido en almidón de algunos cereales, tubérculos y leguminosas, Mercier (1982)

| | <u>Almidón (% materia seca)</u> |
|---------------------------|---------------------------------|
| <u>Cereales</u> | |
| Avena | 63-67 |
| Trigo | 67-69 |
| Maíz | 71-74 |
| Arroz | 75-88 |
| Cebada | 65-68 |
| <u>Tubérculos</u> | |
| Patata | 65-85 |
| Ñame | 68-83 |
| Mandioca | 85-87 |
| Boniato | 69-72 |
| <u>Leguminosas</u> | |
| Judías | 30-35 |
| Lentejas | 55-68 |
| Guisantes | 38-43 |
| Habas | 30-43 |

Los cereales pertenecen a la familia de gramíneas y entre ellas los más cultivados son el trigo, el arroz y el maíz, seguidos por la cebada, la avena, el centeno y el mijo; son la fuente más importante de almidón. Los granos de cereales se consumen en su estado natural o bien se utilizan como materia prima para la obtención de numerosos derivados debido a su elevada proporción en almidón. En la tabla 2.3 se muestra la composición media de algunos cereales, *Borglum (1981)*.

Tabla 2.3

Composición en % de peso sobre materia seca de algunos cereales, Borglum(1981).

| | <u>Trigo</u> | <u>Sorgo</u> | <u>Maíz</u> |
|-----------|--------------|--------------|-------------|
| Almidón | 71,5 | 74,1 | 74,4 |
| Proteínas | 9,9 | 11,2 | 14,5 |
| Grasas | 4,8 | 3,7 | 1,9 |
| Cenizas | 12,4 | 9,5 | 2,0 |

La producción mundial de almidón, es actualmente del orden de 20 millones de toneladas, y se extrae esencialmente a partir del maíz (más de 10 millones de toneladas) y de patatas

(entre 2,5 y 3 millones de toneladas). El resto proviene del trigo, arroz, mandioca y sorgo. La producción de la Comunidad Económica Europea, C.E.E., se estima en 3,5 millones de toneladas, es decir un 20 % de la producción mundial.

2.4. HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON.

A la vista de la composición y estructura del almidón, se comprende que para la obtención de hidrolizados a partir de esta materia prima, habrá que realizar pretratamientos para que los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ sean más asequibles a las enzimas, y utilizar las condiciones adecuadas (pH, temperatura, relación enzima/sustrato, etc..) para que éstas hidrolicen la amilosa y la amilopectina, de forma que el proceso sea económicamente viable, *González Tello y col. (1989)*.

2.4.1- Pretratamientos:

Los pretratamientos que se pueden hacer sobre el grano de almidón son de tipo físico cuando se actúa sobre su estructura (molienda, compresión, etc..), y de tipo químico cuando se degradan los granos hacia los constituyentes del almidón, es decir amilosa y amilopectina.

Mediante estos pretratamientos, se pretende destruir la organización granular del almidón y por tanto, obtener una

materia prima de mayor superficie específica y menor cristalinidad que es más fácilmente atacable por las enzimas.

Uno de los pretratamientos más eficaces consiste en un calentamiento del grano a presiones elevadas durante un corto período de tiempo, seguido de una descompresión súbita. Esta técnica se denomina H.T.S.T. (High Temperature, Short Time), *Williams, (1977)* y presenta la ventaja de romper el grano de almidón en un estado relativamente poco hidratado (menos del 40 % de agua), lo que reduce la energía consumida para efectuar el secado del producto final, *Linko y col. (1981)*.

Un pretratamiento muy utilizado, sobre todo cuando se pretende preparar papillas infantiles, consiste en la tostación de las harinas a unos 150°C durante 1 h. Así, se mejora la calidad bacteriológica, se desactivan los complejos enzimáticos propios de las harinas y se modifica el sabor. Este último factor es especialmente importante desde el punto de vista organoléptico, ya que la mayoría de los almidones no tratados presentan un sabor característico a crudo "Raw Cereal" que desaparece durante la cocción y puede sustituirse por otros sabores.

La gelatinización corresponde a los fenómenos de hinchamiento irreversible y de solubilización observados cuando los granos de almidón se calientan a unas temperaturas superiores a 60°C en presencia de exceso de agua. Los granos pierden progresiva y simultáneamente su cruz de polarización y su

cristalinidad. La solubilización del almidón conduce a la destrucción parcial de la estructura granular dependiendo de la especie botánica y del tipo cristalino del almidón nativo.

Así, en el caso del almidón de la patata, los fenómenos de hinchamiento por adsorción de agua y de solubilización de macromoléculas (principalmente amilosa) son simultáneos. En cambio, los almidones de los cereales se caracterizan por una primera etapa de hinchamiento, a la temperatura de gelatinización, seguida de un segundo hinchamiento a 90°C que produce una solubilización más intensa del contenido granular.

Durante la gelatinización del almidón se producen cambios morfológicos, se reduce la cristalinidad y disminuye la viscosidad, y por tanto es más asequible al ataque enzimático, *Zeleznek y Hosney (1987)*.

El proceso de gelatinización puede seguirse mediante un microscopio polarizante, observando la evolución de la birrefringencia con la temperatura. La temperatura de gelatinización se define como la temperatura de pérdida de birrefringencia; esta temperatura depende de la fuente botánica del almidón, tabla 2.4. El grado de gelatinización se determina por el método de *Wooton y col. (1980)* y se expresa como porcentaje gelatinizado respecto a una gelatinización completa.

Después de las etapas de gelatinización el almidón adquiere una estructura mucho más asequible para las enzimas. Por eso, la gelatinización se ha utilizado como técnica para convertir el almidón a maltodextrinas y glucosa. Sin embargo,

esta operación requiere un gran consumo de energía (30% de la energía requerida para la fermentación alcohólica); *Ueda (1981)*.

Tabla 2.4

Rangos de gelatinización de algunos almidones

| <u>Fuente de almidón</u> | <u>Temperatura de gelatinización</u> <u>(°C)</u> | | |
|----------------------------|---|--------------------|--------------|
| | <u>Inicio</u> | <u>Punto medio</u> | <u>Final</u> |
| Maíz | 62 | 66 | 70 |
| Maíz con 55% de amilosa | 63 | 68 | 72 |
| Sorgo | 68 | 73.5 | 78 |
| Arroz | 51.5 | 57 | 59.5 |
| Trigo | 59.5 | 62.5 | 64 |
| Patata | 58 | 62 | 66 |
| Tapioca | 52 | 59 | 64 |

Las soluciones coloidales de almidón obtenidas por tratamientos térmicos a temperaturas del orden de 100°C, en presencia de agua, son inestables a temperatura ambiente. Durante el

enfriamiento, las macromoléculas de amilosa y amilopectina se reorganizan dando lugar al fenómeno de retrogradación. Cuando la concentración en polímeros es suficiente (1,5% para la amilosa y 10% para la amilopectina), hay formación de un gel blanco y opaco. Por tanto, este fenómeno llamado gelificación del almidón es debido a una bajada de temperatura que induce una disminución de la solubilidad de los polímeros presentes, *Morris (1990), Buléon (1990) y Batey (1991)*. Los geles así obtenidos tienen estructuras tridimensionales y porosas, *Leloup y col. (1990)*.

Esquemáticamente, los geles se forman a partir de una matriz continua de uno de los polímeros que retienen gotitas del otro polímero. La composición de cada una de las dos fases depende principalmente del grado de gelatinización (parcial/total) y de la relación amilosa/amilopectina en el grano de almidón.

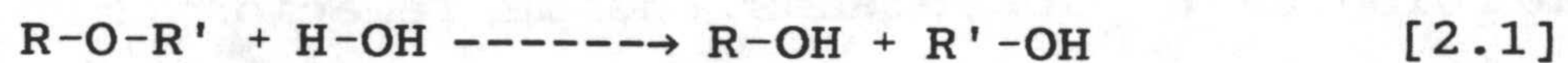
En definitiva, las características del gel de almidón dependen entre otros factores, del tamaño, de la estructura morfológica de los granos, de la relación amilosa/amilopectina, de la temperatura y del tiempo de cocción. *Tester(1990), LeLoup (1991)*.

La descripción de las modificaciones químicas del almidón y de las nuevas propiedades resultantes han sido publicadas por *Fleche (1979)* y posteriormente por *Tian y col. (1990), Light (1990) y Shimashita (1990)*.

2.4.2- Hidrólisis enzimática.

Hasta 1960, la ruptura de los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ del almidón para preparar maltodextrinas y glucosa a escala industrial se realizaba únicamente por vía química. Sin embargo, cuando ésta es intensa, va acompañada de una destrucción parcial del almidón que conduce a productos coloreados, de sabor amargo y difícilmente cristalizables. Aunque en esa misma época, también se utilizaban algunas enzimas de origen vegetal (provenientes de la malta por ejemplo), fue el descubrimiento de las enzimas microbianas y el desarrollo de las técnicas de extracción, purificación e inmovilización de enzimas lo que ha modernizado la industria de los derivados de almidón.

Las enzimas responsables de la degradación del almidón se llaman Glucosil Hidrolasas, y su acción irreversible sobre un sustrato se puede esquematizar como sigue:



donde R y R' son cadenas que contienen de 1 a n moléculas de glucosa anhídrica.

La hidrólisis enzimática debe romper los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ presentes en el almidón para liberar cadenas más cor-

tas: dextrinas, maltosa y glucosa. Por tanto, deben utilizarse enzimas específicas para cada uno de estos enlaces. En la tabla 2.5 se muestran las principales características de las enzimas utilizadas en la hidrólisis del almidón. En esta tabla se pone de manifiesto que existen enzimas específicas de los enlaces $\alpha(1,4)$, para los $\alpha(1,6)$ y otras que atacan por igual a los dos tipos de enlaces.

tabla 2.5

Características de las enzimas utilizadas en la hidrólisis del almidón, Mercier (1982).

| Enzima | Origen | pH | Tipo de enlace | Tipo de ataque | Productos terminales | |
|----------------------------------|---|-----|-------------------------------------|----------------|----------------------|------------------|
| | | | | | Amilosa | Amilopectina |
| α -amilasa E.C.3.2.1.1 | A.oryzae | 6.0 | $\alpha(1,4)$ | Endo | Glucosa | Dextrinas |
| | B.subtilis | 6.5 | | | Maltosa | |
| | B.licheniformis | | | | | |
| β -amilasa E.C.3.2.1.2 | Microbiano | 5.0 | $\alpha(1,4)$ | Exo | Maltosa | Maltosa |
| | | 7.5 | | | Glucosa | Dextrinas |
| Pululanasa E.C.3.2.1.41 | Microbiano | 6.0 | $\alpha(1,6)$ | Endo | Ninguno | Cadenas lineales |
| Isoamilasa E.C.3.2.1.60 | Microbiano | 3.5 | $\alpha(1,6)$ | Endo | Ninguno | Cadenas lineales |
| Amiloglucosidasa E.C.3.2.1.3 | Microbiano (Rhizopus y Aspergillus) | 4.5 | $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$ | Exo | Glucosa | Glucosa |

2.4.2.1- Enzimas específicas del enlace $\alpha(1-4)$.

Se llaman genéricamente Amilasas y han sido clasificadas en α y β amilasas por *Khun (1925)*. Las α -amilasas E.C.3.2.1.1 liberan productos de reacción que tienen el grupo -OH situado en el C₁ en configuración α , mientras que el grupo -OH de los productos de reacción liberados por las β -amilasas E.C.3.2.1.2 se encuentra en configuración β .

Las α -amilasas son las más utilizadas a escala industrial y son enzimas cuyo origen puede ser vegetal, animal y microbiano. Se caracterizan por hidrolizar al azar los enlaces $\alpha(1-4)$ presentes en las cadenas de amilosa y amilopectina produciendo como sustancias terminales, en el primer caso, glucosa y maltosa, y en el segundo, además de los sacáridos anteriores, cadenas más o menos ramificadas llamadas α -dextrinas límites; *Mercier (1985), Leloup y col. (1990)*.

Las α -amilasas atacan las cadenas de almidón al azar y nunca por sus extremos, lo que permite clasificarlas como endoenzimas.

Las α -amilasas comerciales pueden ser de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens*, etc..) o de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*, *A. niger*, etc..). Las enzimas de origen bacteriano suelen ser más termoestables que las de origen fúngico. Por ejemplo, el preparado *THERMAMYL*, de Novo Industri, obtenido a partir de *B. liche-*

niformis tiene una temperatura óptima de operación de 95°C, mientras que las α -amilasas comercializadas por Miles, M.K.C P-5000, obtenidas a partir de *A. oryzae* presentan su máxima actividad a 50°C, **catálogo Novo Industri, catálogo Miles, Hasen (1985)**.

Hasta 1971, la única endo-amilasa que se utilizaba comercialmente era la obtenida a partir de *B. amiloliquefaciens*. Años después, se ha podido aislar cepas del *B. licheniformis*, **Madsen y col. (1973)**, que producen α -amilasas más termoestables y que han sido introducidas rápidamente en los procesos industriales por ser más activa en un intervalo de pH más amplio y por presentar una estabilidad térmica menos dependiente de los iones de calcio (Ca^{2+}) que la proveniente de *B. amiloliquefaciens*.

Otra endo-amilasa bacteriana que podrá tener un papel muy importante es la producida por una especie de *Clostridium* y que ha sido aislada por **Avendaño y Cornejo (1987)**. Es una α -amilasa capaz de hidrolizar (licuar) el almidón a 30°C, lo que destaca su gran interés desde el punto de vista energético.

Las α -amilasas termolábiles de origen fúngico se utilizan fundamentalmente para la obtención de productos que contienen unas proporciones elevadas en maltosa, **Barfoed (1976)**. La enzima de este tipo más utilizada a nivel industrial es la obtenida a partir de *A. oryzae*. La utilización de enzimas termoestables presenta muchas ventajas; entre ellas eliminan riesgos de contaminación por microorganismos y disminuyen la

viscosidad del medio ya que actúan a altas temperaturas. Sin embargo, las α -amilasas fúngicas son más eficaces cuando no es necesario gelatinizar anteriormente el almidón además de que ofrecen la posibilidad de trabajar a bajas temperaturas.

Las β -amilasas son exo-enzimas que atacan las cadenas de almidón por sus extremos no reductores; convierten las cadenas de amilosa en β -maltosa, si estas cadenas contienen un número par de unidades de glucosa anhidra, mientras que los productos de reacción son β -maltosa y glucosa cuando es impar el número de glucosa anhidra.

Las β -amilasas se extraían tradicionalmente a partir de vegetales (cebada, boniato); sin embargo a partir de 1974, se preparan fundamentalmente, de microorganismos tales como: *B. polymxa*, *B. megaterium*, *B. cereus* y ciertas especies de *Streptomyces* y *Pseudomonas*, **Mercier (1982)**.

Estas β -amilasas bacterianas, presentan múltiples ventajas frente a las β -amilasas vegetales. Producidas en mayores cantidades por el microorganismo, pueden ser fácilmente purificadas y actúan a temperaturas entre 60 y 70°C y a un pH comprendido entre 7 y 7.5, más elevado que el de sus equivalentes vegetales. Estas condiciones favorables para la industrialización han hecho que la Industria Japonesa comenzara a utilizar las β -amilasas bacterianas para desarrollar nuevos azúcares. Sin embargo, en otros países como Francia, el uso de este tipo de enzimas, que provienen de microorganismos consi-

derados como patógenos, estaba prohibido por la legislación, *Mercier (1982)*.

Recientemente, se han aislado otras exo-enzimas capaces de producir oligosacáridos específicos como maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa y maltohexaosa, *Buléon y col. (1990)*. No obstante, la acción de todas estas exo-enzimas se bloquea cuando encuentran un enlace $\alpha(1-6)$ por lo que el producto residual resultante del ataque de la amilopectina, llamado β -dextrina límite y que tiene un alto peso molecular, representa alrededor del 50 % del producto inicial.

Las β -amilasas se utilizan en la producción de jarabes ricos en maltosa, productos muy apropiados para la industria confitera y cervecera debido a su concentración elevada en azúcares. Además, los jarabes de maltosa pueden sustituir a la glucosa en la alimentación intravenosa, siendo apropiados para los diabéticos por el hecho de que no aumentan el nivel de glucosa en la sangre. En la tabla 2.6 se recogen los principales microorganismos para la producción de α -amilasa y β -amilasa.

Tabla 2.6

Principales microorganismos productores de α -amilasas y β -amilasas, Avendaño y Cornejo (1988).

| <u>Microorganismos productores de α-amilasas.</u> | <u>Microorganismos productores de β-amilasas.</u> |
|---|--|
| Aspergillus ustus | B. megaterium sensu stricto. |
| B. amiloliquefaciens. | B. polymxa. |
| Bacillus coagulans | Bacillus 2718. |
| Bacillus licheniformis | C. thermosulfurogenes. |
| B. licheniformis CUMC 305 | Emericella nidulans. |
| B. megaterium | Thermoactinomyces sp. |
| B. mesentericus | |
| B. opiacus CBML-152 | |
| B. stearothermophilus | |
| B. thermoamyloliquefaciens | |
| Clostridium 2021 | |
| Clostridium sp.RS-0001 | |
| Clostridium butyricum | |
| Escherichia coli | |
| Lactobacillus cellobiosus | |
| Lipomyces kononenkone | |
| Lipomyces starkeyi | |
| Saccharomyces diastasicus | |
| Schwanniomyces alluvius | |
| Schwanniomyces castellii | |
| Streptomyces limosusf | |
| Thermoactinomyces sp. | |

2.4.2.2. Enzimas específicas del enlace $\alpha(1,6)$

Las enzimas desramificantes más importantes son la *pululanasa* (E.C.3.2.1.41) descubierta por **Bender y Walenfels (1961)** a partir de un cultivo de *Enterobacter aerogenes* y la *isoamilasa* (E.C.3.2.1.68) descubierta por **Harada y col. (1968)** en Japon y **Whelan y col. (1970)** en Estados Unidos a partir de cultivos de *Pseudomonas* y *Citofaga* respectivamente. Sus parámetros de actividad óptima están situados a pH = 5-6,5 y T= 40-50°C. La pululanasa hidroliza la amilopectina del almidón, pero es incapaz, debido a su volumen hidrodinámico, de hidrolizar completamente el glucógeno (polímero de reserva dos veces más ramificado que la amilopectina). La *isoamilasa* tiene una especificidad complementaria a la pululanasa ya que desramifica tanto al glucógeno como a la amilopectina. Ambas enzimas complementan al 100 % las acciones dextrinizantes y sacarificantes de las α y β -amilasas cuando actúan sobre el almidón consiguiendo hidrolizados con alta conversión en maltosa. Esta complementaridad de actividad enzimática ha sido aprovechada desde 1974 por la Sociedad Hayashibara en Japón, para la producción industrial de maltosa y jarabes ricos en maltosa. En la tabla 2.7 se muestran las principales microorganismos productores de enzimas desramificantes.

Tabla 2.7

Principales microorganismos productores de enzimas desramificantes, Avendaño y Cornejo (1988).

| <u>Microorganismos productores de isoamilasa y pululanasa</u> | <u>Microorganismos productores de glucoamilasas.</u> |
|---|--|
| B. megaterium | A. Awamonie |
| B. Stearothermophilus | A. niger |
| C. thermohydrosulfuricum | Aspergillus saltoi. |
| Endomycopsis | Aspergillus sp. K 27 |
| Filobasidium capsuligenum | Aspergillus sp. N 2 |
| Pseudomonas sp. | Aspergillus ustus. |
| Trichosporon | C. thermohydrosulfuricum. |
| | Endomycopsis filibuligera |
| | Flavabacterium sp. |
| | Lipomyces kononekone. |
| | Rhizopus sp. |
| | Saccharomyces cerevisiae. |
| | Scwanniomycetes castellii. |

2.4.2.3- Enzimas específicas de los enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$

El descubrimiento en los años cincuenta y sesenta de enzimas microbianas capaces de hidrolizar los dos tipos de enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$ ha mejorado la industria del almidón, ya que la comercialización de estas enzimas, a partir de 1960, permitió la producción industrial de dextrosa o D-glucosa por vía enzimática en vez del proceso clásico de hidrólisis ácida.

Estas enzimas se denominan *Amiloglucosidasas* (E.C.3.2.1-.3) o *Glucoamilasas*. Son exo-enzimas que tienen una actividad óptima a pH = 4,5-5 y T = 50-60°C y liberan β -D-glucosa por hidrólisis repetitiva de los enlaces glucosídicos empezando por sus extremos no reductores, *Mercier (1982)*, *Ducroo (1982)*.

Proviene de microorganismos del género *Rhizopus* y *Aspergillus*, tabla 2.7, y por su forma de actuar, aunque varía según el origen de estas enzimas, parece ser que tienen más facilidad para unirse a las cadenas largas que a las cortas e hidrolizan antes los enlaces $\alpha(1-4)$ que los enlaces $\alpha(1-6)$ aunque pueden hidrolizar ambos.

2.4.3 Procesos industriales

La utilización a escala industrial de las diferentes enzimas amilolíticas en la hidrólisis de almidón, ha permitido la producción de jarabes cuyas propiedades y características dependen de las enzimas utilizadas, de su concentración y del tiempo de hidrólisis. Los productos de hidrólisis del almidón se caracterizan por la cantidad de dextrosa equivalente, D.E, parámetro que corresponde a la cantidad de azúcares reductores expresados como D.E / cantidad total de oligosacáridos.

Así, la D.E de los jarabes de maltodextrinas es inferior a 20 y la de los jarabes de glucosa está comprendida entre 20 y 97 ($20 < D.E < 97$). No obstante, esta definición no aporta ningún dato acerca de la composición en sacáridos. Así, dos productos de hidrólisis obtenidos por procesos tecnológicos distintos (ácido y enzimático) pueden tener la misma D.E pero diferencias notables en su composición, *Buléon y col. (1990)*, *Nouri (1991)*, tal como se muestra en la tablas 2.8, 2.9 y en algunas de sus propiedades físicas como la viscosidad, figura 2.2.

La hidrólisis industrial del almidón comprende tres etapas sucesivas:

- La licuación o dextrinización (producción de dextrinas).

- La sacarificación (producción de jarabes de glucosa).
- La isomerización (producción de fructosa).

Tabla 2.8

Composición en sacáridos de algunos jarabes de glucosa obtenidos en condiciones diferentes.

| | Conversión. ácida | Conversión. enzimática |
|--------|----------------------|---------------------------|
| DE | 28,0 | 28,0 |
| C-1 | 8,0 | 3,0 |
| C-2 | 7,5 | 9,5 |
| C-3 | 7,0 | 10,0 |
| C-4 | 7,0 | 7,5 |
| C-5 | 6,5 | 9,5 |
| C-6 | 6,0 | 15,0 |
| C-7 | 5,5 | 6,0 |
| C-8 | 5,0 | 2,5 |
| C-9 | 3,5 | 1,5 |
| C10-20 | 20,0 | 7,0 |
| >C-20 | 24,0 | 29,0 |

Tabla 2.9
Composición de algunos jarabes de glucosa.
McDonald (1984).

| Tipo de jarabe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | Altos sacáridos |
|------------------------------|------|------|------|------|-----------------|
| DE=42 Conversión ácida | 18.5 | 14.5 | 12.0 | 10.0 | 45.0 |
| DE=42 ácido/enzima | 5.9 | 44.4 | 12.9 | 3.3 | 33.7 |
| DE=42 Enzima/enzima | 2.5 | 58.0 | 18.0 | 2.0 | 19.5 |

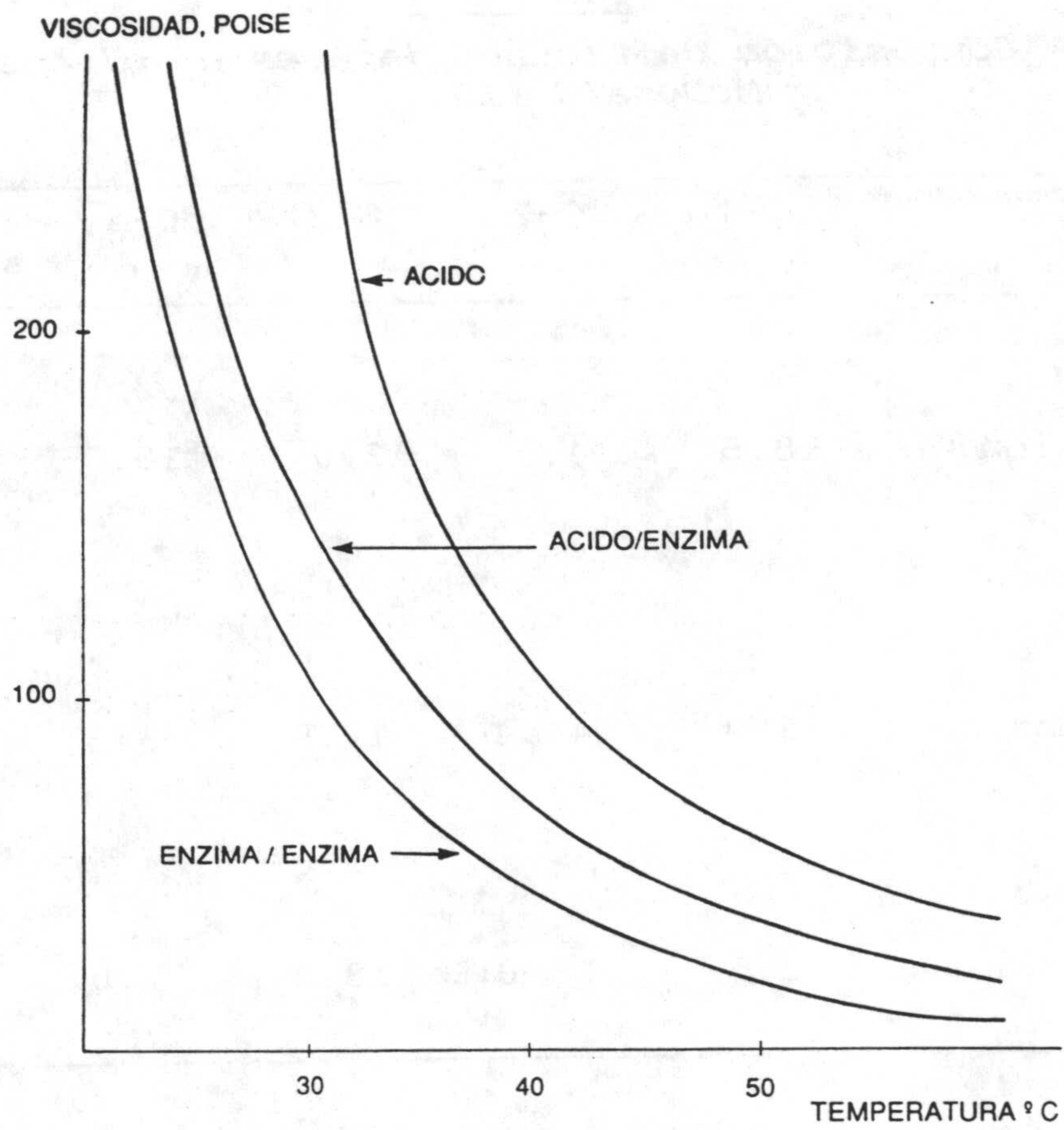


Figura 2.2. Viscosidades de jarabes de glucosa (D.E=42) obtenidos por diferentes métodos de conversión, Howling (1979).

2.4.3.1 Producción de jarabes de glucosa.

Industrialmente, la hidrólisis del almidón para la obtención de jarabes de glucosa se lleva a cabo en dos etapas, *Reilly (1985), Joglekar y col. (1983)*: licuación y sacarificación.

Licuación del almidón

Mediante este proceso se obtienen jarabes cuya cantidad en Dextrosa Equivalente (D.E) debe estar comprendida entre el 8 y 12%, *Lee y Kim, (1990)*. En la figura 2.3 se esquematizan las diversas posibilidades que pueden utilizarse para la licuación del almidón.

La licuación se ha realizado durante muchos años mediante un tratamiento ácido a temperaturas elevadas ($\text{pH} = 2$; $T = 140-150^{\circ}\text{C}$); así se consigue la gelatinización completa del almidón y la obtención de un hidrolizado de viscosidad reducida, *Battacharya y Hanna, (1987)*. Sin embargo, cuando la hidrólisis es intensa, este tratamiento ácido destruye parcialmente los componentes del almidón, lo que conduce a la formación de productos coloreados, de sabor amargo y difícilmente cristalizables. Además, los procesos de neutralización finales aumentan el contenido en sales, lo que supone un gran inconveniente especialmente cuando se trata de utilizar los productos de

hidrólisis para la preparación de alimentos dietéticos e infantiles, *González Tello y col. (1989)*, *Nouri (1991)*.

Para obviar en lo posible estos inconvenientes, la licuación se puede realizar mediante una clarificación ácida, pretratamiento a pH=2 y 140°C, seguido de una dextrinización con una α -amilasa termoestable. Este proceso se recoge en la figura 2.3 como ácido/enzima.

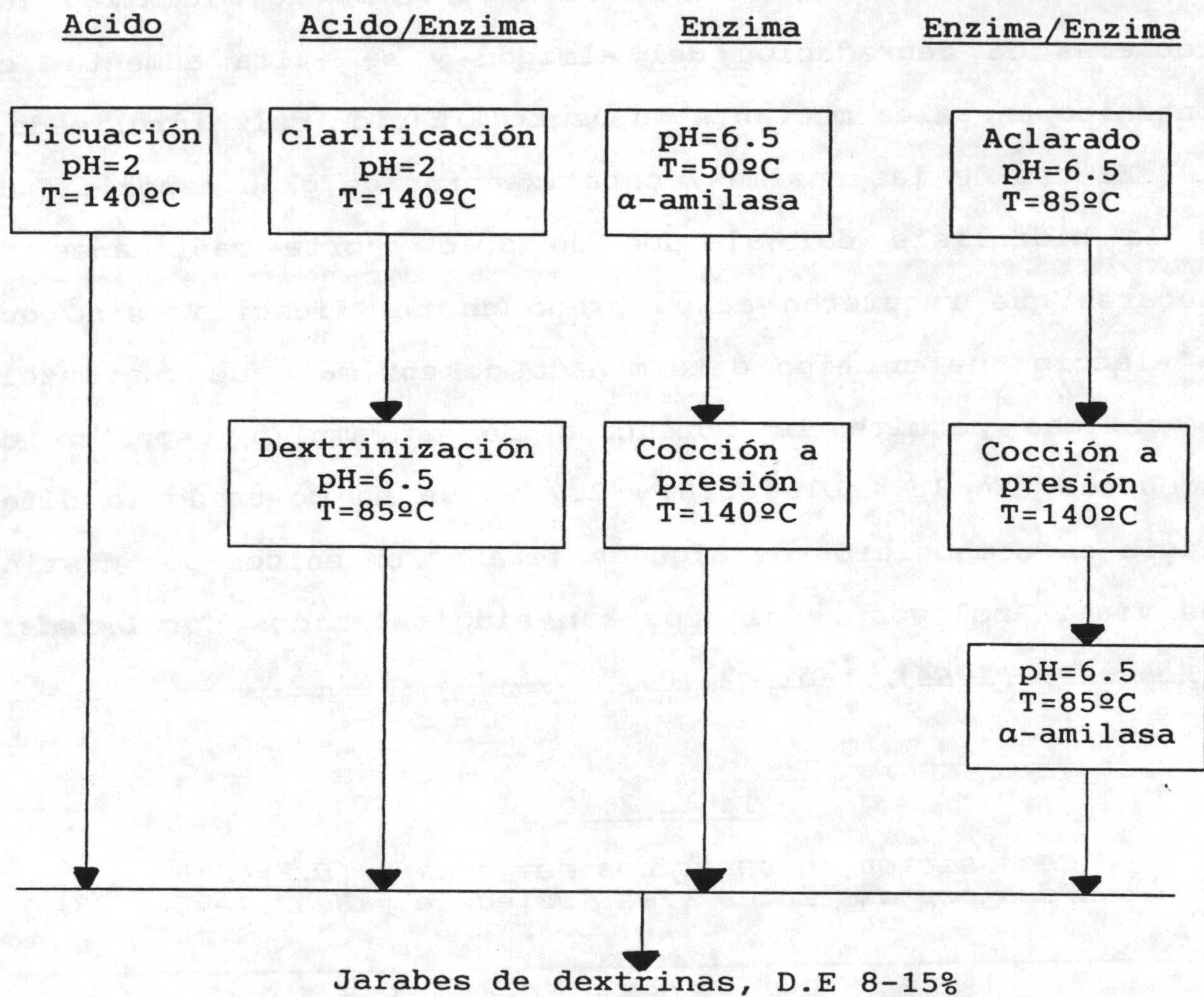


Figura 2.3. Procesos de licuación.

Los métodos que utilizan α -amilasa, en una o dos etapas son los más empleados, sobre todo desde el advenimiento de enzimas termoestables, ya que de esta forma se minimizan los problemas de degradación del almidón y se evita aumentar el contenido en sales mediante la neutralización del hidrolizado.

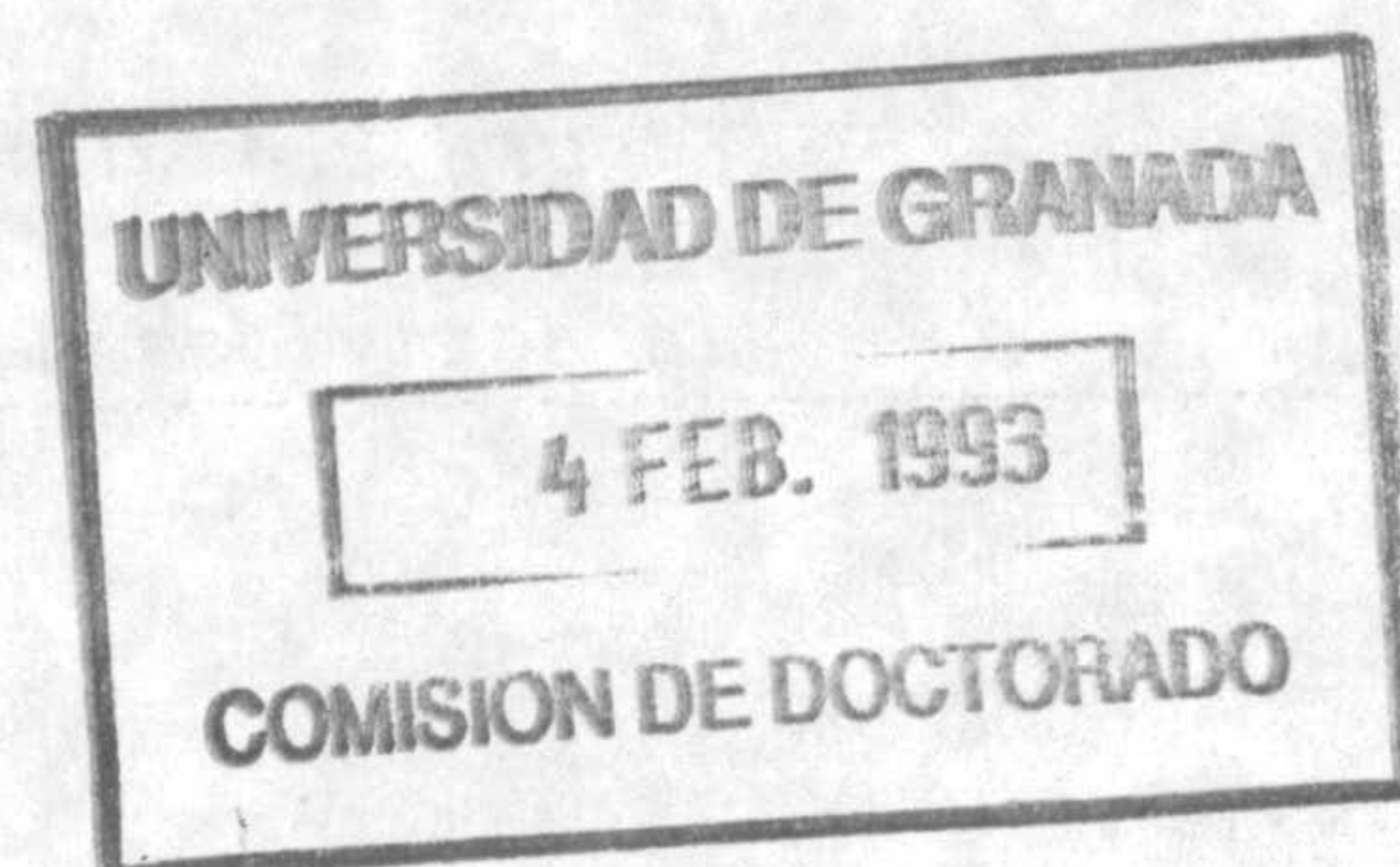
El uso de las enzimas, catalizadores de gran especificidad, en la hidrólisis del almidón no sólo aporta cantidades de azúcares que requieren menos grado de purificación, sino que la elección de un tipo determinado de enzima o de una mezcla de enzimas permite la obtención de un amplio espectro de productos. En la tablas 2.8 y 2.9 ya se ha mostrado la diferencia en composición de algunos jarabes obtenidos por distintas vías. Análogos resultados han sido obtenidos por *Dziedzic y Kearsley (1984)*, tabla 2.10.

Tabla 2.10

Composición en sacáridos de jarabes (D.E=42) obtenidos por distintas vías. Dziedzic y Kearsley (1983)

| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | Altos sacáridos |
|-----------------------------|------|------|------|------|-----|-----|--------------------|
| Conversión ácida | 19.0 | 14.0 | 12.0 | 10.0 | 8.0 | 7.0 | 30.0 |
| Conversión ácido/enzima | 6.0 | 45.0 | 12.0 | 3.0 | 2.0 | 2.0 | 30.0 |
| Conversión enzima/enzima | 2.5 | 56.0 | 16.0 | 0.7 | 0.4 | 0.7 | 23.7 |

El único inconveniente de la utilización de las α -amilasas como agente de clarificación radicaba en que estas últimas presentaban una estabilidad térmica limitada. Para remediar este problema, se recurrió a un tratamiento combinado ácido/enzima, es decir prehidrolizar la suspensión con ácidos y dextrinizarla con α -amilasas bacterianas. Sin embargo, la comercialización de la α -amilasa (*THERMAMYL*) proveniente de cepas del *B. licheniformis* supuso un avance importante en la fabricación de jarabes de glucosa ya que se paliaron los problemas relacionados con la estabilidad térmica de las enzimas. Mediante estas enzimas termoestables, es posible tanto licuar como sacarificar las disoluciones de almidón en una sólo etapa a alta temperatura y tiempos cortos, consiguiendo una mejor productividad y más ahorro energético, *Lee y Kim. (1990); Brooks y Griffin, (1987)*. En la figura 2.4 se muestra la estabilidad térmica de los dos tipos de α -amilasa; la proveniente del *B. licheniformis* es la que presenta mayor estabilidad a temperaturas de 110-115°C, suficientes para gelatinizar todos los tipos de almidón.



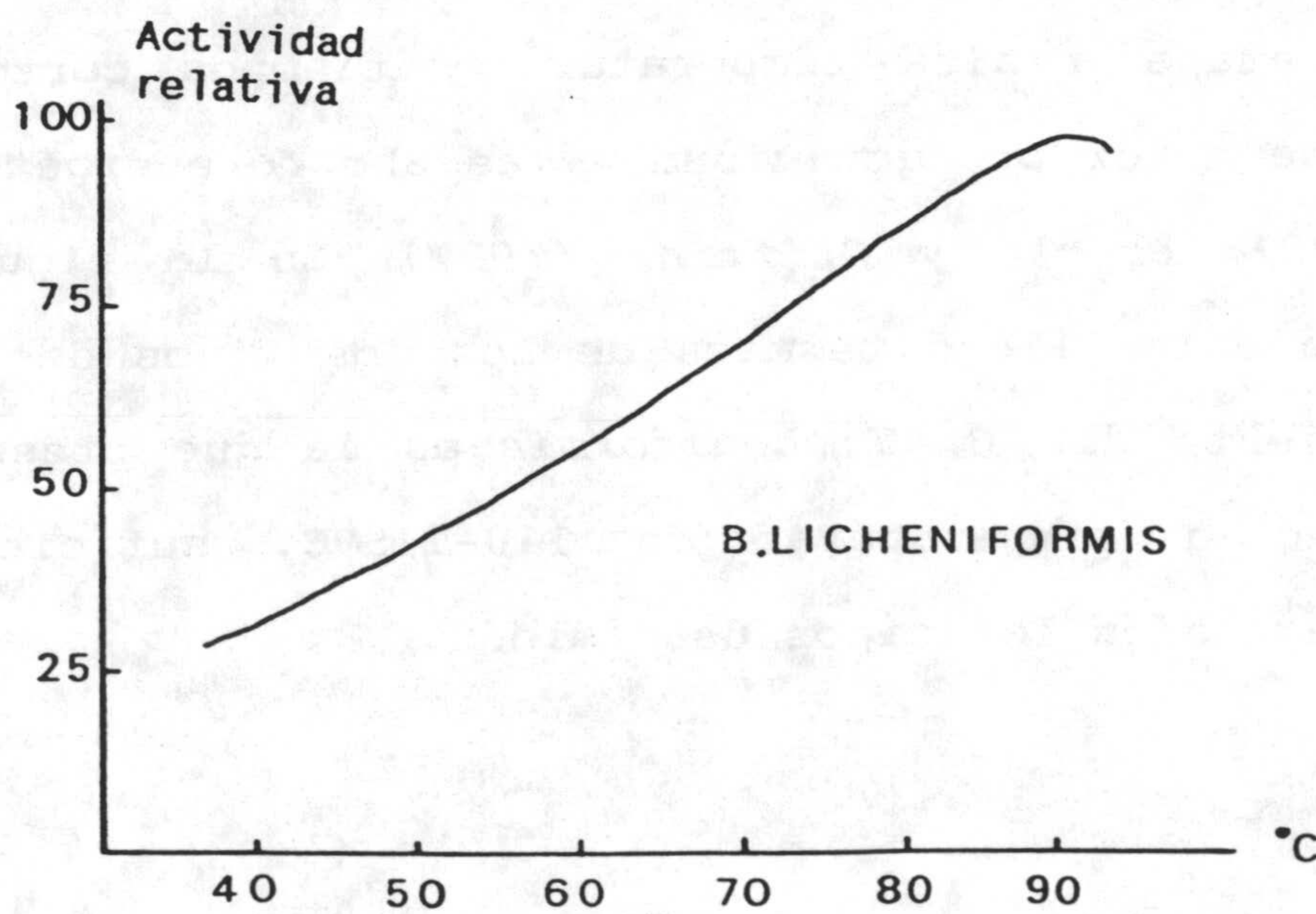
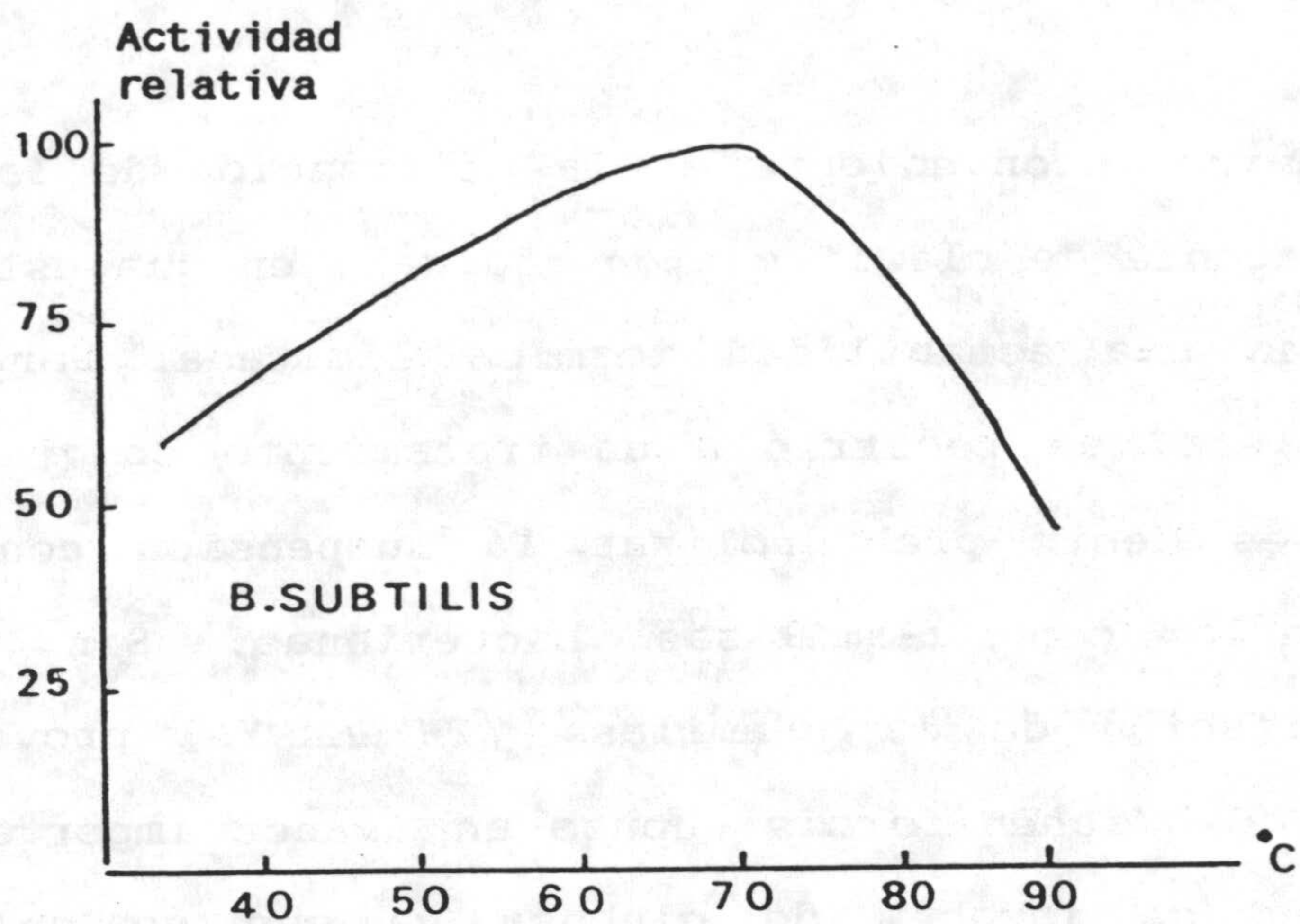


Figura 2.4. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las dos α -amilasas.

Sacarificación

En esta etapa, las dextrinas obtenidas en el proceso anterior se transforman en maltosa y glucosa mediante la adición de amiloglucosidasa (de *Aspergillus niger* por ejemplo). Puede realizarse en fase homogénea ó lo que es más frecuente, mediante glucoamilasa inmovilizada y en continuo. Así, se consigue disminuir las reacciones de reversión de la glucosa a di y oligosacáridos. También, permite tratar grandes cantidades de sustrato con la misma enzima, lo que supone una gran reducción del volumen instalado, *Vallat y col. (1986)*.

La sacarificación puede realizarse también con una mezcla de enzimas, con β -amilasa y pululanasa (*PROMOZYME 200L*) por ejemplo, *Nebesny (1990)*, que actúan separadamente o de una forma combinada con otras enzimas. De este modo, se obtiene una gran variedad de hidrolizados con perfiles de azúcares diferentes y aplicaciones distintas. Así, los hidrolizados que tienen un alto contenido en maltosa, es decir muy poca tendencia a cristalizar y son relativamente poco higroscópicos se utilizan en la industria confitera, heladera, cervecera, etc., *Tegge y col. (1986)*, *Slominska y Stradogardzka (1986)*. Aquellos otros que tienen una concentración elevada en glucosa se utilizan para la producción de glucosa cristalizada o de fructosa, *Lenders y Chrichton (1988)*.

Terminadas las etapas de hidrólisis mostradas en la figura 2.5, los hidrolizados deben ser acondicionados para su almacenamiento posterior: filtración y eliminación de enzimas, acondicionamiento del producto y evaporación para obtener aproximadamente una concentración del 60 % en sólidos totales. No obstante, el jarabe de glucosa (D.E > 20) puede almacenarse tanto en forma líquida como seca, *Rose y Anderson (1983)*.

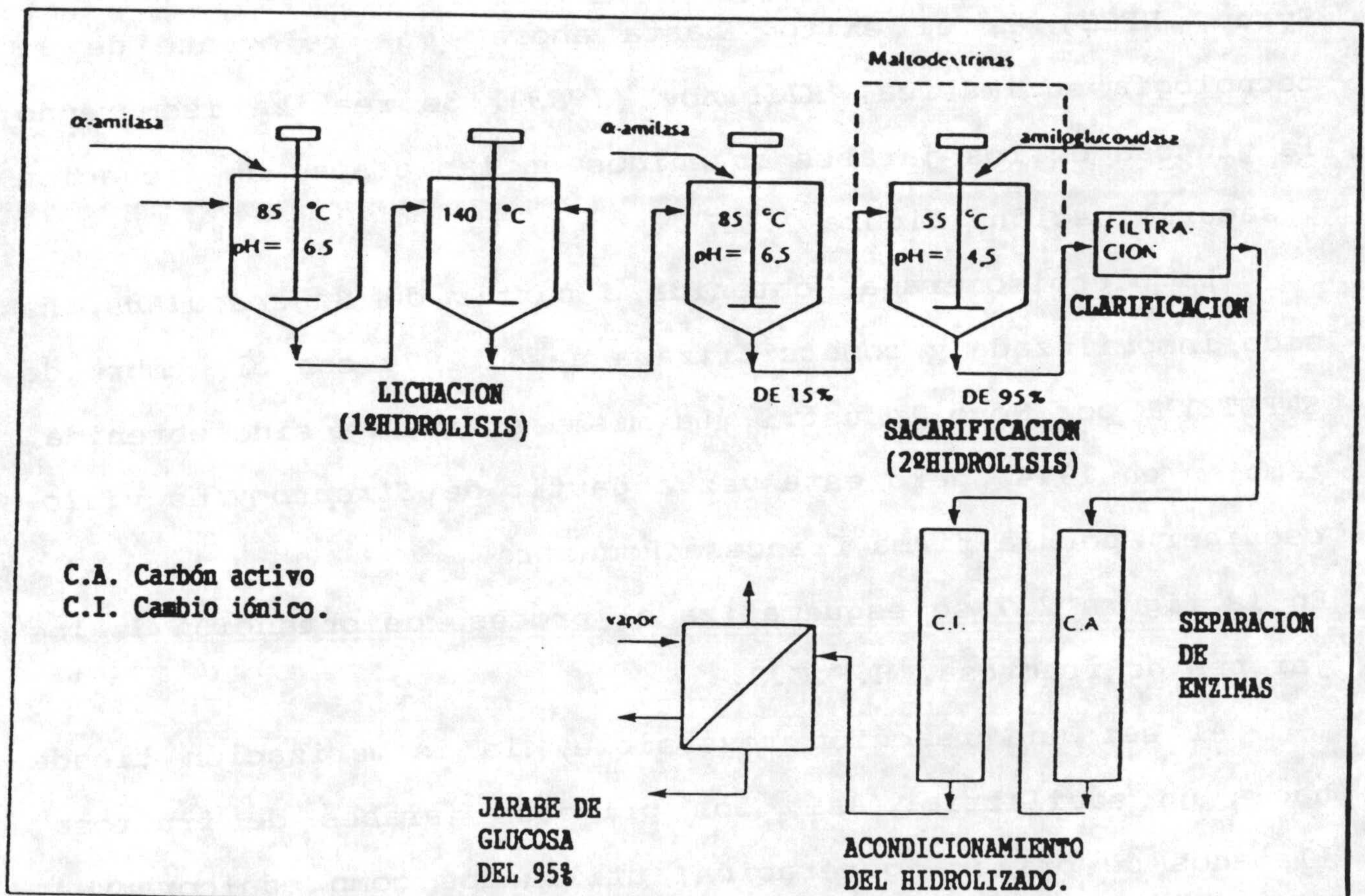


Figura 2.5: Producción de jarabes de glucosa.

2.4.3.2 Producción de jarabes de fructosa:

La producción de jarabes de fructosa (High Fructose Corn Syrup, HFCS) es el éxito, hasta ahora, más relevante de la tecnología enzimática, *Klibanov (1983)*. Se realiza isomerando la glucosa de los jarabes obtenidos en las etapas de licuación y sacarificación, figura 2.6.

La glucoisomerasa, obtenida a partir de *B. coagulans*, ha sido inmovilizada y comercializada desde 1974 con el nombre de *SWEETZYME* por Novo Industri. La misma enzima ha sido obtenida, también en 1974, pero esta vez a partir de *Streptomyces violaceoniger*, por la firma francesa Roquette.

En la figura 2.7 se esquematiza el proceso de obtención de los jarabes de fructosa, H.F.C.S.

Al ser una reacción reversible, la isomerización tiende hacia un equilibrio. Así, los primeros jarabes de fructosa, llamados de primera generación, utilizados como edulcorantes, *Fuchs (1987)*, contenían aproximadamente 42 % de fructosa, 52 % de glucosa y 6 % de maltodextrinas, su poder edulcorante, P.E, es el 90 % del correspondiente a la sacarosa, tabla 2.11.

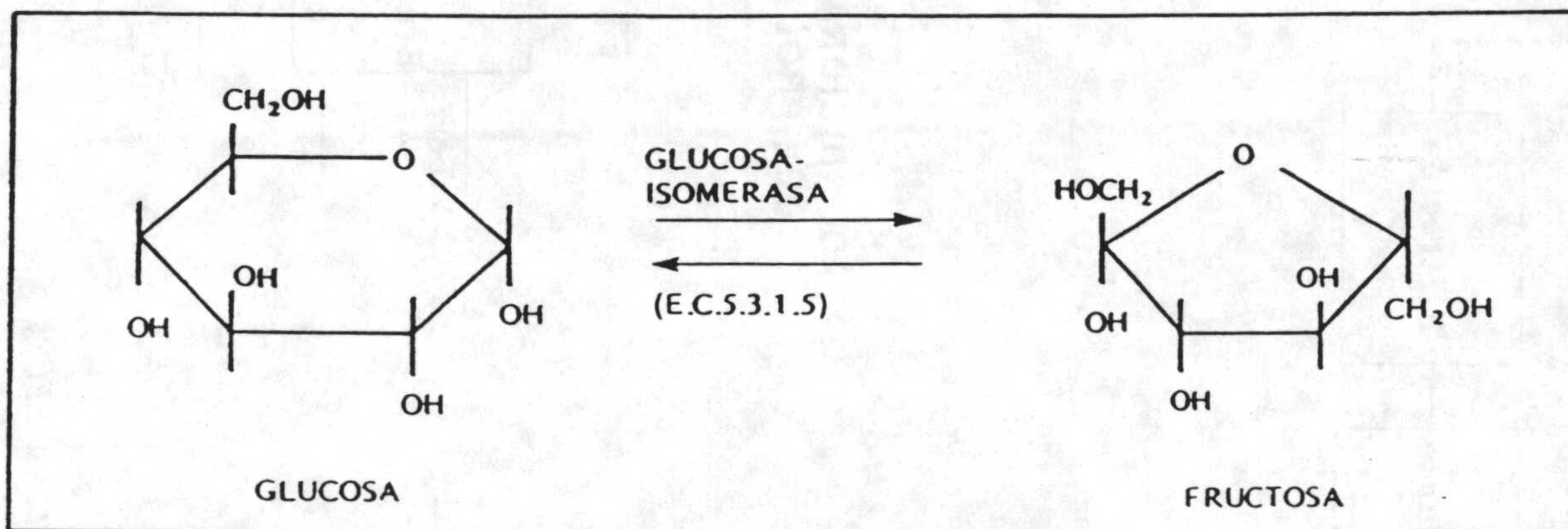


Figura 2.6: Isomerización de la glucosa en fructosa.

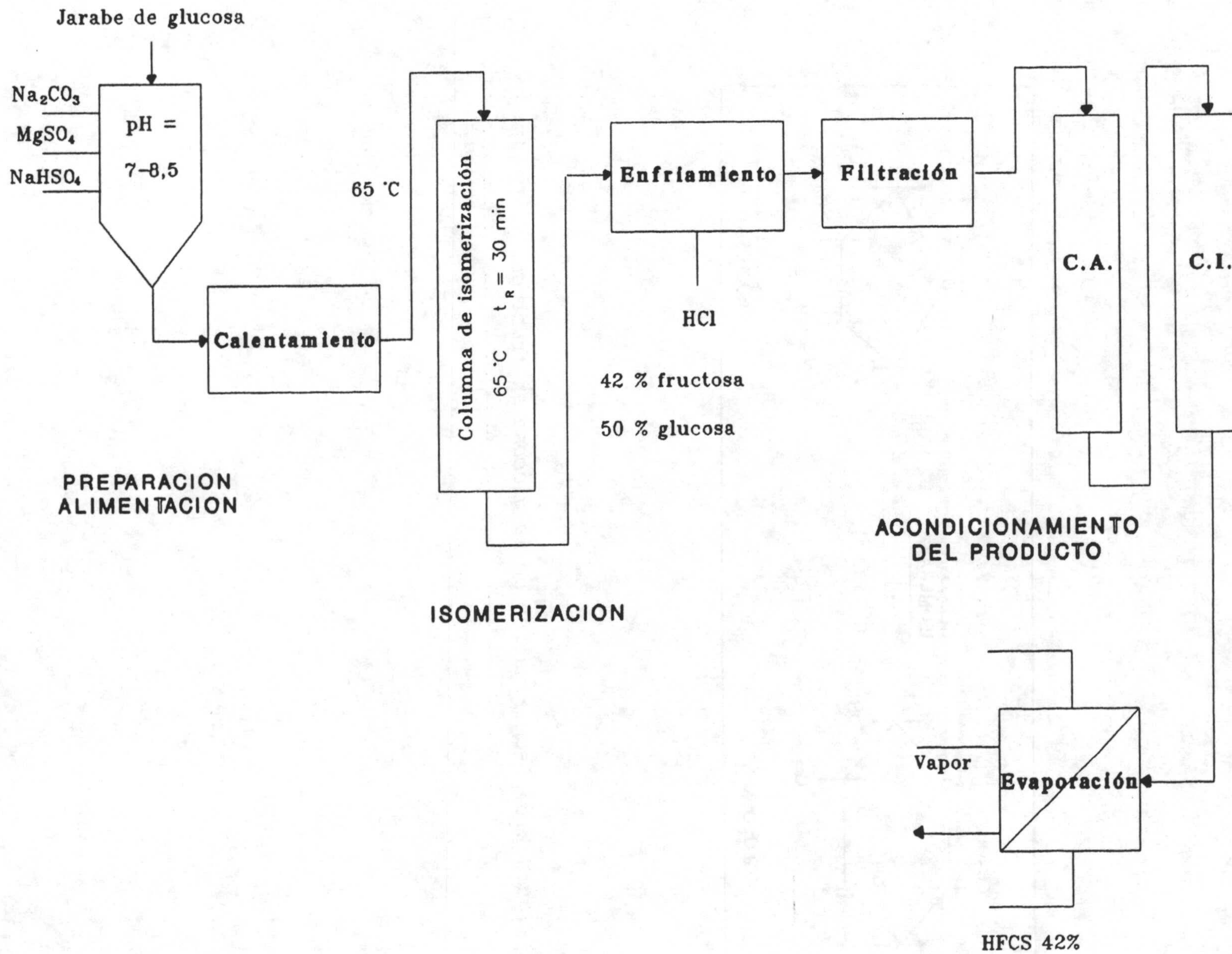


Figura 2.7. Producción de jarabes de fructosa HFCS.

Tabla 2.11

Poder edulcorante (P.E) de algunos azúcares y jarabes.

| <u>Tipo de azúcar</u> | <u>Poder edulcorante</u> |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Sacarosa | 1.00 |
| Fructosa | 1.50 |
| Dextrosa | 0.68 |
| Maltosa | 0.30 |
| Jarabe de glucosa (D.E = 42) | 0.33 |
| Jarabe de glucosa (D.E = 64) | 0.49 |
| HFCS (42 %) | 0.88 |
| 50 % HFCS + 50 % sacarosa | 0.98 |

Esta mezcla es insuficientemente dulce para la mayoría de las aplicaciones de los HFCS, ya que la mayor parte de las bebidas ácidas refrescantes (Coca-cola y Pepsi-cola) requieren un contenido en fructosa del orden del 55 % (segunda generación) para conseguir el mismo poder edulcorante de la sacarosa (a la misma concentración en sólidos), o del azúcar

invertido (sacarosa hidrolizada a 50 % de glucosa y 50 % de fructosa). Por esta razón, la isomerización de los jarabes de glucosa se acompaña de un enriquecimiento cromatográfico sobre resina catiónica de los HFCS formados, *Bucke (1981), Buléon y col. (1990)*; de esta forma se consiguen hidrolizados con un 92 % en fructosa, figura 2.8. Otra posibilidad para aumentar el contenido en fructosa de los hidrolizados sería llevar a cabo la isomerización a 100-110°C, *Lloyd (1986)*. Sin embargo, las glucoisomerasas conocidas no pueden actuar durante mucho tiempo a temperaturas tan elevadas. También en un estudio realizado por *Visuri y Klibanov (1986)*, se ha comprobado que la glucoisomerasa puede producir directamente el HFCS del 55% en fructosa cuando el proceso se lleva a cabo en un medio con 85-90% de etanol aunque este alcohol reduce la vida de la enzima considerablemente creando un problema adicional, como es separar la mezcla sacáridos-etanol, *Klibanov (1986)*. Por tanto y teniendo en cuenta las tendencias actuales, la producción del HFCS a nivel industrial se realiza siguiendo las siguientes etapas:

a) El HFCS (42 %) se produce enzimáticamente de la misma manera que se ha venido haciendo hasta ahora, es decir en disolución acuosa y a temperatura de 60-65°C.

b) En vez de enriquecer el jarabe por cromatografía iónica, *Bos Cornelis (1990)*, que es un proceso caro, otra técnica consiste en diluir el jarabe de glucosa en etanol. Este último se puede producir a partir del almidón hidrolizado

y fermentado in situ por células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* AT CC 36859, **Koren y col. (1991)**. Posteriormente, el jarabe se lleva a través de dos columnas que contienen glucoisomerasa inmovilizada hasta conseguir un porcentaje de fructosa del 55,3 % , 38,7 % de glucosa y 6 % de oligosacáridos. En todo caso, el costo de los jarabes obtenidos depende de su composición y de la enzima utilizada, **Mac Donald (1984)**.

El proceso de isomerización compite favorablemente con la producción de sacarosa a partir de caña y remolacha, **Joglekar y col. (1979)**, **Nouri (1991)**, **Gehlawat (1991)**, y está plenamente desarrollado en U.S.A donde se utiliza el maíz como sustrato del que son grandes productores. Sin embargo, la C.E.E importa el maíz y exporta azúcar del que tiene grandes excedentes. Por lo tanto, parece aconsejable que la producción de los jarabes de fructosa se haga, en este caso, a partir de la sacarosa del azúcar.

La inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa se realiza con la intervención de una enzima denominada Invertasa *E.C.3.2.1.26* obtenida por fermentación de *Saccharomyces*, *Aspergillus*, etc... En la figura 2.9 se muestra el esquema de esta transformación. Las propiedades del azúcar invertido y sus utilidades han sido detalladas por **Buissière y col. (1990)**. El proceso se realiza en continuo ya que estas enzimas se utilizan inmovilizadas en reactores de lecho fijo o fluidizado

a pH = 5,0 y temperaturas del orden de 50 a 55°C. Las etapas del proceso son análogas a las ya indicadas para la isomerización de la glucosa en fructosa con un cambio, lógicamente, en las condiciones de operación, *Prudhomme (1982)*, *Lopez Santin y col. (1984)*, *Thibanet (1984)*, *Mousan y col. (1984)*.

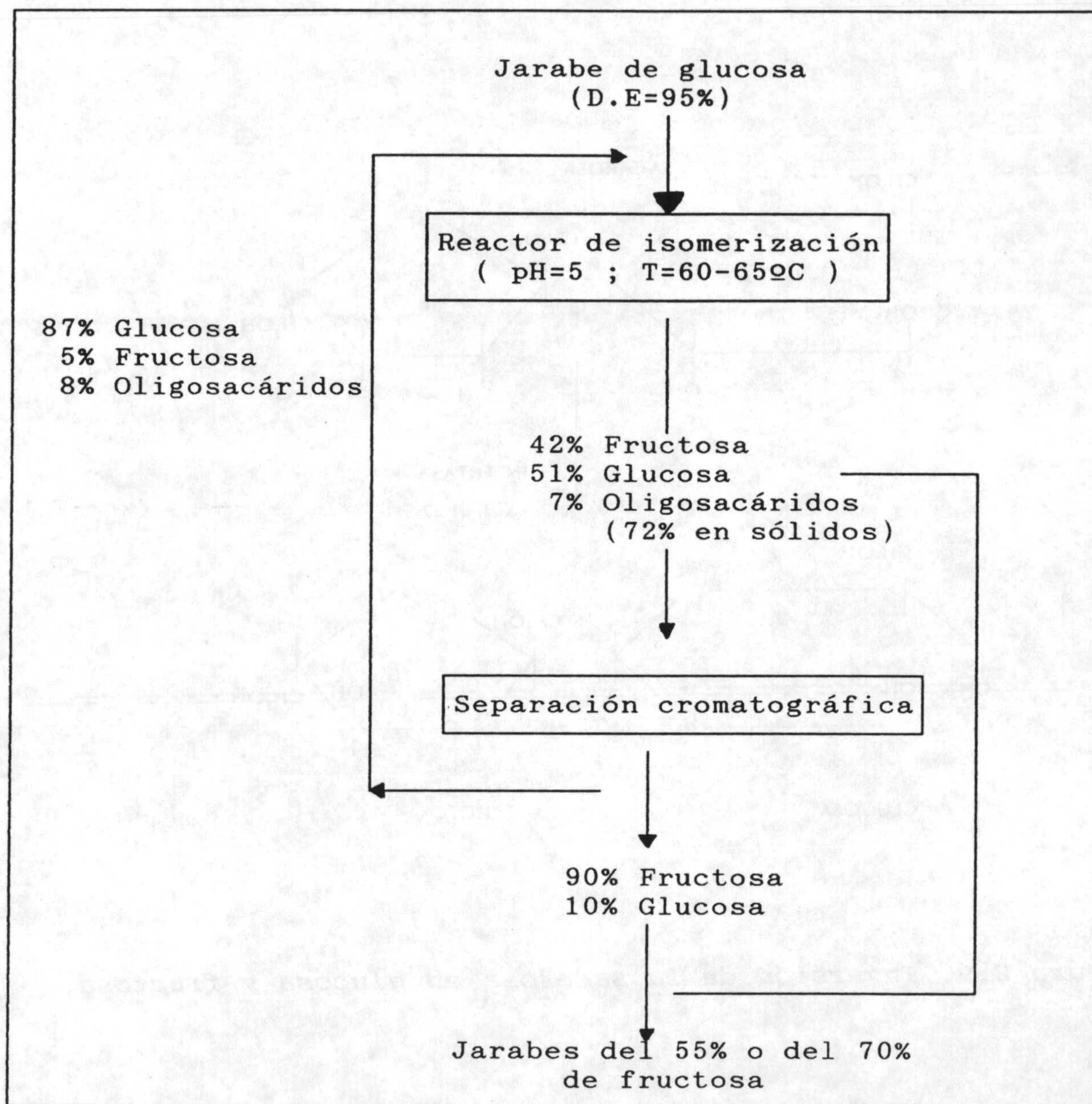


Figura 2.8. Concentración de los HFCS mediante técnicas cromatográficas.

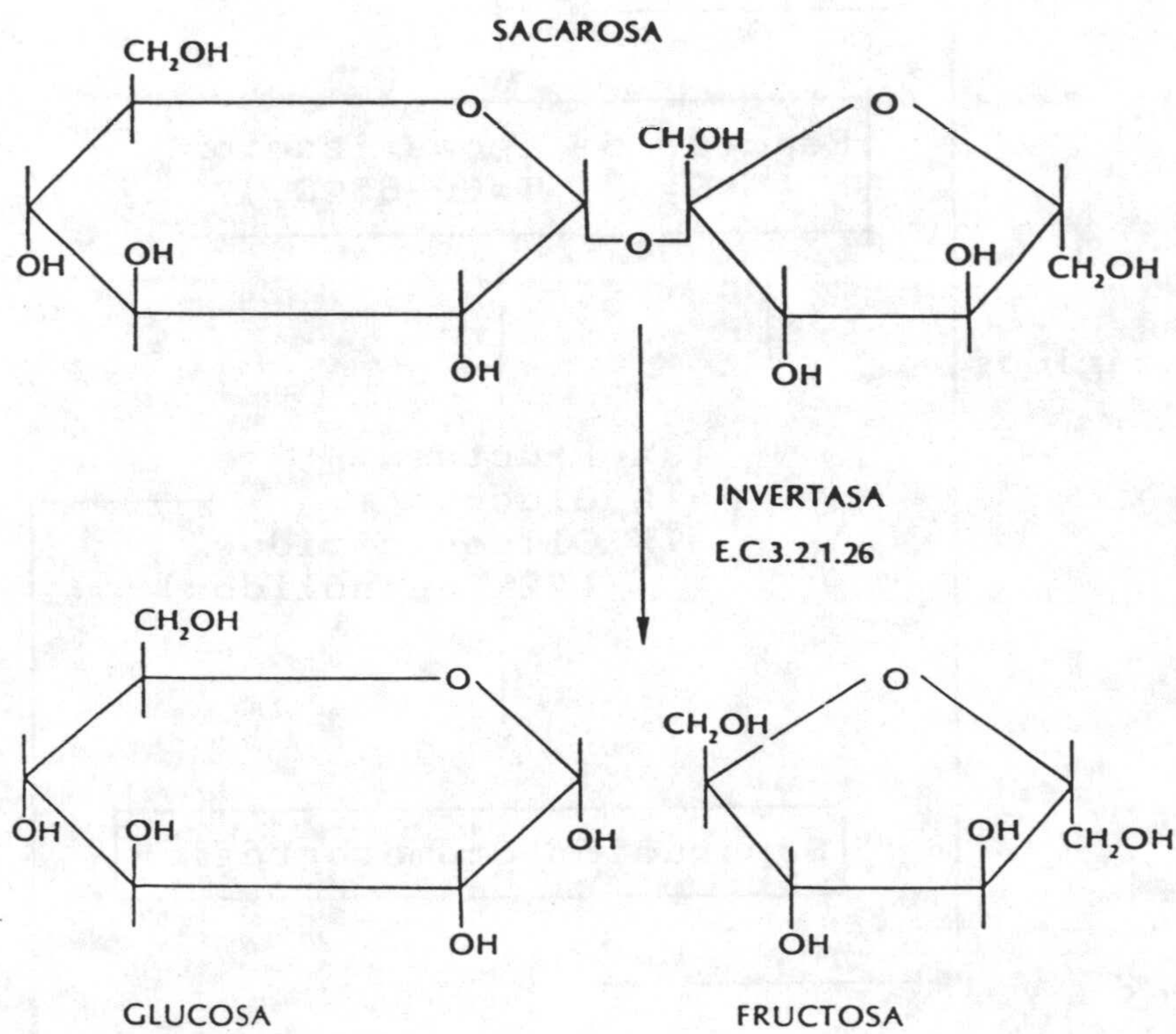


Figura 2.9. Inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa.

2.4.3.3- Hidrogenación de los jarabes de glucosa:

La hidrogenación catalítica de los jarabes de glucosa, previamente purificados y libres de proteínas, se realiza a temperaturas comprendidas entre 100 y 200°C y presiones de 40-150 atm. A nivel industrial, el proceso se puede llevar a cabo en discontinuo utilizando Ni como catalizador o en continuo si el Ni se inmoviliza sobre un soporte de sílice aluminado, *Verwaerde y Sicard (1984)*.

La hidrogenación catalítica de los jarabes de glucosa implica la conversión de la función pseudo-aldehídica del C₁ terminal en un grupo alcohol secundario tal como se indica en la figura 2.10. Este proceso implica la apertura del ciclo piranosa y genera polioles, *Buléon y col. (1990)*.

Mediante la hidrogenación de los jarabes de glucosa, se reduce la tendencia que presentan estos últimos al pardeamiento, reacción de Maillard, que se produce fundamentalmente por complejas interacciones entre glúcidos y los aminoácidos de las proteínas. Esta tendencia se reduce considerablemente con la hidrogenación de los jarabes de glucosa ya que reducen los grupos aldéhicis hacia alcoholes secundarios.

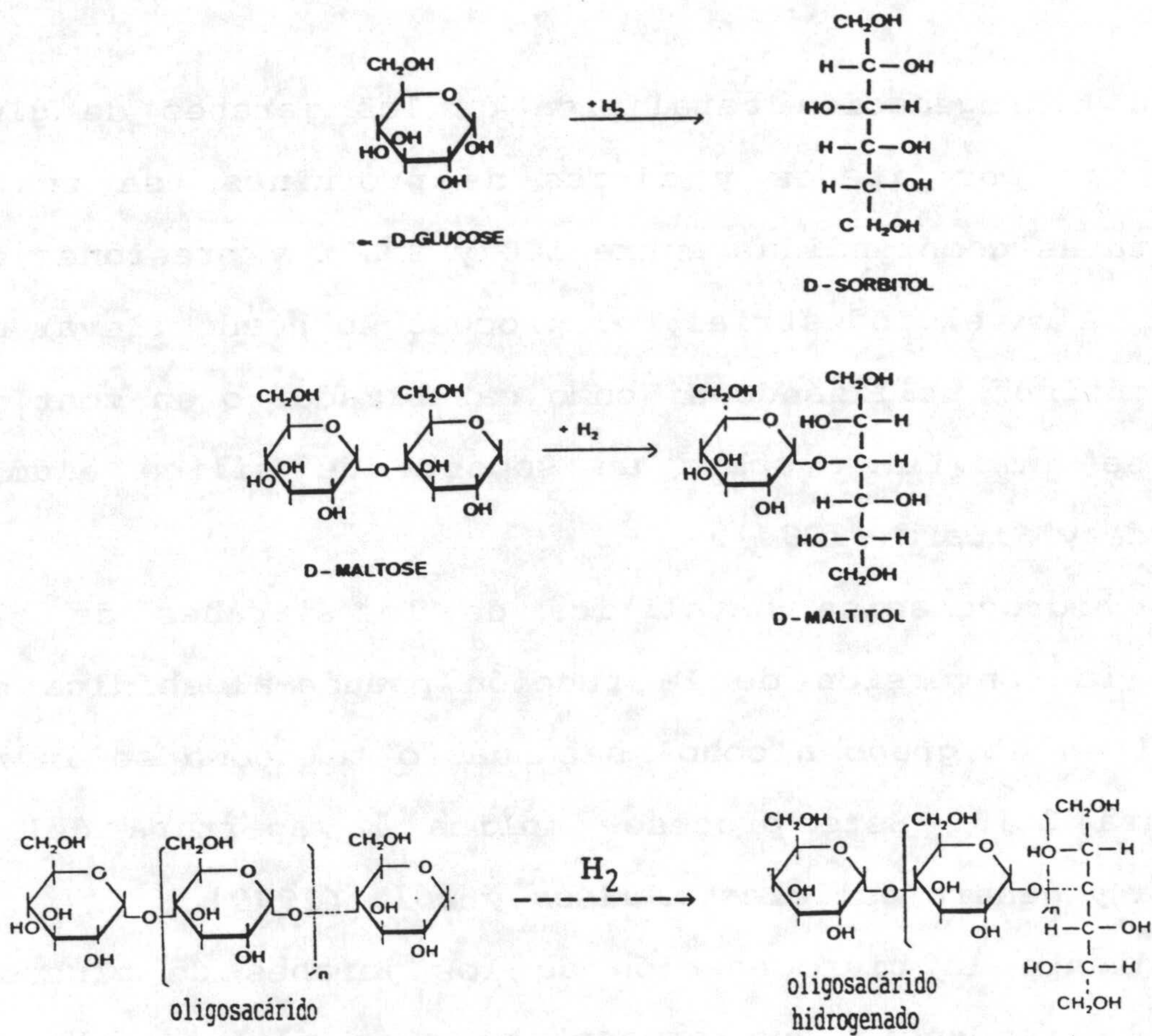


Figura 2.10: Hidrogenación de varios carbohidratos reductores presentes en el jarabe de glucosa.

La hidrogenación de los jarabes de glucosa reduce su fermentabilidad. Efectivamente, la tabla 2.12 muestra que el porcentaje de azúcares fermentables va decreciendo con el aumento del grado de hidrogenación. Por consecuencia, los jarabes hidrogenados de glucosa tienen la ventaja de ser menos fermentables por microorganismos y por tanto menos cariógenos.

Tabla 2.12

Efecto de la hidrogenación sobre el porcentaje de los fermentables en los jarabes de glucosa
Kearsley (1978a)

| D.E del material de partida, % | D.E de la muestra hidrogenada, % | % de los azúcares fermentables |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 21 | 21 | 25,3 |
| 21 | 10 | 17,8 |
| 21 | 0 | 16,8 |
| 43 | 43 | 39,6 |
| 43 | 23 | 17,7 |
| 43 | 0 | 16,4 |
| 65 | 65 | 65,9 |
| 65 | 35 | 24,4 |
| 65 | 12 | 17,9 |
| 84 | 84 | 82,0 |
| 84 | 43 | 42,8 |
| 84 | 0 | 0,0 |
| 100 | 100 | 99,3 |
| 100 | 38 | 36,2 |
| 100 | 0 | 0,0 |
| Fructosa | - | 100,0 |

Las aplicaciones más importantes de los jarabes hidrogenados de glucosa pueden resumirse en los siguientes campos:

a) Alimentación humana:

Dependiendo de la D.E y de la composición de los jarabes de glucosa originales, los homólogos hidrogenados pueden utilizarse como:

- Sustituyentes de azúcares debido a su estabilidad química y a su resistencia a la reacción de Maillard.
- Edulcorantes dietéticos (el P.E depende del contenido en Maltitol).
- Agentes clarificantes y anticristalizantes.
- Estabilizantes de color y de sabor.

b) Aplicación farmacéutica y cosmética:

En la industria farmacéutica, estos productos se utilizan como excipientes sustituyendo a los carbohidratos usuales. Los jarabes hidrogenados de glucosa presentan una doble ventaja:

- a) Son químicamente estables frente a los ingredientes activos.
- b) no son cariógenos y son menos fermentables cuando contienen una baja proporción en oligosacáridos de alto peso molecular ($< 1,5 \% \text{ de D.P} > 20$) lo que es muy beneficioso en el momento de preparar jarabes pediátricos. Señalemos que su

Sorbitol, *Sicard (1982)*. En el campo cosmético, pueden desempeñar el papel de emulsificantes o de retenedores de agua. El Sorbitol se utiliza en la elaboración de pastas y geles dentífricos. En este contexto, el *LYCASIN 80/55* (mezcla de sorbitol y maltitol) es un producto resistente a la fermentación provocada por las bacterias de la placa dental y posee una gran actividad remineralizadora, *Müehlemann y Schmid (1980)*, *Müehlemann y col. (1981)*, *Leach y col. (1983)*.

2.4.3.4 Obtención de cereales hidrolizados

Los cereales son el primer alimento que se introduce en la dieta de los lactantes después de la edad de tres a cuatro meses, *Fomon (1981), Driou y col. (1985), Male (1985)*.

Además de su aporte energético en forma de carbohidratos, contribuyen a suministrar proteínas, minerales, vitaminas y una cantidad apreciable de ácidos grasos esenciales.

Según las recomendaciones de la "*Société Européenne de Gastroenterologie et Nutrition Pédiatrique ESPGAN*", los cereales destinados a lactantes y niños de corta edad deben ser adecuadamente tratados para que se dispersen fácilmente en agua, leche o cualquier líquido apropiado, y sean fácilmente digestibles, ya que a esta edad, la capacidad del páncreas para segregar amilasas es limitada, lo que dificulta la digestión del almidón, *De Vizia (1975), ESPGAN (1981)*.

Los procesos tradicionales de tratamiento de harinas de cereales consisten en una dextrinización parcial a 130-160°C durante una hora, seguida de una instantaneización por dispersión acuosa y un secado posterior. Estos procesos conducen a productos que, una vez reconstituidos, no presentan una textura uniforme y exigen cantidades altas de sacarosa para que su sabor sea aceptado por el lactante. Además, contienen una proporción importante de almidón.

Por estas razones, hay una tendencia creciente a utilizar los hidrolizados enzimáticos de harina de cereales en la preparación de alimentos infantiles, harinas instantáneas y papillas lácteas. Estos hidrolizados permiten la obtención de productos de mayor valor nutritivo y mejores características organolépticas. Además, la intensidad de la hidrólisis enzimática de almidones presentes en las harinas de cereales puede controlarse con una facilidad relativa usando las enzimas y las condiciones adecuadas de operación. Es posible también obtener un perfil de hidratos de carbono que mejore la digestibilidad, el sabor y la textura de los hidrolizados, *Mac Gregor y col. (1985)*.

La tecnología de la hidrólisis enzimática de la harina de cereales es poco conocida y los procesos comerciales que existen son muy limitados y protegidos por patentes.

Lo cierto es que las papillas obtenidas a partir de estos hidrolizados deben satisfacer las siguientes especificaciones:

- Bajo contenido en sales.
- Baja viscosidad y una fácil solubilización.
- Bajo contenido en almidón.
- Textura adecuada y estabilidad en dispersión acuosa, es decir que no deben retrogradar, licuar o espesar.
- Sabor agradable.

Evidentemente, el contenido bajo en sales se asegura utilizando la hidrólisis enzimática. Las características reológicas y de textura de las papillas formadas tienen que

estar relacionadas con la distribución de tamaños moleculares, lo que exige que la primera etapa de la hidrólisis debe dedicarse a la licuación del almidón utilizando α -amilasa y/o pululanasa, analizando la influencia de las variables de operación (tipo de enzima, relación enzima/sustrato, temperatura, pH, intensidad de la hidrólisis, etc..) sobre la distribución de los tamaños moleculares y por tanto sobre las características anteriores, *González Tello y col. (1990)*.

Por otra parte, para evitar la licuación indeseable de las papillas, es necesario asegurar la desnaturalización térmica de las enzimas utilizadas en el proceso, lo que no es tan fácil en el caso de las α -amilasas bacterianas que tienen temperaturas de operación entre 80 y 100°C.

Para mejorar el sabor y evitar excesivas adiciones de sacarosa, el contenido en glucosa debe ser apreciable, lo que puede resultar incompatible con las características reológicas y de textura y por consiguiente, se tiene que recurrir al tratamiento con amiloglucosidasa, libre o inmovilizada, para aumentar el contenido en glucosa sin hidrolizar apreciablemente las dextrinas residuales. Otra posibilidad podría ser la utilización simultánea o independiente, de la isomerasa para convertir una fracción de glucosa en fructosa. Esta operación no alteraría la distribución de pesos moleculares, y en cambio, se aumenta considerablemente el poder edulcorante del producto. En la figura 2.11 se reúnen estas ideas.

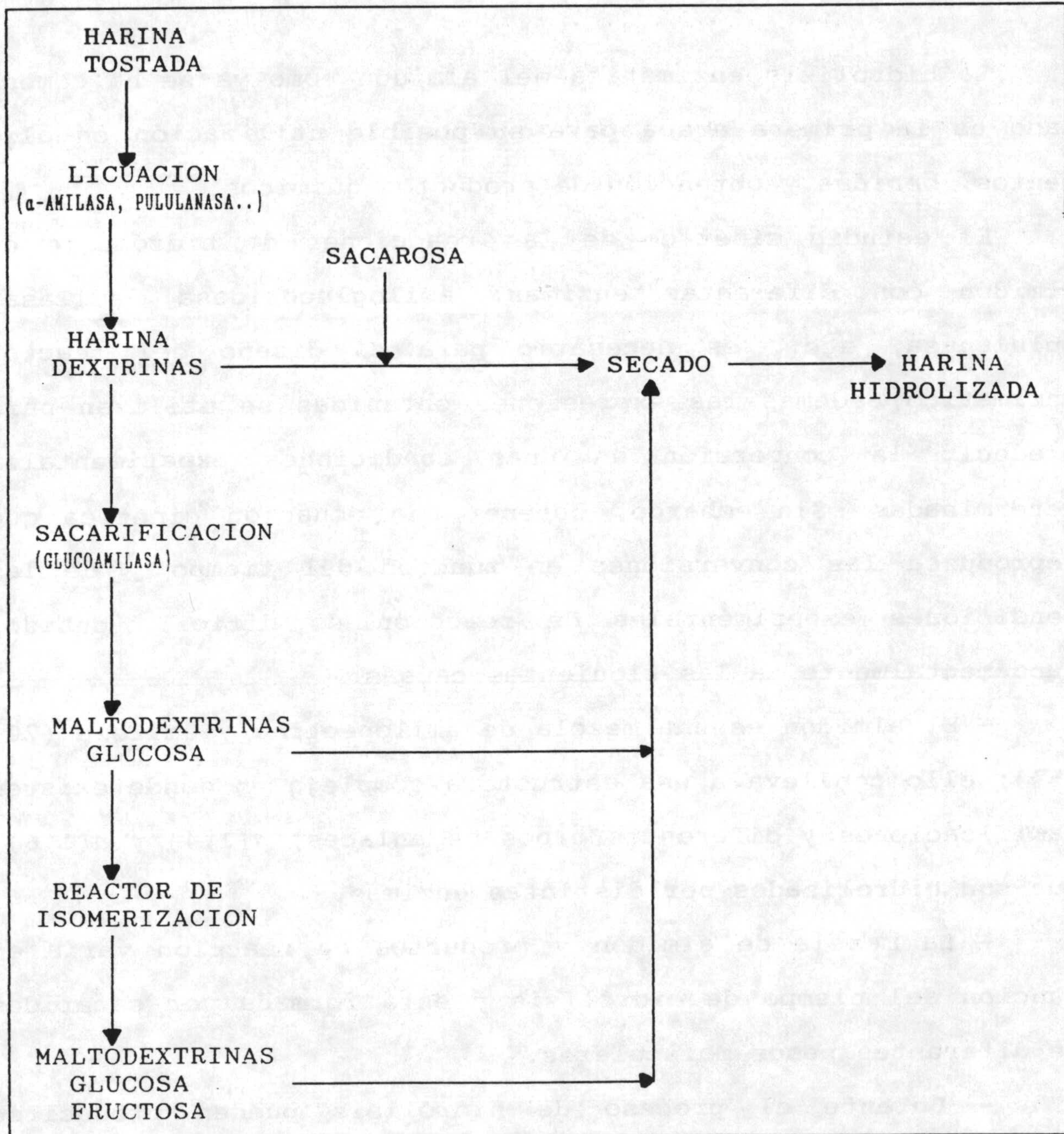


Figura 2.11. Obtención de cereales hidrolizados.

2.5. CINETICA DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON.

La hidrólisis enzimática del almidón como ya se ha comentado es la primera etapa para su posible utilización en alimentos, bebidas y obtención de productos químicos.

El estudio cinético de las reacciones de hidrólisis de almidón con diferentes enzimas: amiloglucosidasa, amilasa, pululanasa, etc.. es necesario para el diseño del reactor enzimático; además las expresiones obtenidas se utilizan para predecir la conversión en unas condiciones experimentales determinadas. Sin embargo, obtener una ecuación cinética que reproduzca las conversiones en función del tiempo y de las condiciones experimentales de reacción es difícil, debido, fundamentalmente, a las siguientes causas:

- El almidón es una mezcla de amilopectina y amilosa (20-25%); ello conlleva a una estructura compleja en donde existen ramificaciones y diferentes tipos de enlaces, $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$, que son hidrolizados por distintas enzimas.

- La mezcla de almidón y productos de reacción varía en función del tiempo de hidrólisis y está formada por sacáridos de diferentes pesos moleculares.

- Durante el proceso de hidrólisis pueden producirse reacciones de reversión.

Por estas razones, la mayoría de los autores que estudian la hidrólisis de almidón con diferentes enzimas se limitan a evaluar las velocidades de reacción, aplicando la ecuación de

Michaelis-Menten y determinan los parámetros K_M y r_m , o proponen modelos empíricos que de alguna forma explican sus resultados experimentales.

2.5.1. Hidrólisis enzimática del almidón con amiloglucosidasa.

Sozaburo y col. (1964) estudian la hidrólisis enzimática de distintos sustratos con amiloglucosidasa, a bajas concentraciones de enzima y de sustrato y a la temperatura de 15°C. Determinan la velocidad inicial de reacción, y aplicando el modelo propuesto por *Michaelis-Menten* determinan sus parámetros K_M y r_m . Concluyen su trabajo indicando que la velocidad de reacción depende de la longitud de las cadenas glucosídicas del sustrato y que los valores de $1/K_M$ y r_{max} aumentan con el grado de polimerización. Análogos resultados han sido publicados por *Vallat y col. (1986)* y *Shiraishi y col. (1986)*.

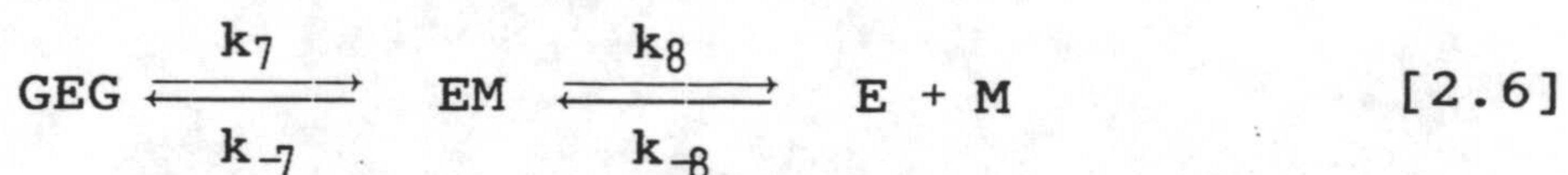
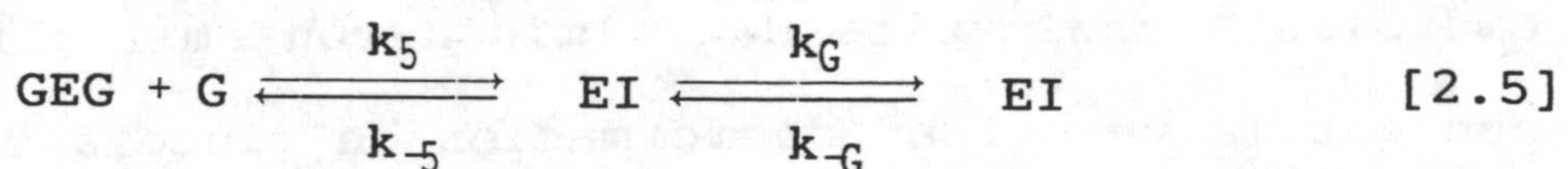
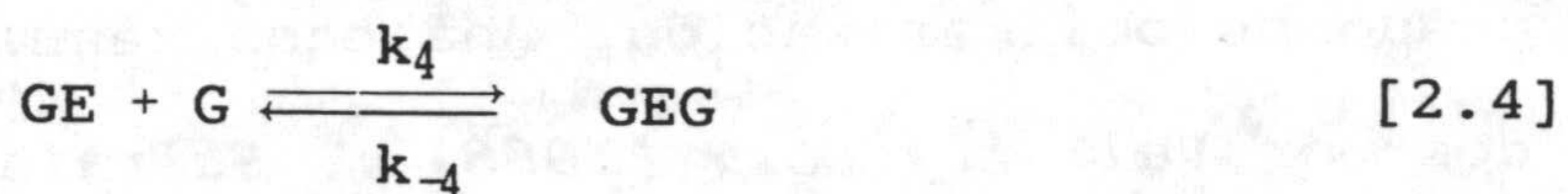
Kusonoki y col. (1982) proponen un modelo de reacción simple con inhibición competitiva de producto para explicar la hidrólisis enzimática del almidón con amiloglucosidasa; obtienen que la velocidad de formación de glucosa viene dada por:

$$\frac{dG}{dt} = \frac{r'_m (S_0 - G)}{K'_M \left(1 + \frac{G}{K_I}\right) + (S_0 - G)} \quad [2.2]$$

Sin embargo, los parámetros cinéticos r'_m y K_M varían con la concentración de sustrato a partir de conversiones del 30%.

En cambio, para conversiones inferiores, $x \leq 0.3$, son iguales a los parámetros K_M y r_m , determinados a partir de las velocidades iniciales con la ecuación de **Michaelis-Menten**.

Fumishide Shiraishi y col. (1984) proponen otro modelo para la hidrólisis enzimática del almidón con amiloglucosidasa. En este caso se tiene en cuenta la formación de maltosa e isomaltosa en paralelo a la producción de glucosa; por tanto se reduce el rendimiento de ésta. El mecanismo propuesto es el siguiente:



donde E, S, G, M e I representan la enzima, sustrato, glucosa, maltosa e isomaltosa, respectivamente.

Madgaukar y col. (1977) ajustan los resultados de la hidrólisis del almidón con glucoamilasa a una ecuación empírica, ya que no cumplen los modelos usuales de cinética enzimática simple y obtienen que la velocidad de formación de glucosa es

$$r = 16.161 C_E^{1.467} C_S^{0.193} \quad [2.7]$$

donde C_E y C_S son las concentraciones de enzima y de sustrato, respectivamente.

González y col. (1990) estudian la hidrólisis de un almidón soluble con una glucoamilasa comercial; sus resultados, para conversiones inferiores al 40%, se ajustan a la expresión

$$r = \frac{k \cdot S_0 \cdot E_0^{1.32}}{K_M + S_0} \cdot \exp(-bX) \quad [2.8]$$

ecuación que parece poner de manifiesto un cambio continuo en la naturaleza del sustrato, que se intensifica para conversiones superiores a 0.40.

2.5.2. Hidrólisis enzimática con α -amilasa.

En la tabla 2.13 se esquematizan algunos de los resultados cinéticos obtenidos por diversos autores, para explicar la hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa. Como se puede observar, la cinética de la reacción depende del origen de la enzima, de la longitud y fuente de las cadenas de almidón y de las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis. A continuación se comentan algunos de estos trabajos.

Marc y Engasser (1983), tabla 2.13, hidrolizan almidón de malta con α -amilasa y β -amilasa y desarrollan un modelo empírico con 22 parámetros que tiene en cuenta la mayoría de los factores físicos y bioquímicos controlantes del proceso de hidrólisis: disolución de los carbohidratos y enzimas, la gelatinización del almidón, la acción catalítica de la α y β -amilasa, la influencia de la temperatura y de la desnaturalización térmica de las enzimas. El modelo aplica expresiones de velocidad de primer orden para la hidrólisis y la desnaturalización enzimática.

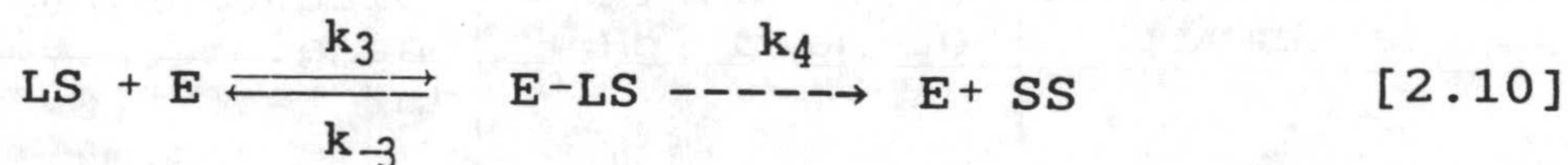
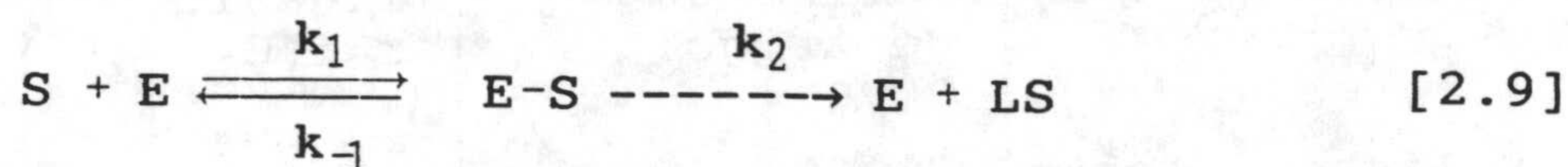
Tabla 2.13

Ecuaciones cinéticas para la hidrólisis de almidón con α -amilasa, Komolprasert y col.(1991).

| α -amilasa de | Condiciones experimentales | Ecuación cinética | Referencia |
|---------------------------------|--|---|----------------------------|
| Schwanniomyces castelli | 1% de almidón 32°C, pH=5 | Michaelis-Menten con inhibición de producto. | Pasari y col (1988) |
| Saccharomyces fibuliger. | 0.1-0.9% de almidón. 32°C, pH=4.8 | Michaelis-Menten con inhibición de producto. | Steverson y col. (1984). |
| Malta | Almidón de malta. 40-70°C. | Reacción de 1ºorden para cada component del producto. Desactivación de 1ºorden. | Marc y col. (1983). |
| B.licheniformis (Thermamyl 60L) | 35-55% de harina de trigo. 80°C. | Modelo no lineal. $r=f(C_S, C_W, C_e)$ | Reinikeinen y col. (1986). |
| B.licheniformis (Thermamyl 60L) | 30-50% de harina de trigo. 90-120°C. | Reacción irreversible de 1ºorden. | Hakkareinen y col.(1985) |
| B.licheniformis (Thermamyl) | 1% de harina de maiz, pH=6 | Licuación de almidón. $dm/dt=f(K, [E+], \alpha, m)$. | Rolling y col.(1984) |
| B.subtilis | 1% de almidón | Reacción consecutiva de 1ºorden. | Henriksmas y col.(1978) |
| B.licheniformis | 6.6-40% de 100°C, pH=7 | Michaelis-Menten. | Yankov y col.(1986) |
| B.stearothermophilus. | 24-36% de harina de maiz. pH=5.3-6.7 $Ca^{2+}=0-200ppm$ | Desactivación de 1ºorden y cinética de licuación de almidón. | Henderson y col.(1988). |
| B.subtilis | 25 g/L de harina de trigo. 35°C pH=7. | Mecanismo de dos etapas consecutivas | Colonna y col.(1988) |

Yankov y col. (1986) hidrolizan el almidón con α -amilasa de *B. Licheniformis* y aplican la ecuación de **Michaelis-Menten** a las velocidades iniciales de reacción. La desviación sufrida por estas velocidades iniciales en la representación de **Lineweaver-Burk**, para concentraciones de sustrato >250 g/L, la explican por una inhibición por sustrato.

Colonna y col. (1988) proponen un mecanismo de dos reacciones en serie para la hidrólisis del almidón de harina de trigo con α -amilasa, pero que solo es aplicable a bajos tiempos de reacción. El mecanismo propuesto es el siguiente:



donde LS y SS representan, respectivamente, a los sacáridos de cadena larga, LS, y corta, SS.

Reinikainen y col. (1986) hidrolizan harina de trigo con α -amilasa durante y después de un proceso de extrusión. El grado de hidrólisis alcanzado depende de la humedad de la alimentación, de la concentración de enzima, de la temperatura

y de la intensidad de la extrusión. El grado de hidrólisis se determina analizando la D.E y la distribución de tamaños moleculares por cromatografía de gel. Proponen un modelo empírico, ya que los resultados experimentales no siguen la ecuación de *Michaelis-Menten*, donde la velocidad de reacción es igual a

$$r = -\frac{ds}{dt} = k C_S^a C_W^b C_E^c \quad [2.11]$$

donde C_S , C_W y C_E son las concentraciones de sustrato, agua y enzima respectivamente. Este modelo reproduce de forma adecuada sus resultados experimentales. Por otra parte, estos autores encuentran que durante el proceso de hidrólisis se forman cuatro fracciones de polisacáridos que evolucionan de la siguiente forma: la fracción de peso molecular $PM > 2 \cdot 10^6$ disminuye y desaparece rápidamente, la fracción comprendida entre $2000 < PM < 2 \cdot 10^6$ disminuye después de de pasar por un máximo y la fracción de $PM < 2000$ aumenta progresivamente con el tiempo de hidrólisis.

Rollings y Thompson (1984), tabla 2.13, obtienen también que los productos mayoritarios de la reacción de hidrólisis del almidón con α -amilasa, son cuatro grupos de pesos moleculares $1.5 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^5$ y 10^7 respectivamente. Estos autores demuestran que durante el proceso de hidrólisis existe la formación de agregados intermoleculares entre los polisa-

cáridos formados. Proponen un modelo cinético que incorpora la despolimerización de los cuatro grupos de polisacáridos y la desactivación de la enzima. El modelo requiere la estimación de cuatro parámetros cinéticos, uno de ellos asociado a la desnaturalización de la enzima.

Pasari y col. (1988) hidrolizan distintos sustratos con una enzima proveniente de *Schwanniomyces castellii* de la que demuestran su actividad como α -amilasa y glucoamilasa. Obtienen las constantes cinéticas de reacción, suponiendo una cinética de *Michaelis-Menten* con inhibición de producto, pero sólo hasta los 10 primeros minutos de reacción, durante los cuales suponen que actúa fundamentalmente la α -amilasa del complejo enzimático. Además, utilizan una técnica de HPLC para analizar la distribución de azúcares reductores durante el proceso de hidrólisis. Cuando se utiliza amilosa como sustrato crecen las cantidades de C-3 y C-4 al aumentar el tiempo de hidrólisis; posteriormente las concentraciones de estas sustancias descienden porque se están transformando en glucosa. Esta última aumenta su concentración durante todo el tiempo de hidrólisis. Durante la hidrólisis del almidón el comportamiento es análogo excepto para los C-4 que pasan por un máximo, disminuyen y vuelven a aumentar durante el proceso; este hecho lo explican por la aparición de dextrinas con enlaces $\alpha(1,6)$ que permanecen en el medio hasta que son hidrolizados por la amiloglucosidasa.

Komolprasert y Ofoli (1991) utilizan como sustrato almidón pregelatinizado con una amilasa termoestable (Thermamyl de Novo) para concentraciones de sustrato inferiores al 8% en peso, la cinética sigue la ecuación de *Michaelis-Menten* y se evalúan sus parámetros cinéticos. Para concentraciones de almidón mayores del 8% en peso obtienen expresiones empíricas para estimar en función del tiempo de reacción las concentraciones de sustrato sin reaccionar y la dextrosa equivalente:

$$[S] = 37.5 \exp(-0.034 t) + 2.81 \quad [2.12]$$

$$D.E. = \frac{t}{(2.02 + 0.023 t)} \quad [2.13]$$

Finalmente desarrollan un modelo de pseudoprimer orden para la estimación de la velocidad global de reacción

$$-r_s = -\frac{d[S]}{dt} = 0.033([S] - 0.06[S_0]) \quad [2.14]$$

2.5.3. Hidrólisis del almidón con mezclas enzimáticas.

La utilización de mezclas enzimáticas para realizar la hidrólisis del almidón complica considerablemente los tratamientos cinéticos, tal como se pone de manifiesto en los trabajos publicados por distintos autores.

Fujii y col. (1981) utilizan una mezcla enzimática formada por α -amilasa y glucoamilasa para la hidrólisis de almidón soluble a bajas concentraciones de sustrato, 0.5-5.4 g/L. Desarrollan un modelo que tiene en cuenta la velocidad de formación de azúcares reductores por la acción de la α -amilasa y la liberación de glucosa por el ataque de la glucoamilasa a las cadenas glucosídicas. La velocidad de formación de glucosa viene dada por una cinética de *Michaelis-Menten* y la α -amilasa conduce a dextrinas que posteriormente se hidrolizan por efecto de la exoenzima. La velocidad global de aparición de azúcares reductores, P g/L, viene dada por:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{r_{m2} \cdot S_0 \cdot e^{kt}}{K_{m2} + S_0 \cdot e^{kt}} + \frac{r_{m1} \cdot S_0}{K_{m1} + S_0} \quad [2.15]$$

Sin embargo, el modelo sólo es aplicable hasta los 10 primeros minutos de reacción.

Posteriormente, *Fujii y Kawamura (1985)*, cuando estudian la hidrólisis de diferentes sustratos puros con el complejo α -amilasa-glucoamilasa, perfeccionan el modelo anterior y encuentran que la velocidad de aparición de azúcares reductores viene dada por

$$\frac{dP}{dt} = \frac{r_{m20} \cdot S}{K_{m20} (1 + P/K_i) + S} + \frac{r_{m1} \cdot S_0}{K_{m1} + S_0} \quad [2.16]$$

donde la cinética de la reacción de α -amilasa sigue la ecuación de *Michaelis-Menten* mientras que la aparición de glucosa está retardada por la inhibición de productos. Cuando el peso molecular del sustrato decrece hasta un valor de 5000, la actuación de la α -amilasa es despreciable y la velocidad de formación de glucosa viene dada exclusivamente por la acción hidrolítica de la amiloglucosidasa. Los parámetros r_{m20} , K_{m20} , r_{m1} y K_{m1} varían con el sustrato utilizado.

Fujii y Taniguchi (1988) han utilizado como sustrato gránulos de almidón de patata y han comprobado que en este caso, la ecuación anterior no es aplicable. Explican sus resultados indicando que la acción de la α -amilasa no obedece a la ley de *Michaelis-Menten* cuando se miden azúcares solubles, ya que la mayoría de los productos de reacción formados por esta enzima, permanecen retenidos en la superficie del grano. Suponiendo una acción sinérgica entre la actuación de

la α -amilasa, que suministra el sustrato para la amiloglucosidasa y que esta última actúa sobre los extremos no reductores del sustrato de la superficie del grano, modifican el modelo anterior y obtienen que

$$\frac{d[S]}{dt} = K_m [E] \left(1 - \frac{[G]}{[G] + K_{i2}} \right) \quad [2.17]$$

$$\frac{d[G]}{dt} = \frac{r_m ([S_0] + [S])}{K_m (1 + [G]/K_{i1}) + ([S_0] + [S])} \quad [2.18]$$

La resolución simultánea de las dos ecuaciones anteriores permite la simulación del modelo propuesto.

Steverson y col. (1984), mediante un cultivo de *Saccharomycopsis fibuliger*, obtienen una mezcla de α -amilasa y glucoamilasa que utilizan posteriormente para hidrolizar distintos sustratos: almidón, amilosa y amilopectina. Aplican la ecuación de **Michaelis-Menten** con inhibición competitiva de producto para explicar la cinética del proceso y analizan la distribución de azúcares, obtenida durante el proceso, mediante cromatografía líquida; obtienen que durante la hidrólisis de la amilosa se forman polímeros de cadenas cortas, fundamentalmente en los instantes iniciales, que se hidrolizan a continuación por acción de la amiloglucosidasa a glucosa. En cambio cuando se hidroliza la amilopectina, las concentracio-

nes de maltosa y triosas aumentan inicialmente, disminuyendo progresivamente con el tiempo; mientras que los sacáridos C-4, C-5 y C-6 pasan por un máximo, descienden y vuelven a aumentar, permaneciendo a niveles constantes los de C-4 y C-5; las fracciones C-6 y C-7 vuelven de nuevo a disminuir en función del tiempo a partir de los 600 minutos de reacción.

Ram y Vankatasubramanian (1982) hidrolizan varios sustratos a concentraciones del 1% en peso utilizando un complejo enzimático formado por glucoamilasa y pululanasa inmovilizadas. El efecto de la pululanasa parece ser más importante en los estados finales de la hidrólisis del almidón y no tiene un marcado efecto sobre la cinética enzimática por debajo del 80% en D.E. La cinética enzimática, por tanto, está controlada por la actuación de la glucoamilasa que según estos autores sigue la ecuación de **Michaelis-Menten**. El efecto de la pululanasa se traduce en incrementar el valor de r_{\max} , respecto al obtenido para la acción en solitario de la glucoamilasa.

Nebesny (1990) estudia la composición de los carbohidratos y la estructura molecular de las dextrinas formadas durante un proceso de hidrólisis enzimática, utilizando almidón pregelatinizado con α -amilasa y una mezcla enzimática formada por β -amilasa y pululanasa. Los cambios más significativos, tanto en el peso molecular de los carbohidratos, así como en el número de ramificaciones presentes en las moléculas, se producen durante la licuación del almidón y en menor medida

durante la sacarificación con β -amilasa y pululanasa. No explica sus resultados desde el punto de vista cinético.

Sreenath y Miller (1990) también utilizan un almidón pregelatinizado con α -amilasa como sustrato para la hidrólisis enzimática con mezclas de amilasa y pululanasa. Según estos autores, la pululanasa sólo libera productos de D.P. comprendidos entre 115-2300 cuando actúa sólo en el proceso de hidrólisis; la amilasa comercial libera grandes cantidades de glucosa y productos con D.P. entre 2.5 y 77. El hidrolizado obtenido cuando actúan conjuntamente ambas enzimas contiene fundamentalmente glucosa, maltosa y maltotriosa. Estos autores explican su alto contenido en glucosa por la existencia de impurezas de glucoamilasa en el complejo enzimático utilizado.

2.6. OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION.

El trabajo que se describe en esta memoria forma parte de una línea de investigación que desarrolla el grupo de *Bio-reactores* del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, en colaboración con el Departamento de I+D de UNIASA (Granada), encaminada a obtener la tecnología adecuada para la fabricación de hidrolizados enzimáticos de interés alimentario, fundamentalmente a partir de proteínas lácteas y de harinas de cereales.

En la primera etapa se trata de estudiar la cinética de la hidrólisis enzimática del almidón de harina de trigo con α -amilasa, pululanasa y distintas mezclas de ambas enzimas; además se pondrán a punto las técnicas necesarias para conocer la distribución de sacáridos en los hidrolizados enzimáticos. En etapas posteriores, se estudiará la influencia de la composición de los hidrolizados sobre las características reológicas y de textura de posibles papillas lacteadas.

El estudio cinético realizado tiene como fin obtener expresiones que permitan conocer la conversión global y la velocidad de hidrólisis en función de las variables de operación; mediante estas ecuaciones se puede estimar la conversión y realizar el diseño del reactor enzimático.

Los ensayos cinéticos se han realizado con una α -amilasa fúngica, que es más fácil de desactivar térmicamente, con pululanasa y distintas mezclas de α -amilasa y pululanasa. En todos los casos, la cinética se ha seguido determinando grupos reductores en el medio, expresados como dextrosa equivalente.

Para conocer la distribución de sacáridos en los hidrolizados se emplea una técnica de HPLC, que permite determinar las concentraciones de los sacáridos cuyo grado medio de polimerización sea igual o inferior a siete. En esta etapa se estudia la influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa, de pululanasa y de mezclas de ambas enzimas sobre la composición del hidrolizado.

Conocida la variación de la conversión global, X , con las variables de operación (pH, temperatura, S_0 , E_0 , y tipo de enzima) y de la distribución de tamaños moleculares con aquella, X , es posible determinar el equipo y modo de operación más idóneos para llevar a cabo el proceso industrialmente. En todo caso, ya se pueden elegir los valores óptimos de las variables de operación.

3. TECNICA EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA

4 FEB. 1993

COMISION DE DOCTORADO

3.1- MATERIALES

3.1.1- Sustrato

El sustrato utilizado ha sido harina de trigo tostada, suministrada por *UNIASA*, en un horno a 135°C durante una hora. La harina tiene la siguiente composición:

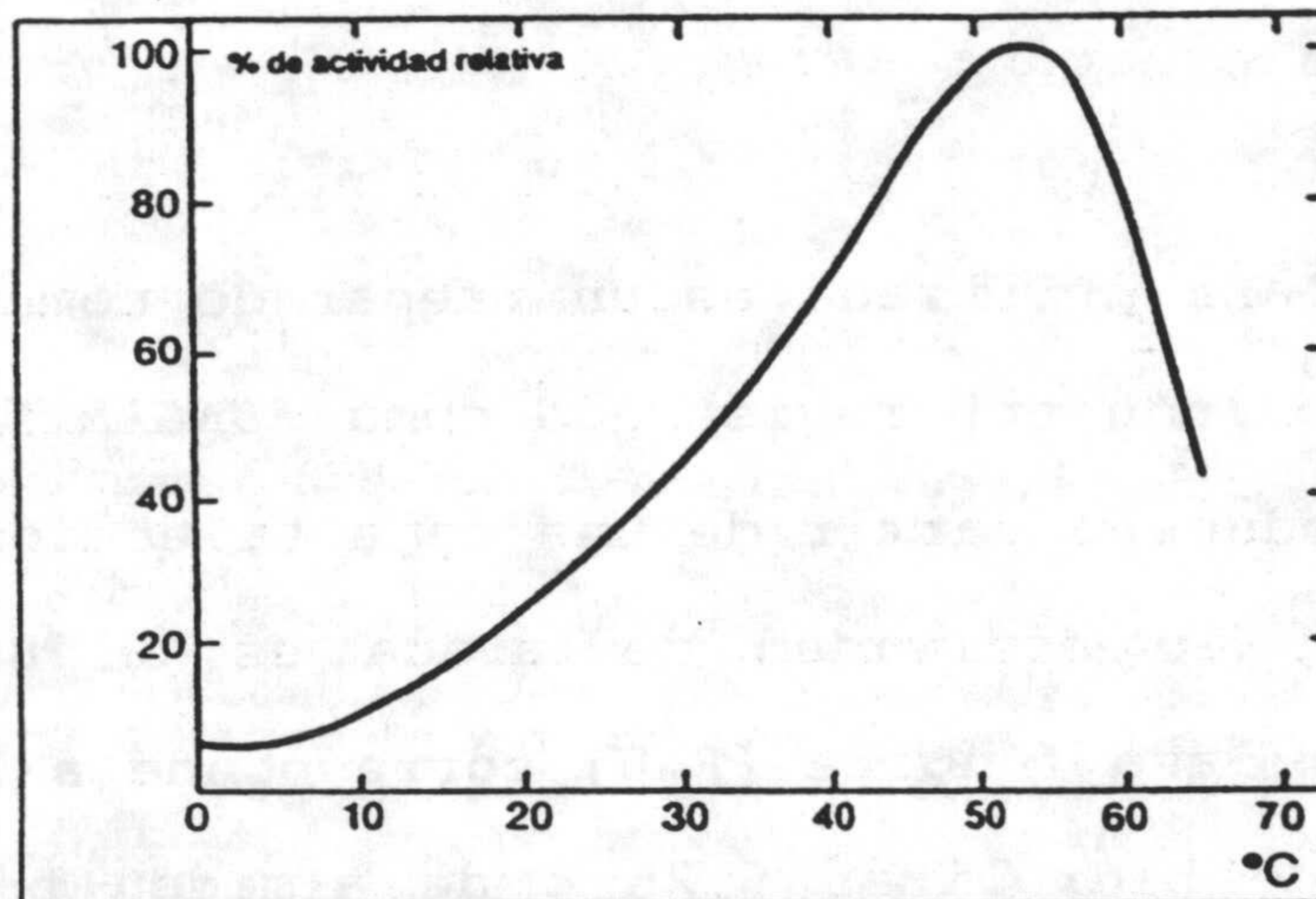
| <u>Sustancia</u> | <u>% Peso</u> |
|---------------------|---------------|
| Agua | 3,00 |
| Proteínas | 11,91 |
| Grasa | 1,27 |
| Almidón | 79,35 |
| Celulosa | 0,67 |
| Ceniza | 0,52 |
| Otros carbohidratos | 3,28 |

El porcentaje en agua se determinó por secado en una estufa a 120°C hasta pesada constante; las cenizas por calcinación en horno a 550°C; las proteínas por el método de *Kjeldahl*; la grasa por el método *Weibull*; el almidón por el método de la *AACC* (*American Association of Cereal Chemist*); la celulosa por el método de la *AOAC* (*Association of Official Agricultural Chemist*) y el resto de los hidratos de carbono por diferencia.

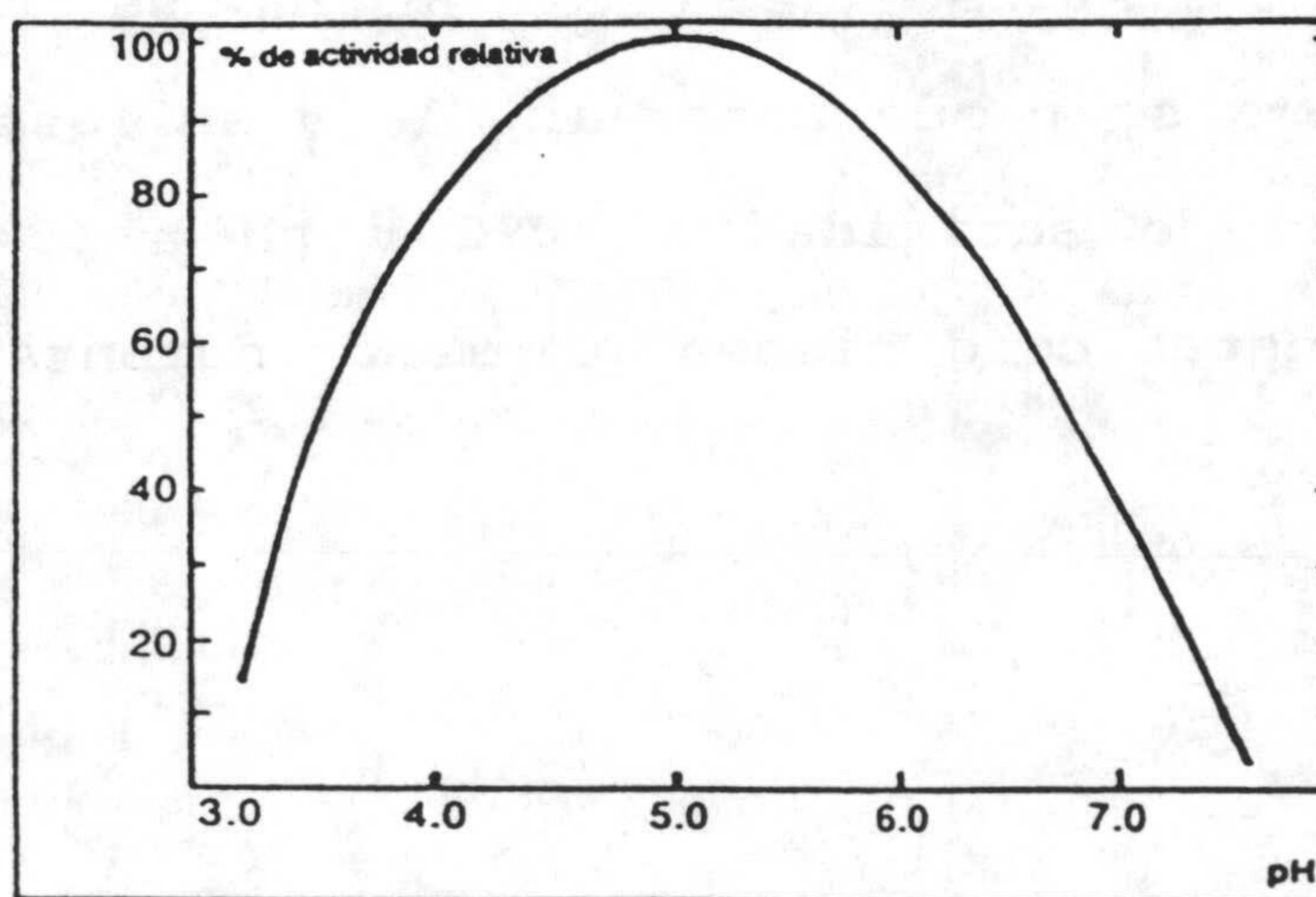
3.1.2- Enzimas

La α -amilasa utilizada es un preparado comercial suministrado por Novo Industri registrado como *FUNGAMYL 800L*. Esta α -amilasa se produce a partir de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae*. Su actividad declarada es de 800 FAU/g. Una unidad de α -amilasa fúngica (FAU) corresponde a la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 5,26 g de almidón por hora (Merck Amylum Solubile Erg. B.6 Batch 9947275) cuando la reacción transcurre durante 20 minutos a 37°C y pH = 4,7. La densidad del preparado comercial es 1.25 g/mL.

Las características de esta enzima se recogen en la figura 3.1. Como se puede observar, la α -amilasa presenta sus valores óptimos de actividad a 50°C y pH = 5 y mantiene su actividad, en estas condiciones, al menos durante 5 horas.



Influencia de la temperatura en la actividad de Fungamyl a un pH de 4,7



Influencia del pH en la actividad de Fungamyl

Figura 3.1. Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad de Fungamyl.

La enzima desramificadora utilizada en esta investigación ha sido *PROMOZYME 200L*, obtenida mediante fermentación sumergida de una cepa seleccionada del *B. acidopullulyticus* y suministrada por Novo Industri. Pertenece al grupo de enzimas desramificadoras conocidas como pululanasa (*E.C.3.2.1.41 pululana 6-glucanohidrolasa*). Cataliza la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1-6)$ en la pululana y la amilopectina, parcialmente hidrolizadas por α -amilasa, siempre que haya un mínimo de dos unidades de glucosa en la cadena lateral.

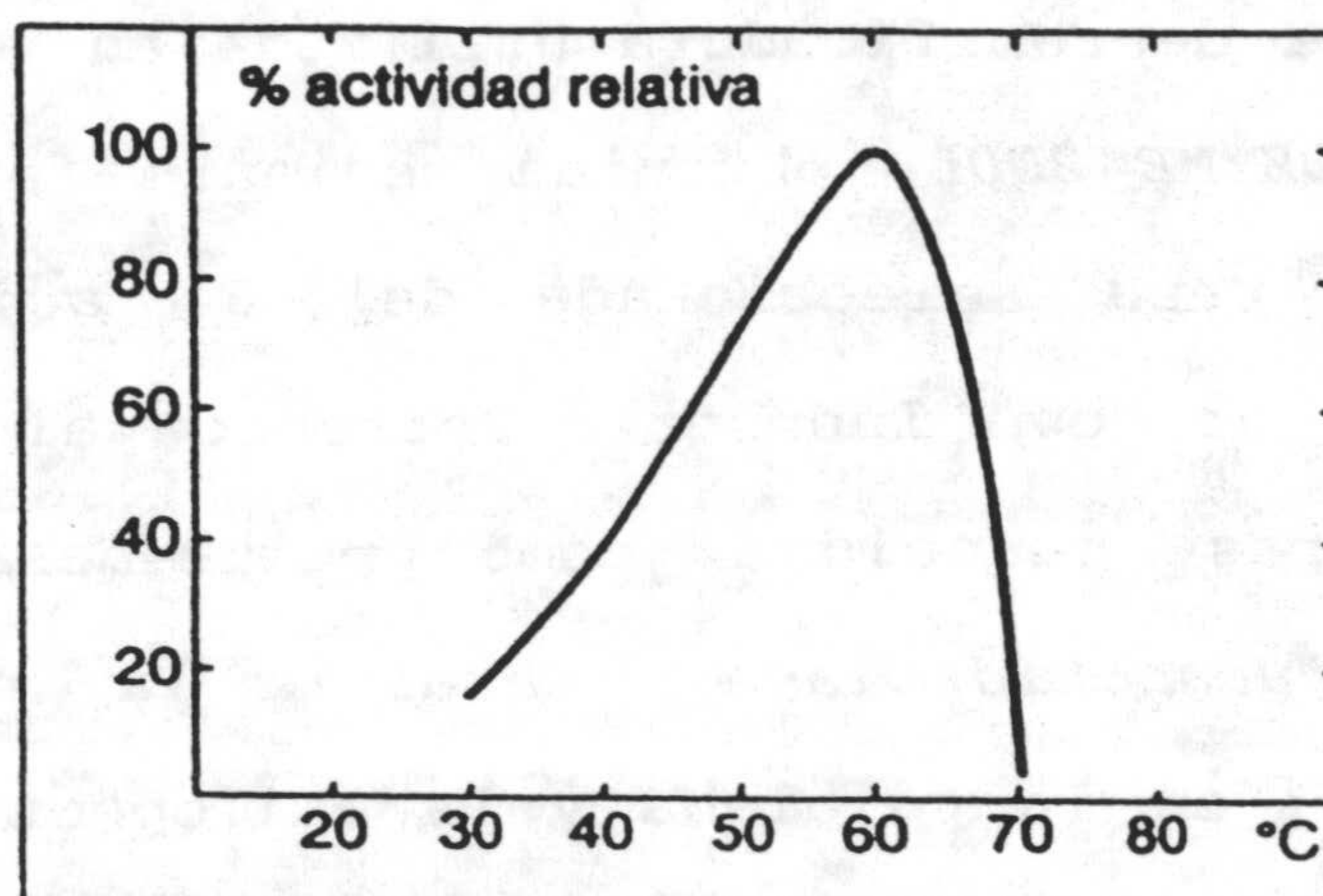
Este preparado, *PROMOZYME 200L*, es un líquido marrón cuya densidad es de 1,25 g/mL. Su actividad declarada es de 200 PUN/g. Una unidad Novo Pululanasa (PUN) se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar la pululana con una velocidad equivalente a la producción de 1 micromol de glucosa por minuto, bajo las siguientes condiciones normalizadas:

0,2 % de sustrato pululana.

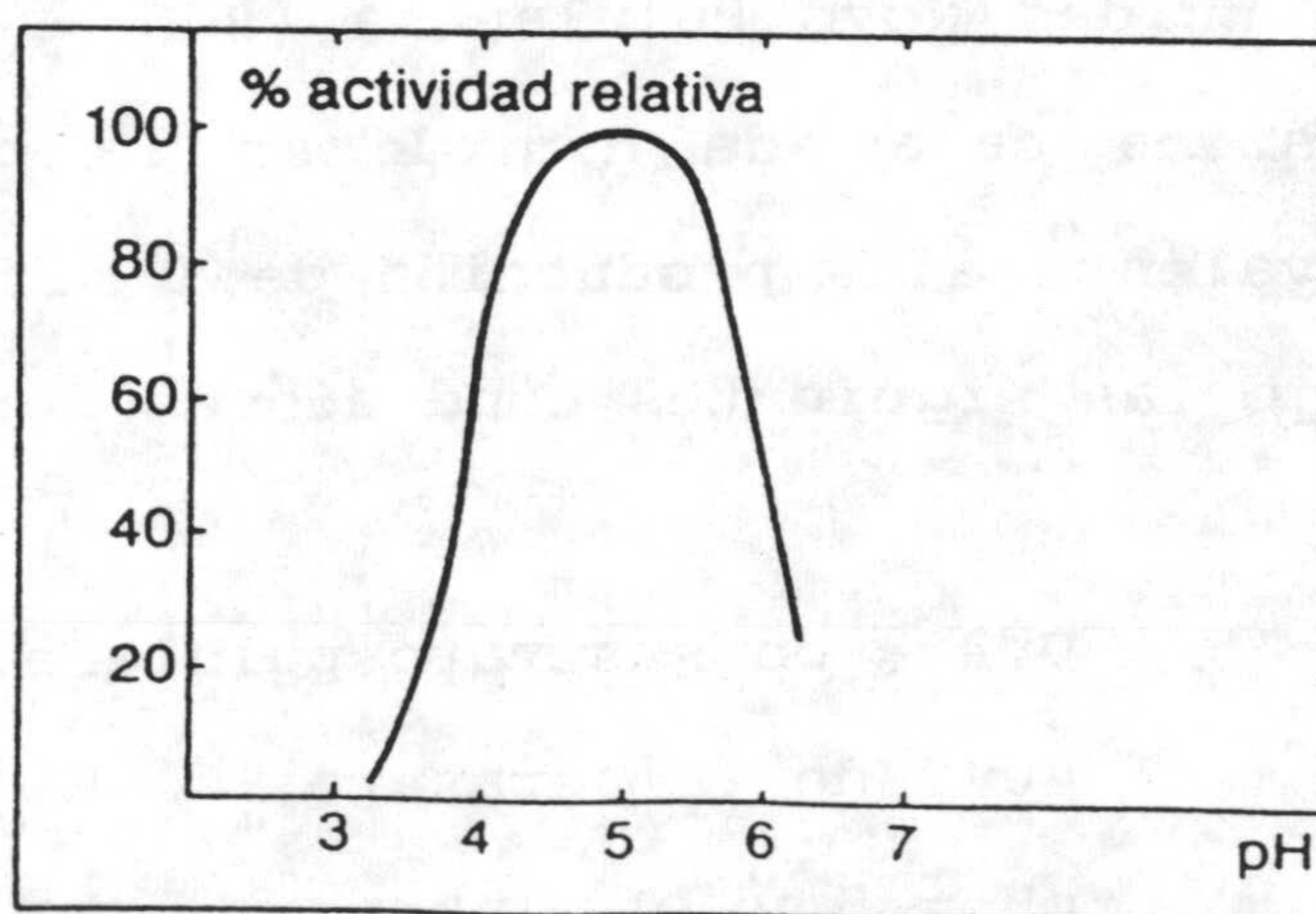
40°C de temperatura.

pH = 5 y 30 minutos.

La influencia de la temperatura y del pH sobre la actividad de esta enzima se muestran en la figura 3.2.



Influencia de la temperatura sobre la actividad



Influencia del pH sobre la actividad.

Figura 3.2. Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad de Promozyme.

3.2- METODOS

3.2.1- Determinación de azúcares reductores.

3.2.1.1. Método de Luff-Schoorl.

Para determinar la cantidad de azúcares reductores (A.R.) liberados durante la hidrólisis enzimática del almidón con α -amilasa y pululanasa, expresados en forma de Dextrosa Equivalente (D.E), se ha seguido el método de valoración de *Luff-Schoorl*, (*Análisis de alimentos. Métodos oficiales y recomendados por el centro de Investigación y control de calidad, Ministerio de Sanidad y consumo*), (1985) para el que se han utilizado las siguientes disoluciones:

* Reactivo de Luff-Schoorl:

- 388 g de carbonato sódico decahidratado ($\text{Na}_2\text{CO}_3, 10 \text{ H}_2\text{O}$) o 143,8 g del mismo producto pero anhidro, disueltos en 400 mL de agua destilada.
- 25 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{SO}_4 \text{ Cu } 5\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de agua destilada.
- 50 g de ácido cítrico anhidro (o 54,28 g de ácido cítrico monohidratado) en 300 mL de agua destilada.

Se mezclan las disoluciones de carbonato sódico y de ácido cítrico y luego se añade el sulfato de cobre enrasando hasta un litro.

* Disolución de yoduro potásico:

Es una disolución de KI al 30 % en peso. Debe ser preservada de la luz por lo que se guarda en frasco topacio.

* Disolución de almidón: (indicador)

5 g de almidón soluble y 200 g de cloruro sódico (NaCl) para conservar la disolución. Posteriormente, se tiene 10 minutos a ebullición.

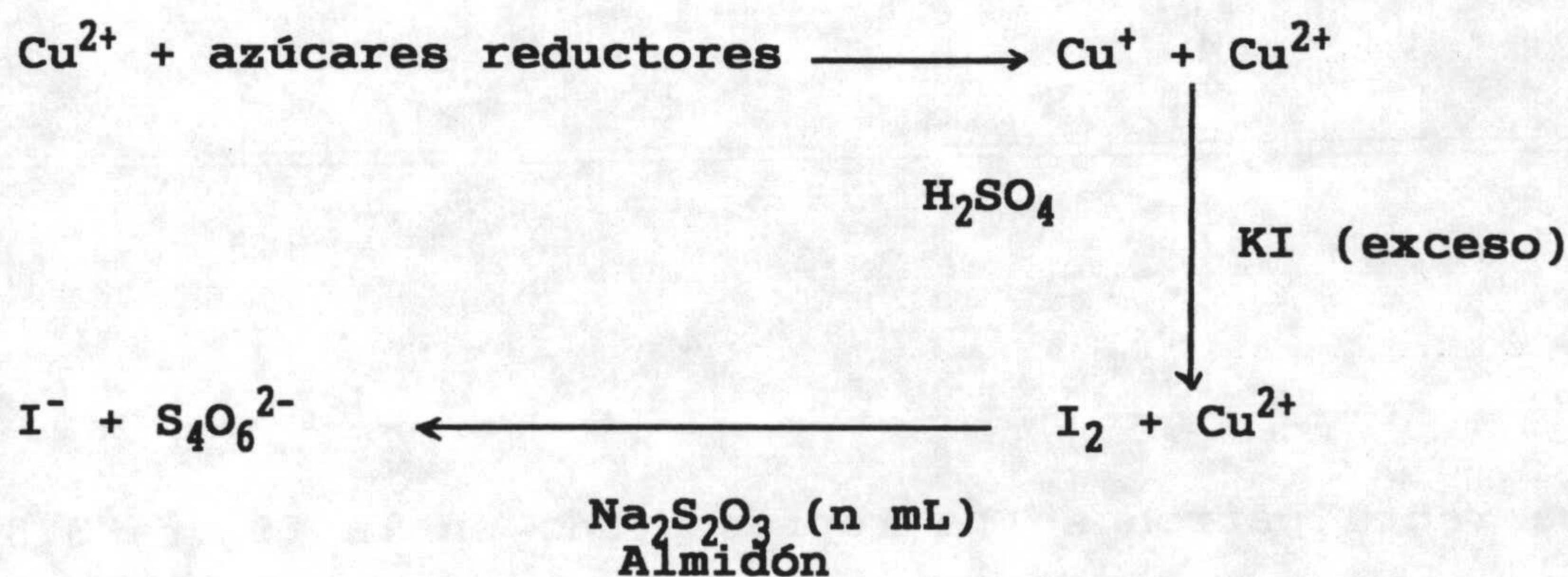
* Disolución (0,05N) de tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

* Disolución de ácido sulfúrico al 25 % en volúmen.

260 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) del 96 % en peso en un litro de disolución.

La determinación de A.R. se hace de la siguiente forma:
 La muestra problema (1 mL) se añade a 25 mL de disolución cuproalcalina y el conjunto se calienta a ebullición con reflujo durante 10 minutos, se enfría y a continuación se añaden 10 mL de la disolución de KI y 25 mL de la disolución de H₂SO₄. El yodo producido se valora finalmente con la disolución de tiosulfato sódico. Para resaltar mejor el punto final de la valoración, se añaden, cerca del mismo, 2 mL de la disolución del almidón (indicador).

Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



El punto final aparece cuando el color azul del complejo I₂-almidón cambia a blanco rosado.

El calibrado del método se ha realizado con disoluciones de glucosa de concentraciones comprendidas entre 0 y 70 g/L.

Las muestras de glucosa se han sometido a los mismos tratamientos previos que las muestras problema y se ha reali-

zado el ensayo de azúcares reductores sobre ellas. Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1

*Recta patrón para la determinación de
azúcares reductores*

| <u>Disolución de glucosa, g/L</u> | <u>Na₂S₂O₃, mL</u> |
|-----------------------------------|---|
| 0 | 48,0 |
| 1 | 41,0 |
| 2 | 36,0 |
| 3 | 30,0 |
| 4 | 24,2 |
| 5 | 19,5 |
| 7 | 8,5 |

La recta patron se ha representado en la figura 3.3 y la relación obtenida, por regresión lineal, para determinar la cantidad de azúcares reductores, g/100 mL, expresados como dextrosa equivalente, es la siguiente:

$$\text{A.R. (g/100mL)} = 8.40 - 0.177 V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}(\text{mL}) \quad [3.1]$$

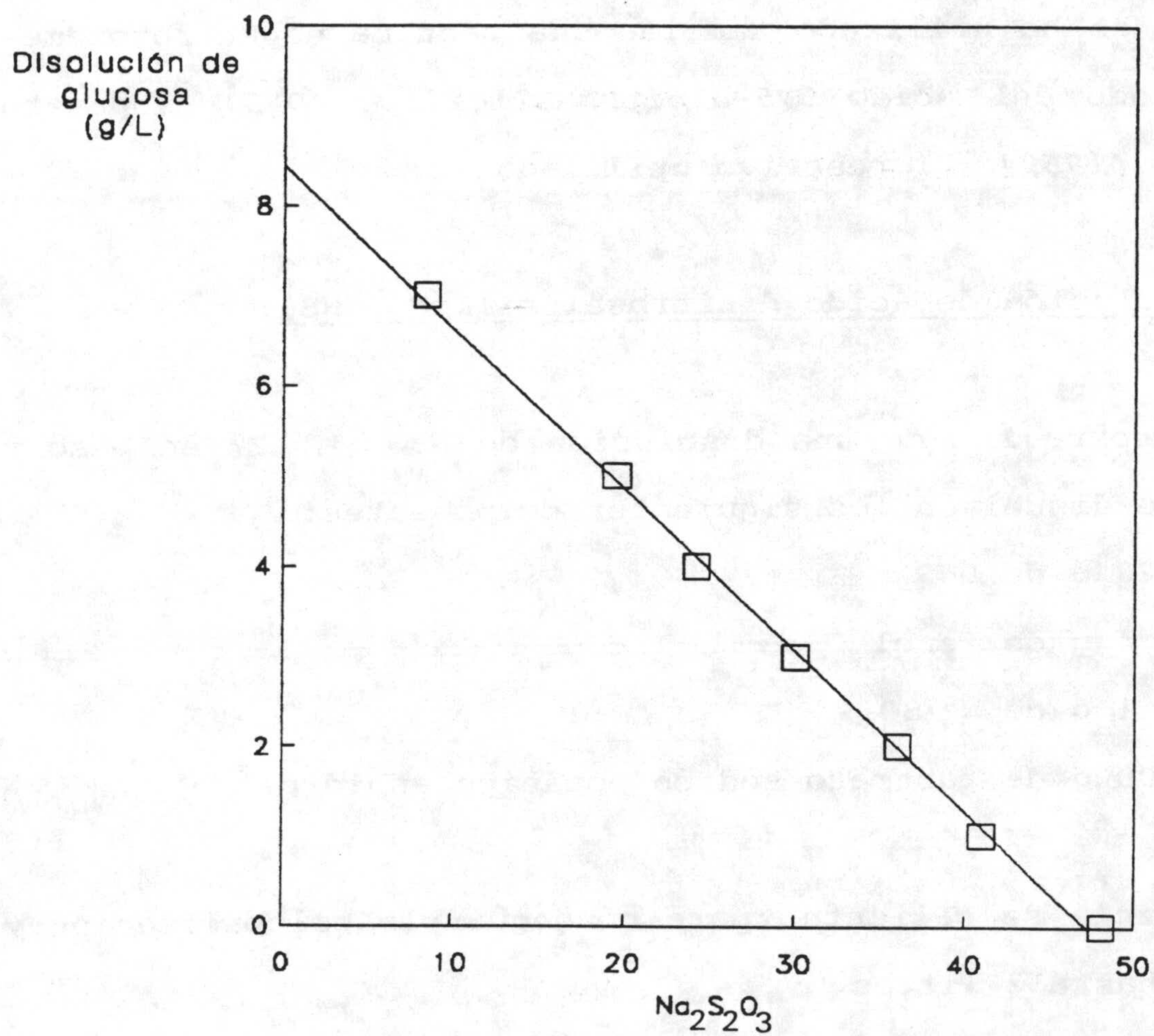


Figura 3.3. Recta patrón para la determinación de azúcares reductores por el método de Luff-Schoorl.

3.2.1.2. Método del DNS.

Para la determinación de la concentración de azúcares reductores se ha utilizado también una técnica espectrofotométrica: método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) propuesto por *Miller (1959)*. El reactivo utilizado es:

* Disolución de ácido dinitrosalicílico (DNS):

Se prepara 1 L de una disolución de NaOH al 2% en peso y en ésta se disuelven los siguientes componentes:

20 g de DNS

4 g de fenol

1 g de Na₂SO₃

400 g de tartrato sódico potásico anhidro.

La mezcla se calienta para conseguir la solubilización y se enrasa hasta 2 litros.

Para la determinación de azúcares reductores, se mezclan dos volúmenes definidos de muestra problema y de reactivo DNS en un tubo de ensayo, se mantiene en agua hirviendo durante 15 minutos, con lo que se alcanza el desarrollo del color. A continuación se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro (*Spectronic 2000*). Como blanco se ha utilizado una disolución

de idéntica composición y volúmen que la problema, sometida a los mismos tratamientos que ésta, pero de concentración nula en azúcares reductores.

El calibrado del método se ha obtenido preparando disoluciones de glucosa de concentraciones comprendidas entre 100 y 700 mg/L. Las muestras de glucosa se han sometido a los mismos tratamientos previos que las muestras problema y se ha realizado el análisis de azúcares reductores indicado anteriormente sobre ellas.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2 donde se presentan los A.R., en mg/L, frente a la absorbancia medida a 640 nm y se representan en la figura 3.4. La relación obtenida entre A.R. y absorbancia ha sido

$$\text{A.R. (mg/L)} = 17.43 + 880.38 \cdot A_{640 \text{ nm}} \quad [3.2]$$

Tabla 3.2

Recta patrón para la determinación de azúcares reductores mediante el método de DNS.

| <u>Disolución de glucosa (mg/L)</u> | <u>A_{640nm}</u> |
|---|--------------------------|
| 0 | 0.000 |
| 100 | 0.080 |
| 200 | 0.190 |
| 300 | 0.321 |
| 400 | 0.445 |
| 500 | 0.556 |
| 600 | 0.655 |
| 700 | 0.775 |

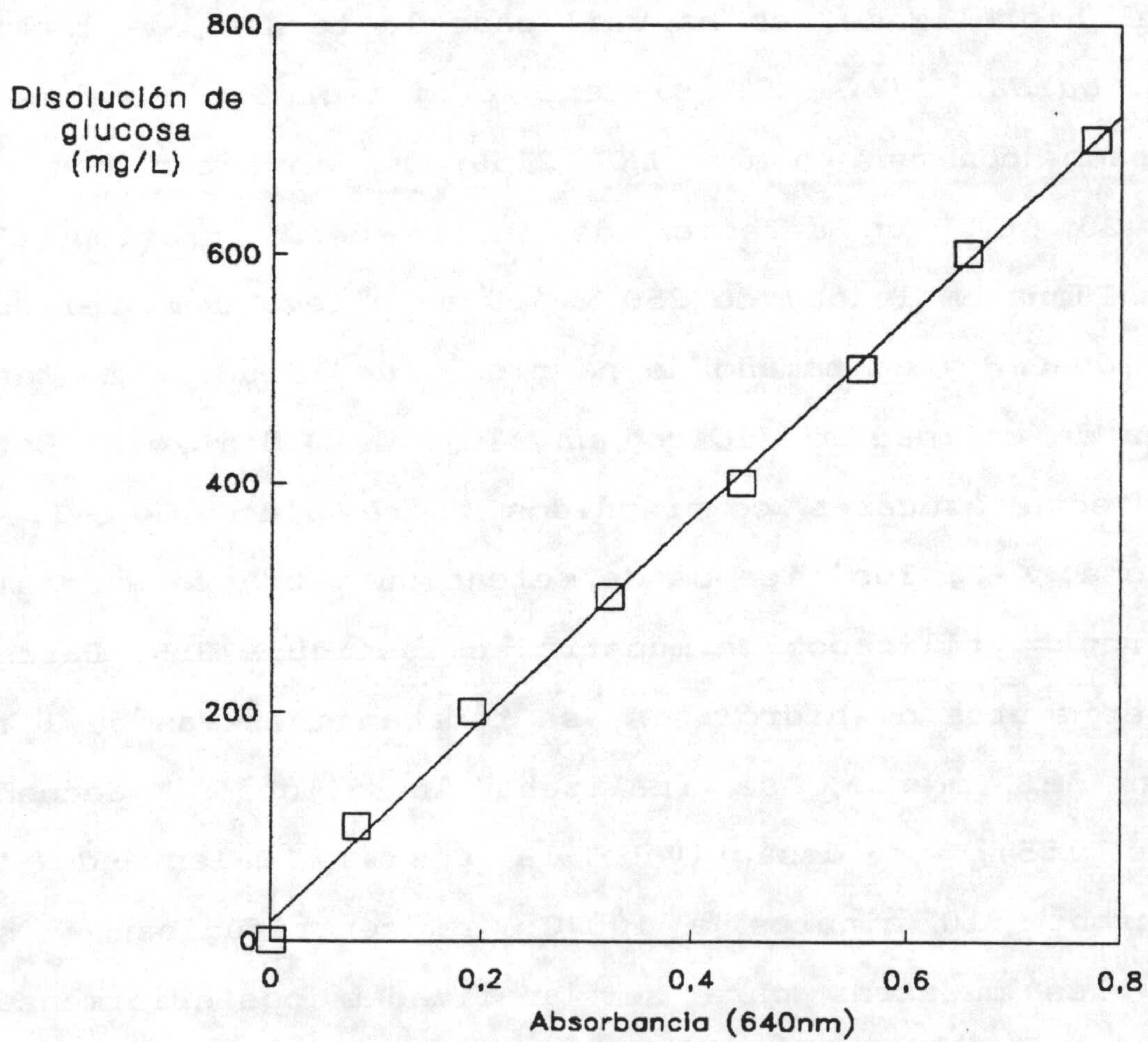


Figura 3.4. Recta patrón para la determinación de azúcares reductores por el método del DNS.

3.2.2. Distribución de sacáridos.

Para determinar la distribución de azúcares reductores, A.R., en el hidrolizado, se ha utilizado la técnica de *cromatografía líquida, HPLC*. El sistema cromatográfico empleado está equipado con una bomba *LKB 2150*; un inyector con un "loop" de 20 μ L y un detector de índice de refracción *LKB 2142*. La columna empleada, de 250 x 4.6 mm, lleva como relleno *Nucleosil 100-C18* y un tamaño de partícula de 10 μ m. Como fase móvil, agua de calidad *milliQ* con un flujo de 0,8 mL/min. Esta columna detecta azúcares comprendidos entre glucosa, C-1, y maltoheptaosa, C-7; los tiempos de retención y un cromatograma de los patrones utilizados se muestra en la figura 3.5. Durante los experimentos de hidrólisis, se tomaban muestras de 1 mL en función del tiempo, se realizaba la dilución adecuada (usualmente 1:5), se desactivaba la enzima, calentando la muestra durante 10 minutos a 100°C, se centrifugaban y se congelaban las muestras para ser analizadas posteriormente. Antes de la inyección, las muestras se filtraban utilizando filtros de 0.45 μ m para eliminar sólidos de la disolución.

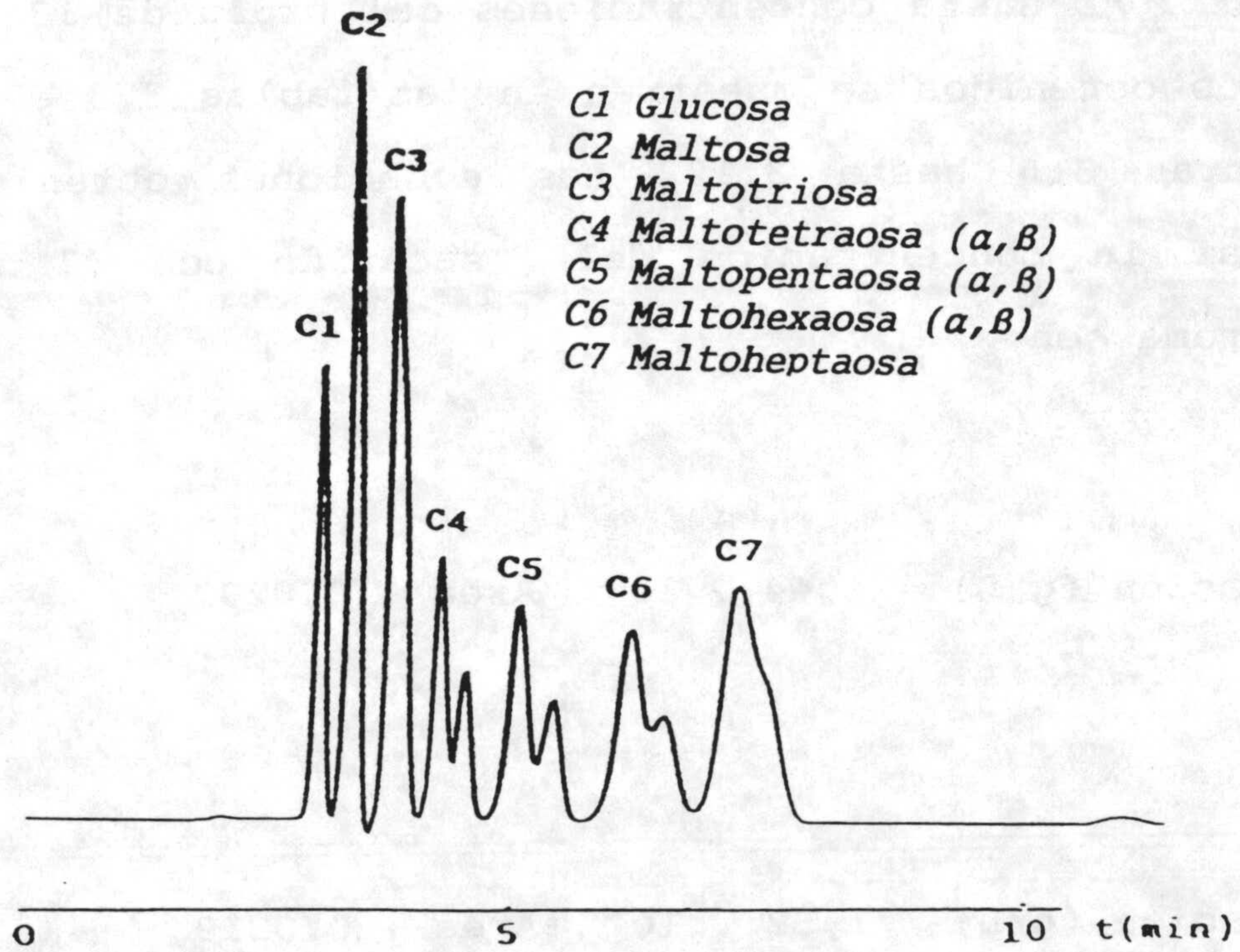


Figura 3.5. Cromatograma de los sacáridos obtenidos mediante la técnica HPLC.

Para el calibrado de la columna, se prepararon disoluciones de patrones de glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa obtenidos de *SIGMA CHEMICAL* hasta concentraciones del orden de 13 g/L. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3.3 a 3.9 y en las figuras 3.6 hasta 3.12. Las ecuaciones obtenidas para relacionar la concentración del sacárido con el área del cromatograma son:

Glucosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,44 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 0,0292$$

Maltosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,52 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 0,0319$$

Maltotriosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,60 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 0,0590$$

Maltotetraosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,44 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 4,05 \cdot 10^{-4}$$

Maltopentaosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,544 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 9,46 \cdot 10^{-3}$$

Maltohexaosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,63 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 0,0112$$

Maltoheptaosa:

$$\text{Concentración (g/L)} = 1,33 \cdot 10^{-6} \cdot \text{Area} + 0,0826$$

Tabla 3.3

Líneas de calibrado para la glucosa

| Glucosa (1) | | Glucosa (2) | |
|-------------|-----------|-------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 1.028 | 0.7790 | 0.1285 | 0.0979 |
| 3.084 | 2.2730 | 0.2056 | 0.1365 |
| 7.097 | 5.0100 | 0.2570 | 0.1738 |
| 8.076 | 5.6040 | 0.3854 | 0.2910 |
| 10.278 | 7.0590 | 0.6167 | 0.4069 |
| 12.236 | 8.0930 | 0.7708 | 0.5165 |
| | | 0.8114 | 0.5046 |
| | | 0.8871 | 0.6580 |
| | | 1.0095 | 0.7410 |
| | | 1.1142 | 1.1441 |
| | | 1.2848 | 0.9680 |
| | | 1.4194 | 0.9269 |
| | | 1.5295 | 1.1820 |
| | | 1.6151 | 1.0495 |
| | | 1.8676 | 1.1578 |
| | | 2.0189 | 1.3193 |
| | | 2.0556 | 1.3327 |
| | | 2.1252 | 1.2849 |
| | | 2.4472 | 1.6669 |
| | | 2.5695 | 1.7034 |
| | | 2.7047 | 1.6583 |
| | | 3.0590 | 2.1149 |
| | | 3.2200 | 2.0327 |
| | | 5.2640 | 3.3108 |

*(1) Disolución de solo esta sustancia.**(2) Formando mezcla con otros sacáridos.*

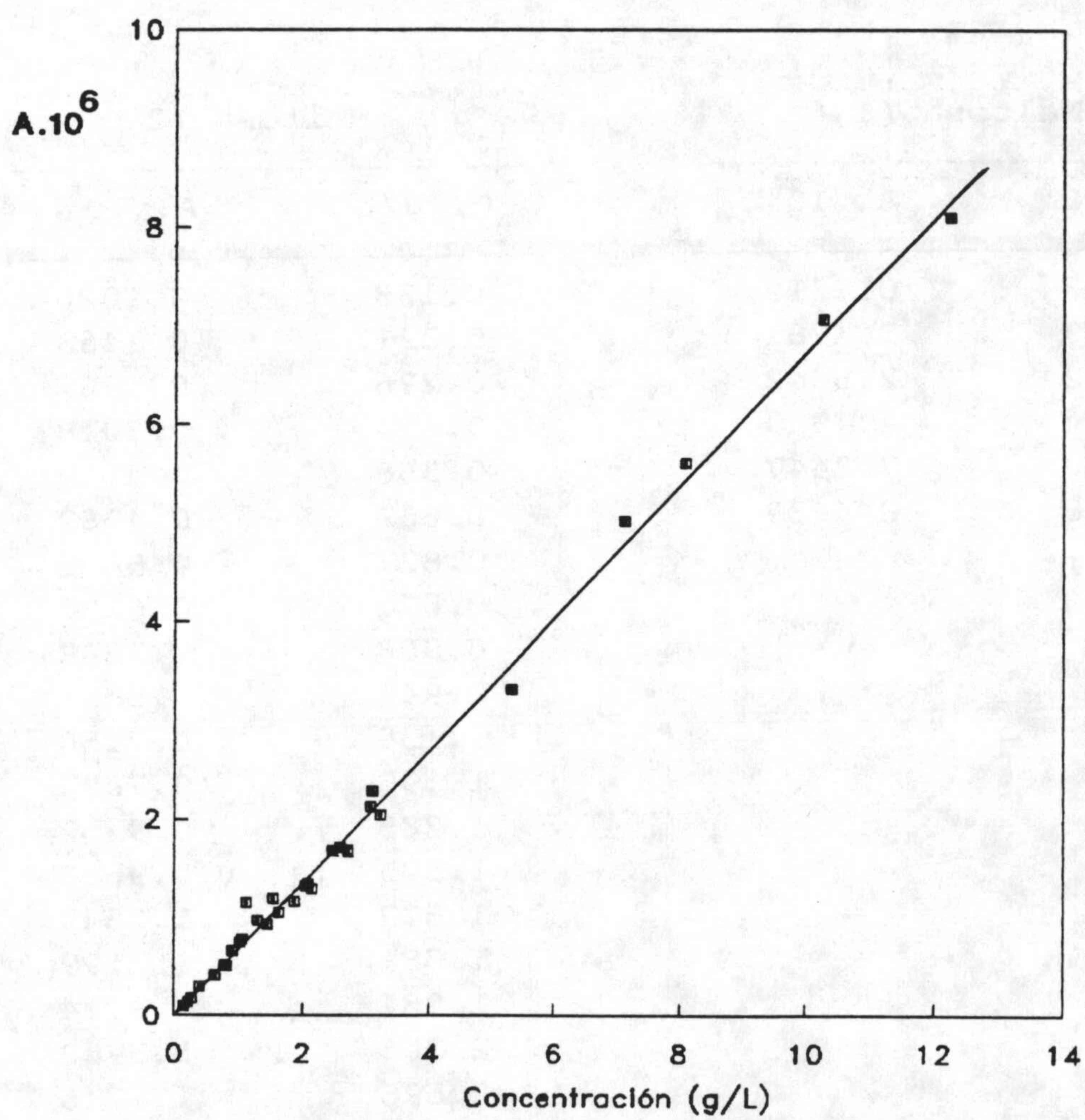


Figura 3.6. Línea de calibrado para la determinación de la glucosa.

Tabla 3.4

Línea de calibrado para la maltosa

| Maltosa (1) | | Maltosa (2) | |
|-------------|-----------|-------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 1.103 | 0.7319 | 0.138 | 0.1026 |
| 3.309 | 2.1761 | 0.221 | 0.1468 |
| 4.542 | 2.8842 | 0.276 | 0.1907 |
| 7.526 | 4.7959 | 0.414 | 0.3018 |
| 11.030 | 7.3447 | 0.568 | 0.4169 |
| 12.976 | 8.4439 | 0.662 | 0.4282 |
| | | 0.827 | 0.5432 |
| | | 0.871 | 0.5280 |
| | | 0.908 | 0.5842 |
| | | 0.941 | 0.6853 |
| | | 1.135 | 0.7150 |
| | | 1.195 | 0.7072 |
| | | 1.285 | 0.9752 |
| | | 1.505 | 0.9658 |
| | | 1.622 | 1.2549 |
| | | 1.881 | 1.2199 |
| | | 1.981 | 1.1794 |
| | | 2.206 | 1.3960 |
| | | 2.595 | 1.7716 |
| | | 2.903 | 1.7291 |
| | | 2.990 | 1.7744 |
| | | 3.244 | 2.2318 |
| | | 3.415 | 2.0839 |

(1) *Disolución de solo esta sustancia.*

(2) *Formando mezcla con otros sacáridos.*

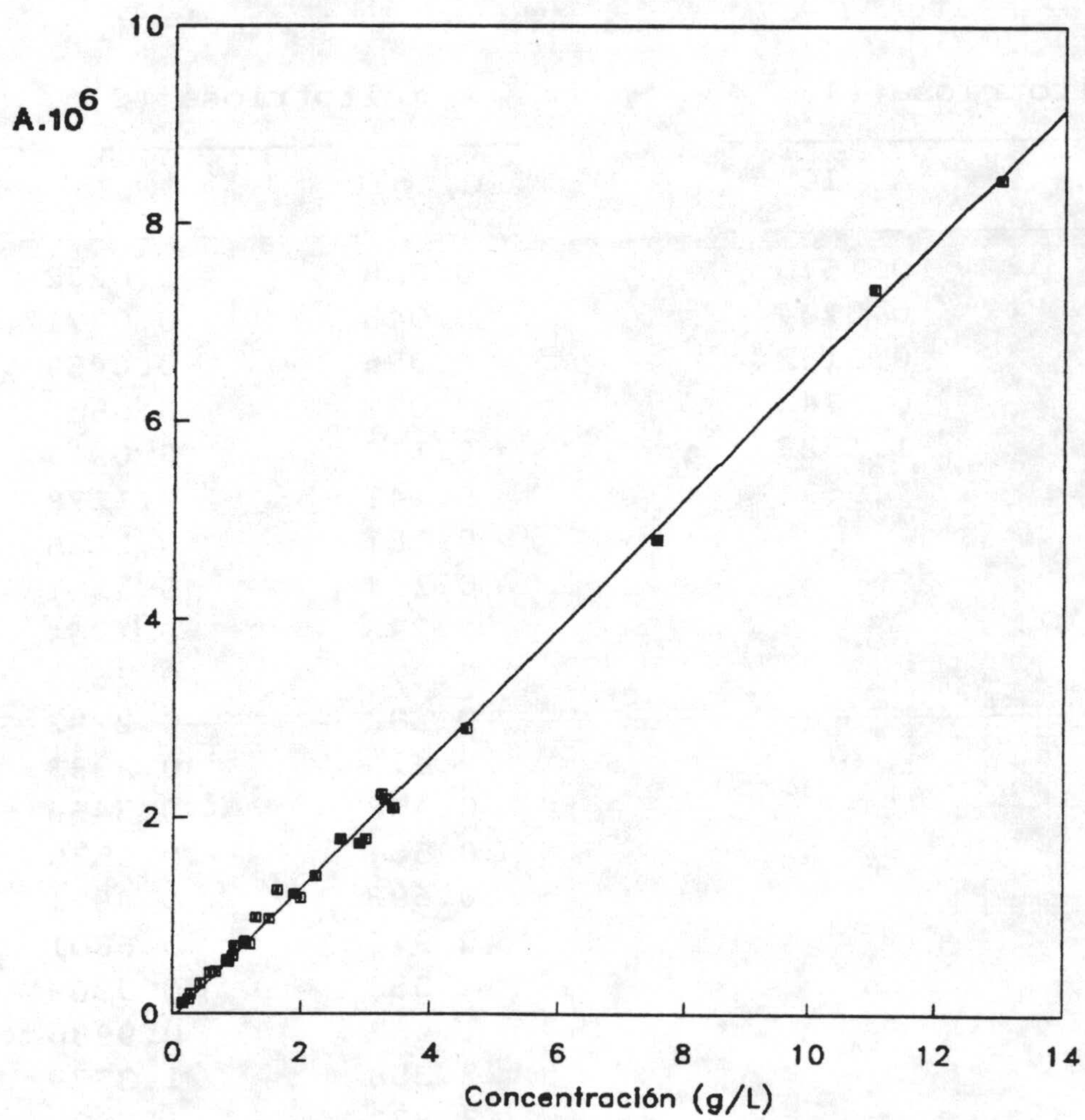


Figura 3.7. Línea de calibrado para la determinación de la maltosa.

Tabla 3.5*Línea de calibrado para la maltotriosa*

| Maltotriosa (1) | | Maltotriosa (2) | |
|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 0.226 | 0.1575 | 0.028 | 0.0262 |
| 0.564 | 0.3704 | 0.045 | 0.0371 |
| 0.903 | 0.6132 | 0.056 | 0.0459 |
| 1.129 | 0.7742 | 0.070 | 0.0566 |
| 2.258 | 1.1523 | 0.113 | 0.0917 |
| 11.290 | 7.9694 | 0.141 | 0.1238 |
| | | 0.181 | 0.1425 |
| | | 0.194 | 0.1381 |
| | | 0.226 | 0.1764 |
| | | 0.277 | 0.2654 |
| | | 0.282 | 0.2282 |
| | | 0.416 | 0.2933 |
| | | 0.452 | 0.3456 |
| | | 0.564 | 0.4539 |
| | | 0.693 | 0.4871 |
| | | 0.970 | 0.6801 |
| | | 1.385 | 0.9309 |
| | | 1.487 | 0.9986 |
| | | 2.258 | 1.3779 |
| | | 2.822 | 1.7638 |

*(1) Disolución de solo esta sustancia.**(2) Formando mezcla con otros sacáridos.*

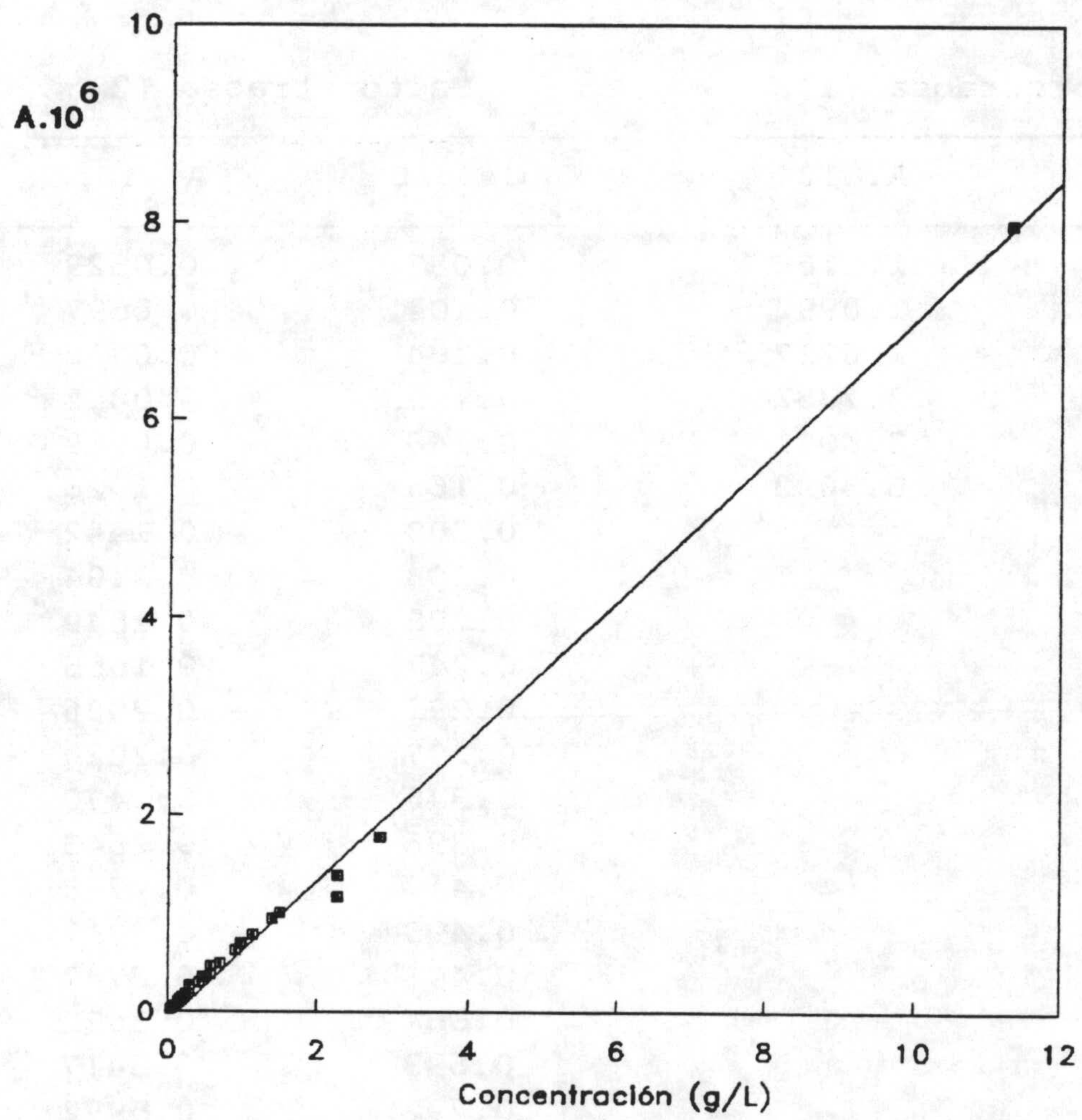


Figura 3.8. Línea de calibrado para la determinación de la maltotriosa.

Tabla 3.6*Línea de calibrado para la maltotetraosa*

| Maltotetraosa (1) | | Maltotetraosa (2) | |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| C, g/L | A. 10 ⁶ | C, g/L | A. 10 ⁶ |
| 1.662 | 1.1166 | 0.087 | 0.0529 |
| 1.662 | 1.0992 | 0.104 | 0.0597 |
| 2.375 | 1.6717 | 0.104 | 0.0748 |
| 3.958 | 2.7382 | 0.125 | 0.0816 |
| 5.541 | 3.8071 | 0.148 | 0.0989 |
| 7.916 | 5.3093 | 0.166 | 0.1026 |
| | | 0.208 | 0.1442 |
| | | 0.208 | 0.1494 |
| | | 0.208 | 0.1549 |
| | | 0.247 | 0.1655 |
| | | 0.292 | 0.2006 |
| | | 0.297 | 0.2220 |
| | | 0.346 | 0.2470 |
| | | 0.396 | 0.2643 |
| | | 0.417 | 0.2768 |
| | | 0.495 | 0.3711 |
| | | 0.495 | 0.3749 |
| | | 0.554 | 0.3632 |
| | | 0.693 | 0.5417 |
| | | 0.792 | 0.5992 |
| | | 0.989 | 0.7652 |
| | | 1.579 | 1.0091 |

(1) *Disolución de solo esta sustancia.*

(2) *Formando mezcla con otros sacáridos.*

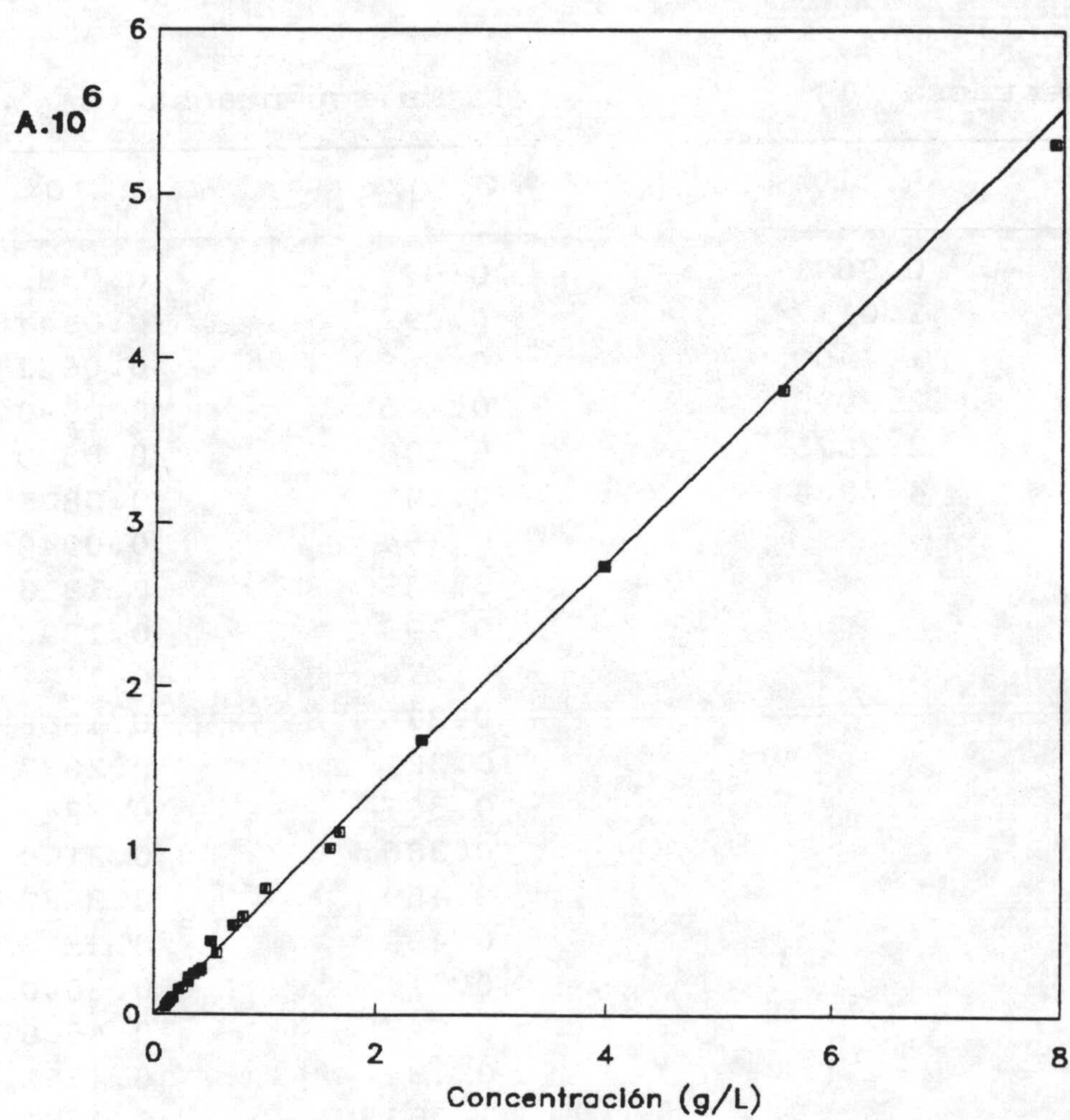


Figura 3.9. Línea de calibrado para la determinación de la maltotetraosa.

Tabla 3.7*Línea de calibrado para la maltopentaosa*

| Maltopentaosa (1) | | Maltopentaosa (2) | |
|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 1.468 | 0.9691 | 0.077 | 0.0382 |
| 1.541 | 1.0113 | 0.092 | 0.0547 |
| 2.202 | 1.4400 | 0.096 | 0.0622 |
| 3.670 | 2.3995 | 0.116 | 0.0590 |
| 5.138 | 3.2875 | 0.138 | 0.0870 |
| 7.340 | 4.6904 | 0.147 | 0.0875 |
| | | 0.154 | 0.0940 |
| | | 0.183 | 0.1316 |
| | | 0.193 | 0.1390 |
| | | 0.270 | 0.1471 |
| | | 0.275 | 0.1968 |
| | | 0.321 | 0.2037 |
| | | 0.367 | 0.2247 |
| | | 0.386 | 0.2190 |
| | | 0.459 | 0.3282 |
| | | 0.459 | 0.3314 |
| | | 0.514 | 0.3040 |
| | | 0.642 | 0.4690 |
| | | 0.734 | 0.4790 |
| | | 1.053 | 0.6658 |

*(1) Disolución de solo esta sustancia.**(2) Formando mezcla con otros sacáridos.*

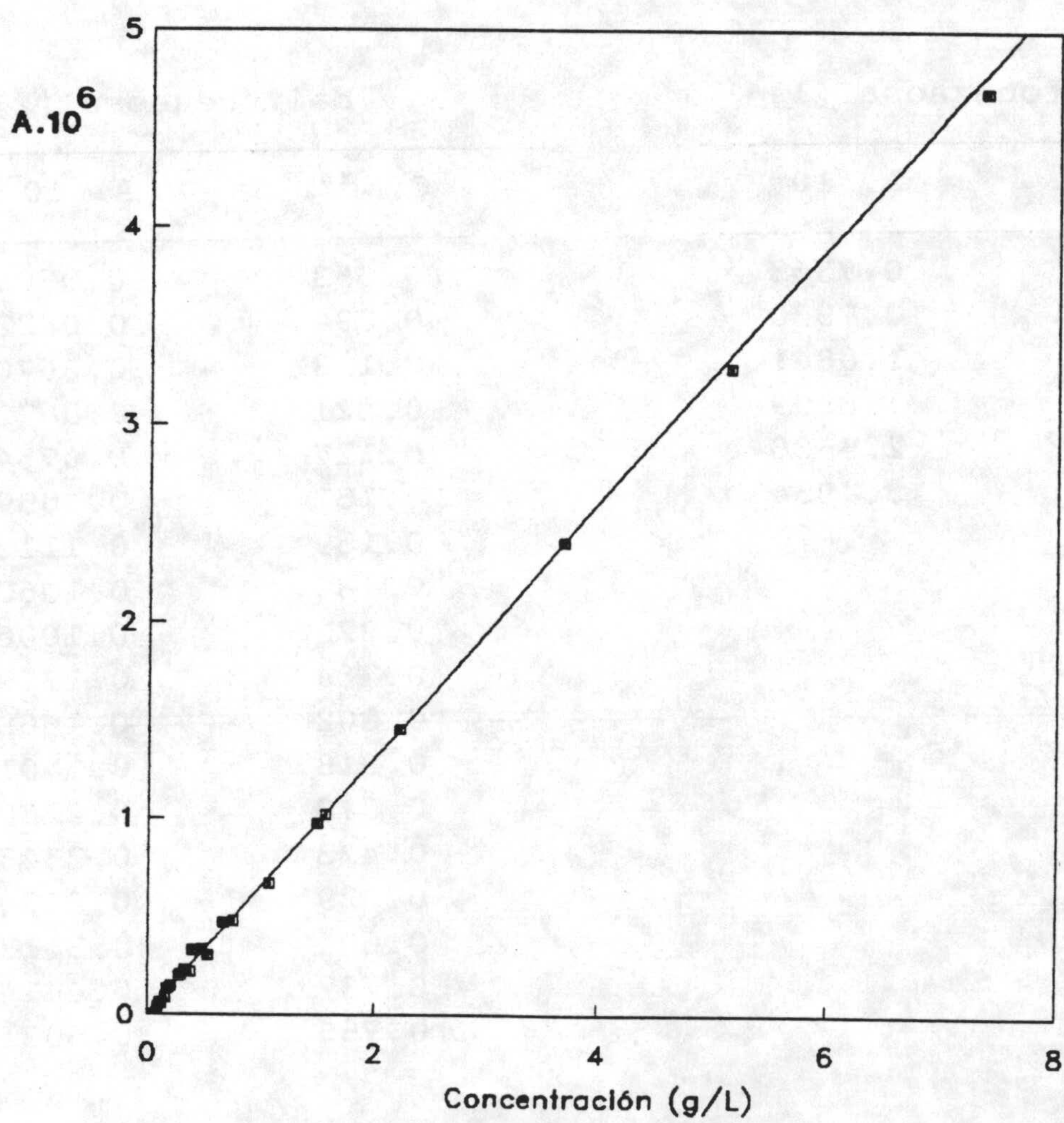


Figura 3.10. Línea de calibrado para la determinación de la maltopentaosa.

Tabla 3.8*Línea de calibrado para la maltohexaosa*

| Maltohexaosa (1) | | Maltohexaosa (2) | |
|------------------|-----------|------------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 1.209 | 0.7363 | 0.063 | 0.0308 |
| 1.269 | 0.7830 | 0.096 | 0.0622 |
| 1.813 | 1.0841 | 0.113 | 0.0670 |
| 3.022 | 1.8599 | 0.121 | 0.0672 |
| 4.231 | 2.5508 | 0.127 | 0.0754 |
| 6.044 | 3.4934 | 0.151 | 0.1059 |
| | | 0.159 | 0.1112 |
| | | 0.189 | 0.1060 |
| | | 0.223 | 0.1006 |
| | | 0.264 | 0.1349 |
| | | 0.302 | 0.1668 |
| | | 0.318 | 0.1501 |
| | | 0.378 | 0.2230 |
| | | 0.423 | 0.2343 |
| | | 0.529 | 0.3839 |
| | | 0.604 | 0.3513 |
| | | 0.737 | 0.4814 |
| | | 0.755 | 0.5031 |

(1) *Disolución de solo esta sustancia.*

(2) *Formando mezcla con otros sacáridos.*

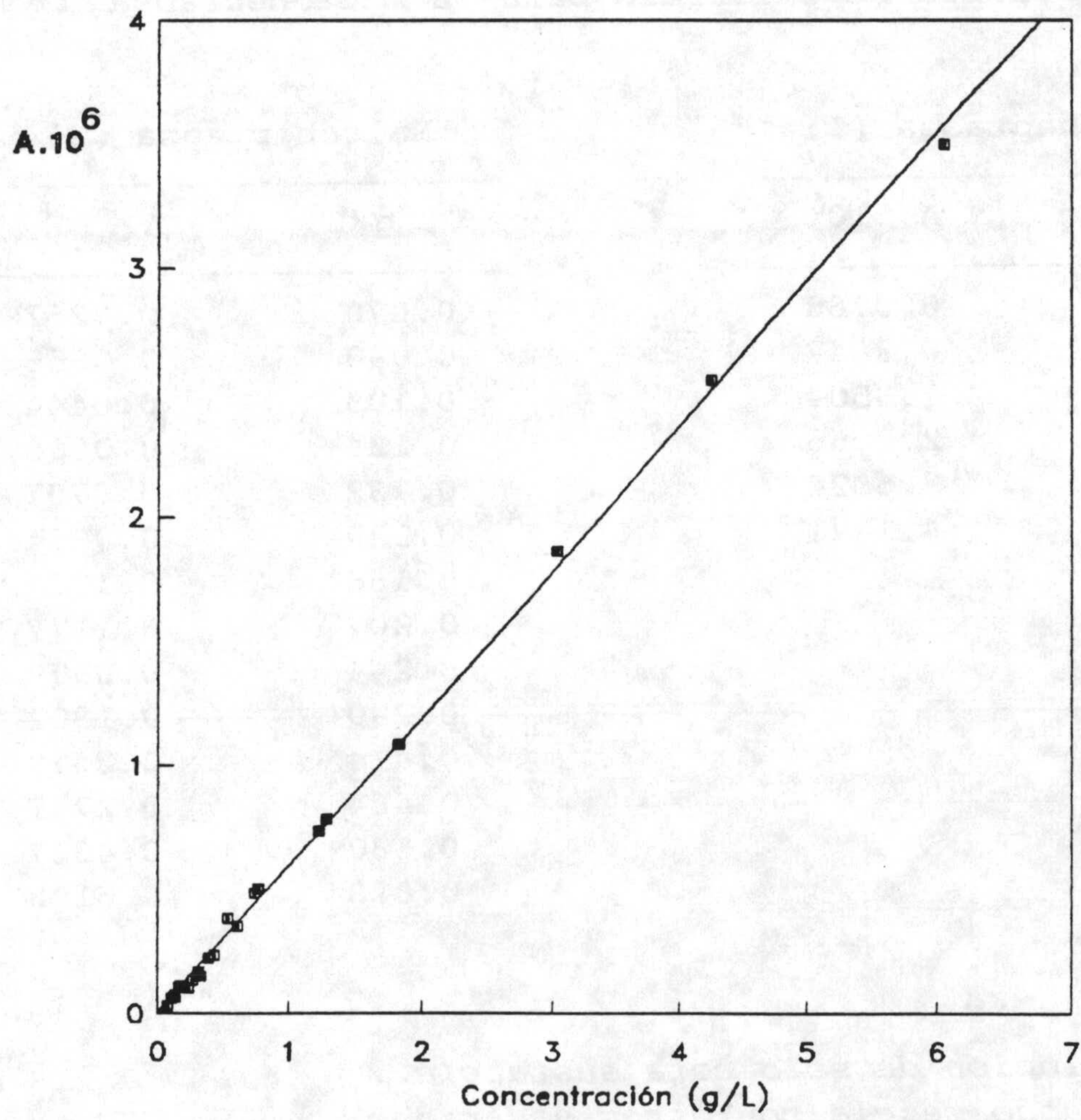


Figura 3.11. Línea de calibrado para la determinación de la maltohexaosa.

Tabla 3.9*Línea de calibrado para la maltoheptaosa*

| Maltoheptaosa (1) | | Maltoheptaosa (2) | |
|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C, g/L | A. 10^6 | C, g/L | A. 10^6 |
| 1.325 | 0.8768 | 0.070 | 0.0252 |
| 1.391 | 0.9647 | 0.090 | 0.0355 |
| 1.987 | 1.3504 | 0.105 | 0.0444 |
| 3.312 | 2.2066 | 0.124 | 0.0806 |
| 4.637 | 3.6024 | 0.132 | 0.0707 |
| 6.624 | 4.1441 | 0.139 | 0.0834 |
| | | 0.166 | 0.1272 |
| | | 0.207 | 0.1177 |
| | | 0.244 | 0.0979 |
| | | 0.290 | 0.1302 |
| | | 0.414 | 0.2419 |
| | | 0.464 | 0.2741 |
| | | 0.580 | 0.4337 |
| | | 0.828 | 0.6125 |

(1) *Disolución de solo esta sustancia.*

(2) *Formando mezcla con otros sacáridos.*

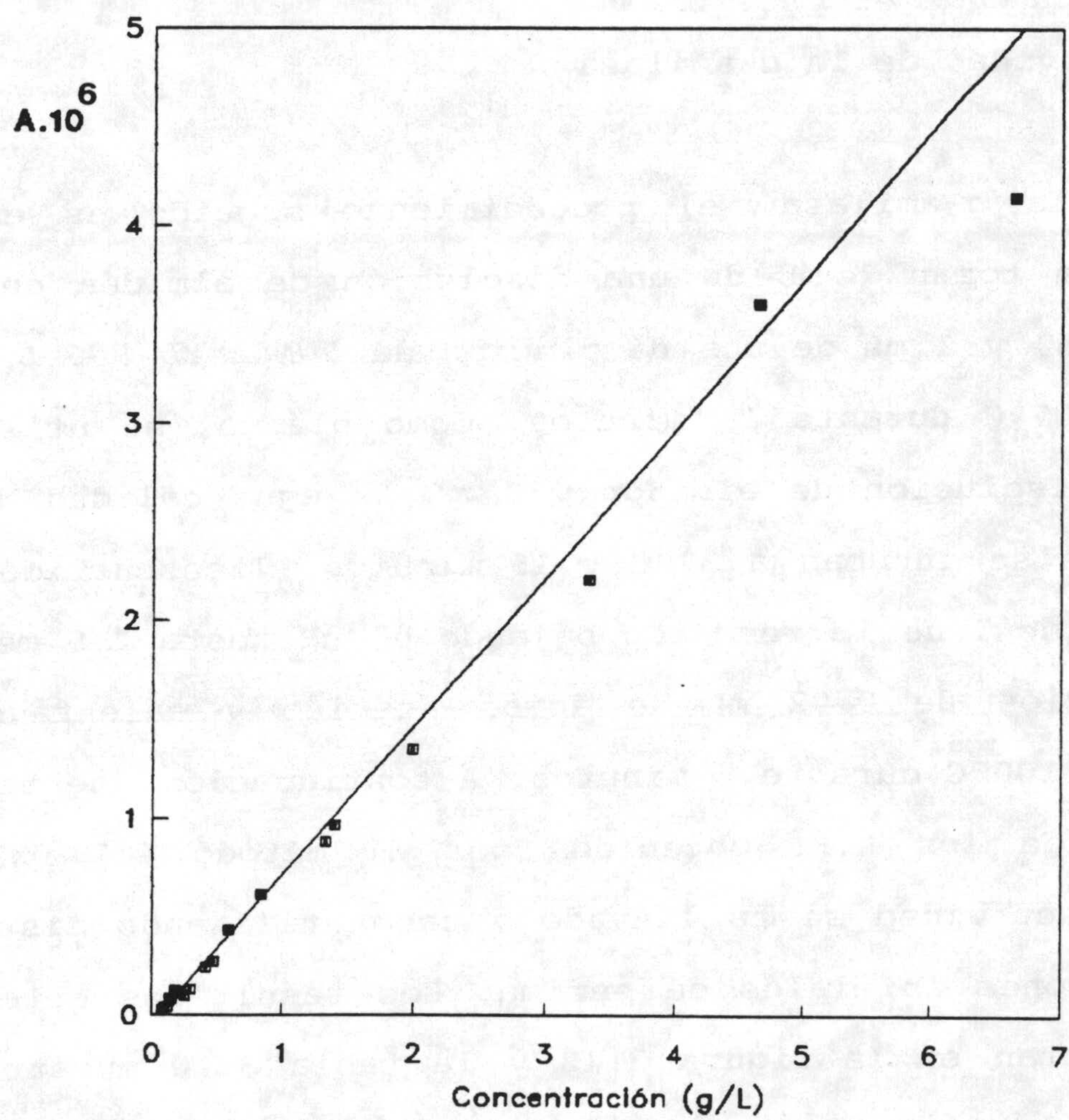


Figura 3.12. Línea de calibrado para la determinación de la maltoheptaosa.

3.3- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

3.3.1. Actividad de la α -amilasa .

Para la α -amilasa, el procedimiento seguido es el siguiente: se toman 1 mL de una disolución de almidón de 6.95 g/L, pH = 5, y 1 mL de una disolución de *FUNGAMYL 800 L*, y se incuban a 37°C durante 15 minutos. Como blanco, se utiliza 1 mL de la disolución de almidón y 1 mL de agua calidad *milliQ* que también se incuban a 37°C y 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se detiene la reacción bajando el pH hasta 2.5 mediante la adición de 0.02 mL de ácido acético y calentando el conjunto a 100°C durante 5 minutos. A continuación, se realiza la medida de los A.R. obtenidos por el método del DNS. El ensayo de actividad se ha llevado a cabo utilizando distintas concentraciones iniciales de enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 3.13 y la tabla 3.10 muestra que la actividad expresada en UI (μ moles de glucosa/g de enzima.-min) permanece constante con la concentración de enzima y su valor medio es $16.42 \cdot 10^3$.

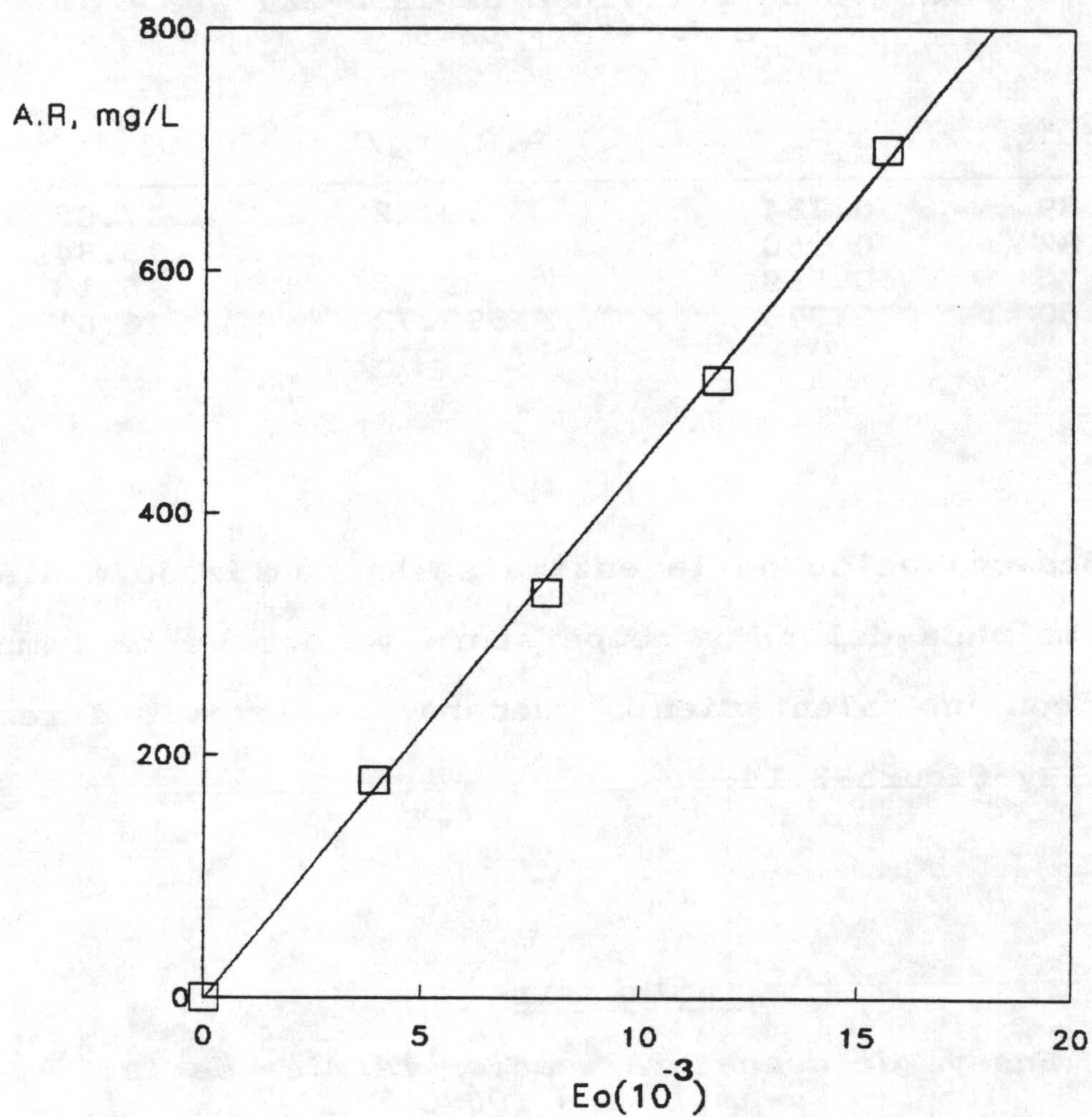


Figura 3.13. Ensayo de actividad de la α -amilasa por el método del DNS.

Tabla 3.10

*Ensayo de actividad de la α -amilasa
a $T=37^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$.*

| $E_0 \cdot 10^{-3}$, g/L | $A_{640\text{nm}}$ | A.R, mg/L | UI. 10^{-3} |
|---------------------------|--------------------|-----------|---------------|
| 3.89 | 0.184 | 179.42 | 17.08 |
| 7.82 | 0.360 | 334.37 | 15.84 |
| 11.70 | 0.559 | 509.56 | 16.13 |
| 15.60 | 0.775 | 699.72 | 16.61 |

La desactivación de la enzima se ha realizado mediante la acción combinada del pH y temperatura ya que se ha comprobado que sólo con un calentamiento quedaba una actividad residual, tabla 3.11 y figura 3.14.

Tabla 3.11

*Ensayo de desnaturalización térmica de la
 α -amilasa a 100°C .*

| t(min) | $A_{640\text{nm}}$ | UI. 10^{-3} | Actividad residual(%) |
|--------|--------------------|---------------|-----------------------|
| 0 | 0,775 | 1,658 | 100,0 |
| 5 | 0,070 | 0,187 | 11,0 |
| 10 | 0,041 | 0,127 | 7,7 |
| 20 | 0,030 | 0,103 | 6,2 |

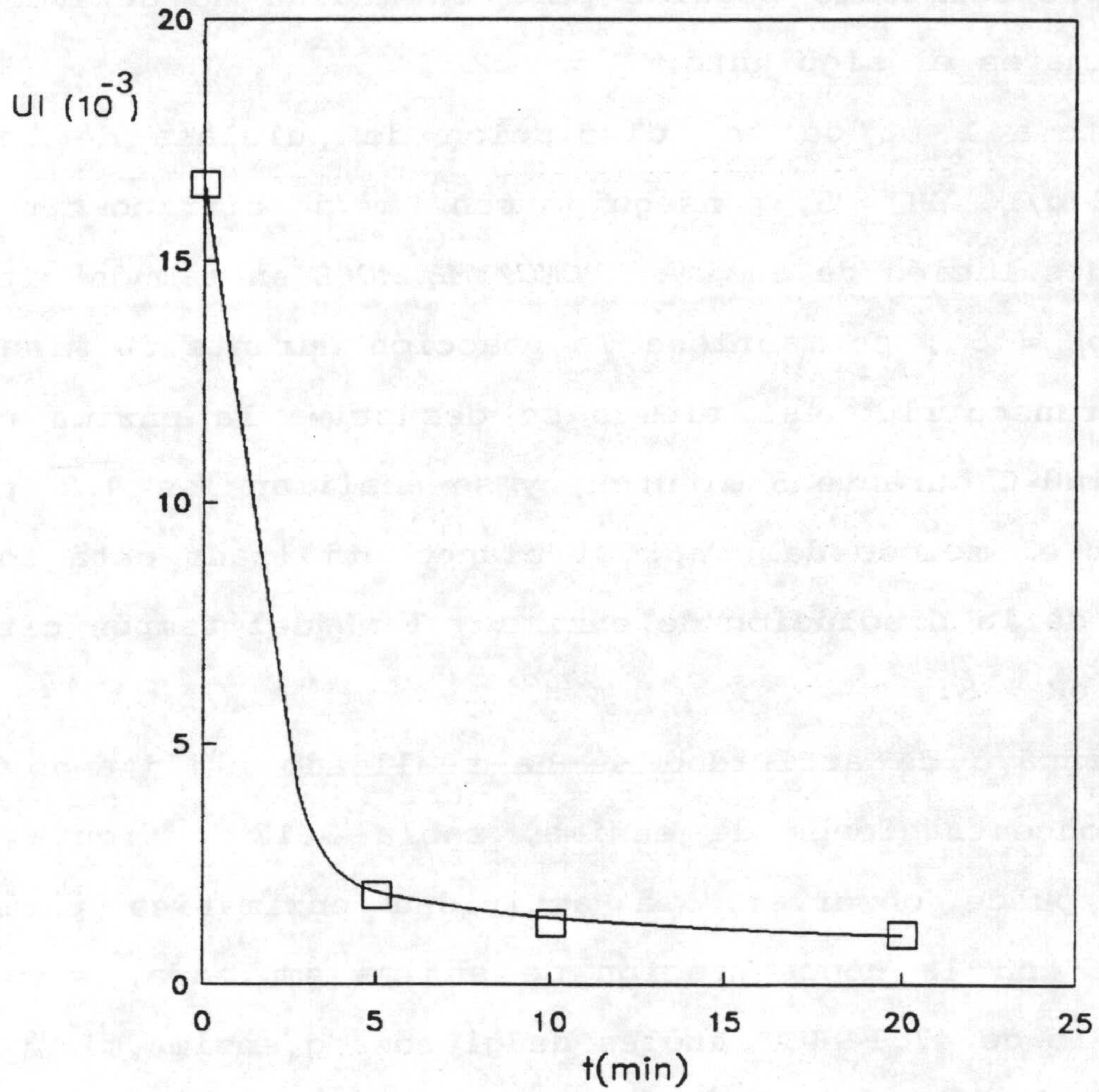


Figura 3.14. Curva de desnaturalización térmica de la α -amilasa.

3.3.2. Actividad de la pululanasa.

El procedimiento seguido para la medida de actividad de esta enzima es el siguiente:

Se toma 1 mL de una disolución de pululana de concentración 2 g/L, pH = 5, conseguido con tampón cítrico-citrato y 1 mL de disolución de enzima *PROMOZYME 200L* en tampón cítrico-citrato pH = 5 ; se mantiene la reacción durante 30 minutos a 40°C y transcurrido ese tiempo se desactiva la enzima calentando a 100°C durante 5 minutos, y se analizan los A.R. producidos por el metodo del *DNS*. El blanco utilizado está formado por 1 mL de la disolución de enzima y 1 mL del tampón cítrico-citrato, pH = 5.

El ensayo de actividad se ha realizado utilizando diferentes concentraciones de enzima, tabla 3.12 y figura 3.15. Como se puede observar, la actividad enzimática permanece constante con la concentración de enzima empleada, siendo su valor medio de 47.14 UI (μ moles de glucosa/g enzima.minuto).

Tabla 3.12

Ensayo de actividad de la pululanasa
T = 40°C ; pH = 5 ; S₀=1 g/L.

| E_0 , g/L | $A_{640 \text{ nm}}$ | A.R, mg/L | UI |
|-------------|----------------------|-----------|-------|
| 0.312 | 0.025 | 39.44 | 46.82 |
| 0.624 | 0.070 | 79.06 | 46.93 |
| 0.938 | 0.118 | 121.31 | 47.90 |
| 1.250 | 0.160 | 158.29 | 46.90 |

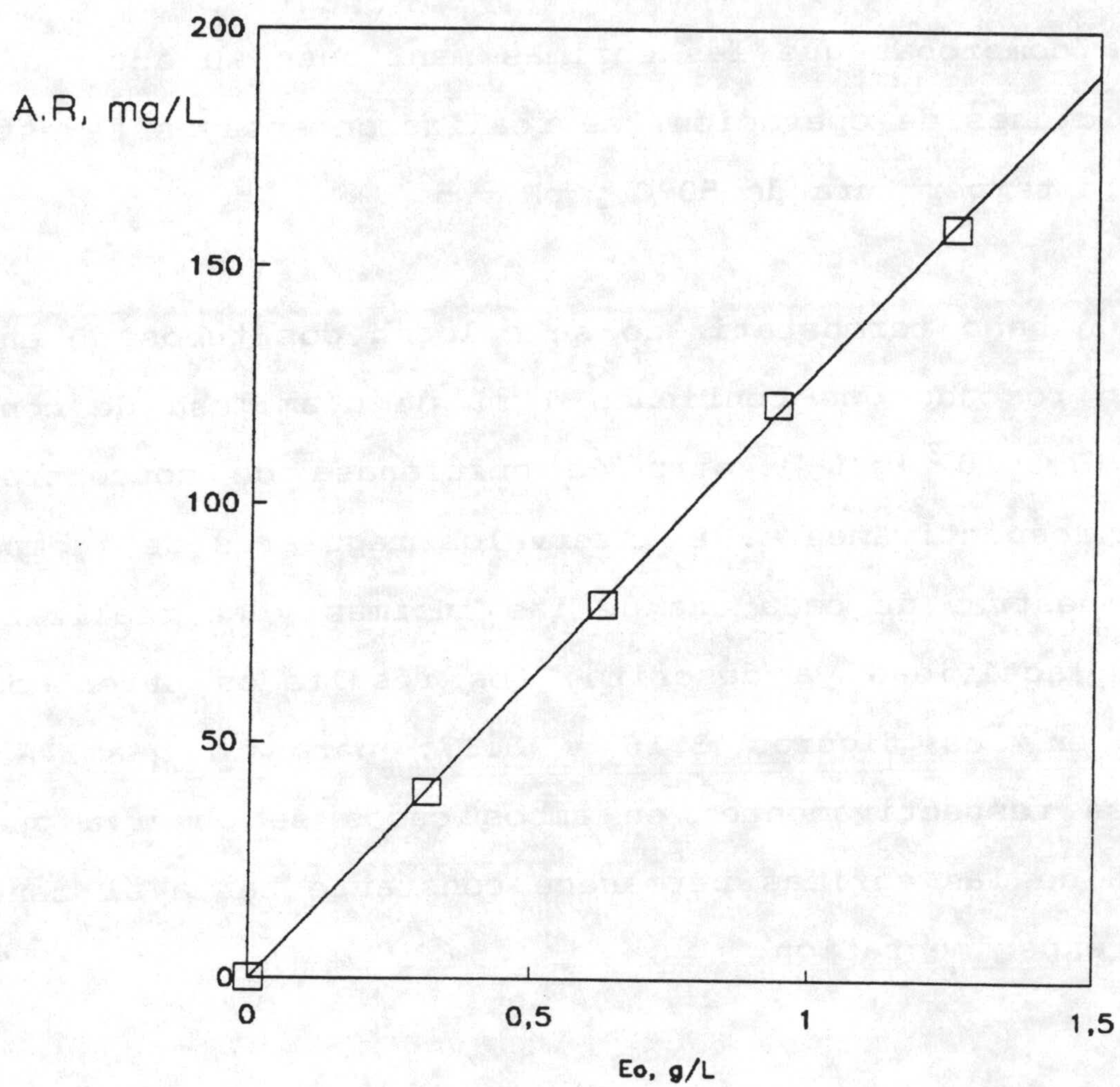


Figura 3.15. Ensayo de actividad de la pululanasa por el método del DNS.

3.3.3. Estabilidad térmica de las enzimas.

Para comprobar que las enzimas mantienen su actividad en las condiciones de operación, se realizaron ensayos de estabilidad a la temperatura de 50°C y pH = 5.

En un baño termostatzado se colocan dos tubos de ensayo con tapón roscado que contienen 1 mL de α -amilasa de concentración $15.6 \cdot 10^{-3}$ g/L y otro de pululanasa de concentración 1.25 g/L respectivamente. A intervalos regulares de tiempo se tomaban muestras de cada una de las enzimas y se realizaba su ensayo de actividad ya descrito. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.16 y 3.17, para la α -amilasa y pululanasa respectivamente; en ambos casos se observa que la actividad de las enzimas permanece constante hasta al menos 6 horas de experimentación.

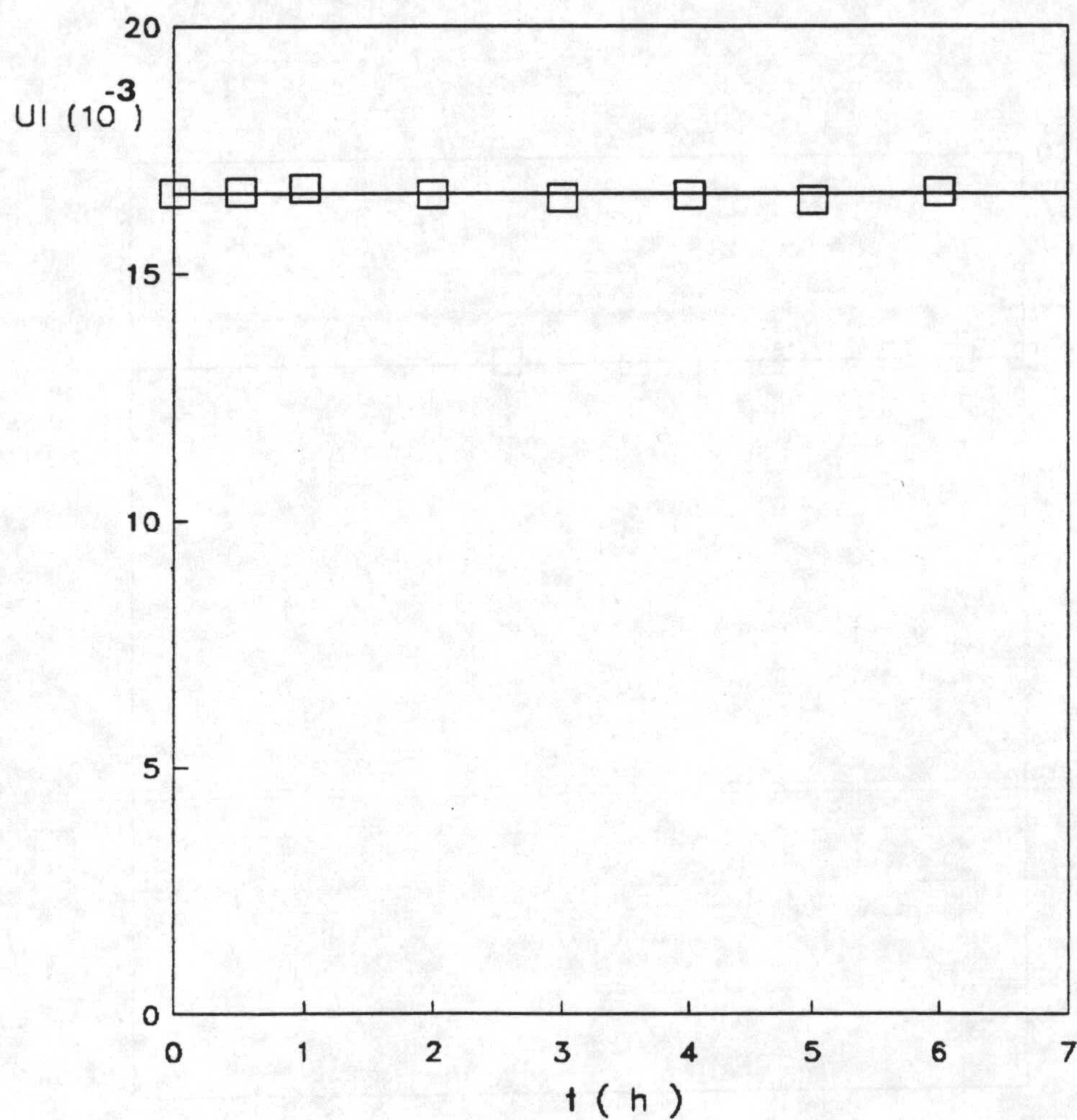


Figura 3.16. Estabilidad térmica de la α -amilasa.

$T=50^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

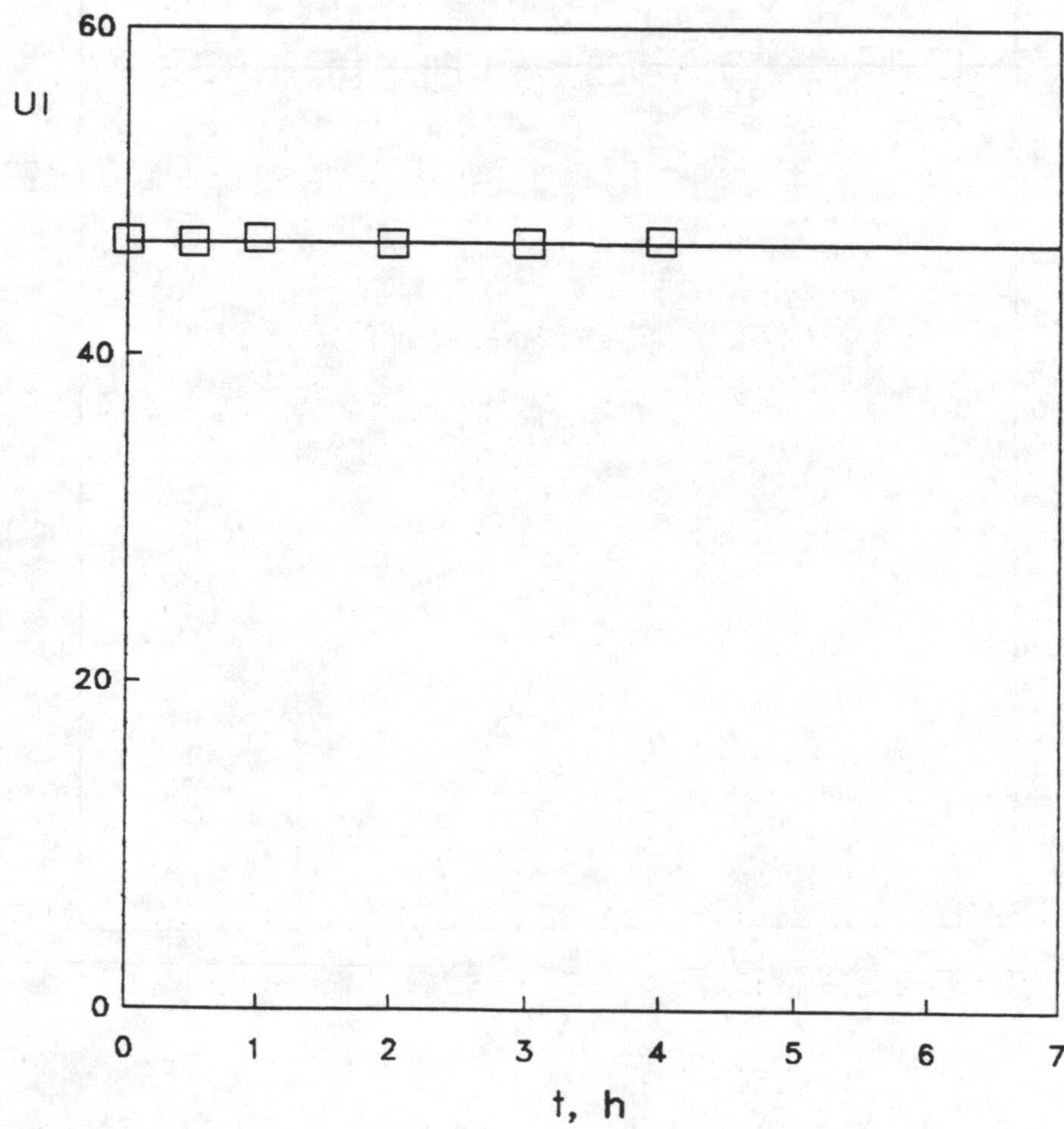


Figura 3.17. Estabilidad térmica de la pululanasa.

$T=50^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

3.4. DIAPOSITIVO Y TECNICA EXPERIMENTAL

El diapositivo experimental utilizado para la realización de los experimentos de hidrólisis de harina de trigo, con α -amilasa y pululanasa, se esquematiza en la figura 3.18 y consta de las siguientes partes:

Un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de cinco bocas esmeriladas por las cuales se introduce el agitador, un termómetro y el electrodo de pH.

El agitador es una varilla acabada en ancla, accionada por un motor eléctrico a velocidad constante.

El procedimiento operatorio es el siguiente:

Preparada la suspensión de harina de trigo a la concentración deseada, se introduce en el reactor, se ajusta el pH y se agita la suspensión hasta conseguir la temperatura de trabajo. En este momento, se añade la enzima y comienza la hidrólisis.

La cinética enzimática se ha seguido tomando, a intervalos de tiempo hasta un máximo de 6 horas, muestras de 1 mL y analizando en estas alícuotas, por el método de *Luff-Schoorl*, los A.R. liberados.

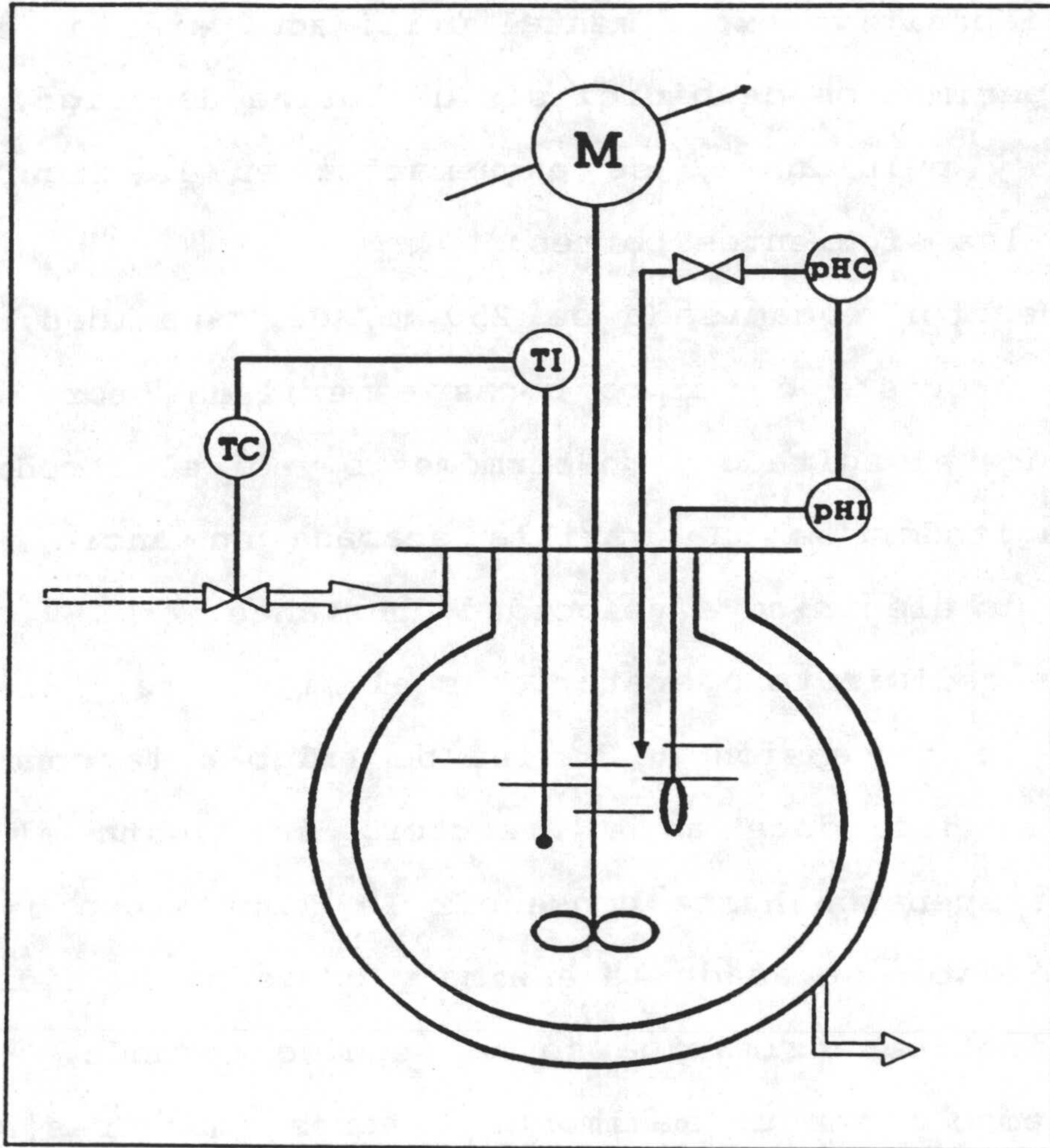


Figura 3.18. Reactor de hidrólisis.

Los resultados obtenidos se expresan en forma de conversiones, X , evaluadas como:

$$X = \frac{A.R.}{S_0 \cdot 0,79 \cdot 1,11} \quad [3.3]$$

ya que 1 gramo de almidón representa 1.11 g expresados como Dextrosa Equivalente y la harina de trigo utilizada tiene un 79% en peso de almidón.

Los ensayos en los que se pretende determinar la distribución de sacáridos, se han realizado en el mismo reactor y utilizando la misma técnica experimental, sólo que en este caso, las alícuotas de 1 mL se emplean para la determinación de sacáridos, utilizando la técnica de HPLC ya descrita.

Las variables ensayadas tanto en los experimentos cinéticos, como en aquellos otros en los que se pretende obtener información sobre la distribución de sacáridos se indican en las tablas 3.13 y 3.14 respectivamente.

Tabla 3.13

*Variables ensayadas en los experimentos cinéticos
pH = 5.*

| E_0 , g/L | E_1 , g/L | S_0 , g/L | T, °C |
|-------------|-------------|-------------|-------|
| 1.58 | 0.00 | 52.50 | 50 |
| 3.12 | 0.00 | 52.50 | 35 |
| | 0.00 | 52.50 | 40 |
| | 0.00 | 52.50 | 45 |
| | 0.00 | 52.50 | 50 |
| 6.25 | 0.00 | 52.50 | 50 |
| | 0.00 | 105.00 | 50 |
| | 0.00 | 210.00 | 50 |
| 12.50 | 0.00 | 21.00 | 50 |
| 12.50 | 0.00 | 52.50 | 50 |
| 12.50 | 0.00 | 105.00 | 50 |
| 12.50 | 0.00 | 210.00 | 50 |
| 0.00 | 6.25 | 210.00 | 50 |
| 0.00 | 12.50 | 210.00 | 50 |
| 0.00 | 25.00 | 210.00 | 50 |
| 6.25 | 6.25 | 210.00 | 50 |
| 6.25 | 12.50 | 210.00 | 50 |
| 6.25 | 25.00 | 210.00 | 50 |
| 12.50 | 6.25 | 210.00 | 50 |
| 12.50 | 12.50 | 210.00 | 50 |
| 12.50 | 25.00 | 210.00 | 50 |

Tabla 3.14

Ensayos en los que también se ha determinado la distribución de sacáridos a pH=5 y T=50°C.

| E_0 , g/L | E_1 , g/L | S_0 , g/L |
|-------------------|-------------------|-------------|
| 6.25 | 0.00 | 52.50 |
| | 0.00 | 105.00 |
| | 0.00 | 210.00 |
| 12.50 | 0.00 | 210.00 |
| 0.00 | 25.00 | 210.00 |
| 6.25 | 6.25 | 210.00 |
| | 25.00 | 210.00 |
| 12.50 | 25.00 | 210.00 |
| 6.25 | 6.25 ^a | 210.00 |
| 6.25 ^b | 0.00 | 210.00 |
| 6.25 | 6.25 ^c | 210.00 |

- a- Los 6.25 g/L de pululanasa se añaden después de 0,5 h de reacción.
- b- Después de 0.5 h de hidrólisis se desactiva la α -amilasa a 100°C y 10 min.
- c- Después de 0.5 h de hidrólisis se desactiva la α -amilasa a 100°C y 10 min y se añade pululanasa.

4. RESULTADOS

EXPERIMENTALES

En este apartado se muestran los resultados experimentales obtenidos durante la hidrólisis del almidón de harina de trigo con α -amilasa y pululanasa.

4.1. EXPERIMENTOS CINETICOS.

4.1.1. Influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa, de sustrato y temperatura.

En las tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 se recoge la influencia de estas variables; en todos los casos se ha mantenido el pH=5 y la temperatura en 50°C. La cinética del proceso se ha seguido determinando azúcares reductores totales y transformando este dato en conversiones.

Tabla 4.1

Influencia de la concentración inicial de α -amilasa : pH=5 , T=50°C , S₀=52.50g/L

| t(h) | E ₀ =1.58 g/L | E ₀ =3.125 g/L | E ₀ =6.25 g/L | E ₀ =12.50 g/L |
|------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | X | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.025 | 0.045 | 0.072 | 0.109 |
| 1.0 | 0.042 | 0.077 | 0.118 | 0.170 |
| 1.5 | 0.060 | 0.100 | 0.159 | - |
| 2.0 | 0.075 | 0.130 | 0.188 | 0.245 |
| 3.0 | 0.096 | 0.156 | 0.230 | 0.298 |
| 4.0 | 0.118 | 0.182 | 0.260 | 0.330 |

Tabla 4.2

Influencia de la concentración inicial de α -amilasa : pH=5 , T=50°C , S₀=210g/L.

| t(h) | E ₀ =6.25g/L | E ₀ =12.50g/L | E ₀ =18.75g/L | E ₀ =25.00g/L |
|------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | X | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.112 | 0.154 | 0.185 | 0.212 |
| 1.0 | 0.176 | 0.210 | 0.290 | 0.340 |
| 1.5 | - | 0.270 | 0.330 | 0.381 |
| 2.0 | 0.235 | 0.306 | 0.378 | 0.425 |
| 3.0 | 0.280 | 0.350 | 0.418 | 0.475 |
| 4.0 | 0.295 | 0.390 | 0.446 | 0.502 |

Tabla 4.3

Influencia de la concentración inicial de sustrato. pH = 5.0 ; T = 50 °C ; E₀ = 6.25 g/L de α -amilasa

| t(h) | S ₀ =52.50g/L | S ₀ =105.00g/L | S ₀ =210.00g/L |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.072 | 0.083 | 0.112 |
| 1.0 | 0.118 | 0.142 | 0.176 |
| 1.5 | 0.159 | 0.176 | - |
| 2.0 | 0.188 | 0.206 | 0.235 |
| 3.0 | 0.230 | 0.253 | 0.280 |
| 4.0 | 0.260 | 0.275 | 0.295 |

Tabla 4.4

*Influencia de la concentración inicial de sustrato
pH = 5.0 ; T = 50 °C ; E₀ = 12.50 g/L de α-amilasa.*

| t(h) | S ₀ =21g/L X | S ₀ =52.5g/L X | S ₀ =105g/L X | S ₀ =210g/L X |
|------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | - | 0.109 | 0.130 | 0.154 |
| 1.0 | 0.145 | 0.170 | 0.193 | 0.210 |
| 1.5 | - | - | - | 0.270 |
| 2.0 | 0.224 | 0.245 | 0.283 | 0.306 |
| 3.0 | 0.260 | 0.298 | 0.330 | 0.350 |
| 4.0 | 0.310 | 0.330 | 0.363 | 0.390 |

En la tabla 4.5 se muestra la influencia de la temperatura (35, 40, 45 y 50°C) sobre el grado de hidrólisis alcanzado. Los experimentos se realizaron con unas concentraciones iniciales de sustrato y de enzima de 52.5 g/L y 3.125 g/L, respectivamente.

Tabla 4.5

Influencia de la temperatura
 $pH = 5.0 ; S_0 = 52.50 \text{ g/L} ; E_0 = 3.125 \text{ g/L}$

| | T=35°C | T=40°C | T=45°C | T=50°C |
|------|--------|--------|--------|--------|
| t(h) | X | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.025 | 0.033 | 0.042 | 0.054 |
| 1.0 | 0.055 | 0.067 | 0.075 | 0.086 |
| 1.5 | 0.076 | 0.087 | 0.098 | 0.117 |
| 2.0 | 0.088 | 0.107 | 0.116 | 0.133 |
| 3.0 | 0.113 | 0.133 | 0.142 | 0.158 |
| 4.0 | 0.130 | 0.153 | 0.165 | 0.182 |

4.1.2. Hidrólisis de almidón con mezclas de α -amilasa y pululanasa.

Estos experimentos se llevaron a cabo a 50°C ; $\text{pH}=5$ y $S_0=210$ g/L. En la tabla 4.6 se recoge la influencia de distintas concentraciones iniciales de pululanasa sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de la harina de trigo y en las tablas 4.7 y 4.8 se muestra la influencia de cantidades crecientes de pululanasa sobre la conversión alcanzada, para una misma cantidad inicial de α -amilasa, $E_0=6.25$ g/L y 12.50 g/L, respectivamente.

Tabla 4.6

*Influencia de la concentración de pululanasa.
pH=5; $S_0=210$ g/L y $T=50^{\circ}\text{C}$.*

| t, h | $E_1=6.25$ g/L | $E_1=12.50$ g/L | $E_1=25.00$ g/L |
|------|----------------|-----------------|-----------------|
| | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.004 | - | 0.038 |
| 1.0 | 0.009 | 0.024 | 0.055 |
| 1.5 | 0.022 | 0.036 | 0.062 |
| 2.0 | 0.035 | 0.044 | 0.067 |
| 3.0 | 0.048 | 0.062 | 0.067 |
| 4.0 | 0.059 | 0.067 | 0.067 |
| 5.0 | 0.066 | 0.067 | 0.067 |
| 6.0 | 0.067 | 0.067 | 0.067 |

Tabla 4.7

*Influencia de la concentración de α -amilasa, E_0 y pululanasa, E_1 : $pH = 5.0$; $S_0 = 210$ g/L ; $T = 50^\circ C$
 $E_0 = 6.25$ g/L*

| t(h) | $E_1=0.00$ g/L | $E_1=6.25$ g/l | $E_1=12.50$ g/L | $E_1=25$ g/L |
|------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| | X | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.112 | 0.128 | 0.142 | 0.183 |
| 1.0 | 0.176 | 0.198 | 0.214 | 0.141 |
| 1.5 | - | - | - | - |
| 2.0 | 0.235 | 0.264 | 0.280 | 0.306 |
| 3.0 | 0.280 | 0.300 | 0.316 | 0.342 |
| 4.0 | 0.295 | 0.333 | 0.340 | 0.360 |

Tabla 4.8

*Influencia de la concentración inicial de α -amilasa (E_0) y pululanasa(E_1) : $pH = 5.0$; $T = 50^\circ C$; $S_0 = 210$ g/L
 $E_0 = 12.50$ g/L*

| t(h) | $E_1=0.00$ g/L | $E_1=6.25$ g/L | $E_1=12.50$ g/L | $E_1=25$ g/L |
|------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| | X | X | X | X |
| 0.0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 0.5 | 0.154 | 0.158 | 0.176 | 0.210 |
| 1.0 | 0.210 | 0.230 | 0.254 | 0.295 |
| 1.5 | 0.270 | 0.285 | 0.300 | 0.341 |
| 2.0 | 0.306 | 0.324 | 0.343 | 0.385 |
| 3.0 | 0.350 | 0.366 | 0.390 | 0.425 |
| 4.0 | 0.390 | 0.400 | 0.415 | 0.457 |

4.2. DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES.

Siguiendo la técnica de HPLC ya descrita se ha estudiado la influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa y harina de trigo, tablas 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12 sobre la distribución de tamaños moleculares. En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo a pH=5 y T=50°C.

Tabla 4.9

Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. $S_0 = 210$ g/L, T=50°C, pH = 5 y $E_0 = 6,25$ g/L.

| Sacárido | C, g/L | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 8.96 | 13.27 | 16.65 |
| C-2 | 11.97 | 12.73 | 12.68 |
| C-3 | 2.79 | 2.41 | 2.33 |
| C-4 | 1.29 | 1.18 | 1.21 |
| C-5 | 2.01 | 2.27 | 2.33 |
| C-6 | 1.41 | 1.37 | 0.92 |
| C-7 | 0.67 | 0.10 | 0.52 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 180.90 | 167.67 | 193.36 |

Tabla 4.10

Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 5$ y $E_0 = 12,50$ g/L.

| Sacárido | C, g/L | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 17.18 | 31.12 | 35.14 | 41.05 |
| C-2 | 18.14 | 14.36 | 18.70 | 11.62 |
| C-3 | 5.07 | 4.20 | 9.10 | 3.52 |
| C-4 | 3.02 | 2.29 | 1.86 | 1.69 |
| C-5 | 3.24 | 3.80 | 2.96 | 3.62 |
| C-6 | 2.23 | 1.78 | 1.68 | 1.33 |
| C-7 | 0.47 | 0.15 | 0.17 | 0.10 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 160.65 | 133.74 | 120.80 | 120.40 |

Tabla 4.11

Influencia de la concentración de sustrato. $\text{pH} = 5$, $T = 50^\circ\text{C}$, $E_0 = 6,25$ g/L y $S_0 = 52,5$ g/L.

| Sustancia | C, g/L | |
|-----------|--------|-------|
| | 1.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 5.03 | 9.84 |
| C-2 | 2.51 | 2.21 |
| C-3 | 0.39 | - |
| C-4 | 0.17 | 0.11 |
| C-5 | 0.31 | 0.46 |
| C-6 | 0.10 | 0.14 |
| C-7 | - | - |

Tabla 4.12

*Influencia de la concentración de sustrato. pH = 5
T = 50°C , E₀ = 6,25 g/L , S₀ = 105 g/L.*

| Sustancia | C, g/L | |
|-----------|--------|-------|
| | 1.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 7.45 | 10.63 |
| C-2 | 7.12 | 12.67 |
| C-3 | 1.05 | 1.37 |
| C-4 | 0.32 | 4.15 |
| C-5 | 0.11 | 1.16 |
| C-6 | 0.60 | 0.39 |
| C-7 | - | - |

En la tabla 4.13 se muestra la influencia del tiempo de reacción sobre la distribución de distintos sacáridos en el hidrolizado; este experimento se realizó sólo con pululanasa, E₁=25 g/L.

Tabla 4.13

*Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la concentración inicial de pululanasa. S₀ = 210 g/L ,
T = 50°C , pH = 5 y E₁ = 25 g/L.*

| Sacárido | C, g/L | | | |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 1.54 | 1.36 | 1.68 | 1.75 |
| C-2 | 6.35 | 7.78 | 9.39 | 1.44 |
| C-3 | 2.60 | 2.49 | 2.49 | 5.06 |
| C-4 | 0.20 | 0.21 | 0.27 | 0.27 |
| C-5 | 0.71 | 0.67 | 0.91 | 1.04 |
| Dextrinas (DP>7) | 198.59 | 197.50 | 195.26 | 190.43 |

En las tablas 4.14, 4.15 y 4.16 se muestra la influencia de cantidades crecientes de pululanasa sobre la concentración de distintos sacáridos en los hidrolizados.

Tabla 4.14

Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la adición de pululanasa. $S_0 = 210$ g/L , $T = 50^\circ\text{C}$, $E_0 = 6,25$ g/L y $E_1 = 6,25$ g/L.

| Sacárido | C, g/L | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 9.74 | 16.42 | 21.61 | 27.76 | 34.09 |
| C-2 | 16.10 | 16.93 | 19.33 | 19.36 | 20.31 |
| C-3 | 3.02 | 2.73 | 2.76 | 3.16 | 3.57 |
| C-4 | 1.14 | 1.23 | 1.25 | 1.51 | 1.72 |
| C-5 | 1.77 | 2.21 | 2.17 | 2.50 | 2.81 |
| C-6 | 1.31 | 1.45 | 0.98 | 1.00 | 0.83 |
| C-7 | - | - | - | - | - |
| Dextrinas (DP>C-6) | 176.92 | 169.03 | 161.90 | 154.73 | 164.67 |

Tabla 4.15

*Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la adición de la pululanasa. $S_0 = 210$ g/L , $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$.
 $E_0 = 6,25$ g/L y $E_1 = 25$ g/L.*

| Sacárido | C, g/L | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 35.37 | 41.02 | 38.83 | 42.73 |
| C-2 | 17.59 | 18.74 | 16.75 | 14.60 |
| C-3 | 1.90 | 2.39 | 2.40 | 3.03 |
| C-4 | 0.98 | 1.21 | 1.17 | 1.35 |
| C-5 | 2.13 | 2.14 | 2.04 | 1.94 |
| C-6 | 0.35 | 0.48 | 0.50 | 0.55 |
| C-7 | - | - | - | - |
| Dextrinas (DP>C-7) | 151.70 | 144.02 | 148.31 | 145.80 |

Tabla 4.16

*Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la adición de pululanasa. $S_0 = 210$ g/L , $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $E_0 = 12,50$ g/L
y $E_1 = 25$ g/L.*

| Sacárido | C, g/L | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 25.41 | 35.22 | 45.51 | 50.89 | 58.12 |
| C-2 | 17.90 | 20.05 | 18.09 | 21.08 | 14.53 |
| C-3 | 9.86 | 9.48 | 7.30 | 15.04 | 4.16 |
| C-4 | 6.13 | 6.65 | 4.12 | 6.36 | 1.58 |
| C-5 | 4.90 | 5.46 | 4.10 | 3.46 | 2.61 |
| C-6 | 3.39 | 3.60 | 2.33 | 1.96 | 1.07 |
| C-7 | 2.00 | 2.09 | 0.95 | 0.61 | - |
| Dextrinas (DP>C-7) | 140.50 | 127.45 | 127.60 | 110.60 | 127.93 |

Finalmente, en las tablas 4.17, 4.18 y 4.19 se muestran los resultados experimentales correspondientes a la adición escalonada de pululanasa, tabla 4.17, a la desactivación de la α -amilasa, tabla 4.18, y a un experimento de desactivación seguido de una adición de 6.25 g/L de pululanasa, tabla 4.19. En todos los casos, los experimentos se han realizado con $S_0=210$ g/L, pH=5 y $T=50^\circ\text{C}$.

Tabla 4.17

Distribución de tamaños moleculares. $S_0= 210$ g/L , $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$. $E_0= 6,25$ g/L y a las 0,5 h se adicionan 6,25 g/L de pululanasa.

| Sacárido | C, g/L | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 7.69 | 13.47 | 18.41 | 23.39 |
| C-2 | 14.11 | 17.47 | 19.38 | 21.18 |
| C-3 | 3.63 | 4.81 | 4.31 | 4.21 |
| C-4 | 1.45 | 2.03 | 1.94 | 1.83 |
| C-5 | 2.06 | 2.90 | 2.57 | 1.99 |
| C-6 | 1.65 | 1.01 | 0.35 | 0.51 |
| C-7 | 0.63 | 0.89 | 0.81 | 0.66 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 178.78 | 167.42 | 162.23 | 156.23 |

Tabla 4.18

Distribución de tamaños moleculares. $S_0 = 210$ g/L , $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, $E_0 = 6,25$ g/L. Después de 0,5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min.

| Sacárido | C, g/L | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 7.69 | 8.09 | 8.43 | 9.16 |
| C-2 | 14.11 | 26.75 | 28.16 | 30.92 |
| C-3 | 3.63 | 20.61 | 22.47 | 25.61 |
| C-4 | 1.45 | 11.52 | 12.56 | 13.95 |
| C-5 | 2.06 | 7.67 | 8.14 | 8.56 |
| C-6 | 1.65 | 5.37 | 1.11 | 1.11 |
| C-7 | 0.64 | 2.48 | 2.44 | 0.47 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 178.78 | 127.51 | 126.69 | 120.22 |

Tabla 4.19

Distribución de tamaños moleculares. $S_0 = 210$ g/L , $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5$ y $E_0=6,25$ g/L. Después de 0,5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min y se añade pululanasa, $E_1=6,25$ g/L.

| Sacárido | C, g/L | | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h | 5.0 h |
| C-1 | 7.69 | 8.55 | 7.92 | 8.21 | 8.46 | 8.51 |
| C-2 | 14.11 | 30.86 | 29.93 | 29.94 | 32.22 | 32.80 |
| C-3 | 3.63 | 26.92 | 27.33 | 27.15 | 30.75 | 31.51 |
| C-4 | 1.45 | 12.66 | 13.48 | 13.14 | 15.06 | 15.48 |
| C-5 | 2.06 | 8.06 | 8.85 | 8.56 | 9.51 | 9.60 |
| C-6 | 1.65 | 5.87 | 6.21 | 6.14 | 6.24 | 6.26 |
| C-7 | 0.63 | 2.49 | 2.31 | 2.51 | 2.34 | 2.33 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 178.78 | 114.59 | 113.97 | 114.35 | 105.42 | 103.51 |

LOS RESULTADOS

5. DISCUSION DE

5- DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En este apartado se estudia en primer lugar la cinética de la hidrólisis enzimática del almidón de la harina de trigo con α -amilasa, pululanasa y distintas mezclas de estas enzimas; a continuación se discute la influencia de las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato, así como de distintas mezclas enzimáticas sobre la distribución de tamaños moleculares en los hidrolizados.

5.1- HIDROLISIS ENZIMATICA DEL ALMIDON.

5.1.1- Hidrólisis de almidón con α -amilasa.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con α -amilasa, a 50°C y pH = 5, que se indican en las tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 se han representado en las figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4.

En las figuras 5.1 y 5.2 se representa la conversión, X, frente al tiempo de hidrólisis, t, para los experimentos realizados con distintas concentraciones iniciales de α -amilasa a dos concentraciones iniciales de sustrato, 210 g/L y 52.5 g/L de harina. En las figuras 5.3 y 5.4 se realiza la misma representación para distintas concentraciones iniciales de sustrato y 6.25 g/L y 12.50 g/L de α -amilasa respectivamente.

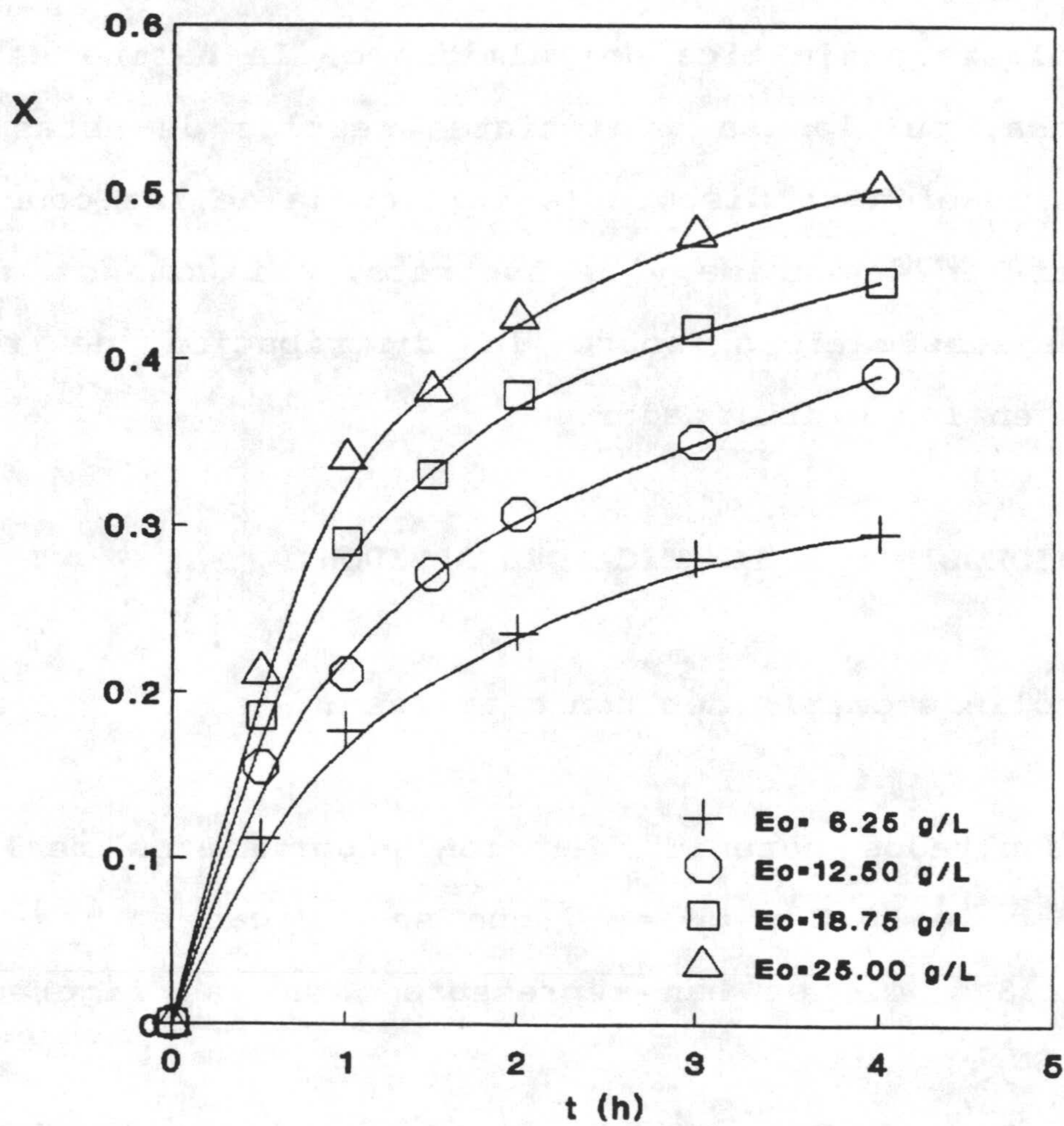


Figura 5.1. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. $S_0=210$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

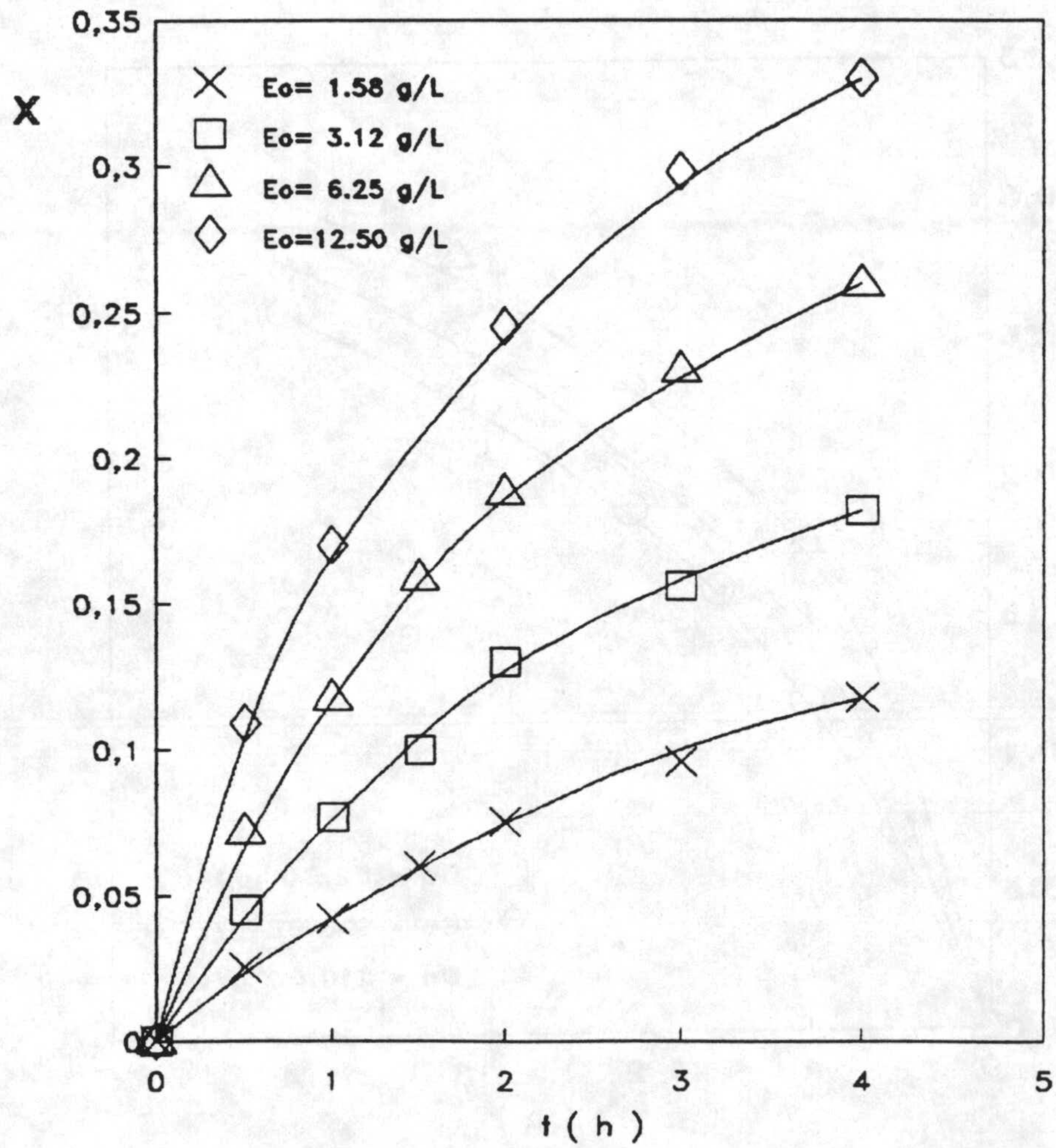


Figura 5.2. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. $S_0=52.5$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

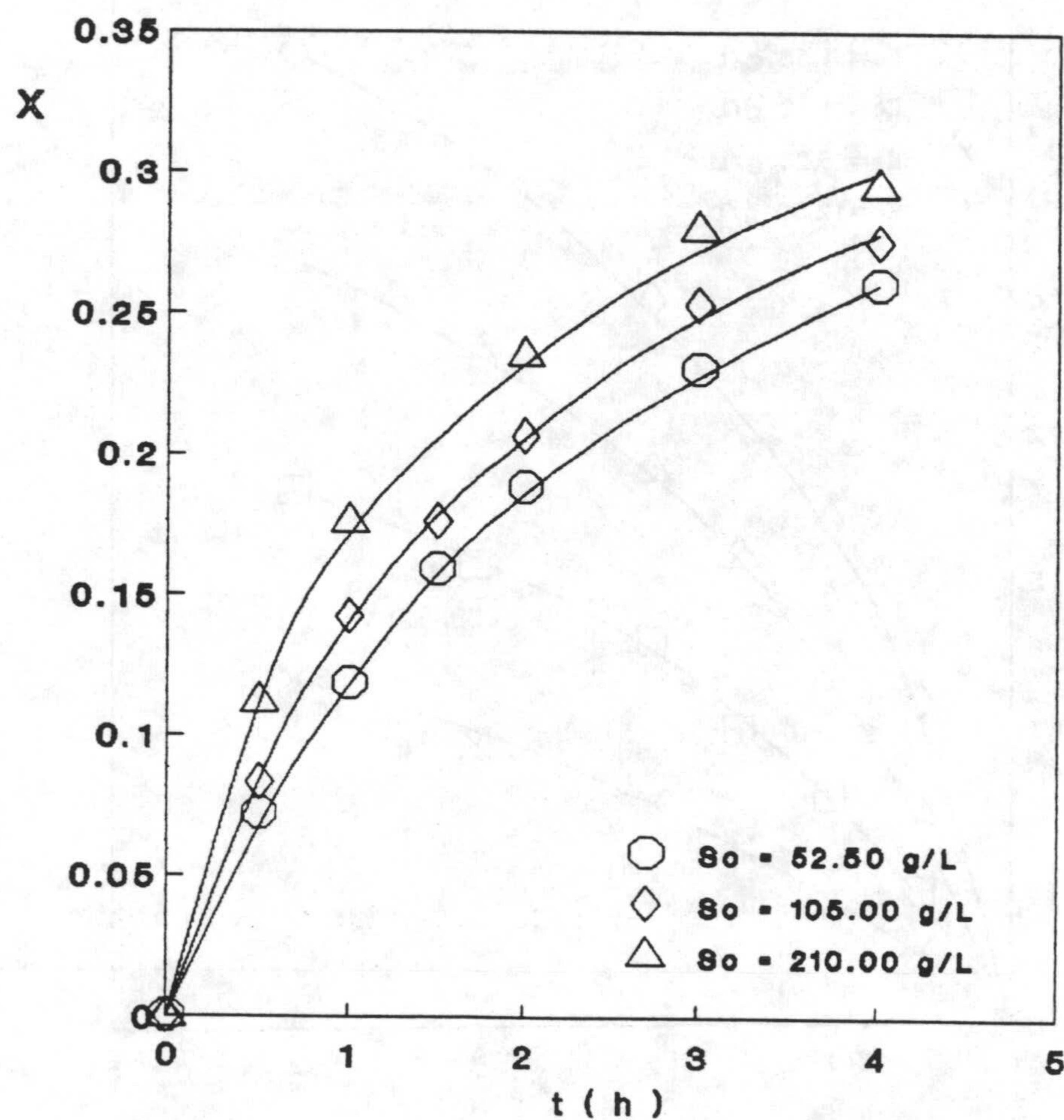


Figura 5.3. Influencia de la concentración inicial de sustrato. $E_0=6.25$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

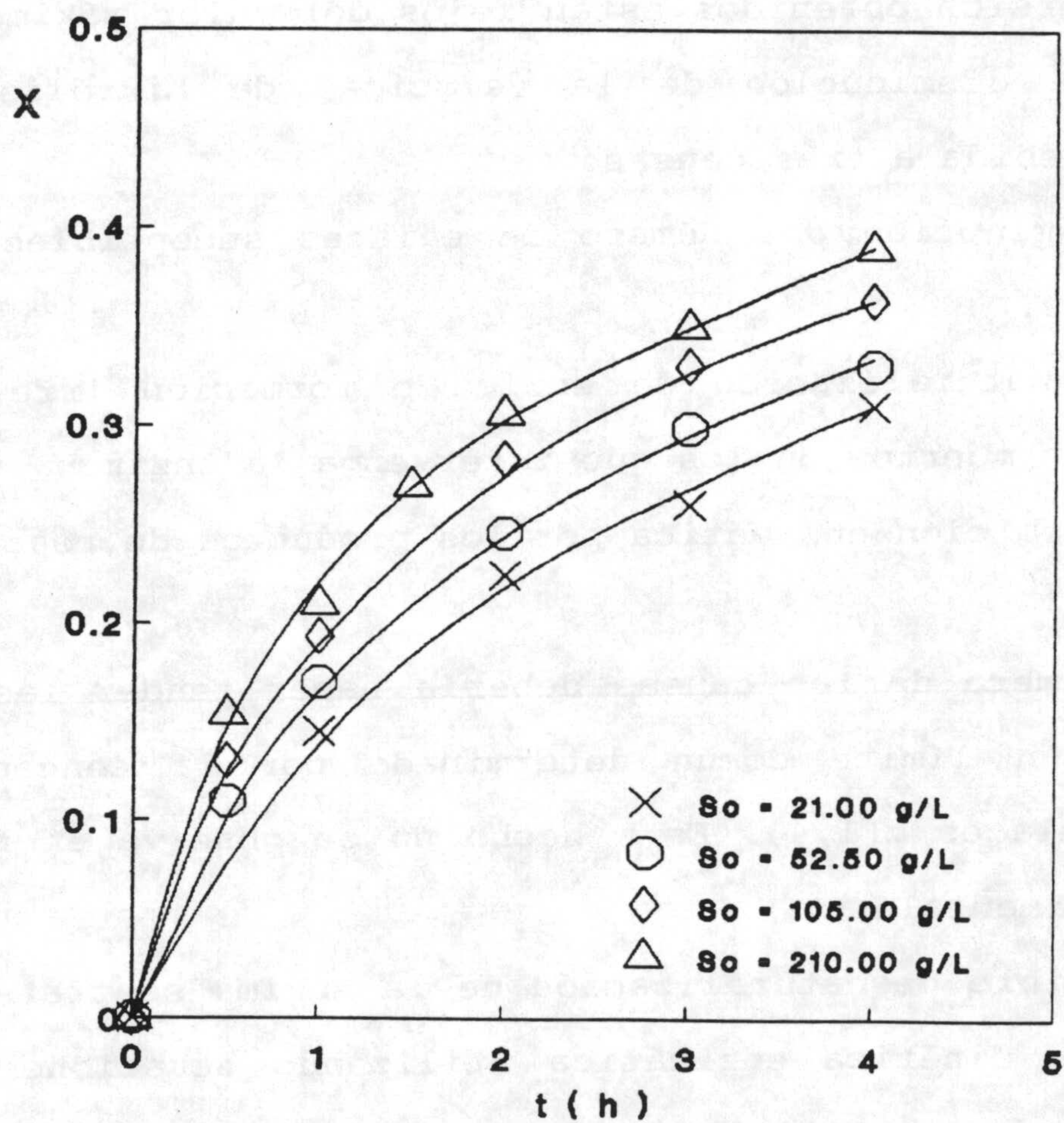


Figura 5.4. Influencia de la concentración inicial de sustrato. $E_0=12.50$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

En todos los casos se observa que la velocidad de hidrólisis disminuye apreciablemente con el tiempo y parece que la conversión tiende a un valor límite, función de las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato. Dado que los valores de la conversión obtenidos están lejos del valor máximo alcanzable, esta disminución de la velocidad de hidrólisis sólo puede ser debida a tres causas:

a- Disminución del número de enlaces susceptibles de ser hidrolizados.

b- Desnaturalización de enzima o formación irreversible de complejos muertos en los que intervenga la enzima.

c- Inhibición enzimática por los productos de reacción.

La primera de las causas debería hacer tender las curvas $X-t$ hacia un límite común determinado por la concentración total de enlaces $\alpha(1,4)$. Este hecho no se observa en nuestros datos experimentales .

La posible desnaturalización de la enzima se trata usualmente en la cinética enzimática utilizando ecuaciones potenciales para la velocidad de desaparición de la concentración de enzima activa:

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot e^n \quad [5.1]$$

La integración de esta ecuación conduce, para $n=1$ a

$$e = e_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad [5.2]$$

Para $n \neq 1$

$$e = [e_0^{1-n} + (n-1) k_d \cdot t]^{\frac{1}{1-n}} \quad [5.3]$$

Dado que en cinética enzimática la velocidad de reacción es, generalmente, proporcional a las concentración de enzima activa

$$r = S_0 \cdot \frac{dx}{dt} = f(S_0, X, C_j) \cdot e \quad [5.4]$$

donde C_j representa las concentraciones de todas aquellas sustancias que no participan en la reacción pero que pueden influir sobre la velocidad de la misma. Separando variables en [5.4] e integrando se obtiene que

$$S_0 \int_0^X \frac{dx}{f(S_0, X, C_j)} = \int_0^t e \cdot dt \quad [5.5]$$

Esta ecuación pone de manifiesto que para unas condiciones iniciales dadas, la conversión obtenida depende del valor de la integral del segundo miembro, *Camacho y col. (1985)*. Si no se produce desnaturalización enzimática, la ecuación [5.5] se transforma en

$$S_0 \int_0^X \frac{dx}{f(S_0, X, C_j)} = e_0 \cdot t \quad [5.6]$$

Para una desnaturalización de orden uno, utilizando [5.2] se tiene que

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{e_0}{k_d} [1 - \exp(-k_d \cdot t)] \quad [5.7]$$

Para $n = 2$

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{1}{k_d} \cdot \text{Ln} (1 + k_d \cdot e_0 \cdot t) \quad [5.8]$$

y para $n \neq 1$ y $n \neq 2$

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) \cdot k_d} [1 - (1 - (1-n)e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t)]^{\frac{2-n}{1-n}} \quad [5.9]$$

Con objeto de comprobar cuales de estas ecuaciones podrían representar el comportamiento de la α -amilasa en nuestras condiciones experimentales, pH = 5 y 50°C, tablas 5.1, 5.2 y 5.3, en las figuras 5.5, 5.6 y 5.7 se ha representado la conversión frente al producto $E_0 \cdot t$.

Tabla 5.1

*Influencia del producto $E_0 \cdot t$ sobre la conversión.
 $S_0 = 210$ g/L; pH = 5; T = 50°C.*

| X | $E_0 \cdot t$ | X | $E_0 \cdot t$ | X | $E_0 \cdot t$ | X | $E_0 \cdot t$ |
|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.112 | 3.12 | 0.154 | 6.25 | 0.185 | 9.38 | 0.212 | 12.50 |
| 0.176 | 6.25 | | | 0.290 | 18.75 | 0.340 | 25.00 |
| | | 0.270 | 18.75 | 0.330 | 28.13 | 0.381 | 37.50 |
| 0.235 | 12.50 | 0.306 | 25.00 | 0.378 | 37.50 | 0.425 | 50.00 |
| 0.280 | 18.75 | 0.350 | 37.50 | 0.418 | 56.25 | 0.475 | 75.00 |
| 0.295 | 25.00 | 0.390 | 50.00 | 0.446 | 75.00 | 0.502 | 100.00 |

Tabla 5.2*Influencia del producto $E_0.t$ sobre la conversión* *$S_0 = 52.50$ g/L; pH = 5; $T = 50^\circ\text{C}$.*

| X | Eo.t | X | Eo.t | X | Eo.t | X | Eo.t |
|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.025 | 0.79 | 0.054 | 1.56 | 0.072 | 3.13 | 0.109 | 6.25 |
| 0.042 | 1.58 | 0.086 | 3.13 | 0.118 | 6.25 | 0.170 | 12.50 |
| 0.060 | 2.37 | 0.117 | 4.69 | 0.159 | 9.38 | | |
| 0.075 | 3.16 | 0.133 | 6.25 | 0.188 | 12.50 | 0.245 | 25.00 |
| 0.096 | 4.74 | 0.158 | 9.38 | 0.230 | 18.75 | 0.298 | 37.50 |
| 0.118 | 6.32 | 0.181 | 12.50 | 0.260 | 25.00 | 0.330 | 50.00 |

Tabla 5.3*Influencia del producto $E_0.t$ sobre la conversión.* *$T = 50^\circ\text{C}$; pH = 5; $S_0 = 105$ g/L.*

| <u>X</u> | <u>$E_0.t$</u> | <u>X</u> | <u>$E_0.t$</u> |
|----------|---------------------------|----------|---------------------------|
| 0.000 | 0.00 | 0.000 | 0.00 |
| 0.130 | 6.25 | 0.083 | 3.13 |
| 0.193 | 12.50 | 0.142 | 6.25 |
| - | - | 0.176 | 9.38 |
| 0.283 | 25.00 | 0.206 | 12.50 |
| 0.330 | 37.50 | 0.253 | 18.75 |
| 0.363 | 50.00 | 0.275 | 25.00 |

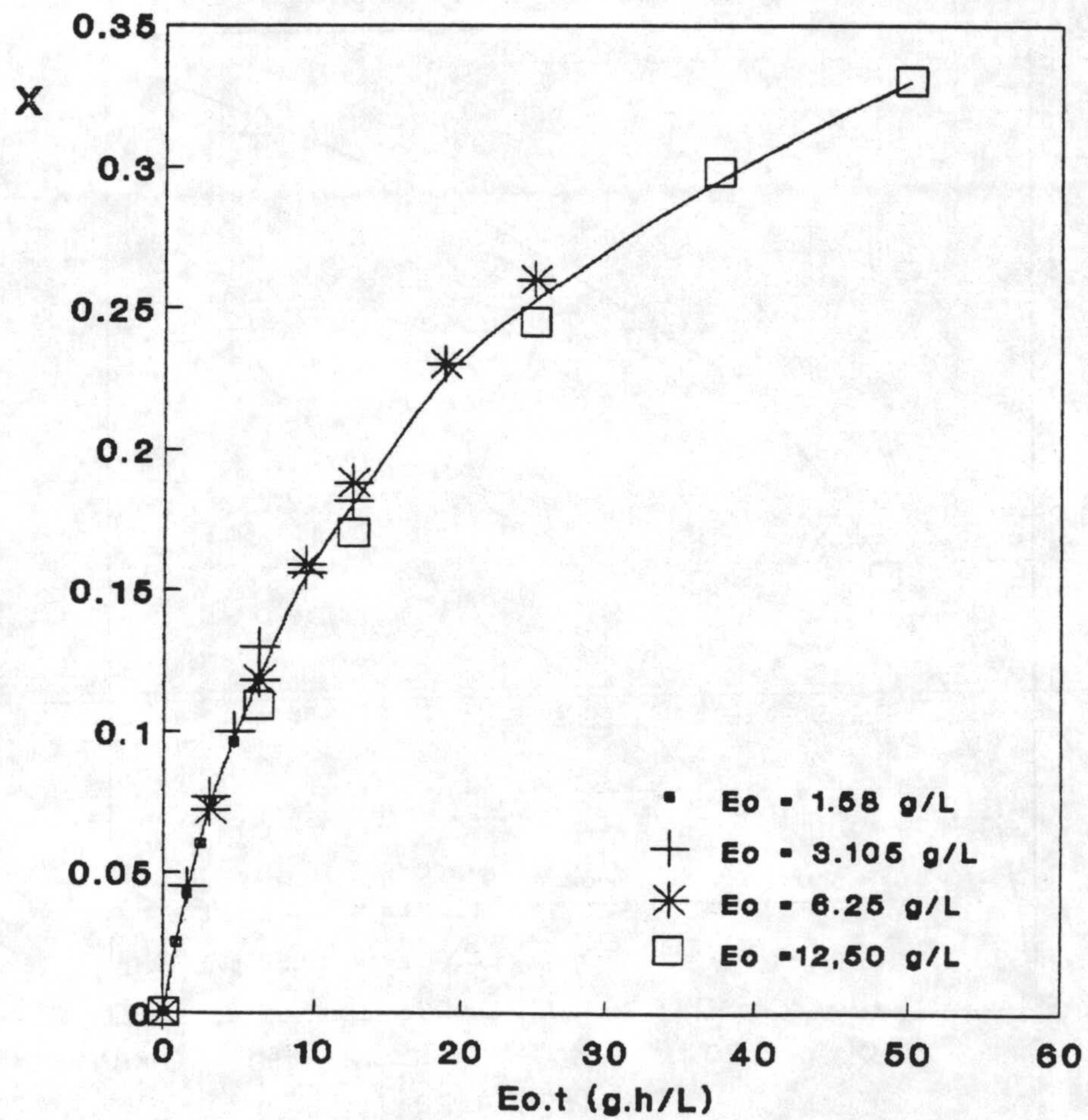


Figura 5.5. Influencia del producto $E_0 \cdot t$ sobre la conversión.
 $S_0 = 52.50 \text{ g/L}$; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

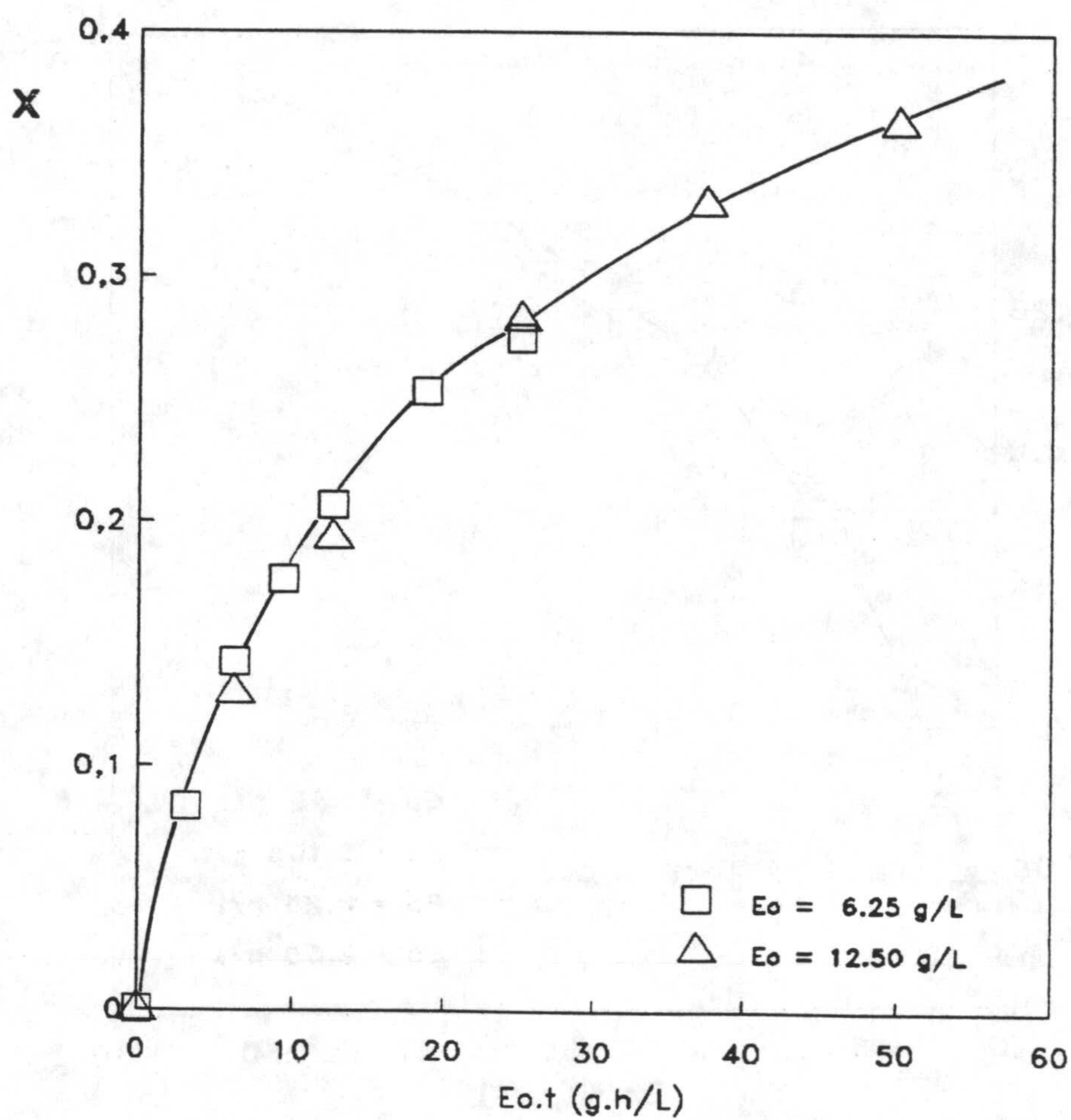


Figura 5.6. Influencia del producto $E_0 \cdot t$ sobre la conversión.
 $S_0=105$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

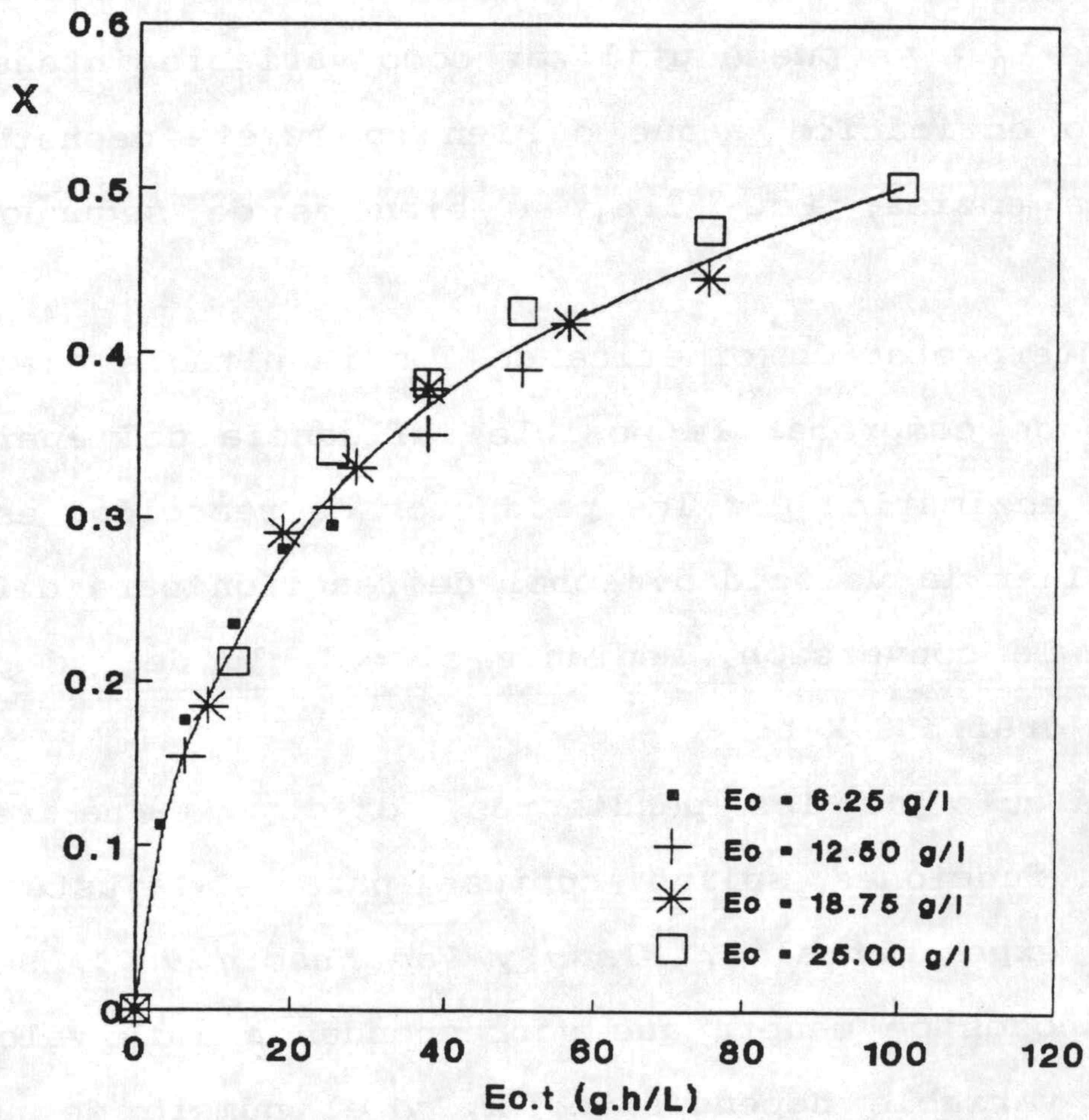


Figura 5.7. Influencia del producto $E_0 \cdot t$ sobre la conversión.
 $S_0=210$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

4 FEB. 1993

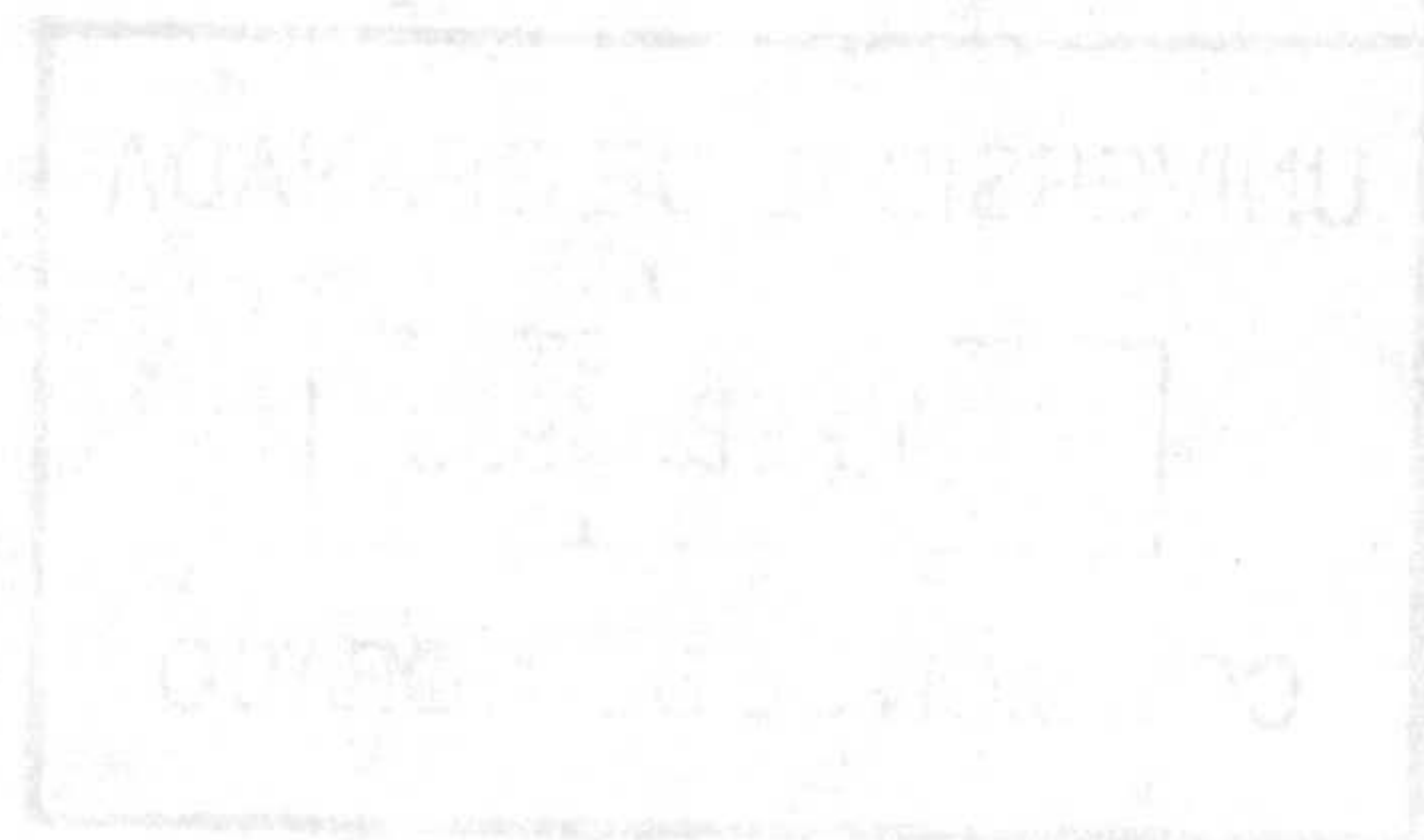
COMISION DE DOCTORADO

Se observa que los experimentos realizados con la misma concentración inicial de sustrato se reúnen en una sola línea independientemente de la concentración inicial de enzima, siempre que el producto $E_0 \cdot t$ sea constante. Este hecho parece indicar que $E_0 \cdot t$ se puede utilizar como variable intensiva del tratamiento enzimático y que o bien no existe desnaturalización de la enzima, Ec. [5.6], o bien es de segundo orden, Ec. [5.8].

Para la interpretación cinética de los resultados obtenidos y con objeto de comprobar la posible influencia del apartado c, inhibición enzimática por los productos de reacción, es conveniente evaluar la velocidad global de reacción para diferentes valores de la conversión, mediante el cálculo de las pendientes de los gráficos X-t.

El cálculo de las pendientes, dX/dt , se ha realizado utilizando funciones spline cúbicas para el ajuste de los resultados experimentales, *Klaus y Van Ness (1967)*, seleccionando los nodos de manera que correspondan a intervalos iguales de la variable dependiente, X, y el número de nodos de forma que se minimice el sumatorio de los cuadrados residuales

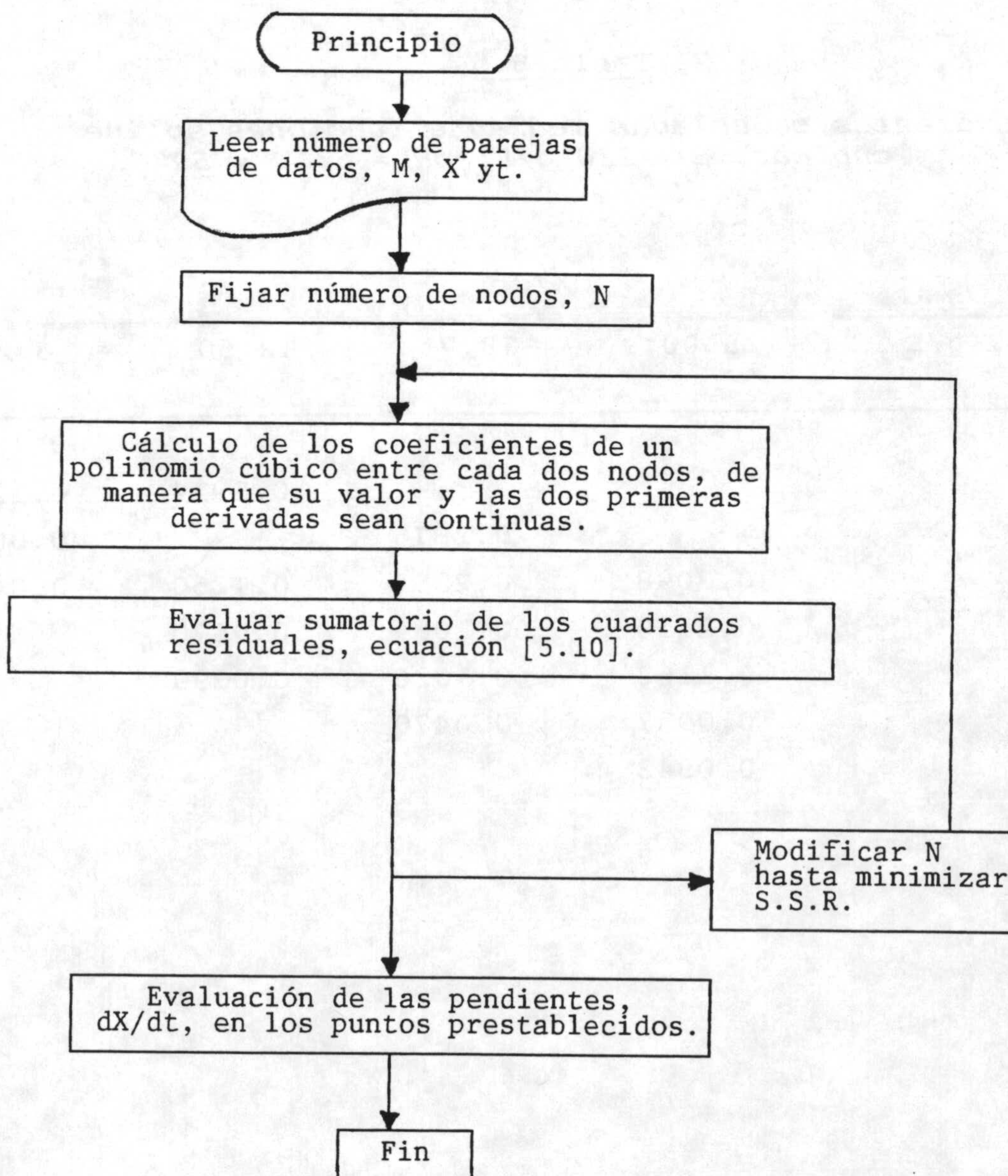
$$SSR = \frac{\sum (X_{cal} - X_{exp})^2}{M - N} \quad [5.10]$$



donde M es el número de parejas de datos y N el número de nodos, **Tsao y Watson (1988)**. El algoritmo utilizado se indica en la tabla 5.4 y el programa en *PASCAL* se encuentra disponible en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada (**Guadix Escobar, E. Tesis Doctoral (1992)**).

Tabla 5.4

Organigrama simplificado para el cálculo de las pendientes.



En las tablas 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 se indican los valores de dx/dt obtenidos mediante este método. De acuerdo con la ecuación [5.4], para una concentración inicial de sustrato dada, el valor de dx/dt debe ser función exclusiva de la conversión y de la concentración activa de enzima.

Tabla 5.5

Pendientes calculadas mediante funciones spline cúbicas. $S_0 = 210$ g/L; pH = 5; T = 50°C.

| X | E ₀ , g/L | dx/dt | | | |
|------|----------------------|-------|--------|--------|--------|
| | | 25.00 | 18.75 | 12.50 | 6.25 |
| 0.10 | | | | | 0.1858 |
| 0.15 | | | | 0.1914 | 0.1246 |
| 0.20 | | | 0.2876 | | 0.0649 |
| 0.25 | 0.3098 | | 0.2252 | 0.1260 | 0.0485 |
| 0.30 | 0.2410 | | 0.1064 | 0.0570 | |
| 0.35 | 0.1162 | | 0.1026 | 0.0399 | |
| 0.40 | 0.0927 | | 0.0470 | | |
| 0.45 | 0.0543 | | | | |

Tabla 5.6

Pendientes calculadas mediante funciones spline cúbicas. $S_0 = 52.50$ g/L; pH = 5; $T = 50^\circ\text{C}$.

| X | E_0 , g/L | dX/dt | | | |
|------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1.58 | 3.125 | 6.25 | 12.50 |
| 0.05 | | 0.0368 | 0.0848 | 0.1348 | 0.2292 |
| 0.10 | | 0.0207 | 0.0659 | 0.0870 | 0.1747 |
| 0.15 | | | 0.0453 | 0.0787 | 0.1116 |
| 0.20 | | | | 0.0538 | 0.0789 |
| 0.25 | | | | 0.0269 | 0.0602 |
| 0.30 | | | | | 0.0421 |

Tabla 5.7

Pendientes calculadas mediante funciones spline cúbicas. $S_0 = 105$ g/L; pH = 5; $T = 50^\circ\text{C}$.

| X | E_0 , g/L | dX/dt | |
|------|-------------|--------|--------|
| | | 6.25 | 12.50 |
| 0.05 | | 0.1628 | 0.2894 |
| 0.10 | | 0.1294 | 0.2270 |
| 0.15 | | 0.0865 | 0.1444 |
| 0.20 | | 0.0603 | 0.0997 |
| 0.25 | | | 0.0898 |
| 0.30 | | | 0.0535 |

Tabla 5.8

Pendientes calculadas mediante funciones spline cúbicas. $S_0 = 21$ g/L; pH = 5; $T = 50^\circ\text{C}$; $E_0 = 12.50$ g/L.

| <u>X</u> | <u>dX/dt, h⁻¹</u> |
|----------|------------------------------|
| 0.05 | 0.1585 |
| 0.10 | 0.1359 |
| 0.15 | 0.1088 |
| 0.20 | 0.0738 |
| 0.30 | 0.0601 |

Por otra parte, la concentración de enzima activa debe de depender de E_0 , del tiempo de hidrólisis y de la concentración de sacáridos, $S_0 \cdot X$, si éstos participan en el proceso de desnaturalización. Por tanto, en cada experimento, dX/dt debe ser una función exclusiva de la conversión ya que tanto la temperatura como el pH han permanecido constantes, 50°C y 5 respectivamente, y existe una relación unívoca entre X y t.

$$\frac{dX}{dt} = F(X) \quad [5.11]$$

De las relaciones funcionales ensayadas para [5.11] la que mejor reproduce nuestros resultados experimentales es la indicada en las figuras 5.8, 5.9, 5.10 y 5.11 en las que se ha representado $\log(dX/dt)$ frente a X . En estas gráficas se observa que los resultados experimentales parecen ajustarse a una relación funcional de la forma

$$\frac{dX}{dt} = a \exp (- b X) \quad [5.12]$$

El valor de b , pendiente de las líneas, parece ser aproximadamente constante, mientras que los valores de a aumentan con las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato.

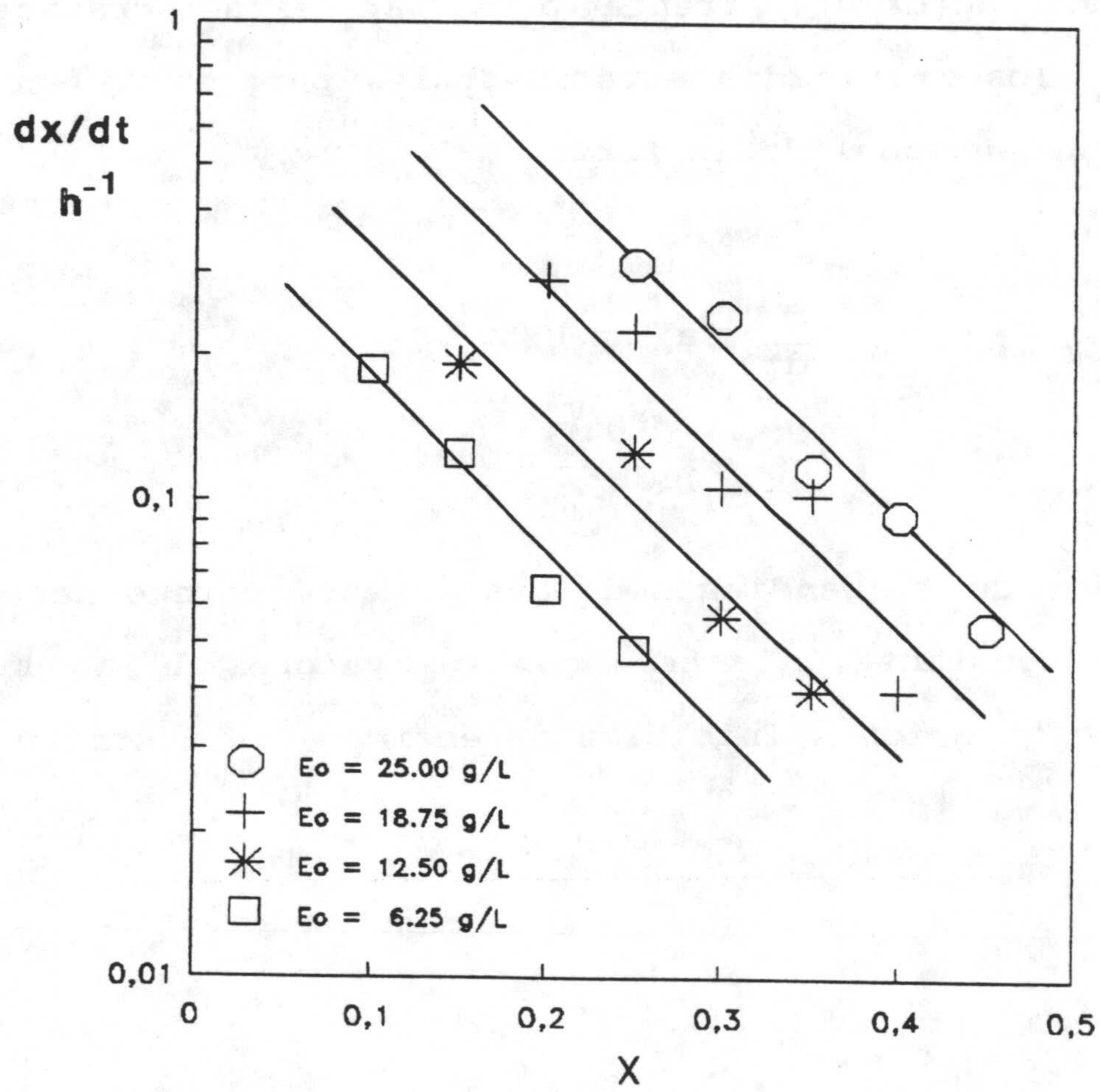


Figura 5.8. Variación de las pendientes con X .

$S_0=210 \text{ g/L}$; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

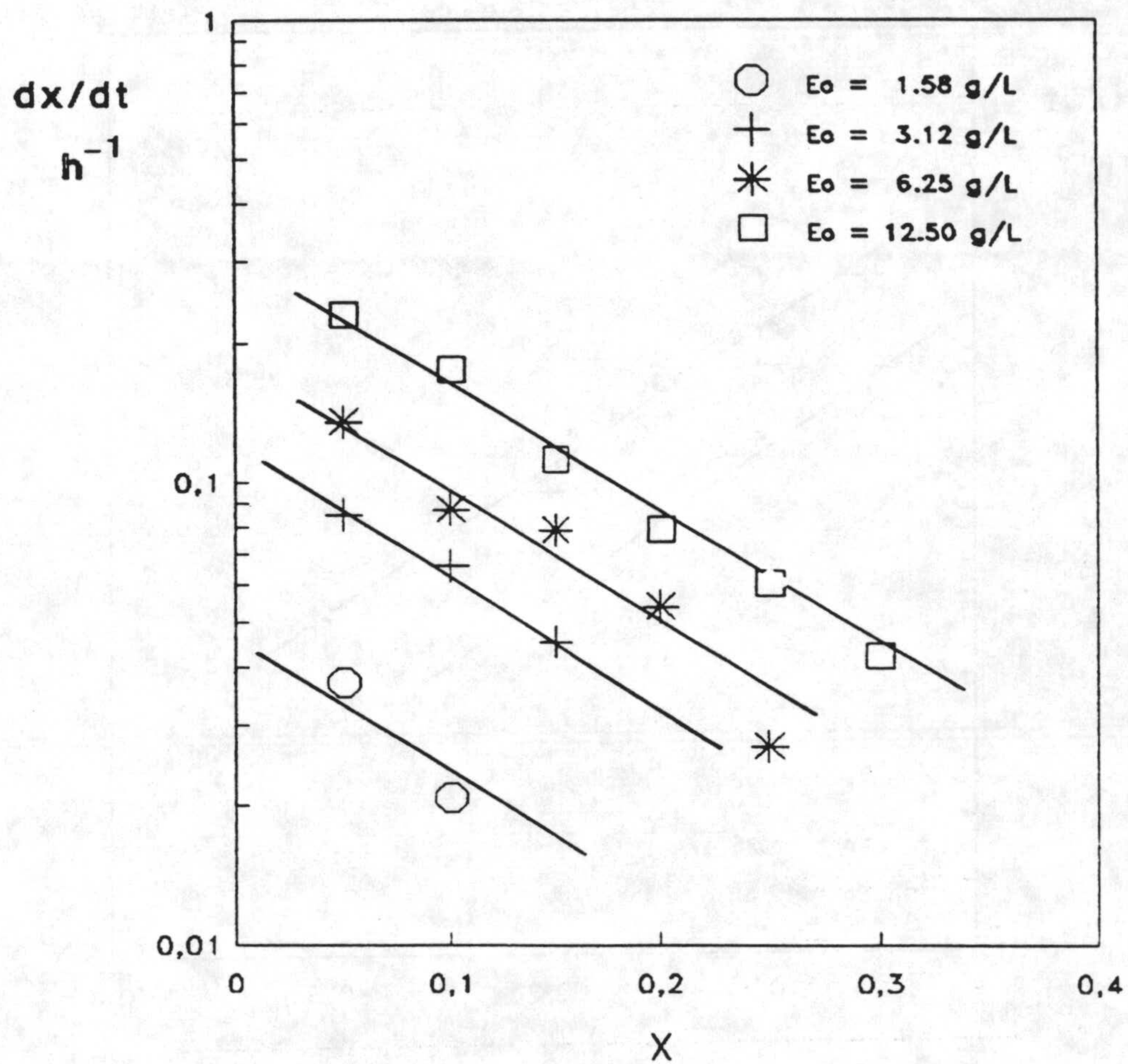


Figura 5.9. Variación de las pendientes con X.

$S_0=52.50$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

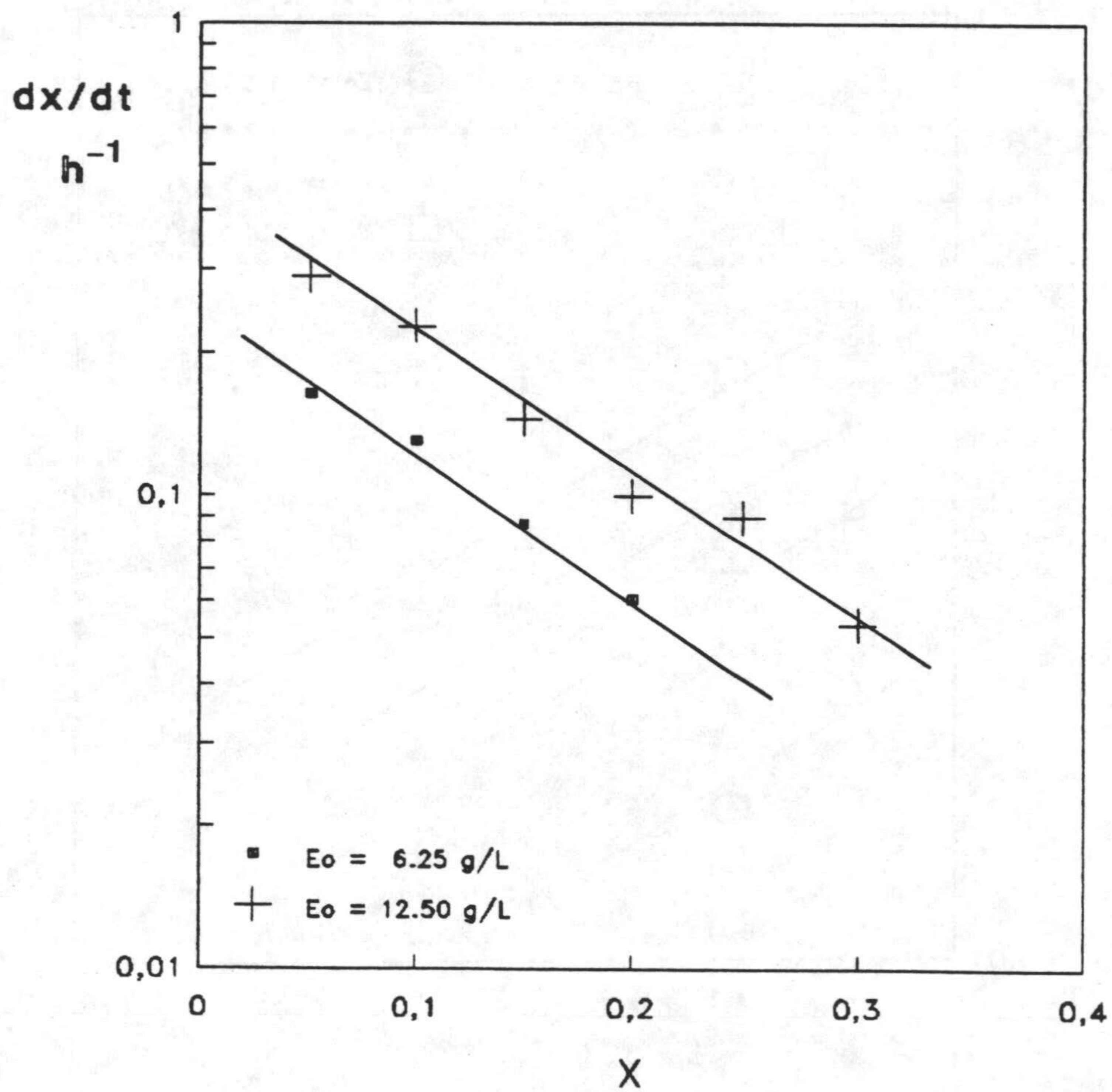


Figura 5.10. Variación de las pendientes con X .

$S_0=105$ g/L; $T=50^\circ C$ y $pH=5$.

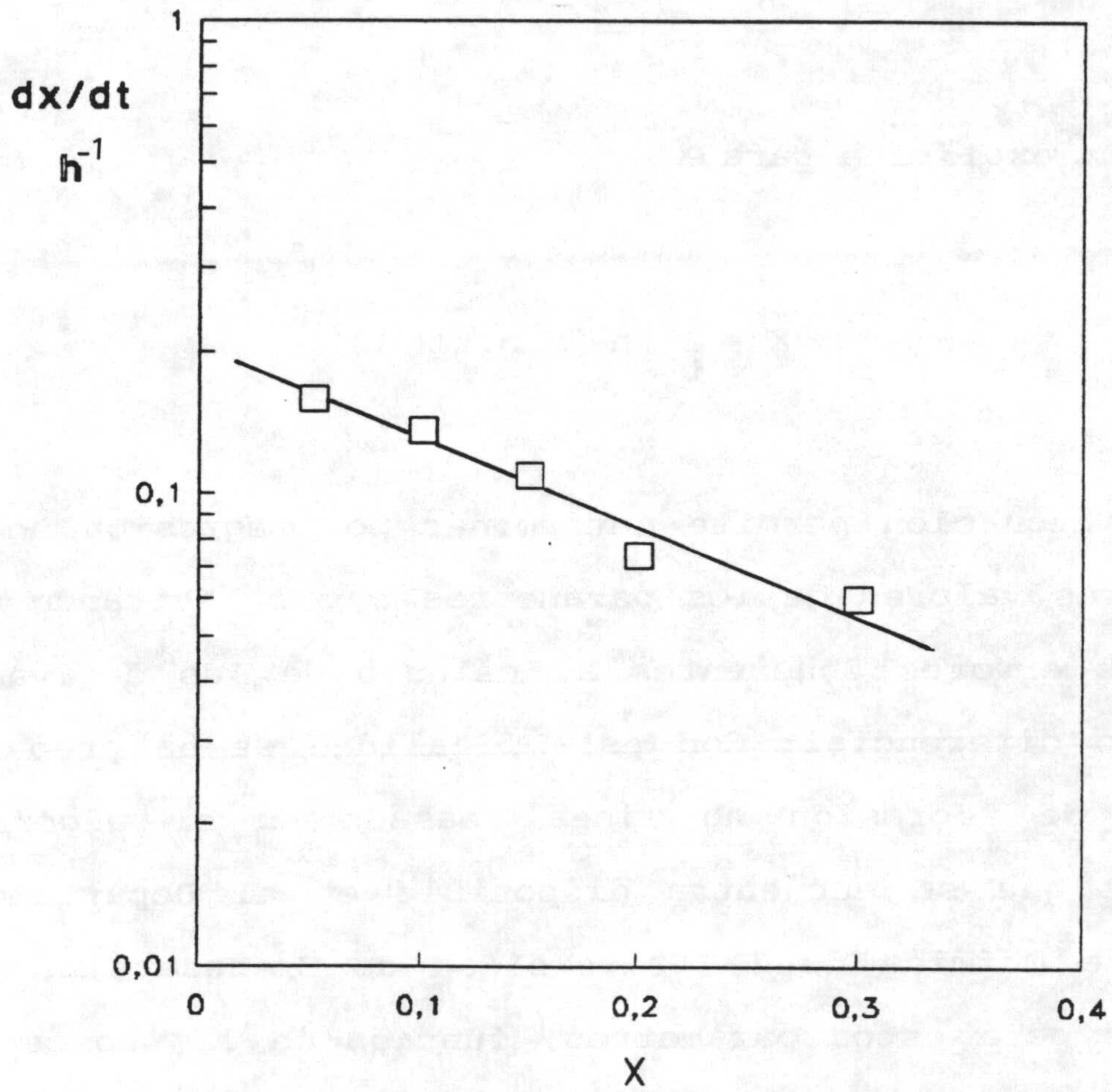


Figura 5.11. Variación de las pendientes con X.

$S_0=21$ g/L; $E_0=12.50$ g/L; $T=50^{\circ}C$ y $pH=5$.

Separando variables e integrando [5.12] se obtiene que

$$\frac{1}{b} [\exp(bx) - 1] = a \cdot t \quad [5.13]$$

o de forma explícita para X

$$X = \frac{1}{b} \ln (a \cdot b \cdot t + 1) \quad [5.14]$$

Esta ecuación permite determinar por regresión no lineal los mejores valores de los parámetros a y b , evitando de esta forma los errores inherentes al cálculo de las derivadas por el método diferencial. Con esta finalidad se ha preparado un programa de regresión no lineal basado en el *algoritmo de Marquardt* que se encuentra disponible en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada. Los valores obtenidos para estos parámetros, función de las concentraciones de enzima y de sustrato se indican en las tablas 5.9 y 5.10, respectivamente. En éstas se observa, de acuerdo con las figuras 5.8 a 5.11, que b es aproximadamente constante oscilando alrededor de un valor medio de

$$b = 7.72 \quad [5.15]$$

Con este valor de b , se han recalculado los correspondientes valores de a que se indican en las tablas 5.9 y 5.10. Mediante estos valores medios se reproducen los resultados experimentales con desviaciones inferiores al $\pm 10\%$.

Tabla 5.9

Parámetros de la ecuación [5.14]. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. pH = 5; T = 50°C.

* $S_0 = 210$ g/L

| E_0 , g/L | a , h^{-1} | b | a , calculado(1) |
|-------------|----------------|------|--------------------|
| 6.25 | 0.4307 | 9.43 | 0.3357 |
| 12.50 | 0.5358 | 7.18 | 0.5956 |
| 18.75 | 0.9240 | 7.30 | 1.0220 |
| 25.00 | 1.1272 | 6.67 | 1.5158 |

* $S_0 = 52.50$ g/L

| E_0 , g/L | a , h^{-1} | b | a , calculado(1) |
|-------------|----------------|-------|--------------------|
| 1.58 | 0.0534 | 9.39 | 0.0530 |
| 3.125 | 0.1540 | 11.48 | 0.1169 |
| 6.25 | 0.1903 | 6.90 | 0.2070 |
| 12.50 | 0.3260 | 6.97 | 0.3654 |

(1) calculado con $b = 7.72$

Tabla 5.10

Parámetros de la ecuación [5.14]. Influencia de la concentración inicial de sustrato. pH = 5; T = 50°C.

* $E_0 = 6.25$ g/L

| S_0 , g/L | a , h^{-1} | b | a , calculado(1) |
|-------------|----------------|------|--------------------|
| 52.5 | 0.1903 | 6.90 | 0.2070 |
| 105 | 0.2406 | 7.68 | 0.2419 |
| 210 | 0.4307 | 9.40 | 0.3357 |

* $E_0 = 12.50$ g/L

| S_0 , g/L | a , h^{-1} | b | a , calculado(1) |
|-------------|----------------|------|--------------------|
| 21 | 0.2445 | 6.54 | 0.2927 |
| 52.5 | 0.3260 | 6.90 | 0.3654 |
| 105 | 0.4214 | 6.94 | 0.4827 |
| 210 | 0.5358 | 7.18 | 0.5956 |

(1) calculado con $b = 7.72$

Como ya se ha comentado, los valores de a crecen con E_0 y con la concentración inicial de sustrato S_0 g/L. A la vista de estos hechos, se ha representado a frente a E_0 , para S_0 constante, figura 5.12. En esta gráfica se observa que a aumenta linealmente con la concentración inicial de sustrato. Es decir

$$a \propto E_0$$

[5.16]

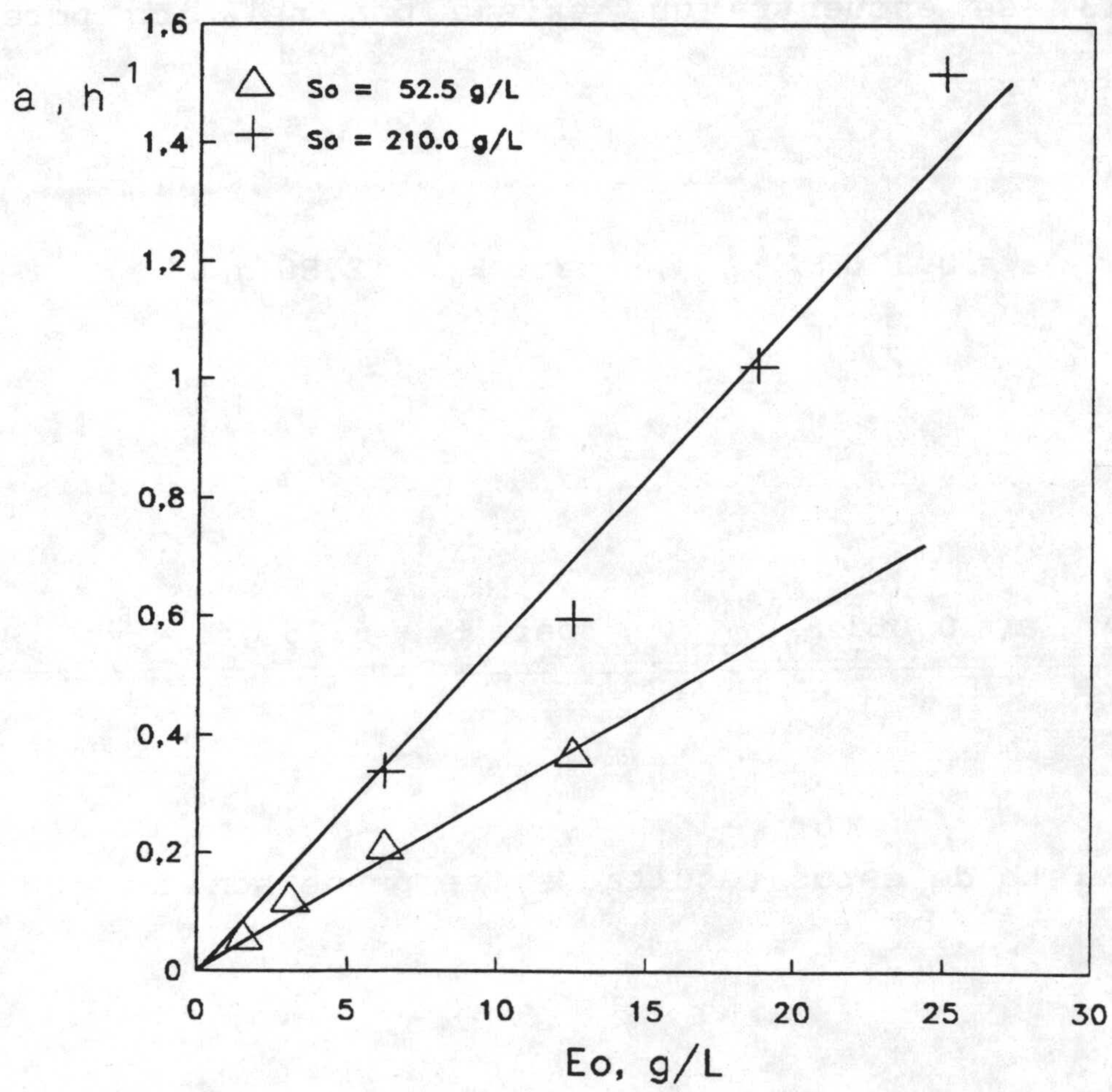


Figura 5.12. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa sobre a . $T=50^{\circ}C$ y $pH=5$.

De manera análoga se han representado los valores tabulados en [5.10], que muestran la influencia de la concentración inicial de sustrato sobre a . Sin embargo en este caso, figura 5.13, se encuentra que existe una relación potencial entre a y S_0

$$a = 0.110 S_0^{0.315} , \text{ para } E_0 = 12.50 \text{ g/L} \quad [5.17]$$

y

$$a = 0.051 S_0^{0.349} , \text{ para } E_0 = 6.25 \text{ g/L} \quad [5.18]$$

A la vista de estos resultados, se puede admitir que

$$a \propto E_0 \cdot S_0^{1/3} \quad [5.19]$$

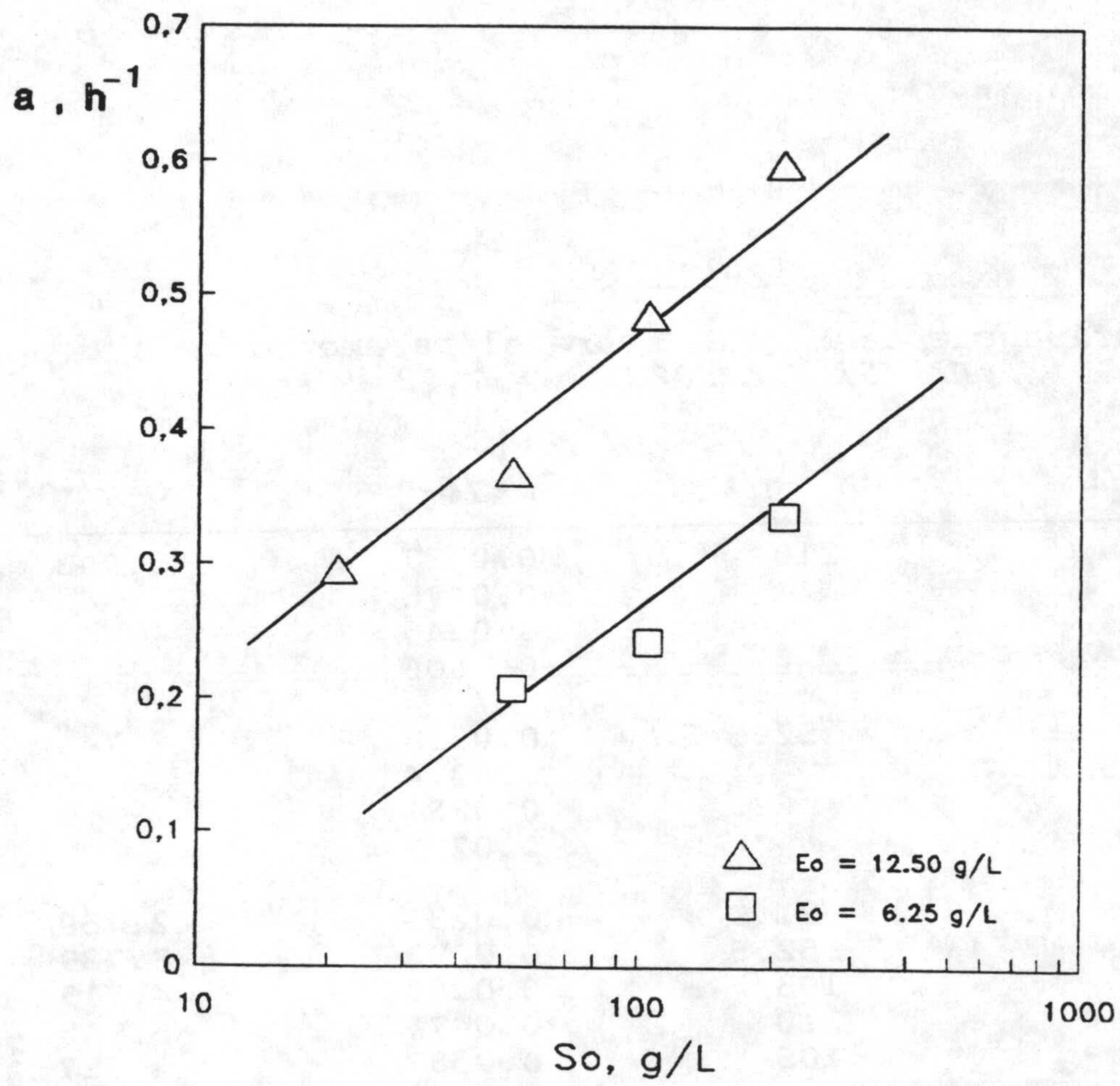


Figura 5.13. Influencia de la concentración inicial de sustrato sobre a . $T=50^{\circ}C$ y $pH=5$.

Para comprobar este hecho y obtener una única ecuación para todos los sistemas ensayados a 50°C y pH = 5 se han calculado todos los valores de a/E_0 , tabla 5.11.

Tabla 5.11

*Influencia de E_0 y S_0 sobre el parámetro a , h^{-1} .
pH = 5; T = 50°C. b = 7.72*

| E_0 , g/L | S_0 , g/L | a/E_0 | $S_0^{1/3}$ |
|-------------|-------------|---------|-------------|
| 6.25 | 210 | 0.0537 | 5.943 |
| 12.50 | | 0.0476 | |
| 18.75 | | 0.0545 | |
| 25.00 | | 0.0606 | |
| 1.58 | 52.5 | 0.0318 | 3.744 |
| 3.125 | | 0.0374 | |
| 6.25 | | 0.0331 | |
| 12.50 | | 0.0292 | |
| 12.50 | 21.0 | 0.0234 | 2.759 |
| 12.50 | 52.5 | 0.0292 | 3.739 |
| 12.50 | 105 | 0.0386 | 4.717 |
| 12.50 | 210 | 0.0476 | 5.943 |
| 6.25 | 105 | 0.0387 | 4.717 |

En ésta se observa que para un valor constante de S_0 , a/E_0 oscila alrededor de un valor medio. Representando estos datos, tabla 5.12, frente a $S_0^{1/3}$, figura 5.14, se obtiene que

$$a = 9.359 \cdot 10^{-3} \cdot E_0 \cdot S_0^{1/3} \quad [5.20]$$

Tabla 5.12

*Valores medios de a/E_0 frente a S_0 .
pH=5; T=50°C.*

| a/E_0 | S_0 , g/L | $S_0^{1/3}$ |
|---------|-------------|-------------|
| 0.0541 | 210.0 | 5.943 |
| 0.0386 | 105.0 | 4.717 |
| 0.0329 | 52.5 | 3.744 |
| 0.0234 | 21.0 | 2.759 |

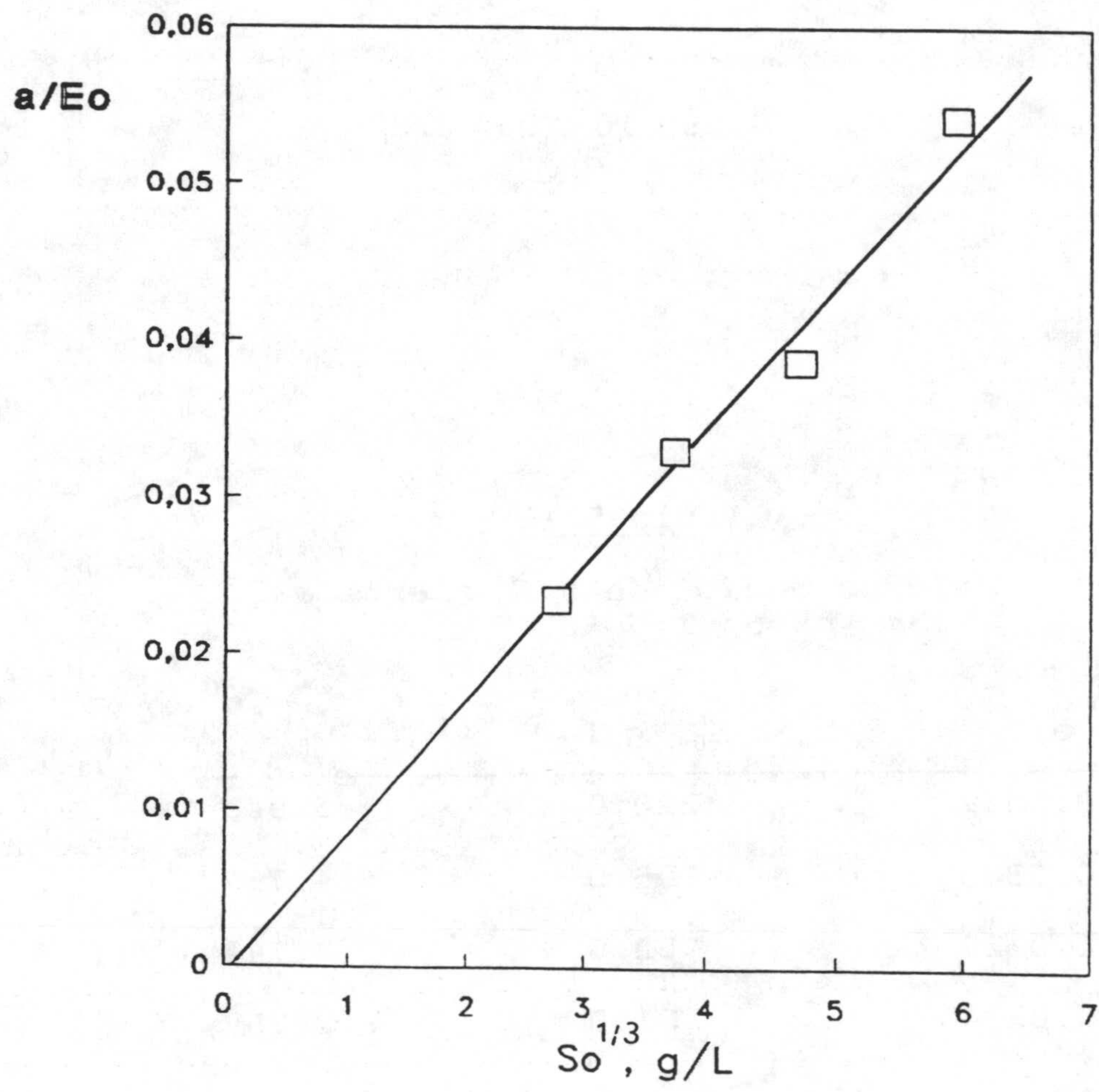


Figura 5.14. Variación de a/E_0 con la concentración inicial de sustrato. $T=50^\circ\text{C}$; $\text{pH}=5$.

Sustituyendo [5.20] en [5.14] se obtiene que

$$X = \frac{1}{7.72} \text{Ln} [0.072 \cdot E_0 \cdot t \cdot S_0^{\frac{1}{3}} + 1] \quad [5.21]$$

Esta expresión permite reproducir los resultados experimentales de X frente a t con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$, tal como se observa en las tablas 5.13, 5.14 y 5.15 y se pone de manifiesto en las gráficas 5.15, 5.16 y 5.17 donde se han representado los valores de X calculados frente a los experimentales. Además esta ecuación muestra, de acuerdo con lo ya comentado que $E_0 \cdot t$ se puede utilizar como variable intensiva para el tratamiento enzimático del almidón de la harina de trigo.

Tabla 5.13

*Influencia de la concentración inicial de α -amilasa.
Comparación entre resultados experimentales y calculados
 $S_0 = 210 \text{ g/L}$; $\text{pH} = 5$; $T = 50^\circ\text{C}$.*

| t, h | Eo=6.25g/L | | Eo=12.50g/L | | Eo=18.75g/L | | Eo=25 g/L | |
|------|------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-----------|-------|
| | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal |
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.112 | 0.110 | 0.154 | 0.169 | 0.185 | 0.209 | 0.212 | 0.240 |
| 1.0 | 0.176 | 0.169 | | | 0.290 | 0.285 | 0.340 | 0.319 |
| 1.5 | | | 0.270 | 0.285 | 0.330 | 0.333 | 0.381 | 0.368 |
| 2.0 | 0.235 | 0.239 | 0.306 | 0.319 | 0.378 | 0.367 | 0.425 | 0.403 |
| 3.0 | 0.280 | 0.285 | 0.350 | 0.367 | 0.418 | 0.418 | 0.475 | 0.454 |
| 4.0 | 0.295 | 0.319 | 0.390 | 0.403 | 0.446 | 0.453 | 0.502 | 0.490 |

Tabla 5.14

*Influencia de la concentración inicial de sustrato.
Comparación entre resultados experimentales y calculados.
 $E_0 = 12.50$ g/L; pH = 5; T = 50°C.*

| t, h | So= 21 g/L | | So=52.5g/L | | So=105g/L | | So=210g/L | |
|------|------------|-------|------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal |
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | | | 0.109 | 0.128 | 0.130 | 0.148 | 0.154 | 0.169 |
| 1.0 | 0.145 | 0.162 | 0.170 | 0.191 | 0.193 | 0.215 | | |
| 1.5 | | | | | | | 0.270 | 0.285 |
| 2.0 | 0.224 | 0.232 | 0.245 | 0.265 | 0.283 | 0.292 | 0.306 | 0.319 |
| 3.0 | 0.260 | 0.276 | 0.298 | 0.312 | 0.330 | 0.340 | 0.350 | 0.368 |
| 4.0 | 0.310 | 0.310 | 0.330 | 0.346 | 0.363 | 0.374 | 0.390 | 0.403 |

Tabla 5.15

*Influencia de la concentración inicial de α -amilasa.
Comparación entre resultados experimentales y calculados.
 $S_0 = 52.5$ g/L; pH = 5; T = 50°C.*

| t, h | Eo=1.58g/L | | Eo=3.125g/L | | Eo=6.25g/L | | Eo=12.5g/L | |
|------|------------|-------|-------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal |
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.025 | 0.025 | 0.046 | 0.050 | 0.072 | 0.079 | 0.109 | 0.128 |
| 1.0 | 0.042 | 0.046 | 0.079 | 0.082 | 0.118 | 0.128 | 0.170 | 0.191 |
| 1.5 | 0.060 | 0.064 | 0.106 | 0.104 | 0.159 | 0.163 | | |
| 2.0 | 0.075 | 0.080 | 0.128 | 0.133 | 0.188 | 0.191 | 0.245 | 0.265 |
| 3.0 | 0.096 | 0.107 | 0.164 | 0.158 | 0.230 | 0.233 | 0.298 | 0.312 |
| 4.0 | 0.118 | 0.128 | 0.191 | 0.182 | 0.260 | 0.266 | 0.330 | 0.346 |

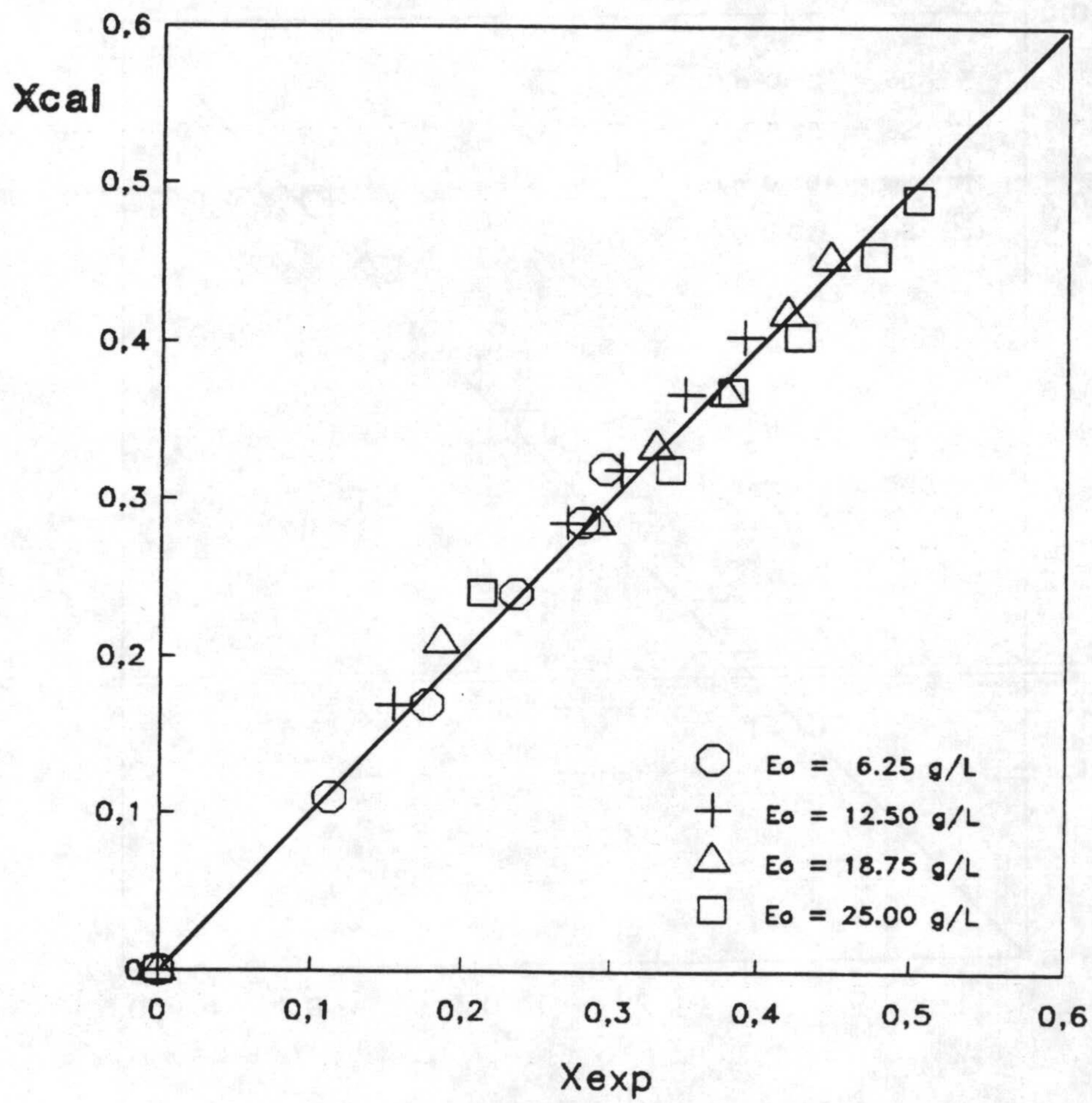


Figura 5.15. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. Comparación entre resultados experimentales y calculados. $S_0=210$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

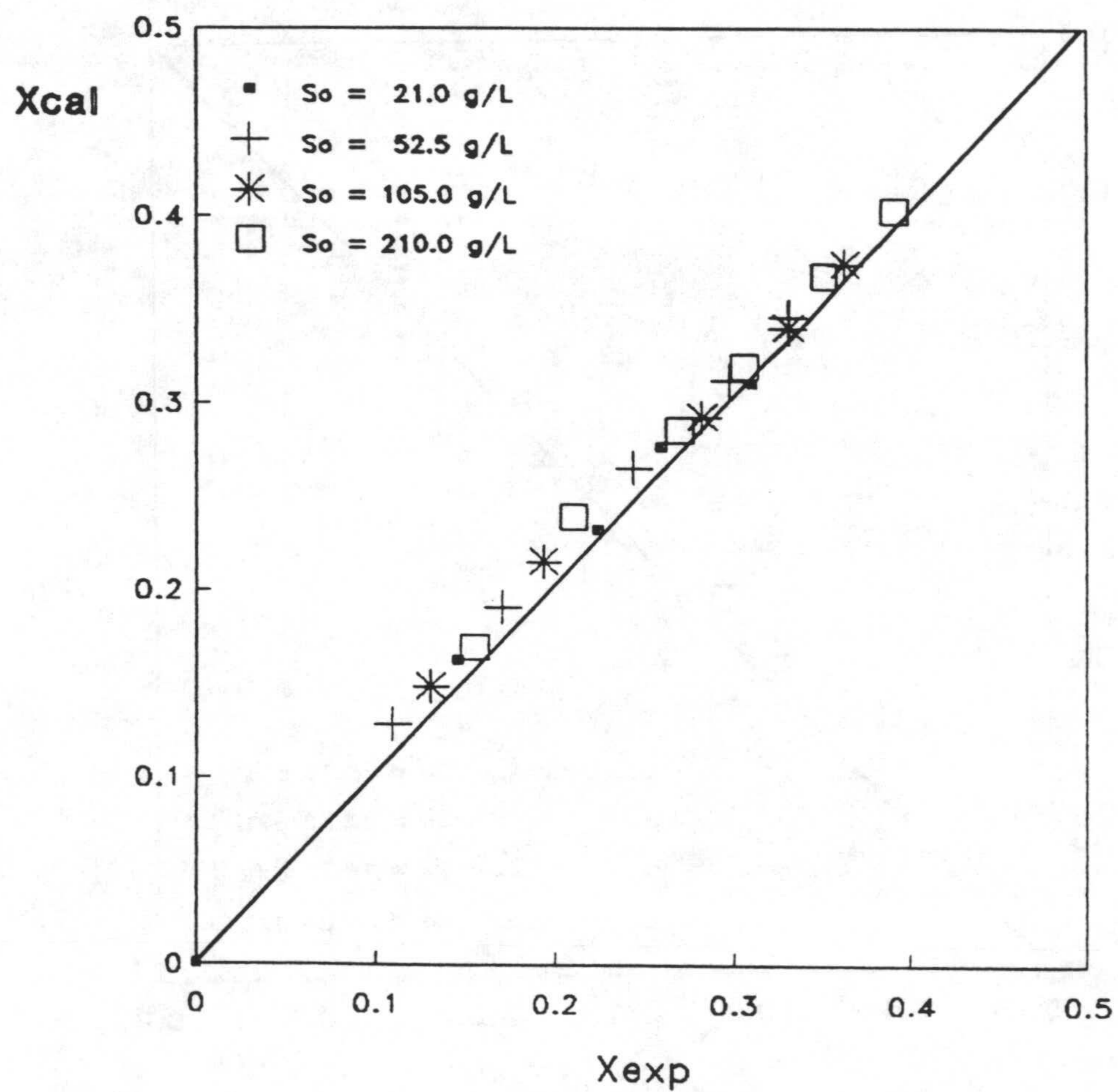


Figura 5.16. Influencia de la concentración inicial de sustrato. Comparación entre resultados experimentales y calculados. $E_0=12.50$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

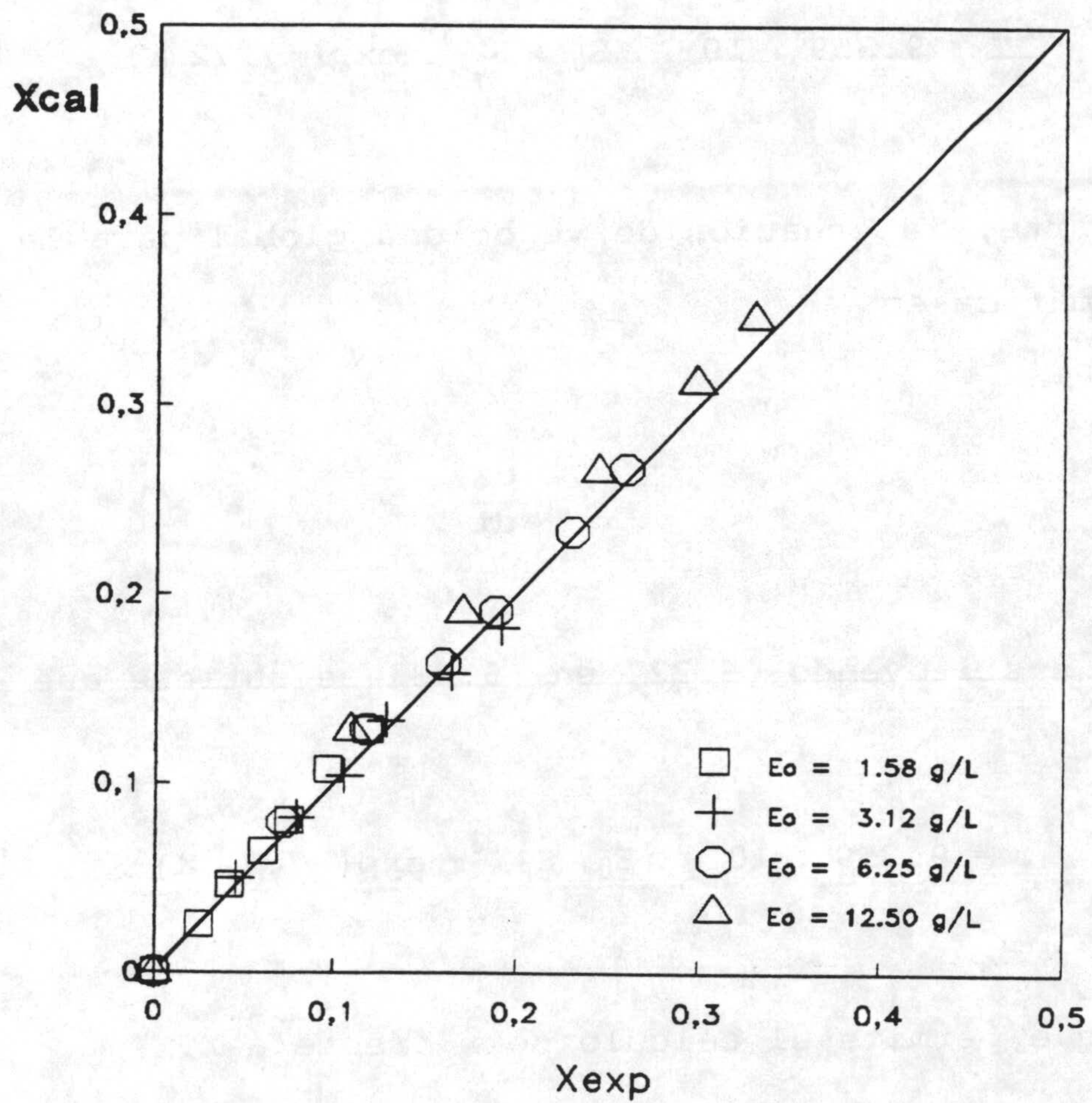


Figura 5.17. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa. $S_0=52.50$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

Sustituyendo [5.20] en [5.12] y teniendo en cuenta que $b = 7.72$, se obtiene que

$$\frac{dX}{dt} = 9.359 \cdot 10^{-3} \cdot E_0 \cdot S_0^{1/3} \cdot \exp(-7.72 X) \quad [5.22]$$

Por otra parte, la ecuación de velocidad global para la hidrólisis enzimática es

$$r = S_0 \cdot \frac{dX}{dt} \quad [5.23]$$

por lo que sustituyendo [5.22] en [5.23] se obtiene que

$$r = 9.359 \cdot 10^{-3} \cdot E_0 \cdot S_0^{1.33} \cdot \exp(-7.72 X) \quad [5.24]$$

expresión que permite el cálculo de r frente a X .

5.1.1.1- Análisis de las velocidades iniciales.

De la ecuación [5.24], se deduce que para $X = 0$, $r = r_0$ y por tanto, la velocidad inicial del proceso de hidrólisis viene dada por

$$r_0 = 9.359 \cdot 10^{-3} \cdot E_0 \cdot S_0^{1.33} \quad [5.25]$$

Esta ecuación pone de manifiesto que la velocidad inicial es proporcional a la concentración inicial de enzima activa, E_0 , y a $S_0^{1.33}$. Por ello, es previsible que no se ajuste a la clásica ecuación de *Michaelis-Menten*, cuya expresión es:

$$r_0 = \frac{k \cdot E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0} \quad [5.26]$$

La ecuación [5.26] implica que

$$r_0 = k \cdot E_0 \quad \text{para} \quad S_0 \gg K_m \quad [5.27]$$

$$r_0 = k \cdot E_0 \cdot S_0 \quad \text{para} \quad S_0 \ll K_m \quad [5.28]$$

es decir, que r_0 o es independiente de la concentración de sustrato, ecuación [5.27], o proporcional a ella, ecuación [5.28], como casos extremos. Sin embargo, en nuestro caso es proporcional a $S_0^{1.33}$, ecuación [5.25].

Teniendo en cuenta que en los instantes iniciales de la hidrólisis la reacción debe ser heterogénea, ya que la α -amilasa se debe adsorber sobre los gránulos de almidón para hidrolizar los primeros enlaces $\alpha(1,4)$ y por tanto liberar cadenas más cortas, cabe pensar que la velocidad de hidrólisis esté controlada por la superficie externa de las partículas de almidón. Esta superficie viene dada por

$$S_p = \pi \cdot d_s^2 \quad [5.29]$$

donde d_s es el diámetro de la esfera equivalente

$$d_s = \left(\frac{6V_p}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \quad [5.30]$$

y por tanto, S_p es

$$S_p = \pi \cdot \left(6 \frac{V_p}{\pi} \right)^{2/3} \quad [5.31]$$

de acuerdo con [5.31] la superficie de las partículas es proporcional a $V_p^{2/3}$ y admitiendo que la densidad del almidón es constante, S_p también debe ser proporcional a $m_p^{2/3}$ y por tanto a $S_0^{2/3}$

$$S_p = C S_0^{2/3} \quad ; \quad S_0 \propto S_p^{3/2} \quad [5.32]$$

De ser ciertas estas hipótesis, la velocidad inicial de hidrólisis vendrá dada por

$$r_0 = C_1 \cdot E_0 [(S_p)^{3/2}]^{4/3} = C_1 \cdot E_0 \cdot S_p^2 \quad [5.33]$$

Esta ecuación indica que la velocidad de hidrólisis, r_0 , gDE/L.h, es proporcional a la concentración inicial de α -amilasa y a S_p^2 .

5.1.1.2- Modelo cinético

A partir de [5.24] se deduce que la velocidad de hidrólisis es

$$r_H = B e_0 \cdot \exp(-bX) \quad [5.34]$$

donde

$$B = 0,0094 \cdot S_0^{1.33} \quad [5.35]$$

Como ya se ha indicado, la disminución continua de la velocidad de hidrólisis que indica la ecuación [5.34] debe estar provocada por la inhibición de producto o la desnaturación enzimática de 2º orden, ya que el producto $E_0 \cdot t$ se comporta aceptablemente como variable intensiva del tratamiento enzimático. Por tanto, el sistema puede estar representado por las ecuaciones:

$$\frac{dX}{dt} = f(S_0 , X) \cdot e \quad [5.36]$$

$$-\frac{de}{dt} = g(S_0 , X) \cdot e^2 \quad [5.37]$$

en donde para $t = 0$, $X = 0$ y $e = e_0$.

Dividiendo [5.37] por [5.36], se obtiene que

$$-\frac{de}{dX} = \frac{g(S_0 , X)}{f(S_0 , X)} \cdot e \quad [5.38]$$

si el cociente

$$\frac{g(S_0 , X)}{f(S_0 , X)} = b \quad [5.39]$$

por integración de [5.38] se llega a

$$e = e_0 \cdot \exp(- b X) \quad [5.40]$$

ecuación que indica que la concentración de enzima activa disminuye exponencialmente con la conversión alcanzada. Sustituyendo [5.40] en [5.36]

$$\frac{dX}{dt} = f (S_0 , X) . e_0 . \exp (- bX) \quad [5.41]$$

Esta ecuación coincide con [5.34] siempre que

$$f (S_0 , X) = \beta = 0.0094 S_0^{1,33} \quad [5.42]$$

Dado que durante la hidrólisis enzimática la enzima debe adsorberse sobre el sustrato, se puede admitir el siguiente equilibrio:



de donde

$$[ES] = K_s . [E] . [S] \quad [5.44]$$

y realizando un balance de enzima activa

$$[E] + [ES] = e \quad [5.45]$$

Sustituyendo [5.44] en [5.45]

$$[E] + K_s \cdot [E] \cdot [S] = e \quad [5.46]$$

de donde

$$[E] = \frac{e}{1 + K_s \cdot [S]} \quad [5.47]$$

$$[ES] = \frac{K_s \cdot [S] \cdot e}{1 + K_s [S]} \quad [5.48]$$

Si se considera que $K_s \cdot [S] \ll 1$, es decir que la mayor parte de la α -amilasa se encuentra en disolución como enzima activa, las ecuaciones [5.47] y [5.48] se transforman en

$$[E] = e \quad [5.49]$$

$$[ES] = K_s \cdot [S] \cdot e \quad [5.50]$$

Estas ecuaciones implican que el fenómeno controlante puede ser la superficie de almidón útil para la adsorción de la α -amilasa, ya que prácticamente toda la enzima se encuentra libre y en disolución.

Por otra parte, la reacción de hidrólisis es



y por tanto su velocidad

$$r_H = S_0 \cdot \frac{dX}{dt} = k_H \cdot [ES] = k_H \cdot K_S \cdot [S] \cdot e \quad [5.52]$$

Sustituyendo [5.40] en [5.52]

$$r_H = k_H \cdot K_S \cdot [S] \cdot e_0 \exp(-bX) \quad [5.53]$$

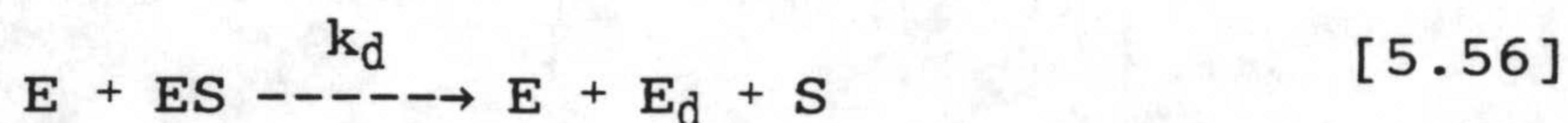
ecuación que coincidiría con [5.34] siempre que

$$[S] \propto S_0^{1.33} \quad [5.54]$$

Para que el cociente representado por [5.34] resulte independiente de S_0 y X , es necesario que

$$g(S_0, X) \propto [S] \propto S_0^{1/3} \quad [5.55]$$

Admitiendo que la desnaturalización de 2ºorden, ecuación [5.37], tiene lugar por el ataque de la enzima libre a la enzima ligada al sustrato, el mecanismo es:



lo que además explicaría que la desnaturalización no se produzca en ausencia de sustrato, como ya se ha demostrado experimentalmente. Por tanto, de acuerdo con [5.56] la ecuación de la desnaturalización enzimática es

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot [E] \cdot [ES] \quad [5.57]$$

y sustituyendo en esta expresión [5.49] y [5.50]

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot e \cdot K_s \cdot [S] \cdot e \quad [5.58]$$

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot K_s \cdot [S] \cdot e^2 \quad [5.59]$$

Las ecuaciones [5.53] y [5.59] ponen de manifiesto que el mecanismo propuesto explicaría la hidrólisis del almidón con α -amilasa siempre que

$$[S] \propto S_0^{1.33} \quad [5.60]$$

y para que esto ocurra, la superficie externa de las partículas debe ser proporcional a $S_0^{2/3}$ y la enzima debe adsorberse simultáneamente sobre dos centros activos.

En la dispersión acuosa de la harina el tamaño del flóculo debe depender de la concentración de la dispersión, de manera que al aumentar esta última el tamaño medio del flóculo también aumenta. En estas condiciones, la superficie de cada uno de los flóculos expuestos al ataque enzimático viene dado por

$$\text{Superficie} \propto (S_0)^{2/3} \quad [5.61]$$

Si la cinética del proceso está controlada por la etapa heterogénea de disolución de los flóculos de almidón y la enzima se adsorbe sobre dos centros activos de la superficie de éstos



Por tanto, la concentración de enzima adsorbida en estado estacionario sería

$$[ES_2] = K'_s [E][S]^2 \approx K'_s e [S]^2 \quad [5.63]$$

Evidentemente, la concentración de centros activos será proporcional a la superficie de los flóculos

$$[S] \propto \text{Superficie} \propto (S_0)^{2/3} \quad [5.64]$$

de donde

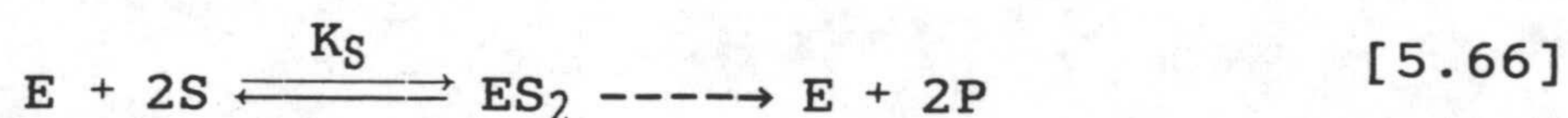
$$[ES_2] \propto K'_s \cdot e \cdot ([S_0^{2/3}])^2 \quad [5.65]$$

En principio, la ecuación anterior sería aplicable exclusivamente al instante inicial; sin embargo los resultados experimentales indican que se mantiene hasta conversiones apreciables, probablemente debido a:

- Al mantenimiento del tamaño de los flóculos por sus componentes no glúcidos.
- Posible hinchamiento de los flóculos que compense su disolución parcial al facilitar esta última un mejor mojado del interior del flóculo.
- Aparición de cadenas solubles más susceptibles a la hidrólisis.

En resumen, la ecuación cinética obtenida, expresión [5.24], puede explicarse mediante el siguiente mecanismo:

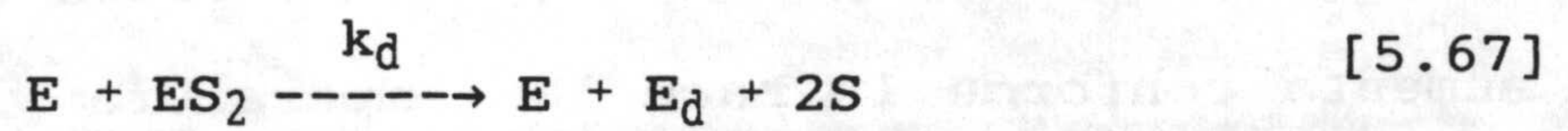
a- La enzima se une simultáneamente a dos centros activos, forma el complejo enzima-sustrato y a continuación, se descompone dando lugar a enzima libre y sacáridos de cadena más corta.



En [5.66], se admite que la mayor parte de la enzima está libre, en disolución, debido a la escasa superficie externa que presentan los gránulos de almidón, y por tanto el fenómeno

controlante es la fase heterogenea de la reacción de hidrólisis.

b- Existe una desnaturalización de la enzima libre a la enzima ligada



c- En todo caso, se admite que el tamaño de los flóculos de almidón y por tanto la superficie externa de estas partículas, es proporcional a $S_0^{2/3}$

De acuerdo con [5.66] y [5.35]

$$k_H \cdot K'_S = 0.0094 \quad [5.68]$$

y

$$b = \frac{k_d \cdot K'_S}{k_H \cdot K'_S} = \frac{k_d}{k_H} \quad [5.69]$$

5.1.1.3- Influencia de la temperatura

Los resultados obtenidos durante el estudio de esta variable, tabla 4.5, con una concentración inicial de sustrato de 52.5 g/L y $E_0 = 3.125$ g/L y pH = 5 se han representado en la figura 5.18. En esta gráfica se observa que la conversión aumenta conforme lo hace la temperatura y el tiempo de hidrólisis, si bien la pendiente de estas líneas decrece, con x. Este hecho y debido a que la forma de las figuras es similar, induce a pensar que la ecuación [5.12] podría aplicarse también para las temperaturas de 35, 40 y 45°C. Admitiendo que [5.12] es aplicable a estos ensayos, por regresión no lineal de [5.14], se han calculado los valores de a y b que se muestran en la tabla 5.16.

Tabla 5.16

Influencia de la temperatura. Parámetros a y b de la ecuación [5.14]. $S_0 = 52.5$ g/L y $E_0 = 3.125$ g/L.

| T°C | a, h^{-1} | b | $a_{cal}(1)$ | $a/E_0 \cdot S_0^{1/3} \cdot 10^3$ | $1/T \cdot 10^3 \cdot K^{-1}$ |
|----------|-------------|-------|--------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 35 | 0.0737 | 10.95 | 0.0619 | 5.291 | 3.25 |
| 40 | 0.0916 | 9.91 | 0.0798 | 6.821 | 3.19 |
| 45 | 0.1135 | 10.73 | 0.0936 | 8.000 | 3.14 |
| 50 | 0.1540 | 11.48 | 0.1169 | 9.982 | 3.10 |
| $V_m(1)$ | - | 7.72 | - | 9.359 | - |

(1) con $b=7.72$

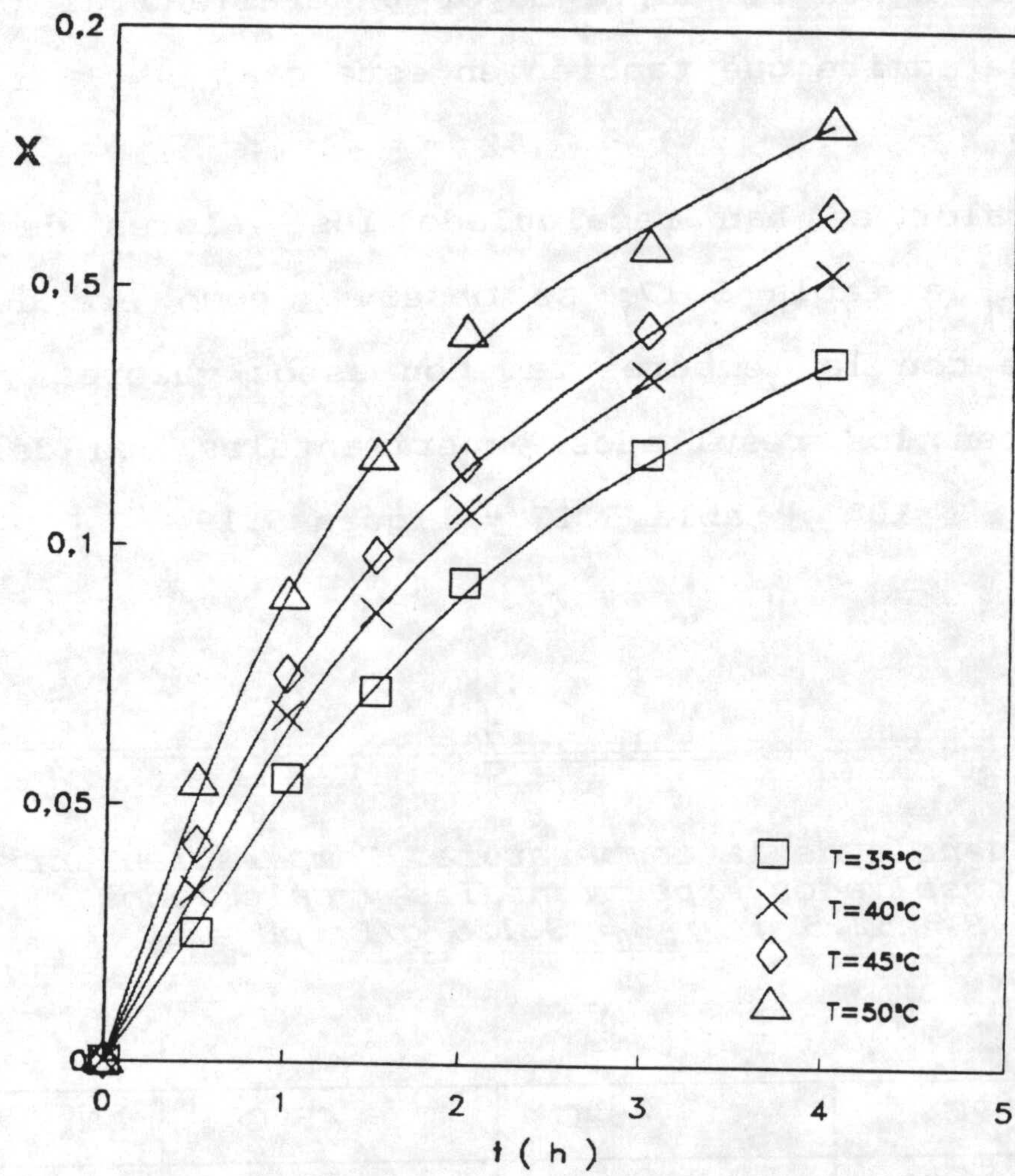


Figura 5.18. Influencia de la temperatura.
 $S_0=52.50$ g/L; $E_0=3.125$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

En la tabla 5.16 se observa que b es aproximadamente constante y que los valores de b no son significativamente distintos de los ya mostrados en las tablas 5.9 y 5.10. Por ello, y con objeto de darle mayor generalidad al tratamiento cinético, se admite que también en este caso

$$b = 7.72$$

Con este valor se han recalculado los valores de a que se muestran en la tabla 5.17; se observa, como era de esperar, que a crece con la temperatura. Con estos valores y $b = 7.72$ se reproducen los resultados experimentales con desviaciones inferiores a $\pm 10\%$; tabla 5.17 y figura 5.19.

Tabla 5.17

Influencia de la temperatura. Comparación entre resultados experimentales y calculados.
 $S_0 = 52.5 \text{ g/L}$; $E_0 = 3.125 \text{ g/L}$; $\text{pH} = 5$.

| t, h | T = 35°C | | T = 40°C | | T = 45°C | | T = 50°C | |
|------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal | X | Xcal |
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.025 | 0.028 | 0.033 | 0.035 | 0.042 | 0.042 | 0.050 | 0.046 |
| 1.0 | 0.055 | 0.051 | 0.067 | 0.062 | 0.075 | 0.070 | 0.082 | 0.079 |
| 1.5 | 0.076 | 0.070 | 0.087 | 0.085 | 0.098 | 0.095 | 0.104 | 0.106 |
| 2.0 | 0.088 | 0.087 | 0.107 | 0.104 | 0.116 | 0.116 | 0.133 | 0.128 |
| 3.0 | 0.113 | 0.115 | 0.133 | 0.136 | 0.142 | 0.149 | 0.158 | 0.163 |
| 4.0 | 0.130 | 0.138 | 0.153 | 0.161 | 0.165 | 0.176 | 0.182 | 0.191 |

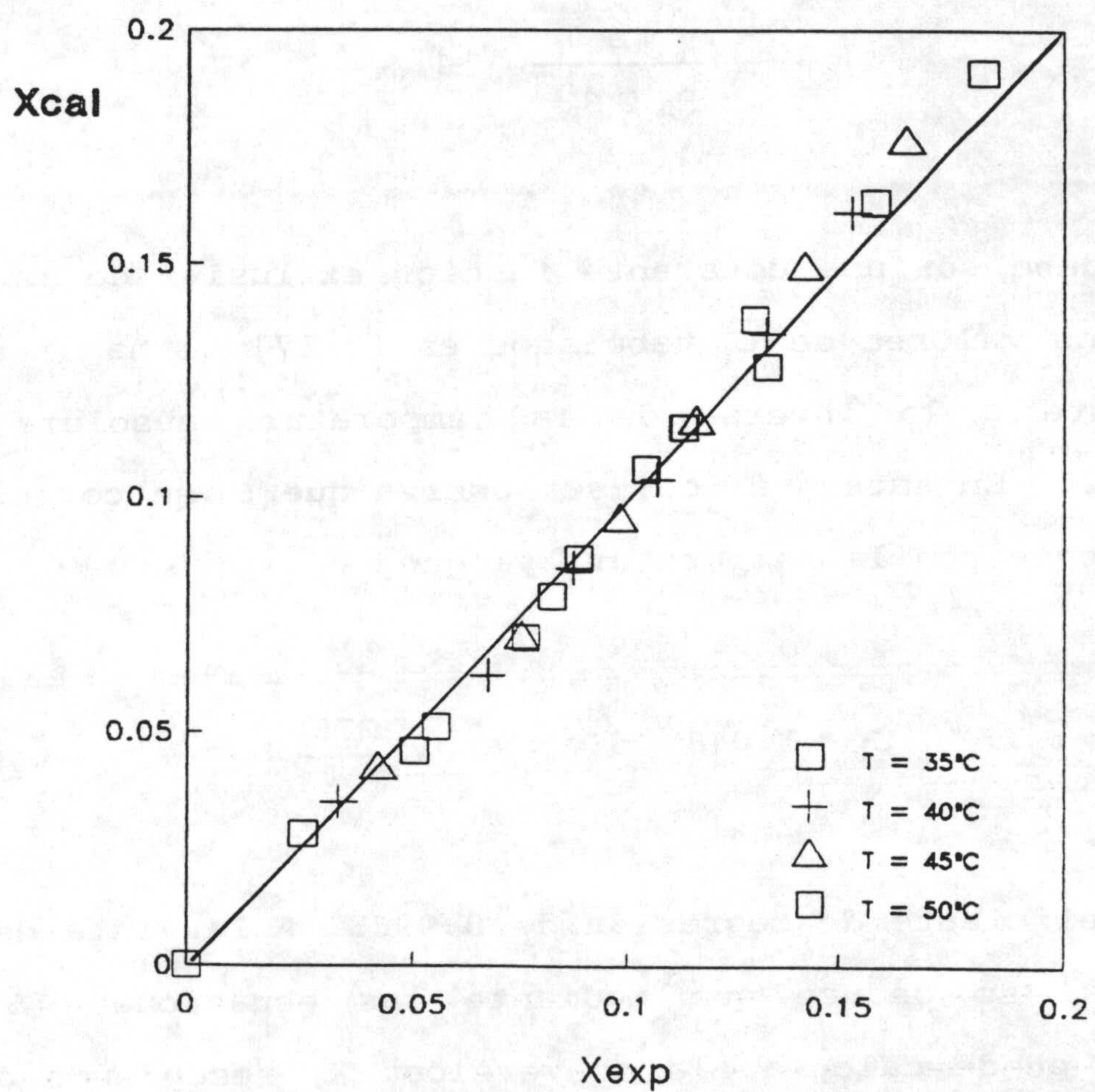


Figura 5.19. Influencia de la temperatura. $S_0=52.50$ g/L; $E_0=3.125$ g/L; $T=50^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$. Comparación entre resultados experimentales y calculados.

Admitiendo que se cumple la relación funcional establecida por la ecuación [5.20], el cociente

$$\frac{a}{E_0 \cdot S_0^{1/3}} = C_1 \quad [5.70]$$

donde C_1 debe ser una constante función exclusiva de la temperatura. Los valores de C_1 tabulados en [5.17] se han representado frente a la inversa de la temperatura absoluta en la figura 5.20. En este gráfico, se observa que C_1 se correlaciona adecuadamente con la temperatura ya que

$$C_1 = 1.048 \cdot 10^3 \cdot \exp\left(-\frac{3750}{T}\right) \quad [5.71]$$

con un coeficiente de regresión de 0.9985. A la vista de estos resultados, se deduce que mediante las ecuaciones [5.21] y [5.35] se puede calcular la conversión, X , recogiendo de este modo la influencia de la concentración de enzima, E_0 , de sustrato, S_0 y de la temperatura, T .

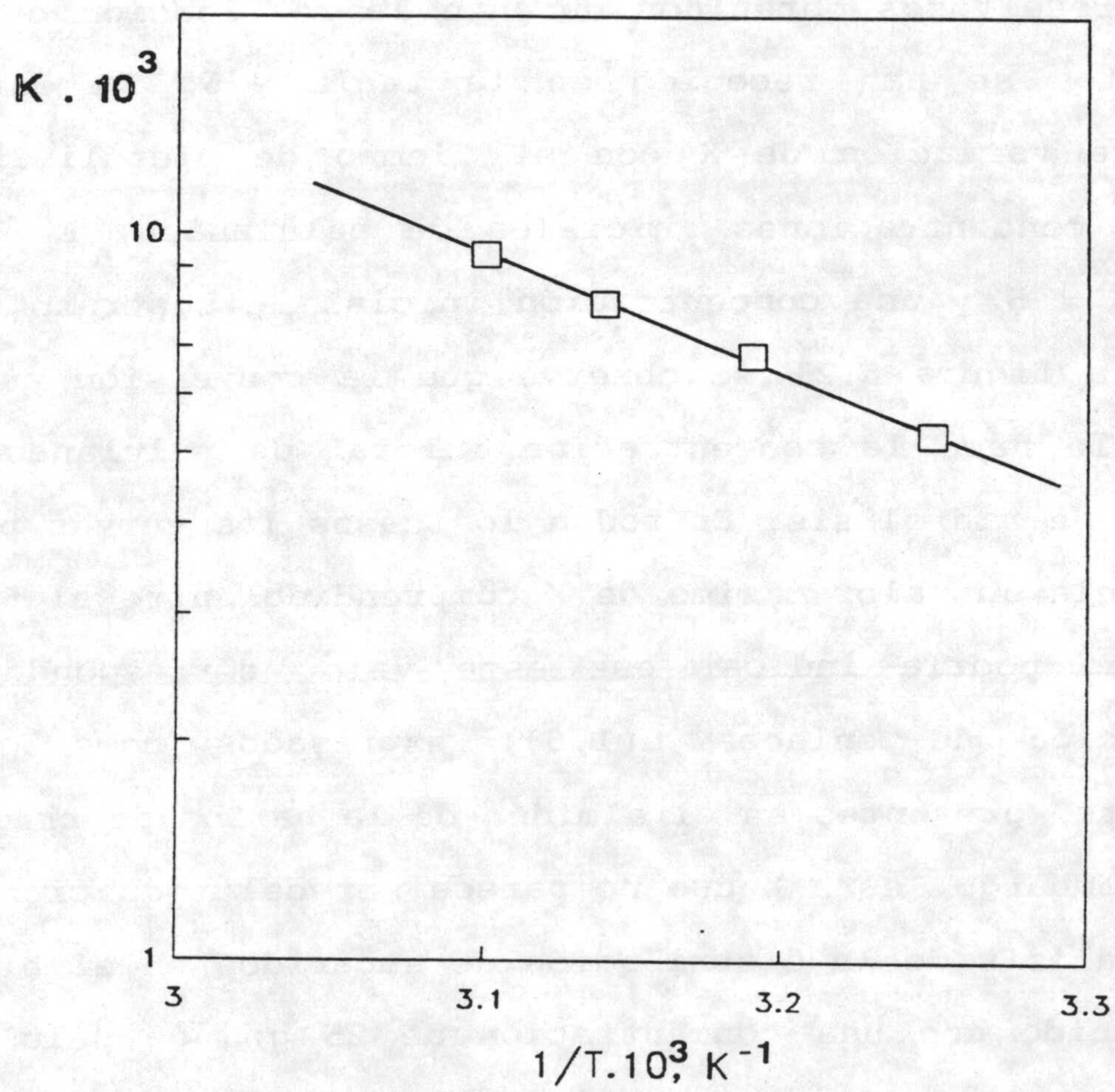


Figura 5.20. Influencia de la temperatura.

5.1.2. Cinética de la hidrólisis de almidón con pululanasa.

Los resultados obtenidos durante la realización de estos experimentos se han recogido en la tabla 4.6. En ésta, se muestra la variación de X con el tiempo de hidrólisis para distintas concentraciones iniciales de pululanasa, E_1 g/L, a 50°C y pH = 5 y una concentración inicial de sustrato de 210 g/L. En la figura 5.21 se observa que la conversión aumenta, conforme lo hace la concentración inicial de pululanasa, con el tiempo de hidrólisis. En todos los casos las curvas parecen tender hacia un valor máximo de X comprendido entre el 6 y 7%. Este hecho podría indicar que este valor corresponde a la concentración de enlaces $\alpha(1,6)$, expresados como glucosa equivalente, presentes en el almidón de la harina de trigo.

Sin embargo, este hecho no parece ser del todo cierto, ya que el análisis de la distribución de sacáridos en el hidrolizado obtenido con una concentración de 25 g/L de pululanasa, tabla 4.13, indica que éste está formado fundamentalmente por mono y disacáridos, especialmente maltosa. Este hecho pone de manifiesto que la enzima utilizada en esta investigación debe estar impurificada con α -amilasa, o con cualquier otra enzima capaz de liberar glucosa de las cadenas de sacáridos, presumiblemente glucoamilasa.

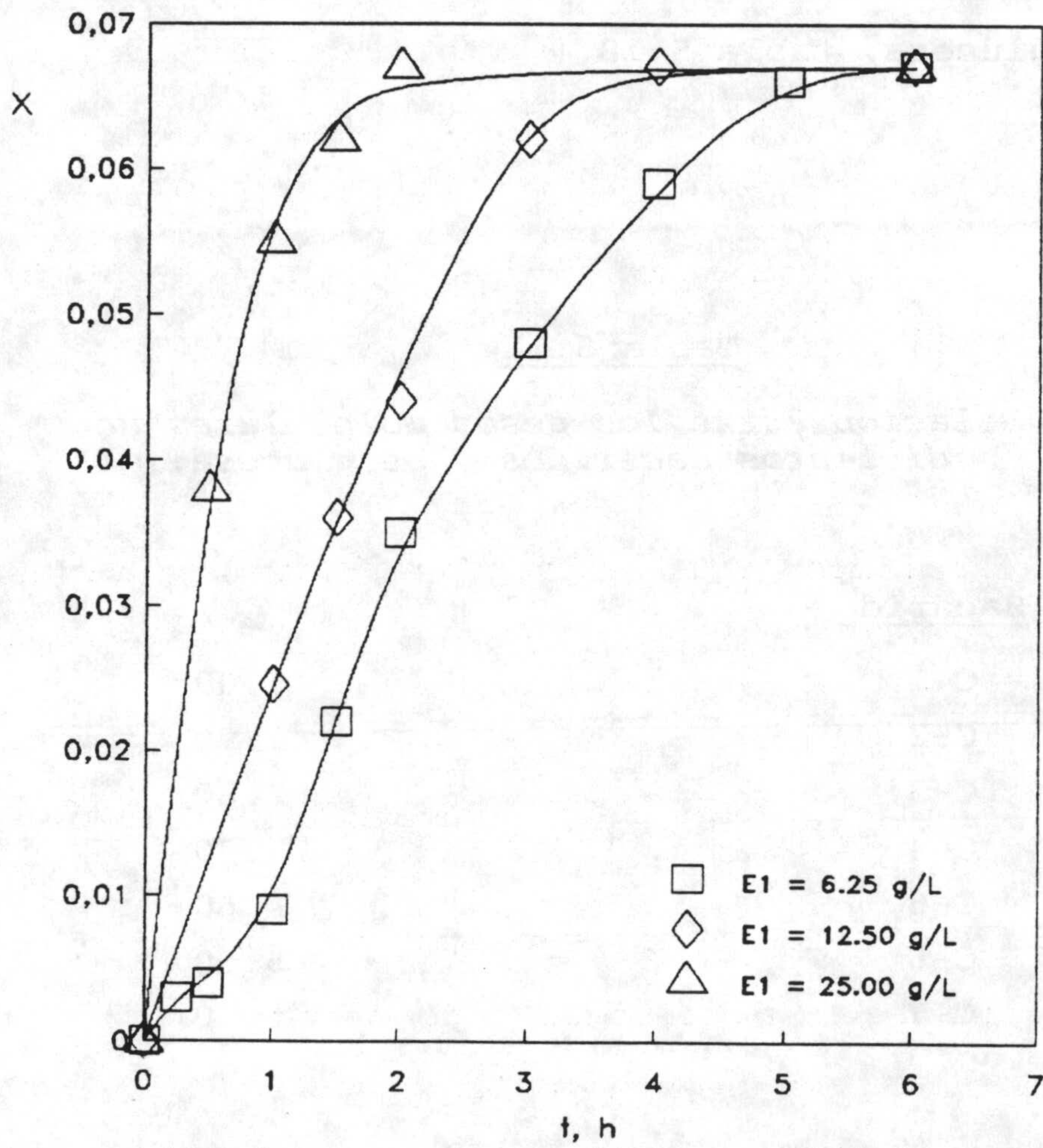


Figura 5.21. Influencia de la concentración inicial de pululanasa. $S_0=210 \text{ g/L}$; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

Los datos contenidos en la tabla 4.13 se pueden expresar como g DE/L, dividiendo las concentraciones en g/L por el cociente entre el peso molecular del correspondiente sacárido y el de la glucosa, tabla 5.18.

Tabla 5.18

Relación entre los pesos moleculares de distintos sacáridos y de glucosa.

| <u>Sacárido</u> | <u>Q</u> |
|-----------------|----------|
| C-1 | 1.00 |
| C-2 | 1.90 |
| C-3 | 2.80 |
| C-4 | 3.70 |
| C-5 | 4.60 |
| C-6 | 5.50 |
| C-7 | 6.40 |

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 5.19. En esta tabla se incluyen las conversiones, X, calculados a partir de las concentraciones totales en dextrosa equivalente. Evidentemente la diferencia entre la concentración total de

azúcares reductores (184.33 . X) expresados como dextrosa equivalente y el total obtenido por HPLC, debe corresponder a sacáridos de DP>5, que no se han detectado mediante este análisis.

Teniendo en cuenta que la pululanasa no puede romper un enlace $\alpha(1,6)$ que una a un solo residuo de glucosa a una cadena de unidades de glucosa anhidra unidas por enlaces $\alpha(1,4)$, *Mercier (1982)*, se comprende que la glucosa nunca puede provenir de la acción hidrolítica de la pululanasa, aunque si lo pueden hacer C-2, C-3, C-4, C-5 y mayores. Por tanto, si a la cantidad total de azúcares reductores, se le sustrae la concentración de glucosa, se tendrá la cantidad de enlaces $\alpha(1,6)$ hidrolizados, expresados como glucosa equivalente, tabla 5.19. En esta tabla se observa que como máximo es el 6%. Si se tiene en cuenta que es posible que no toda la maltosa esté originada por la rotura de enlaces $\alpha(1,6)$, este porcentaje puede ser considerablemente menor.

Tabla 5.19

Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la concentración de pululanasa. $S_0=210$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$; $\text{pH}=5$ y $E_1=25$ g/L.

| Sacárido | C, g DE/L | | | |
|---------------------|-----------|-------|-------|-------|
| | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 1.54 | 1.36 | 1.68 | 1.74 |
| C-2 | 3.34 | 4.09 | 4.94 | 6.02 |
| C-3 | 0.93 | 0.89 | 0.89 | 1.81 |
| C-4 | 0.06 | 0.05 | 0.07 | 0.07 |
| C-5 | 0.15 | 0.15 | 0.20 | 0.23 |
| Total | 6.02 | 6.54 | 7.78 | 9.87 |
| Dextrinas (DP>5) | 4.11 | 4.89 | 4.57 | 2.48 |
| Xcal | 0.033 | 0.035 | 0.042 | 0.043 |
| Xexp | 0.055 | 0.062 | 0.067 | 0.067 |
| X[$\alpha(1,6)$] | 0.047 | 0.055 | 0.058 | 0.058 |

5.1.3. Cinética de la hidrólisis de almidón con mezclas de α -amilasa y pululanasa

Los resultados experimentales tabulados en 4.7 y 4.8 se han representado en las figuras 5.22 y 5.23. En éstas, se observa que la conversión, para una misma concentración inicial de α -amilasa, aumentan conforme lo hace la cantidad de pululanasa y el tiempo de hidrólisis.

Sin embargo, en contra de lo que cabía esperar no existe un efecto sinérgico apreciable en la actuación conjunta de las enzimas α -amilasa y pululanasa, ya que las conversiones alcanzadas son del mismo orden que la suma de las conversiones obtenidas, en los experimentos realizados en las mismas condiciones experimentales, con α -amilasa o pululanasa en solitario, tal como se puede observar en la tablas 5.20 y 5.21.

Debido a que la forma de las curvas de las figuras 5.22 y 5.23 son análogas a las obtenidas con sólo α -amilasa y que estos datos se reproducen adecuadamente mediante la ecuación [5.14], se ha utilizado esta misma expresión para ajustar los datos X-t para las distintas mezclas enzimáticas. Por regresión no lineal de [5.14] se obtienen los valores de a y b que se indican en la tabla 5.22. En ésta, se observa que b es aproximadamente constante en cada una de las series experimentales, mientras que a crece con la concentración inicial de α -amilasa, E_0 g/L, y para esta constante, con la concentración inicial de pululanasa, E_1 g/L.

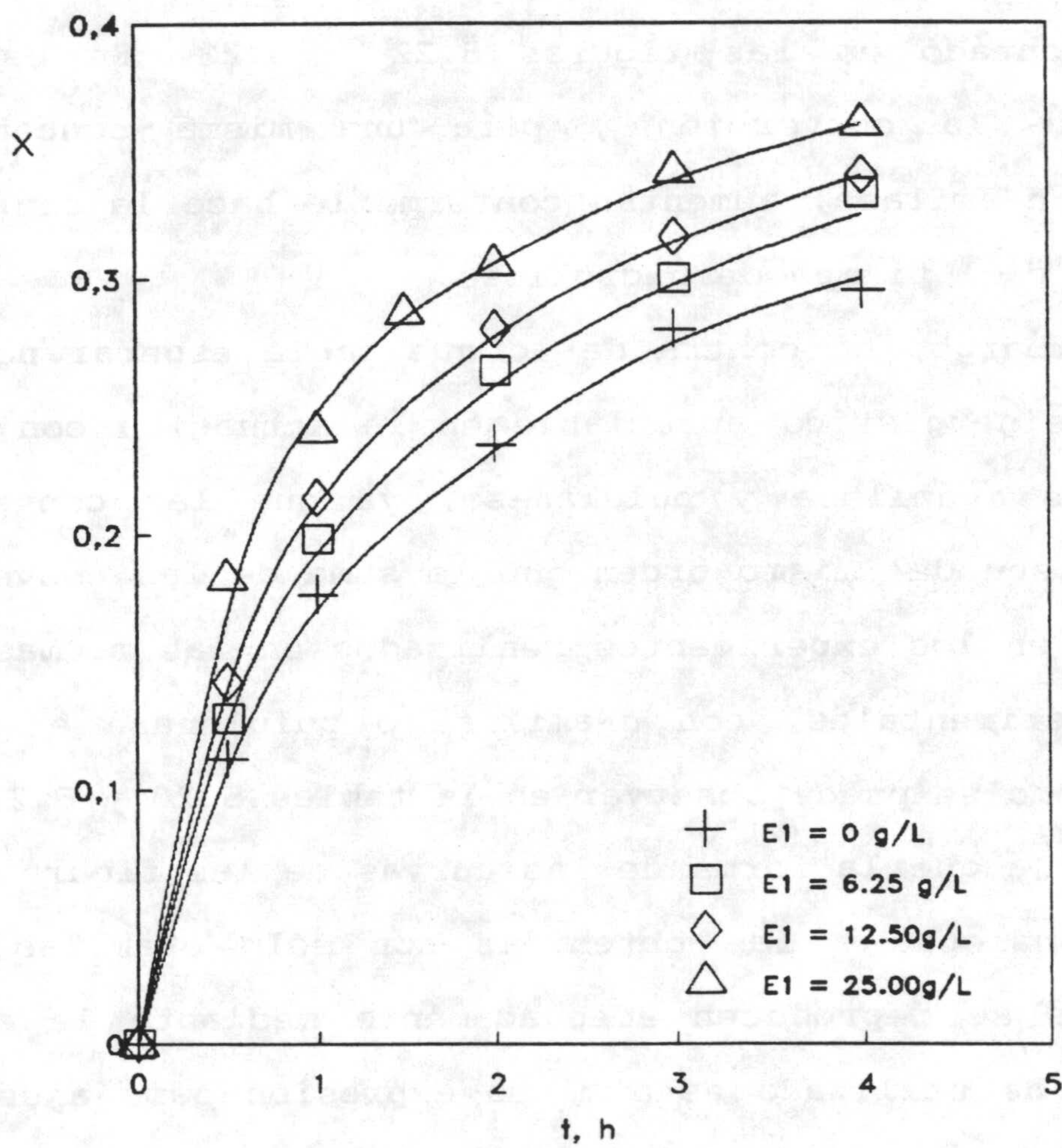


Figura 5.22. Influencia de la adición de pululanasa sobre la conversión global. $S_0=210$ g/L; $T=50^{\circ}\text{C}$; $\text{pH}=5$ y $E_0=6.25$ g/L.

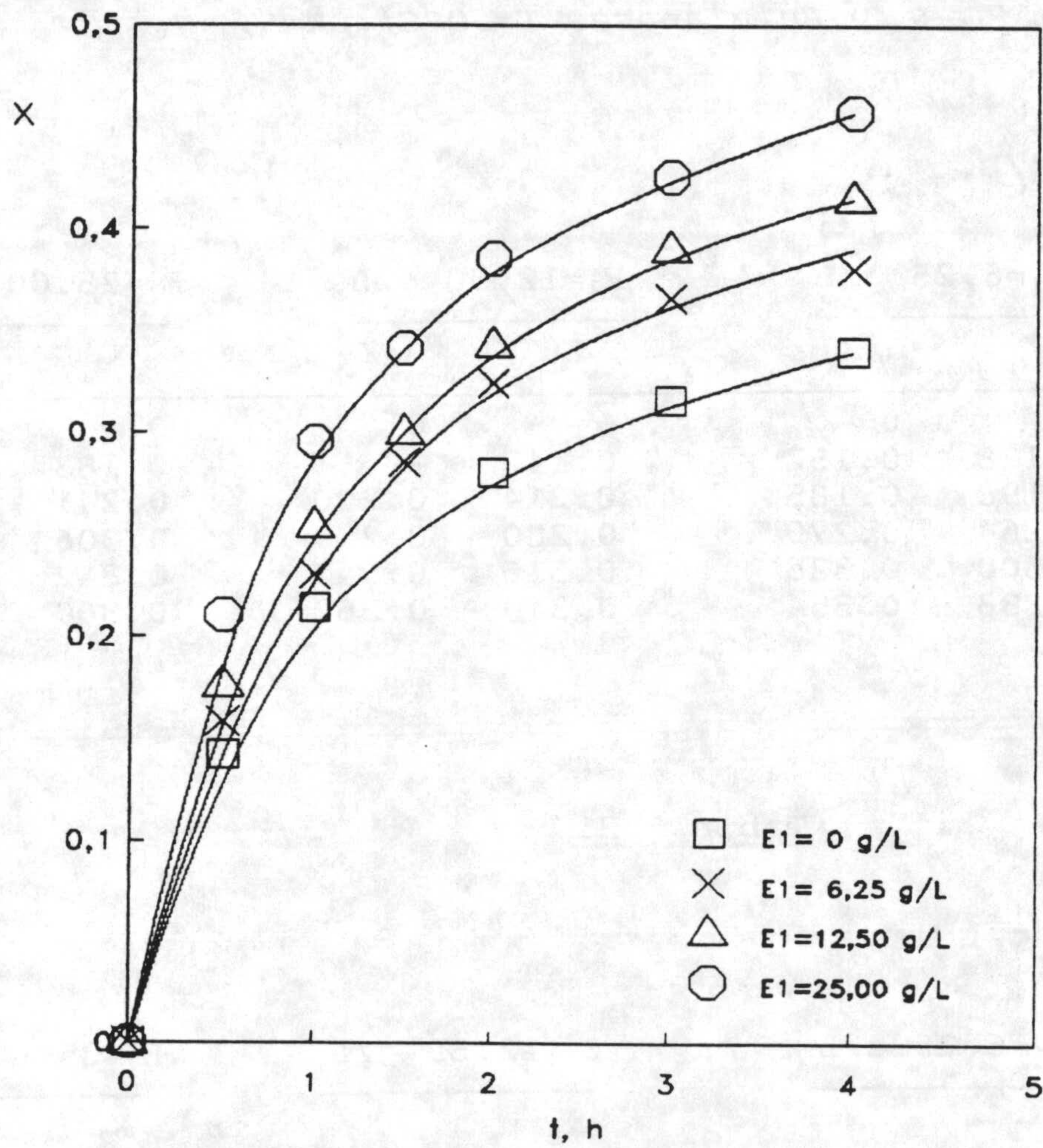


Figura 5.23. Influencia de la utilización de mezclas enzimáticas de α -amilasa y pululanasa sobre la conversión. $T=50^{\circ}\text{C}$; $S_0=210 \text{ g/L}$; $\text{pH}=5$ y $E_0=12.50 \text{ g/L}$.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
 4 FEB. 1993
 COMISION DE DOCTORADO

Tabla 5.20

Experimentos con mezclas de α -amilasa y pululanasa. Comparación entre las conversiones obtenidas con la mezcla, X_1 , y con la suma de las obtenidas en experimentos separados con α -amilasa y Pululanasa. $T=50^{\circ}\text{C}$; $\text{pH}=5$.

* $E_0=6,25$ g/L.

| t, h | $E_1=6,25$ g/L | | $E_1=12,50$ g/L | | $E_1=25.00$ g/L | |
|------|----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | X_1 | X_2 | X_1 | X_2 | X_1 | X_2 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.128 | 0.152 | 0.142 | - | 0.183 | 0.150 |
| 1.0 | 0.198 | 0.185 | 0.214 | 0.200 | 0.241 | 0.231 |
| 2.0 | 0.264 | 0.270 | 0.280 | 0.279 | 0.306 | 0.302 |
| 3.0 | 0.300 | 0.328 | 0.316 | 0.342 | 0.342 | 0.347 |
| 4.0 | 0.333 | 0.354 | 0.340 | 0.362 | 0.360 | 0.362 |

Tabla 5.21

* $E_0=12.50$ g/L

| t, h | $E_1=6.25$ g/L | | $E_1=12.50$ g/L | | $E_1=25.00$ g/L | |
|------|----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | X_1 | X_2 | X_1 | X_2 | X_1 | X_2 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.158 | 0.158 | 0.176 | - | 0.210 | 0.192 |
| 1.0 | 0.230 | 0.219 | 0.254 | 0.234 | 0.295 | 0.265 |
| 1.5 | 0.285 | 0.292 | 0.300 | 0.306 | 0.341 | 0.332 |
| 2.0 | 0.324 | 0.341 | 0.343 | 0.350 | 0.385 | 0.373 |
| 3.0 | 0.366 | 0.398 | 0.390 | 0.415 | 0.425 | 0.417 |
| 4.0 | 0.400 | 0.449 | 0.415 | 0.457 | 0.457 | 0.457 |

Tabla 5.22

Parámetros de la ecuación [5.14]. Influencia de las concentraciones iniciales de α -amilasa y pululanasa.
 $S_0=210$ g/L; $T=50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

* $E_0=6.25$ g/L

| E_1 , g/L | a , h^{-1} | b | $a_{\text{cal}}(1)$ |
|-------------|-----------------------|-------|---------------------|
| 0 | 0.4307 | 9.43 | 0.3357 |
| 6.25 | 0.4954 | 8.70 | 0.4218 |
| 12.50 | 0.6470 | 9.36 | 0.4854 |
| 25.00 | 1.1746 | 10.83 | 0.6364 |

* $E_0=12.50$ g/L

| E_1 , g/L | a , h^{-1} | b | $a_{\text{cal}}(2)$ |
|-------------|-----------------------|------|---------------------|
| 0 | 0.5358 | 7.17 | 0.5956 |
| 6.25 | 0.6129 | 7.25 | 0.6725 |
| 12.50 | 0.7636 | 7.52 | 0.7962 |
| 25.00 | 1.1053 | 7.69 | 1.1127 |

Dado que los valores de b oscilan entre 7.17 y 10.83 y que éstos están comprendidos en el intervalo de variación encontrado en los experimentos realizados con α -amilasa, tablas 5.9 y 5.10, se ha utilizado el valor medio de estas series experimentales, $b=7.72$, para reproducir los datos experimentales correspondientes a las distintas mezclas enzimáticas ensayadas. Aunque con esta aproximación se aumentan ligeramente las desviaciones entre valores de X experimentales y calculados, se consigue una mayor generalidad en el tratamiento.

Tomando $b=7.72$ se han recalculado los valores de a que se indican en la tabla 5.22, y con ellos y el ya mencionado valor de b se han calculado los correspondientes valores de X , tabla 5.23.

$$X = \frac{1}{7,72} \text{Ln} (a \cdot 7,72 t + 1) \quad [5.72]$$

Tabla 5.23

Comparación entre resultados experimentales y calculados mediante [5.72]. $S_0=210$ g/L; pH= 5; $T=50^\circ\text{C}$.

* $E_0=6.25$ g/L

| t, h | $E_1= 6.25$ g/L | | $E_1=12.50$ g/L | | $E_1=25.00$ g/L | |
|------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | X | X_{cal} | X | X_{cal} | X | X_{cal} |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.128 | 0.125 | 0.142 | 0.137 | 0.183 | 0.161 |
| 1.0 | 0.195 | 0.188 | 0.214 | 0.202 | 0.241 | 0.230 |
| 2.0 | 0.264 | 0.261 | 0.280 | 0.277 | 0.306 | 0.308 |
| 3.0 | 0.300 | 0.308 | 0.316 | 0.324 | 0.342 | 0.357 |
| 4.0 | 0.333 | 0.342 | 0.340 | 0.359 | 0.360 | 0.392 |

* $E_0=12.50$ g/L

| t, h | $E_1= 6.25$ g/L | | $E_1=12.50$ g/L | | $E_1=25.00$ g/L | |
|------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | X | X_{cal} | X | X_{cal} | X | X_{cal} |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 0.158 | 0.166 | 0.176 | 0.182 | 0.210 | 0.216 |
| 1.0 | 0.230 | 0.236 | 0.254 | 0.255 | 0.295 | 0.293 |
| 1.5 | 0.285 | 0.282 | 0.300 | 0.301 | 0.341 | 0.341 |
| 2.0 | 0.324 | 0.315 | 0.343 | 0.335 | 0.385 | 0.376 |
| 3.0 | 0.366 | 0.364 | 0.390 | 0.384 | 0.425 | 0.426 |
| 4.0 | 0.400 | 0.399 | 0.415 | 0.420 | 0.457 | 0.462 |

Estos valores se han representado en la forma de $X_{\text{calculado}}$ frente a $X_{\text{experimental}}$ en las figuras 5.24 y 5.25. En las tablas correspondientes y en estas figuras, se observa que las desviaciones encontradas son inferiores al 10%.

Por otra parte, los valores de a , tabulados en 5.22, se han representado frente a la concentración inicial de pululanasa en la figura 5.26. En ella, se observa que a aumenta linealmente con E_1 y por regresión lineal se han obtenido las siguientes ecuaciones:

$$* E_0 = 12.50 \text{ g/L}$$

$$a = 0.563 + 0.021 E_1 \quad , \quad C_R = 0.9904 \quad [5.73]$$

$$* E_0 = 6.25 \text{ g/L}$$

$$a = 0.340 + 0.012 E_1 \quad , \quad C_R = 0.9991 \quad [5.74]$$

La comparación entre [5.73] y [5.74] indica que el nivel inicial de α -amilasa hace que la pendiente de una de estas líneas sea prácticamente el doble de la otra, lo que parece indicar que la pululanasa podría necesitar la acción licuante de la α -amilasa para su acción hidrolítica. Sin embargo, los valores absolutos de las pendientes ponen en manifiesto la escasa influencia de E_1 sobre la conversión global.

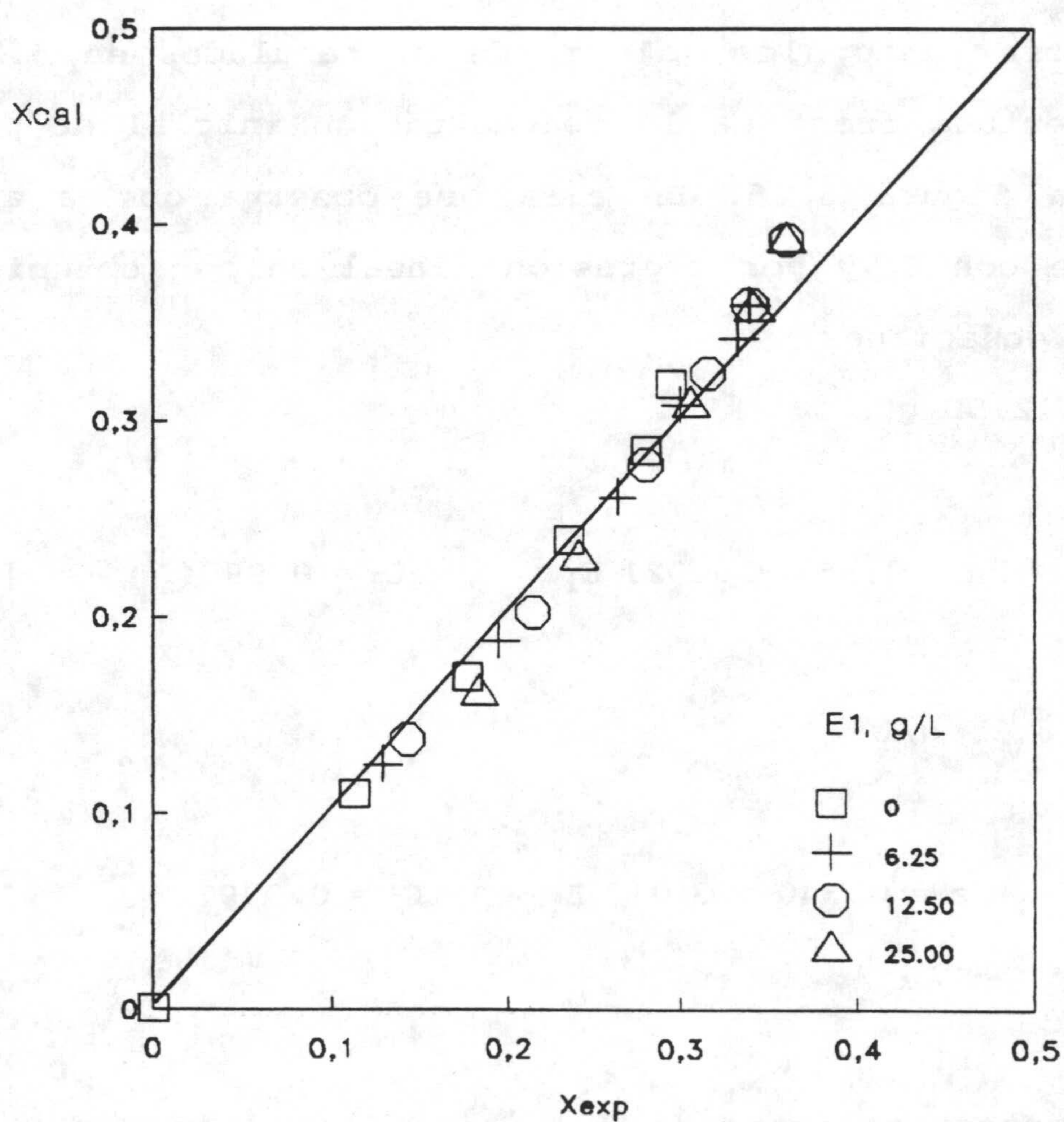


Figura 5.24. Influencia de la adición de pululanasa. Comparación entre resultados experimentales y calculados. $E_0=6.25$ g/L; pH=5 y $T=50^{\circ}C$.

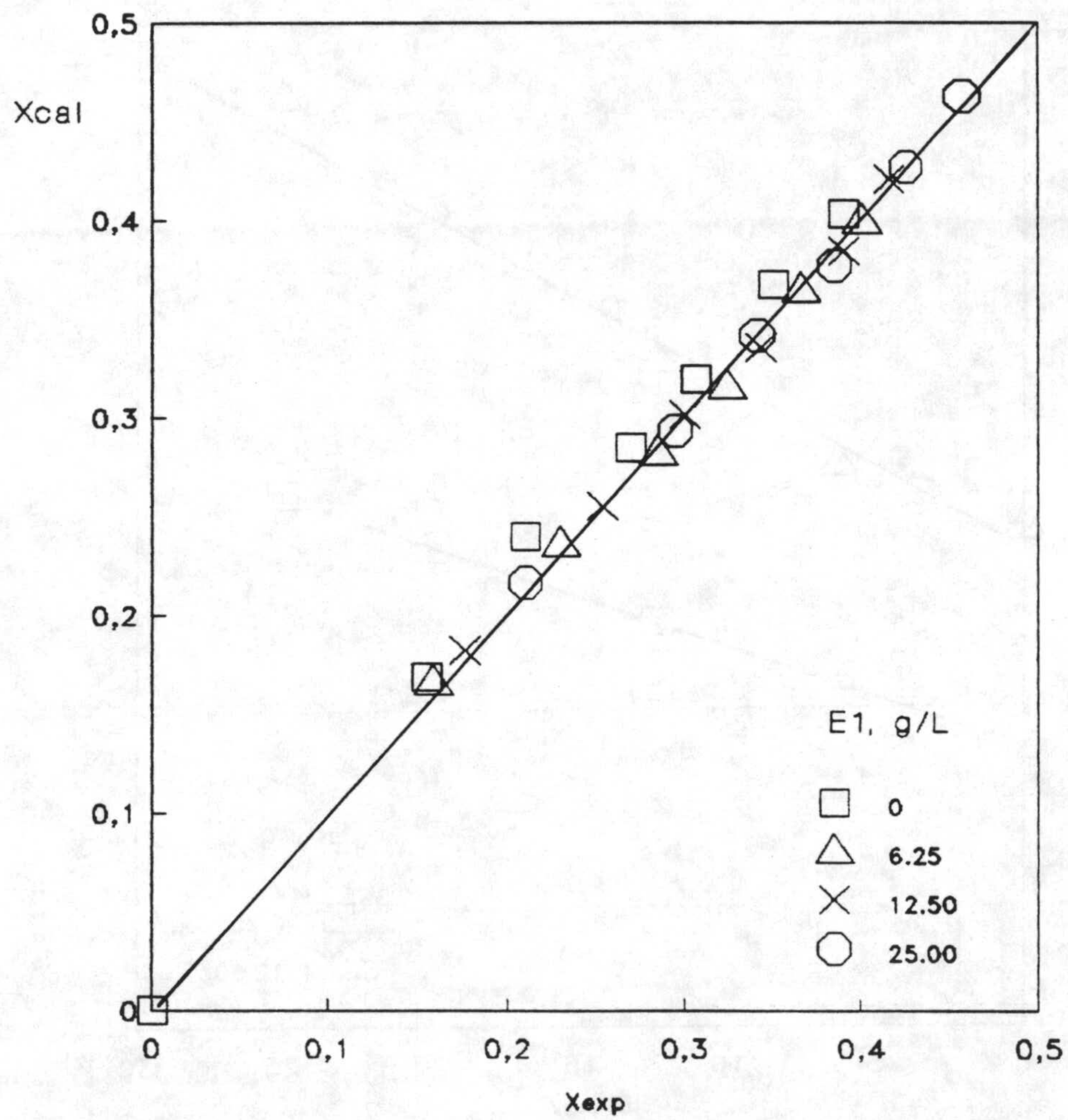


Figura 5.25. Influencia de la adición de pululanasa. Comparación entre resultados experimentales y calculados. $E_0=12.50$ g/L; pH=5 y $T=50^{\circ}\text{C}$.

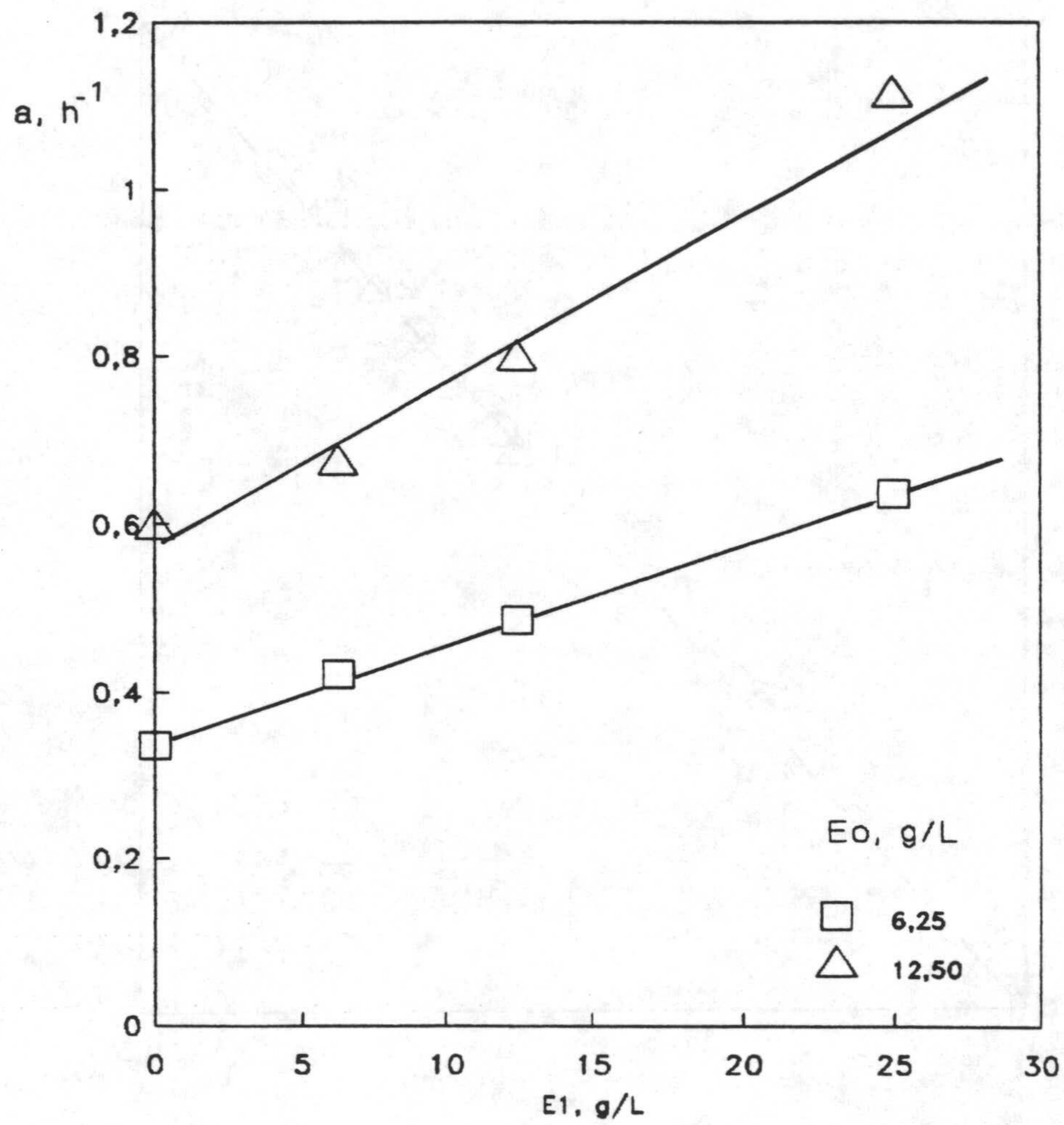


Figura 5.26. Variación de a , Ec.[5.72], con la concentración inicial de pululanasa. $S_0=210$ g/L; $T=50^{\circ}C$ y $pH=5$.

5.2- DISTRIBUCION DE SACARIDOS EN LOS HIDROLIZADOS:

En este apartado se exponen y discuten los resultados obtenidos mediante la determinación de sacáridos en los hidrolizados enzimáticos utilizando una técnica de *HPLC*.

5.2.1- Influencia de la concentración inicial de α -amilasa.

Los resultados obtenidos durante el estudio de la influencia de esta variable se muestran en las tablas 4.9 y 4.10. Estos experimentos se realizaron con una concentración inicial de sustrato de 210 g/L, a pH = 5 y 50°C.

Los datos tabulados en 4.9 y 4.10 se han transformado en g/L de dextrosa equivalente, dividiendo por la relación de pesos moleculares que se indica en la tabla 5.19. Este cambio en la expresión de las concentraciones de los distintos sacáridos es útil, ya que de esta forma se pueden conocer no sólo las cantidades de las especies solubles, sino también de aquellas que no se han detectado por *HPLC*. En efecto, la diferencia entre el número total de grupos reductores ($184,33 \cdot X$, para $S_0 = 210$ g/L) determinado por métodos químicos y la suma de las concentraciones, expresadas como dextrosa equivalente, D.E., correspondientes a los sacáridos desde C-1 hasta C-7, es la concentración en g DE/L de aquellos sacáridos de grado de polimerización, DP, mayor que siete. Por

este mismo razonamiento, la cantidad de almidón residual, expresado como dextrosa equivalente, es 184,33 (1-X).

El resultado de los anteriores cálculos se expone en las tablas 5.24 y 5.25. En ellas, se observa que las concentraciones correspondientes a los sacáridos de $2 < DP \leq 7$ es relativamente pequeña por lo que para cálculos posteriores se han englobado como dextrinas de grado medio de polimerización cinco, C-5.

Tabla 5.24

Influencia de la concentración de α -amilasa.
 $pH = 5$, $T = 50^{\circ}C$, $S_0 = 210$ g/L , $E_0 = 6.25$ g/L.

| Sustancia | g DE/L | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 8.96 | 13.27 | 16.65 |
| C-2 | 6.30 | 6.70 | 6.67 |
| C-3 | 0.93 | 0.83 | 0.83 |
| C-4 | 0.35 | 0.32 | 0.33 |
| C-5 | 0.44 | 0.49 | 0.51 |
| C-6 | 0.26 | 0.25 | 0.17 |
| C-7 | 0.11 | 0.02 | 0.08 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 15.10 | 21.40 | 26.37 |
| Almidón(1) | 151.87 | 141.00 | 132.70 |
| X | 0.176 | 0.235 | 0.280 |

(1) Expresado como dextrosa equivalente (DE).

Tabla 5.25

*Influencia de la concentración de α -amilasa.
 $pH = 5$, $T = 50^{\circ}C$, $S_0 = 210$ g/L , $E_0 = 12.5$ g/L.*

| Sustancia | g DE/L | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 17.18 | 31.12 | 35.14 | 41.05 |
| C-2 | 9.54 | 7.56 | 9.84 | 6.12 |
| C-3 | 1.81 | 1.50 | 3.25 | 1.26 |
| C-4 | 0.82 | 0.62 | 0.50 | 0.46 |
| C-5 | 0.70 | 0.83 | 0.64 | 0.79 |
| C-6 | 0.40 | 0.32 | 0.30 | 0.24 |
| C-7 | 0.07 | 0.02 | 0.03 | 0.01 |
| Dextrinas (DP>C-7) | - | 14.43 | 14.82 | 21.95 |
| Almidón(1) | 155.93 | 121.91 | 119.80 | 112.43 |
| X | 0.154 | 0.306 | 0.350 | 0.390 |

(1) *Expresado como dextrosa equivalente.*

Por otra parte, en las tablas 5.26 y 5.27, se muestra la composición en % en D.E. de la fracción hidrolizada y estos datos se han representado en las figuras 5.27 y 5.28 frente a la conversión alcanzada. En la figura 5.27 se observa que el componente mayoritario de la fracción hidrolizada son las dextrinas de D.P. > 7, seguidas de glucosa y maltosa. En cambio, en la figura 5.28, el porcentaje en glucosa es el mayor; este hecho podría estar provocado por el carácter heterogeneo de la reacción de hidrólisis, ya que la enzima debe adsorberse sobre el sustrato para producir la ruptura de los enlaces $\alpha(1,4)$. Como la cantidad de sustrato es igual en ambos casos, 210 g/L, los resultados parecen indicar que para $E_0 = 12,50$ g/L, no toda la α -amilasa puede adsorberse sobre la superficie del almidón y que por tanto la fracción de enzima que resta en disolución es mayor y va hidrolizando las dextrinas producidas en fase heterogenea a glucosa y maltosa, figura 5.29; por ello, las cantidades de C-1 y C-2 son mayores para $E_0 = 12,50$ g/L. En cambio, el porcentaje en dextrinas de DP > 7 es inferior para la mayor de las concentraciones de enzima.

Tabla 5.26

*Influencia de la concentración de α -amilasa.
 $E_0 = 6.25$ g/L, $S_0 = 210$ g/L.
 Composición de la fracción hidrolizada.*

| Sacárido | % DE | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 27.61 | 30.66 | 32.26 |
| C-2 | 19.41 | 15.48 | 12.92 |
| C-5 | 6.44 | 4.41 | 3.72 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 46.53 | 49.45 | 51.09 |
| X | 0.176 | 0.235 | 0.285 |

Tabla 5.27

*Distribución de tamaños moleculares. Influencia de la concentración de α -amilasa. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$.
 Composición de la fracción hidrolizada. $E_0 = 12.50$ g/L.*

| Sacárido | % DE | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 56.89 | 55.17 | 54.47 | 57.10 |
| C-2 | 31.26 | 13.40 | 15.25 | 8.50 |
| C-5 | 12.45 | 5.83 | 7.31 | 3.85 |
| Dextrinas | - | 25.05 | 22.97 | 30.53 |
| X | 0.154 | 0.306 | 0.350 | 0.390 |

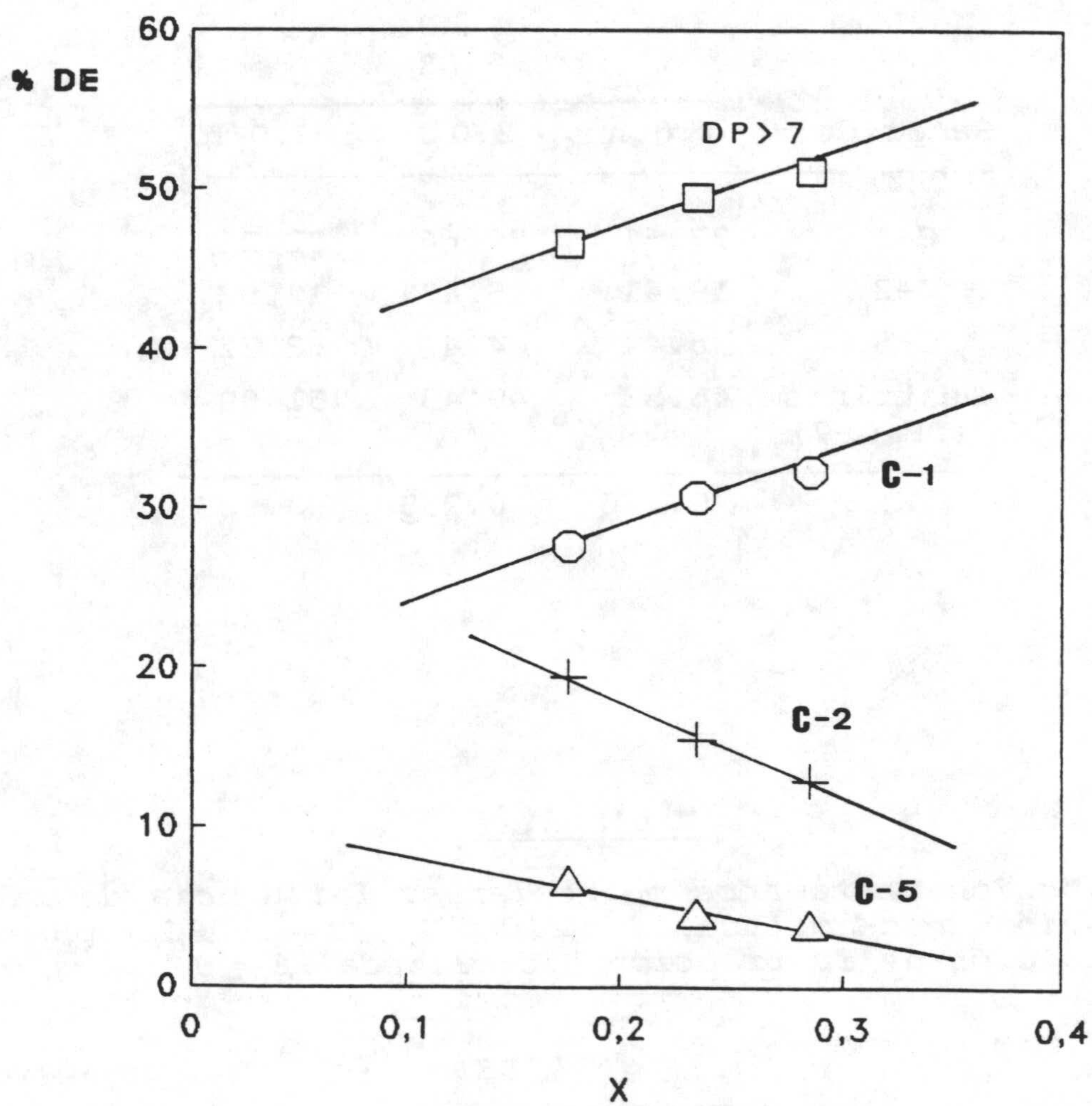


Figura 5.27. Distribución de tamaños moleculares para $E_0 = 6.25 \text{ g/L}$; $S_0 = 210 \text{ g/L}$; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

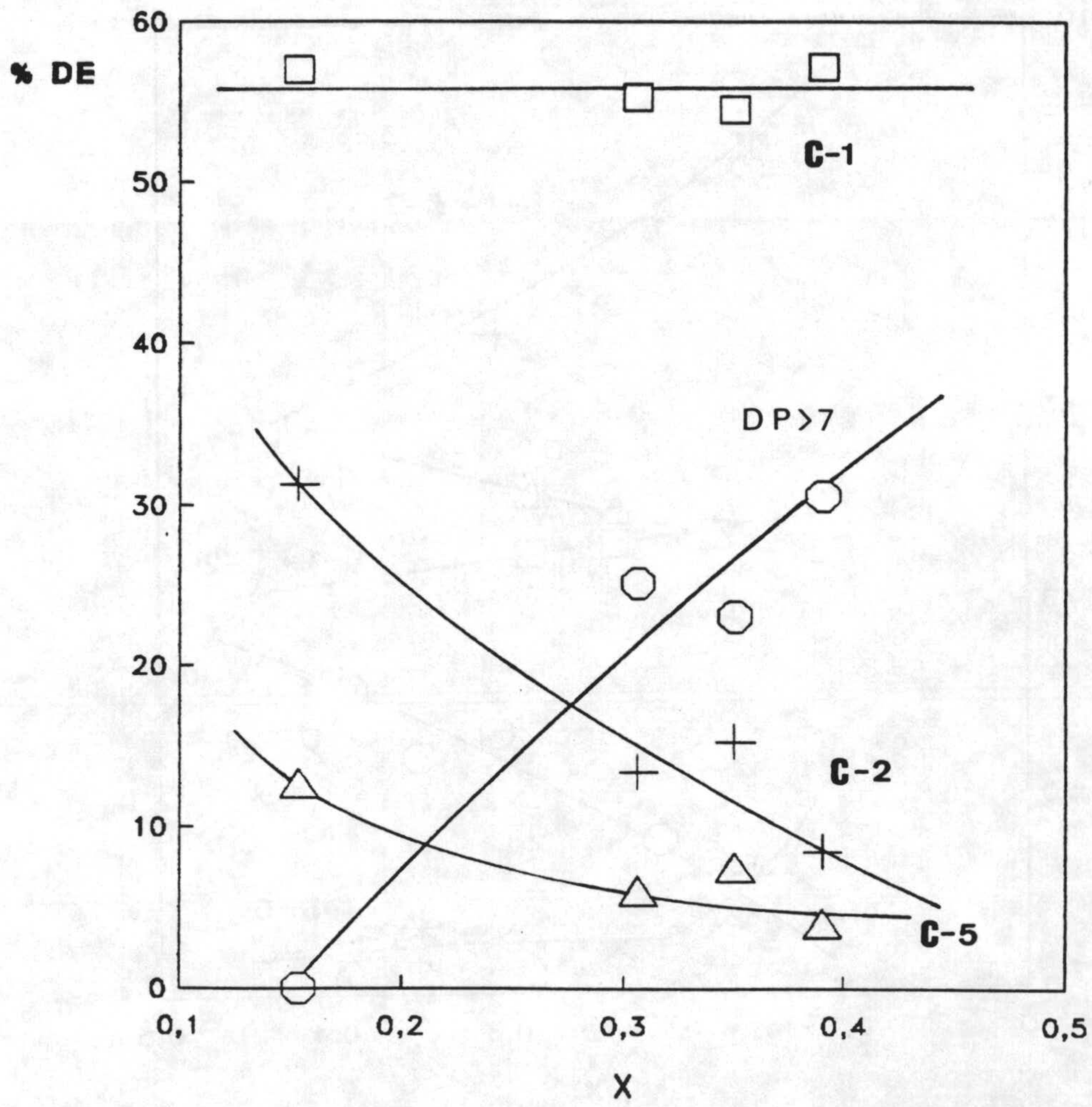


Figura 5.28. Distribución de tamaños moleculares para $E_0 = 12.50$ g/L; $S_0 = 210$ g/L; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

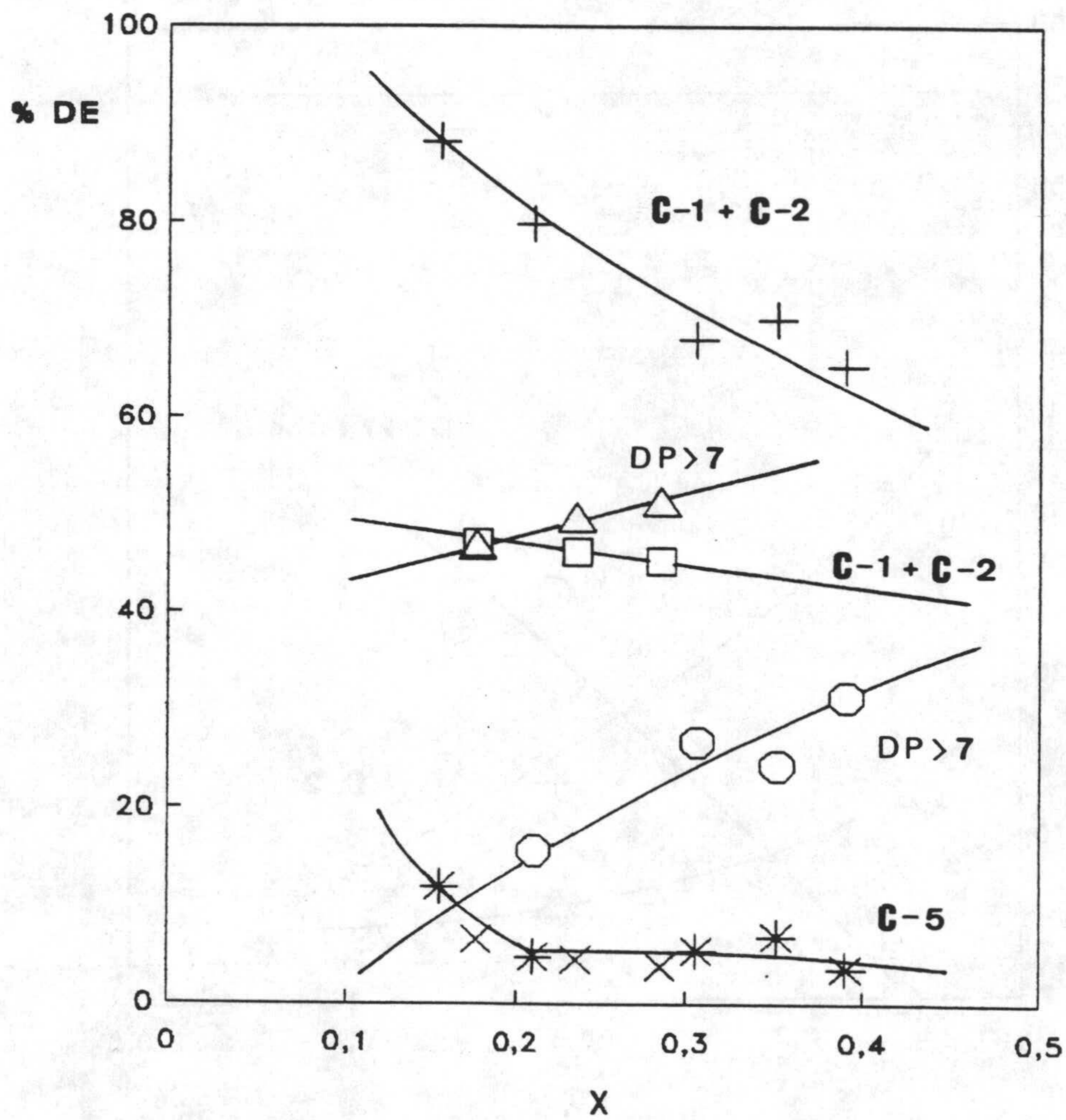


Figura 5.29. Influencia de la concentración inicial de α -amilasa sobre la distribución de tamaños moleculares (\square, Δ, x para $E_0 = 6.25$ g/L y $+, o, *$ para $E_0 = 12,50$ g/L). $S_0 = 210$ g/L y $T = 50^\circ\text{C}$.

5.2.2- Influencia de la concentración inicial de sustrato.

En los experimentos en los que se ha estudiado la influencia de la concentración de sustrato con una concentración inicial de α -amilasa de 6,25 g/L, tablas 4.11 y 4.12, se ponen en manifiesto algunos de los hechos comentados en el apartado anterior. En efecto, transformando las concentraciones de g/L a g DE/L, tablas 5.28 y 5.29, se observa que los componentes mayoritarios son C-1, C-2 y dextrinas de DP > 7. En cambio, es escasa la cantidad de C-3, C-4, C-5 y C-6, e incluso en estos cromatogramas no aparece C-7.

Tabla 5.28

*Distribución de tamaños moleculares.
Influencia de la concentración de sustrato.
pH = 5 , T = 50°C , E₀ = 6.25 g/L y S₀ = 52.5 g/L.*

| Sustancia | C, g DE/L | |
|-----------------------|-----------|-------|
| | 1.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 5.03 | 7.84 |
| C-2 | 1.32 | 1.16 |
| C-3 | 0.13 | - |
| C-4 | 0.05 | 0.03 |
| C-5 | 0.07 | 0.10 |
| C-6 | 0.02 | 0.03 |
| C-7 | - | - |
| Dextrinas (DP>C-6) | - | 1.44 |
| Almidón(1) | 40.56 | 35.48 |
| X | 0.118 | 0.230 |

(1) Expresado como dextrosa equivalente.

Tabla 5.29

*Distribución de tamaños moleculares.
Influencia de la concentración de sustrato.
pH = 5 , E₀ = 6.25 g/L y S₀ = 105 g/L.*

| Sustancia | g DE/L | | |
|-----------------------|--------|-------|-------|
| | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 7.45 | 9.38 | 10.63 |
| C-2 | 3.75 | 3.49 | 6.67 |
| C-3 | 0.35 | 0.35 | 0.49 |
| C-4 | 0.09 | 0.14 | 1.12 |
| C-5 | 0.02 | 0.22 | 0.25 |
| C-6 | 0.11 | 0.04 | 0.07 |
| C-7 | - | - | 0.08 |
| Dextrinas (DP>C-6) | 1.32 | 5.36 | 4.01 |
| Almidón(1) | 79.07 | 73.17 | 68.84 |
| X | 0.142 | 0.206 | 0.253 |

(1) *Expresado como dextrosa equivalente.*

En las tablas 5.30 y 5.31, se muestran los porcentajes en DE correspondientes a estos hidrolizados en donde C-5 representa, en este caso, el % de aquellos sacáridos cuyo $2 < DP \leq 6$.

Tabla 5.30

*Influencia de la concentración de sustrato.
Composición de la fracción hidrolizada.
 $E_0 = 6.25$ g/L y $S_0 = 52.5$ g/L.*

| Sacárido | % DE | |
|-----------|-------|-------|
| | 1.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 75.98 | 73.96 |
| C-2 | 19.94 | 10.94 |
| C-5 | 4.08 | 1.51 |
| Dextrinas | - | 13.58 |
| X | 0.118 | 0.230 |

Tabla 5.31

*Influencia de la concentración de sustrato.
Composición de la fracción hidrolizada.
 $E_0 = 6.25$ g/L , $S_0 = 105$ g/L.*

| Sacárido | % DE | |
|-----------|-------|-------|
| | 1.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 56.91 | 45.58 |
| C-2 | 28.65 | 28.60 |
| C-5 | 4.35 | 8.62 |
| Dextrinas | 10.08 | 17.20 |
| X | 0.142 | 0.253 |

En las tablas 5.30 y 5.31, junto con los datos que se muestran en la tabla 5.26, se pone en manifiesto que conforme aumenta la relación enzima/sustrato, E_0/S_0 , en las mismas condiciones experimentales, el porcentaje en sacáridos pequeños C-1 y C-2 va creciendo, lo cual parece confirmar la hipótesis realizada en el apartado anterior en el sentido de que el fenómeno controlante es la superficie externa del almidón. En la figura 5.30, se indica la distribución de tamaños moleculares obtenida para una misma relación de enzima/sustrato ($E_0= 6,25$ g/L y $S_0= 105$ g/L y $E_0= 12,50$ g/L y $S_0= 210$ g/L). Esta gráfica parece poner de manifiesto que la distribución de sacáridos en los hidrolizados depende de la conversión alcanzada y de la relación E_0/S_0 .

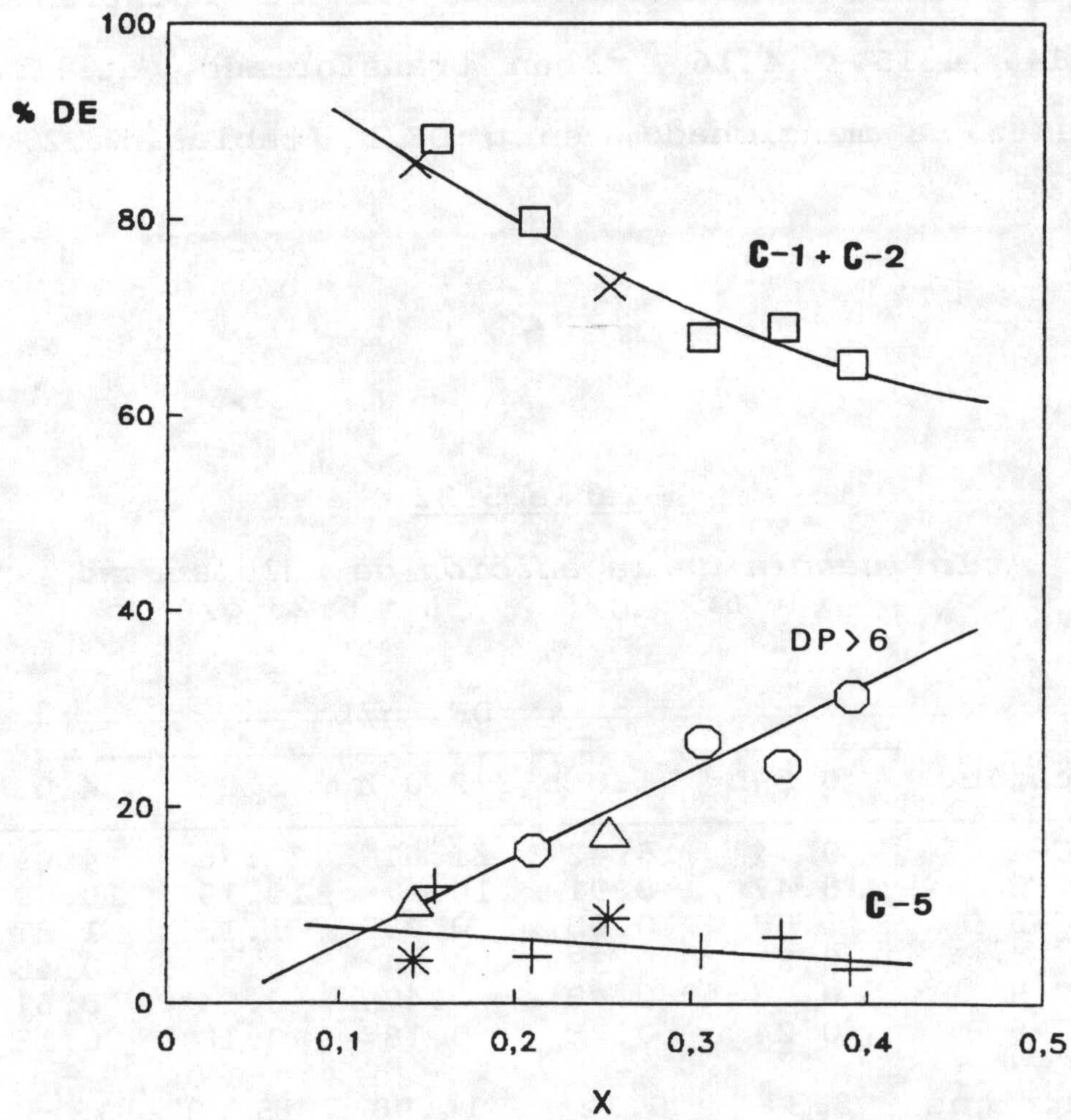


Figura 5.30. Distribución de tamaños moleculares para una misma relación enzima/sustrato. $T = 50^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 5$. ($E_0/S_0 = 0.06$ g de α -amilasa/g de sustrato).

5.2.3- Utilización de mezclas de α -amilasa y pululanasa.

Los resultados experimentales que se muestran en las tablas 4.14, 4.15 y 4.16 se han transformado, utilizando el procedimiento ya mencionado, en g DE/L (tablas 5.32, 5.33 y 5.34).

Tabla 5.32

Influencia de la adición de pululanasa.
 $E_0 = 6.25$ g/L y $E_1 = 6.25$ g/L.

| Sacárido | DE, g/L | | | | |
|-----------------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 9.74 | 16.42 | 21.61 | 27.76 | 34.09 |
| C-2 | 8.47 | 8.91 | 10.17 | 10.19 | 10.69 |
| C-3 | 1.08 | 0.98 | 0.99 | 1.13 | 1.27 |
| C-4 | 0.31 | 0.33 | 0.34 | 0.41 | 0.46 |
| C-5 | 0.38 | 0.48 | 0.47 | 0.54 | 0.61 |
| C-6 | 0.24 | 0.26 | 0.18 | 0.18 | 0.15 |
| C-7 | - | - | - | - | - |
| Dextrinas (DP>C-6) | 3.37 | 9.12 | 14.90 | 15.08 | 13.55 |
| Almidón(1) | 160.72 | 147.82 | 135.66 | 129.02 | 123.49 |
| X | 0.128 | 0.198 | 0.264 | 0.300 | 0.330 |

(1) Expresado como dextrosa equivalente.

Tabla 5.33

Influencia de la adición de pululanasa.
 $E_0 = 6.25 \text{ g/L}$; $E_1 = 25 \text{ g/L}$.

| Sacárido | DE, g/L | | | |
|-----------------------|---------|--------|--------|--------|
| | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 35.37 | 41.02 | 38.83 | 42.73 |
| C-2 | 9.26 | 9.86 | 8.81 | 7.68 |
| C-3 | 0.68 | 0.85 | 0.86 | 1.08 |
| C-4 | 0.26 | 0.33 | 0.32 | 0.36 |
| C-5 | 0.46 | 0.47 | 0.44 | 0.42 |
| C-6 | 0.06 | 0.09 | 0.09 | 0.10 |
| C-7 | - | - | - | - |
| Dextrinas (DP>C-7) | - | - | 7.05 | 10.67 |
| Almidón(1) | 139.90 | 131.79 | 127.91 | 121.28 |
| X | 0.241 | 0.287 | 0.306 | 0.342 |

Tabla 5.34

Influencia de la adición de pululanasa.
 $E_0 = 12.50 \text{ g/L}$ y $E_1 = 25 \text{ g/L}$.

| Sacárido | C, g DE/L | | | | |
|-----------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 25.41 | 35.22 | 45.51 | 50.89 | 58.12 |
| C-2 | 9.42 | 10.55 | 9.52 | 11.10 | 7.65 |
| C-3 | 3.52 | 3.39 | 2.61 | 5.37 | 1.49 |
| C-4 | 1.66 | 1.80 | 1.11 | 1.72 | 0.43 |
| C-5 | 1.06 | 1.19 | 0.89 | 0.75 | 0.57 |
| C-6 | 0.62 | 0.65 | 0.42 | 0.36 | 0.20 |
| C-7 | 0.32 | 0.33 | 0.15 | 0.09 | - |
| Dextrinas (DP>C-7) | - | 1.24 | 10.75 | 8.05 | 15.77 |
| Almidón(1) | 145.61 | 129.94 | 113.35 | 105.98 | 100.08 |
| X | 0.210 | 0.295 | 0.385 | 0.425 | 0.457 |

(1) Expresado como dextrosa equivalente.

A continuación se ha calculado el % en DE correspondiente a cada uno de los hidrolizados, tablas 5.35, 5.36 y 5.37. En éstas, se muestra que los componentes mayoritarios en los hidrolizados son C-1 y C-2, lo cual vuelve a poner de manifiesto el carácter comercial de las enzimas utilizadas en esta investigación, ya que el porcentaje en glucosa, siempre expresado en D.E., puede llegar a ser del orden del 80 %.

Tabla 5.35

*Influencia de la adición de pululanasa.
 $E_0 = 6.25$ g/L y $E_0 = 6.25$ g/L.
 Composición de la fracción hidrolizada.*

| Sacárido | % DE | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 41.29 | 44.99 | 44.41 | 50.21 | 56.05 |
| C-2 | 35.91 | 24.41 | 20.90 | 18.43 | 17.58 |
| C-5 | 8.52 | 5.62 | 4.07 | 4.09 | 4.09 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 14.29 | 24.99 | 30.62 | 29.27 | 22.28 |
| X | 0.128 | 0.198 | 0.264 | 0.300 | 0.330 |

Tabla 5.36

*Influencia de la adición de pululanasa.
 $E_0 = 6.25$ g/L ; $E_1 = 25$ g/L
 Composición de la fracción hidrolizada.*

| Sacárido | % DE | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 76.74 | 77.96 | 68.85 | 67.78 |
| C-2 | 20.09 | 18.74 | 15.62 | 12.18 |
| C-5 | 3.17 | 3.31 | 3.03 | 3.11 |
| Dextrinas (DP>C-7) | - | - | 12.50 | 16.93 |
| X | 0.241 | 0.287 | 0.306 | 0.342 |

Tabla 5.37

*Influencia de la concentración de pululanasa.
 $E_0 = 12.50$ g/L y $E_1 = 25$ g/L.
 Composición de la fracción hidrolizada.*

| Sacárido | % DE | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h |
| C-1 | 60.49 | 64.78 | 64.13 | 64.97 | 69.00 |
| C-2 | 22.42 | 19.40 | 13.42 | 14.17 | 9.08 |
| C-5 | 17.09 | 13.54 | 7.30 | 10.58 | 3.19 |
| Dextrinas (DP>C-7) | - | 2.28 | 15.15 | 10.28 | 18.72 |
| X | 0.210 | 0.295 | 0.385 | 0.425 | 0.457 |

En los experimentos realizados con $E_0 = 6,25$ g/L, tablas 5.35 y 5.36, se observa que los porcentajes en glucosa y maltosa aumentan conforme lo hace la cantidad de pululanasa, figura 5.31, si bien los porcentajes son prácticamente independientes de la conversión para cuando no existe pululanasa o la concentración de ésta es 6,25 g/L. En cambio, para $E_1 = 25$ g/L, las cantidades de glucosa y maltosa disminuyen con X. En la figura 5.32 se ha representado la composición del hidrolizado en dextrinas de DP medio 5 frente a la conversión; en este gráfico se observa que no existen diferencias significativas entre los experimentos realizados sólo con α -amilasa y con una mezcla de 6,25 g/L de pululanasa. En cambio, los resultados obtenidos con la máxima concentración de pululanasa son algo menores. Finalmente, la figura 5.33 muestra la variación del contenido de dextrinas de $DP > 7$ con la conversión; en esta figura se observa que el contenido en estas sustancias en ausencia de pululanasa puede llegar a ser del 50 %. Sin embargo, para E_1 6,25 g/L y 25 g/L, se observa que estas dextrinas aparecen cuando se ha alcanzado un cierto grado de hidrólisis, que aumenta con la concentración inicial de pululanasa; en todo caso, el contenido en dextrinas de $DP \geq 7$ disminuye con la adición de pululanasa.

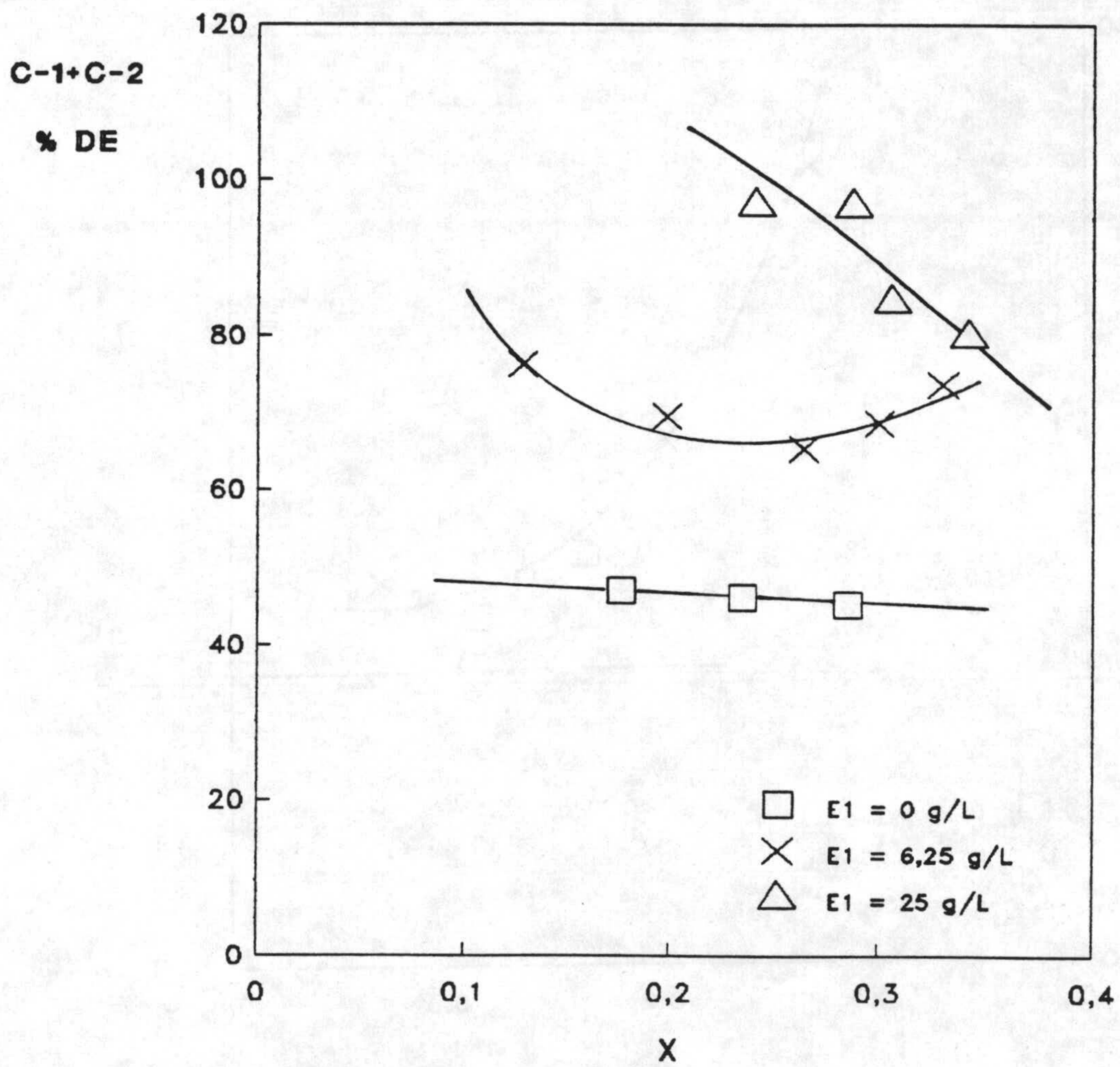


Figura 5.31. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en glucosa y maltosa. $E_0 = 6.25 \text{ g/L}$; $S_0 = 210 \text{ g/L}$; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

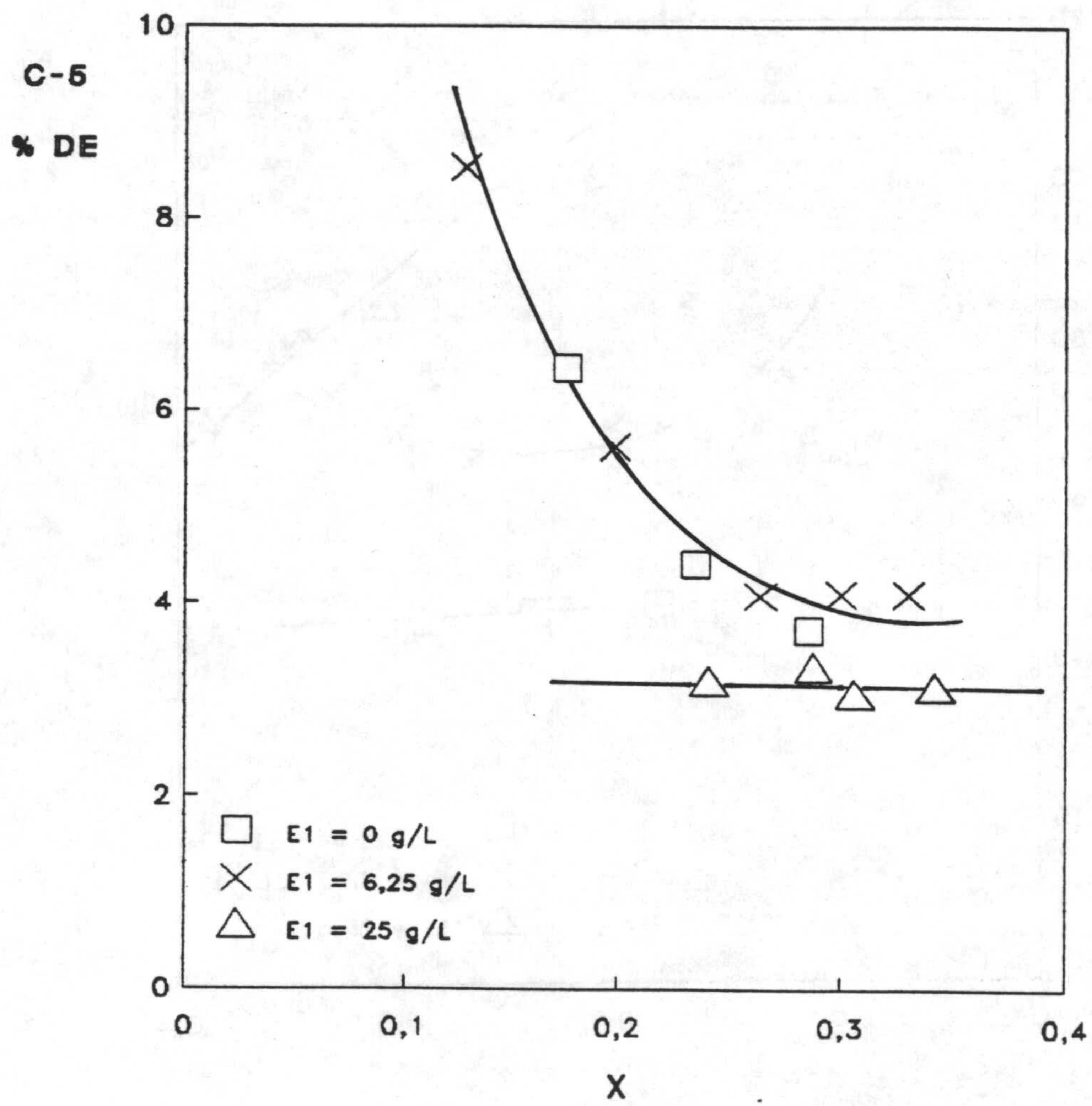


Figura 5.32. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en C-5. $E_0 = 6.25 \text{ g/L}$; $S_0 = 210 \text{ g/L}$; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

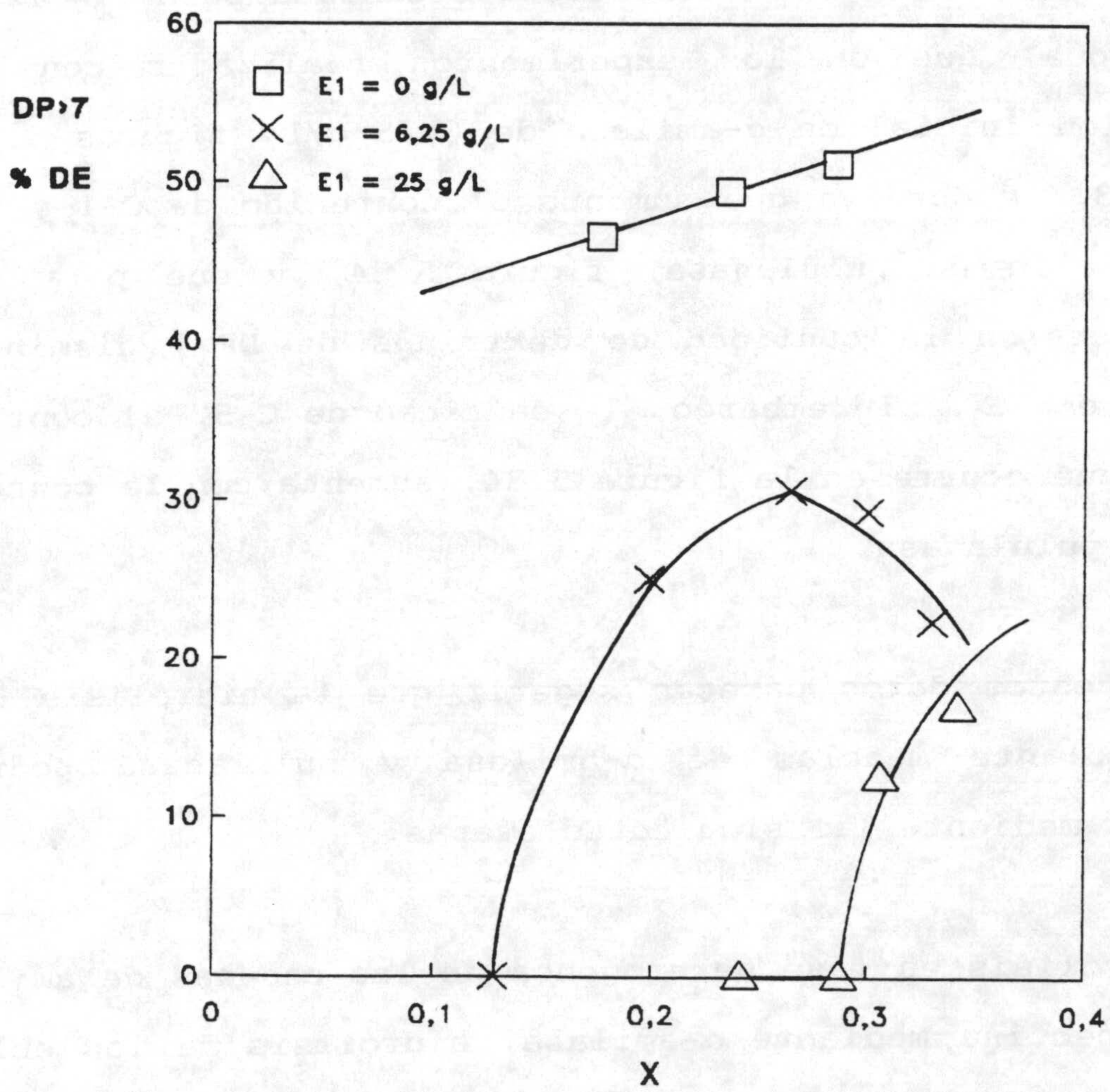


Figura 5.33. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en dextrinas DP>7. $E_0 = 6.25 \text{ g/L}$; $S_0 = 210 \text{ g/L}$; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

En las figuras 5.34, 5.35 y 5.36 se muestra, respectivamente, la variación del contenido en glucosa y maltosa, C-5 y dextrinas de $DP > 7$, con la conversión alcanzada para $E_0 = 12,50$ g/L. Al igual que en los experimentos realizados con una concentración inicial de α -amilasa de 6,25 g/L, figuras 5.31, 5.32 y 5.33, se observa que aumenta el contenido de C-1 y C-2 con la adición de pululanasa, figura 5.34, y que para una misma conversión la cantidad de dextrinas de $DP > 7$ disminuye conforme crece E_1 . Sin embargo, la cantidad de C-5, al contrario de lo que ocurre en la figura 5.34, aumenta con la concentración de pululanasa.

Todos estos datos parecen sugerir que la hidrólisis del almidón mediante mezclas de α -amilasa y pululanasa podría transcurrir mediante las siguientes etapas:

- Hidrólisis en fase heterogénea de las cadenas de amilosa y amilopectina mediante α -amilasa, hidrólisis de los enlaces $\alpha(1,4)$, y liberación de dextrinas que pueden contener enlaces $\alpha(1,6)$.

- Hidrólisis en fase pseudohomogénea de los enlaces $\alpha(1,6)$ por la pululanasa, por lo que disminuye el contenido en dextrinas de $D.P. > 7$, que pasan en disolución; simultáneamente, la α -amilasa puede estar rompiendo enlaces $\alpha(1,4)$.

- Hidrólisis en fase homogénea de los enlaces $\alpha(1,4)$ por la α -amilasa.

Mediante estas hipótesis, se explica que disminuya el contenido en dextrinas de D.P. > 7 y que en cambio crezca el correspondiente a los sacáridos pequeños, C-1 y C-2, ya que el número de cadenas solubles, y por tanto la facilidad y accesibilidad de los enlaces $\alpha(1,4)$ para la α -amilasa, es mayor. Por ello, la adición de pululanasa conduce a hidrolizados ricos en C-1 y C-2.

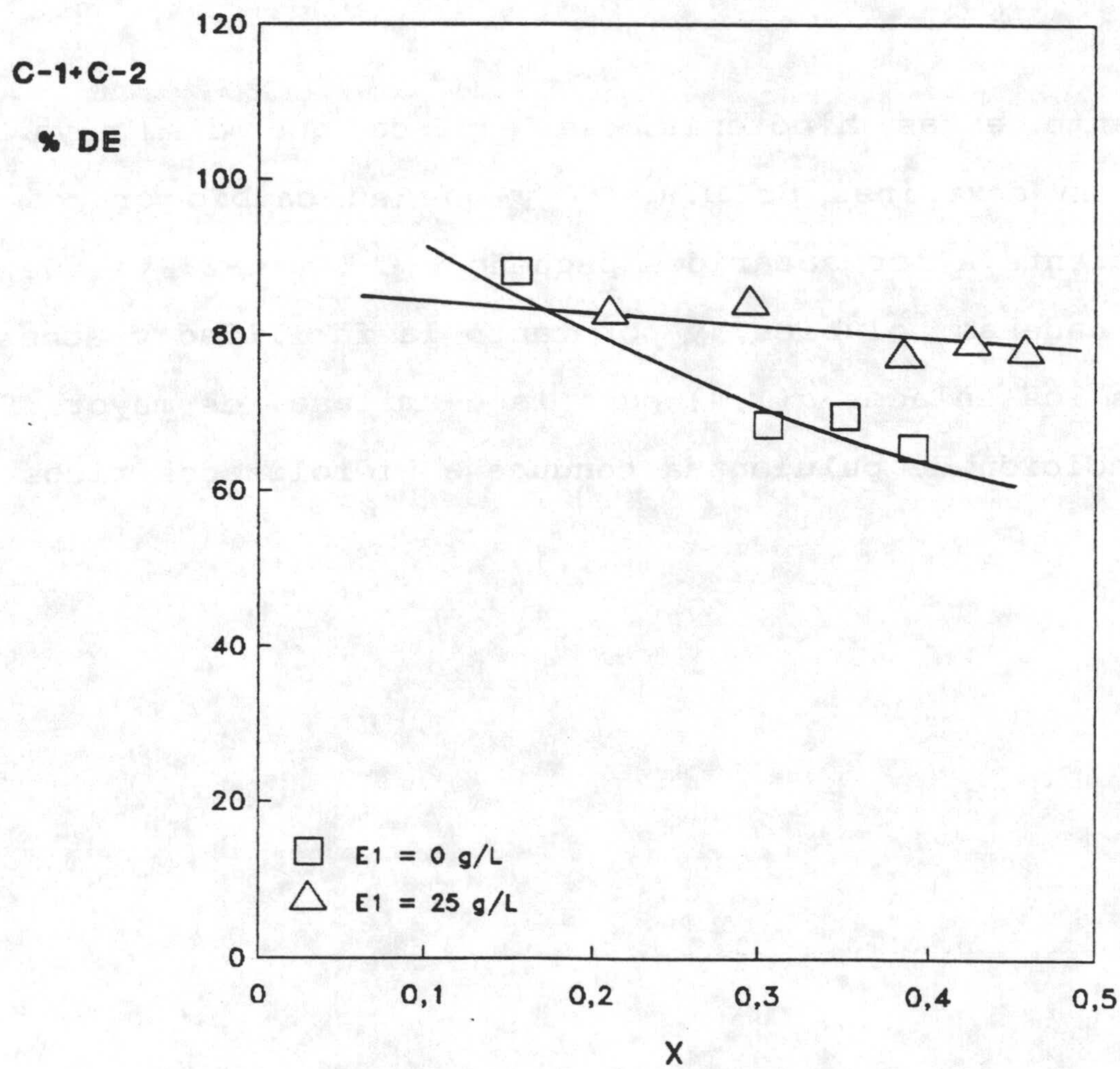


Figura 5.34. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en C-1 y C-2. $E_0 = 12.50$ g/L; $S_0 = 210$ g/L; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

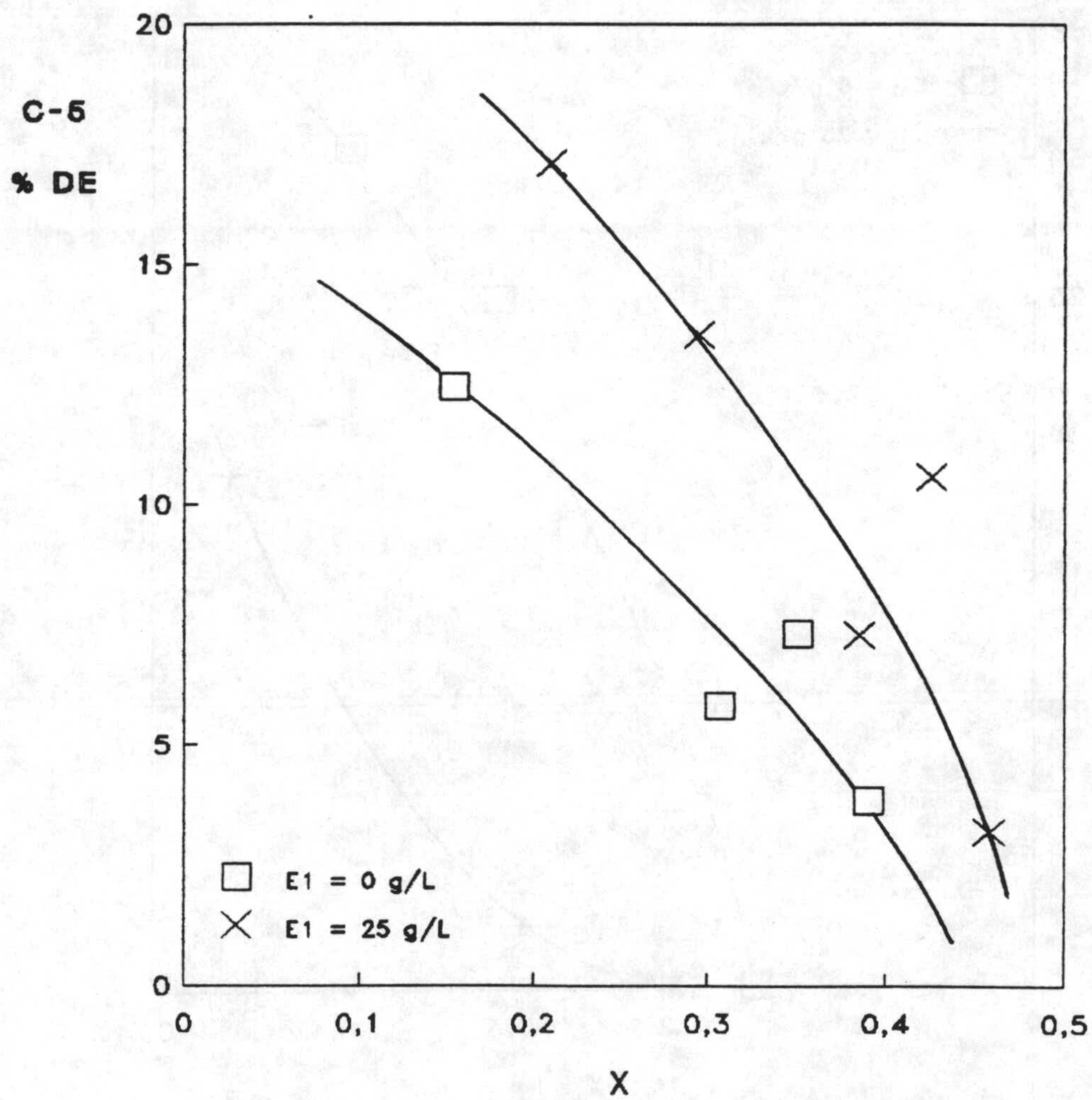


Figura 5.35. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en dextrinas de DP medio 5. $E_0 = 12.50$ g/L; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

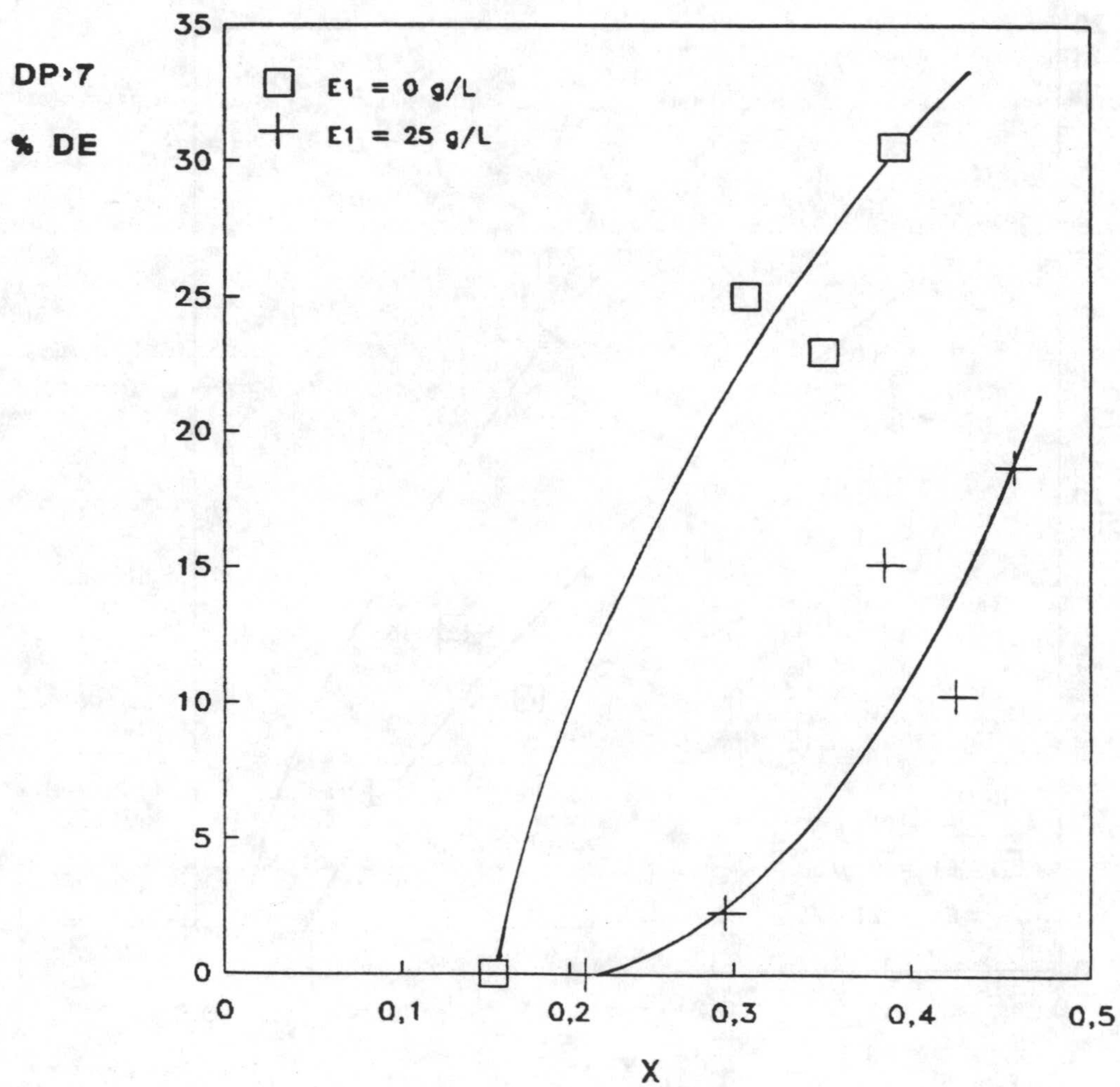


Figura 5.36. Influencia de la adición de pululanasa sobre el contenido en dextrinas de DP>7. $E_0 = 12.50$ g/L; $S_0 = 210$ g/L; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

5.2.4- Licuación parcial del almidón.

Para comprobar si una licuación previa con α -amilasa facilita la velocidad de actuación de la pululanasa y modifica la distribución de tamaños moleculares, se ha realizado el experimento cuyos datos se recogen en la tabla 4.17. En este ensayo se prehidroliza el almidón con $E_0 = 6,25$ g/L hasta $X = 0,10$ y a continuación se añaden 6,25 g/L de pululanasa. Transformando estos datos a g DE/L, tabla 5.38, y expresando éstos como % de DE en el hidrolizado, se obtiene la tabla 5.39.

Tabla 5.38

Distribución de tamaños moleculares. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$. $E_0 = 6.25$ g/L y a las 0.5 h se adicionan 6.25 g/L de pululanasa.

| Sacárido | C, g DE/L | | | |
|-----------------------|-----------|--------|--------|--------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 7.69 | 13.47 | 18.41 | 23.39 |
| C-2 | 7.43 | 9.19 | 10.20 | 11.15 |
| C-3 | 1.30 | 1.72 | 1.54 | 1.50 |
| C-4 | 0.39 | 0.55 | 0.52 | 0.49 |
| C-5 | 0.45 | 0.63 | 0.56 | 0.43 |
| C-6 | 0.30 | 0.18 | 0.06 | 0.09 |
| C-7 | 0.10 | 0.14 | 0.13 | 0.10 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 2.98 | 8.96 | 12.82 | 13.54 |
| Almidón(1) | 163.67 | 149.48 | 140.08 | 133.63 |
| X | 0.112 | 0.189 | 0.240 | 0.275 |

(1) Expresado como dextrosa equivalente.

Tabla 5.39

Distribución de tamaños moleculares en la fracción hidrolizada. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$, $E_0 = 6.25$ g/L y a las 0.5 h se adicionan 6.25 g/L de pululanasa.

| Sacárido | % DE | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| C-1 | 37.26 | 38.66 | 41.61 | 46.14 |
| C-2 | 36.00 | 26.38 | 23.06 | 22.00 |
| C-5 | 12.31 | 9.24 | 6.35 | 5.15 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 14.44 | 25.72 | 29.98 | 26.71 |
| X | 0.112 | 0.189 | 0.240 | 0.275 |

Comparando estos resultados con los obtenidos mediante la adición simultánea, desde $t = 0$ h de 6,25 g/L de α -amilasa y 6,25 g/L de pululanasa, figuras 5.37 y 5.38, se encuentran que éstas son prácticamente coincidentes.

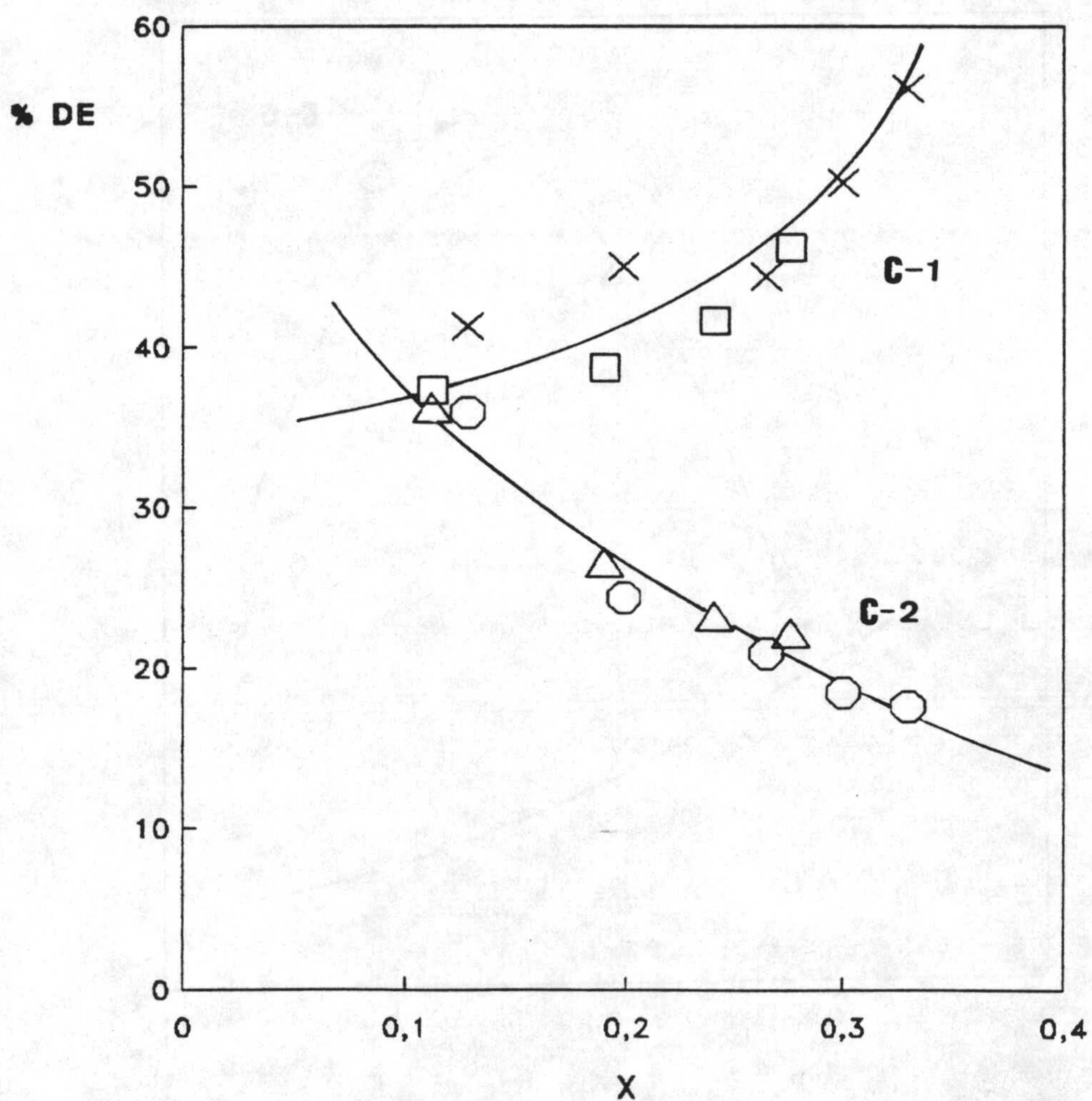


Figura 5.37. Comparación entre la distribución de sacáridos conseguida mediante la adición de 6.25 g/L de pululanasa.
 □, △ adición de E_1 a $t = 0.5$ h y X, O adición simultanea.

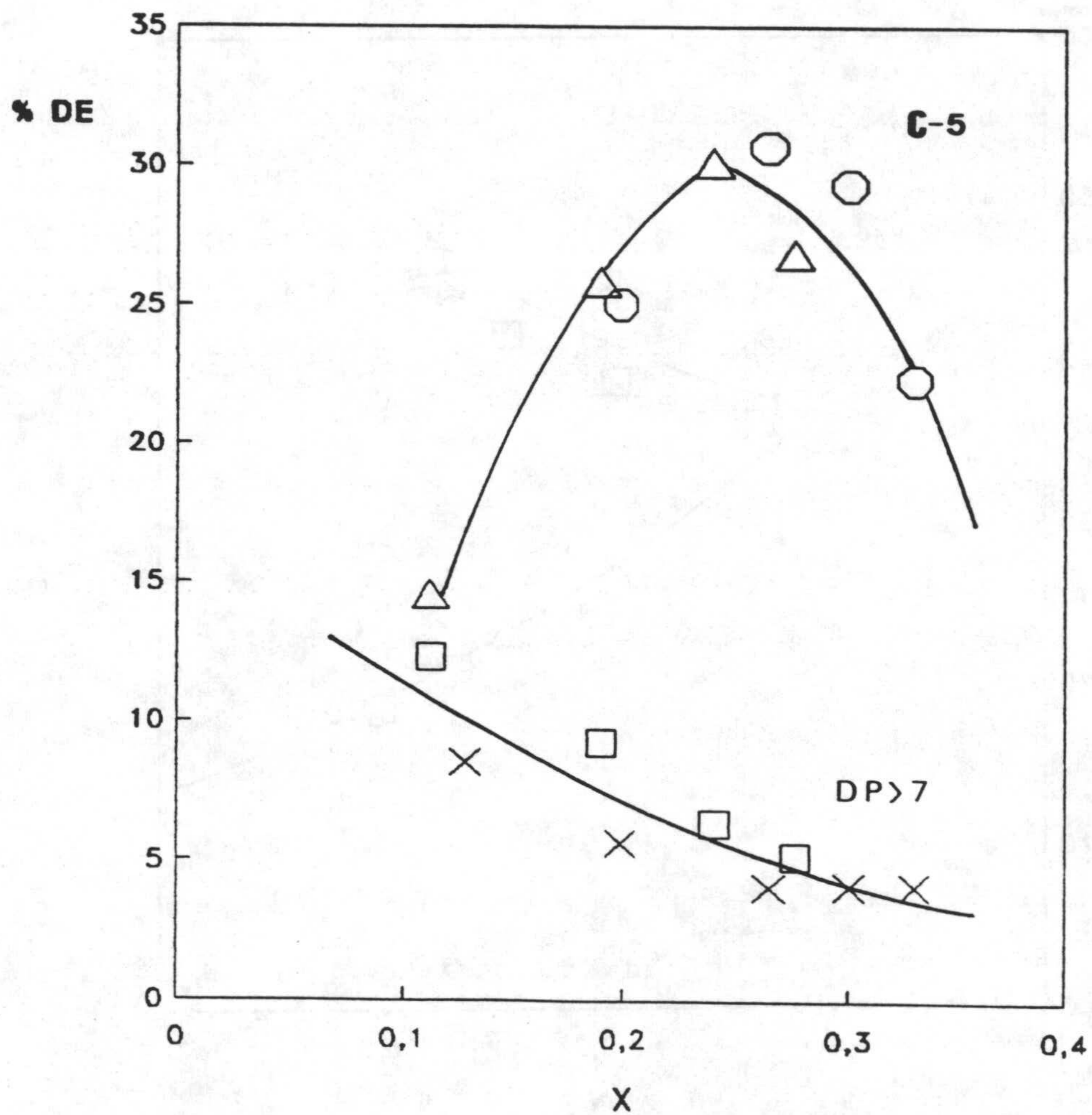


Figura 5.38. Comparación entre la distribución de sacáridos conseguida mediante la adición de 6.25 g/L de pululanasa. \square, \triangle adición de E_1 a $t = 0.5$ h y \times, \circ adición simultanea.

Para comprobar la influencia de la prehidrólisis sobre la distribución de sacáridos, se modificaron las condiciones experimentales descritas en el párrafo anterior. En este ensayo se realiza una licuación con $E_0 = 6,25$ g/L hasta $X = 0,10$ y a continuación se desactiva la α -amilasa mediante la inmersión del reactor en agua hirviendo durante 10 min; para evitar gradientes internos de temperatura se mantiene la agitación y se mide la evolución de la temperatura con el tiempo, tabla 5.40.

Transcurridos los 10 min, se enfria el reactor y se toman muestras a 1 h, 2 h y 3 h en las que se determinan azúcares reductores totales y la distribución de tamaños moleculares por HPLC, tabla 4.18. Estos resultados se han transformado en g D.E./L y % en D.E. en el hidrolizado, tablas 5.41 y 5.42 respectivamente. Los datos tabulados en estas dos tablas muestran que la enzima se ha desnaturalizado ya que la conversión total es prácticamente constante, $X = 0,35$, y las cantidades de los distintos sacáridos no cambian significativamente.

Tabla 5.40

Evolución de la temperatura con el tiempo durante la desnaturalización de la α -amilasa en el reactor de hidrólisis.

| <u>t, min</u> | <u>T, °C</u> |
|---------------|--------------|
| 1 | 61.0 |
| 2 | 66.7 |
| 3 | 76.2 |
| 4 | 82.8 |
| 5 | 86.6 |
| 6 | 88.9 |
| 7 | 90.2 |
| 8 | 91.3 |
| 9 | 91.6 |
| 10 | 91.8 |

Tabla 5.41

Distribución de tamaños moleculares. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$ y $E_0 = 6.25$ g/L. Después de 0.5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min.

| Sacárido | <u>C, g DE/L</u> | | | |
|-----------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|
| | <u>0.5 h</u> | <u>1.0 h</u> | <u>2.0 h</u> | <u>3.0 h</u> |
| C-1 | 7.69 | 8.09 | 8.43 | 9.16 |
| C-2 | 7.43 | 14.08 | 14.82 | 16.27 |
| C-3 | 1.30 | 7.36 | 8.03 | 9.15 |
| C-4 | 0.39 | 3.11 | 3.39 | 3.77 |
| C-5 | 0.45 | 1.67 | 1.77 | 1.86 |
| C-6 | 0.30 | 0.98 | 0.20 | 0.20 |
| C-7 | 0.10 | 0.39 | 0.38 | 0.07 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 2.98 | 28.83 | 27.47 | 24.03 |
| Almidón | 163.67 | 119.80 | 119.80 | 119.80 |

Tabla 5.42

Distribución de tamaños moleculares en la fracción hidrolizada. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $E_0 = 6.25$ g/L. Después de 0.5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min.

| Sacárido | % DE | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | Media |
| C-1 | 37.26 | 12.54 | 13.07 | 14.20 | 13.27 |
| C-2 | 36.00 | 21.83 | 22.98 | 25.22 | 23.34 |
| C-5 | 12.31 | 20.94 | 21.35 | 23.33 | 21.87 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 14.44 | 44.69 | 42.60 | 37.25 | 41.51 |
| X | 0.112 | 0.350 | 0.350 | 0.350 | 0.350 |

En cambio, la distribución de tamaños moleculares es muy distinta es la obtenida antes del calentamiento, ya que los componentes mayoritarios son dextrinas de D.P. medio 5 y dextrinas de D.P.> 7, tabla 5.42. Este hecho parece indicar que durante el calentamiento se ha producido una gelatinización parcial de los gránulos de almidón, con aumento por tanto de superficie, y que la α -amilasa si bien se ha ido desnaturizando ha actuado sobre las cadenas de almidón produciendo dextrinas. Por tanto, la desnaturización de la α -amilasa por métodos térmicos conduce simultáneamente a una licuación del

almidón en donde los componentes mayoritarios del hidrolizado son las dextrinas.

En las tabla 4.19 se muestran los resultados obtenidos cuando se adicionan al hidrolizado anterior, con el almidón parcialmente gelatinizado y la α -amilasa desnaturalizada, 6,25 g/L de pululanasa. Estos datos se han transformado, según el procedimiento ya descrito, en g DE/L, tabla 5.43, y en % de DE en el hidrolizado, tabla 5.44.

Tabla 5.43

Distribución de tamaños moleculares. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$ y $E_0 = 6.25$ g/L. Después de 0.5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min y se añaden 6.25 g/L de pululanasa.

| Sacárido | C, g DE/L | | | | | |
|-----------------------|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h | 5.0 h |
| C-1 | 7.69 | 8.55 | 7.92 | 8.21 | 8.46 | 8.51 |
| C-2 | 7.43 | 16.24 | 15.75 | 15.75 | 16.96 | 17.26 |
| C-3 | 1.30 | 9.61 | 9.76 | 9.70 | 10.98 | 11.25 |
| C-4 | 0.39 | 3.42 | 3.64 | 3.55 | 4.07 | 4.18 |
| C-5 | 0.45 | 1.75 | 1.92 | 1.86 | 2.07 | 2.09 |
| C-6 | 0.30 | 1.07 | 1.13 | 1.12 | 1.13 | 1.14 |
| C-7 | 0.10 | 0.39 | 0.36 | 0.39 | 0.37 | 0.36 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 2.98 | 27.35 | 31.40 | 36.65 | 40.93 | 43.50 |
| Almidón | 163.67 | 115.93 | 112.43 | 107.09 | 99.35 | 96.03 |
| X | 0.112 | 0.371 | 0.390 | 0.419 | 0.461 | 0.479 |

Tabla 5.44

Distribución de tamaños moleculares en la fracción hidrolizada. $S_0 = 210$ g/L, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$ y $E_0 = 6.25$ g/L. Después de 0,5 h de hidrólisis se desactiva la enzima a 100°C y 10 min y se añaden 6.25 g/L de pululanasa.

| Sacárido | % DE | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | 4.0 h | 5.0 h |
| C-1 | 37.26 | 12.50 | 11.02 | 10.63 | 9.96 | 9.64 |
| C-2 | 36.00 | 23.75 | 21.91 | 20.39 | 19.96 | 19.55 |
| C-5 | 12.31 | 23.75 | 23.39 | 21.52 | 21.90 | 21.54 |
| Dextrinas (DP>C-7) | 14.44 | 40.00 | 43.68 | 47.46 | 48.17 | 49.27 |
| X | 0.112 | 0.371 | 0.390 | 0.419 | 0.461 | 0.479 |

Representado estos últimos datos frente a la conversión se obtiene la figura 5.39. En esta gráfica, se observa que la adición de pululanasa no modifica apreciablemente el contenido en C-1, C-2 y dextrinas medias, C-5, pero si aumenta la proporción de dextrinas de $\text{DP} > 7$ ya que esta enzima debe actuar sobre las cadenas de amilopectina separadas inicialmente por la acción de α -amilasa. De todas formas, lo que si se pone de manifiesto en la figura 5.41, es que mediante este procedimiento se consiguen hidrolizados de escaso contenido en glucosa y ricos en dextrinas.

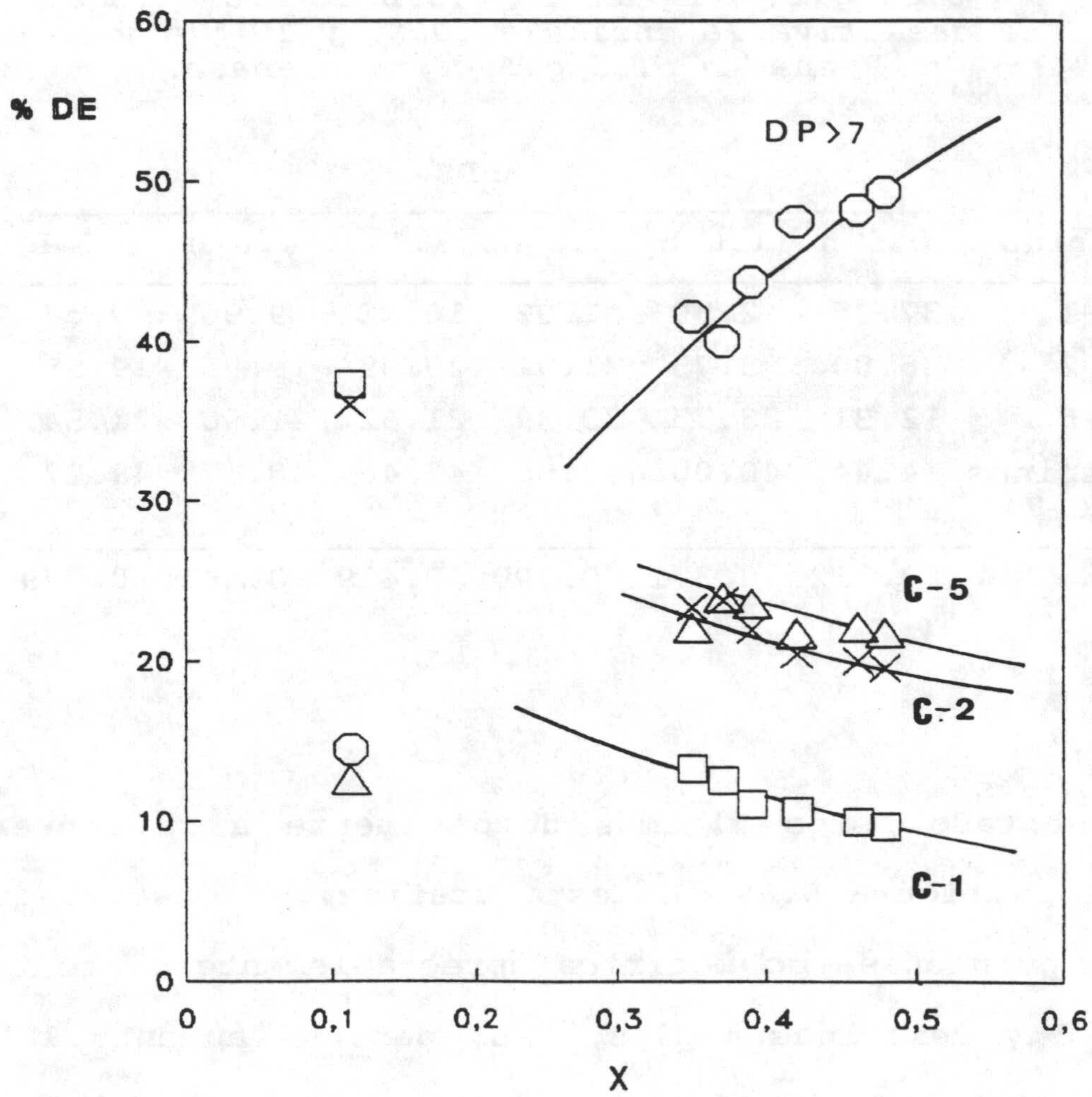


Figura 5.39. Influencia de la gelatinización y de la adición de 6.25 g/L de pululanasa. $S_0 = 210$ g/L; $T = 50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5$.

6. CONCLUSIONES

De los resultados experimentales y de su posterior discusión se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Del estudio cinético realizado con α -amilasa se ha obtenido una expresión que permite el cálculo de la conversión global, X, función de las variables de operación, pH=5 y 50°C.

$$X = \frac{1}{7.72} \text{Ln} [0.072 E_0 \cdot t \cdot S_0^{1/3} + 1] \quad [6.1]$$

Esta expresión pone de manifiesto que el producto $E_0 \cdot t$, a S_0 constante, se puede utilizar como variable intensiva del tratamiento enzimático, y que la desnaturalización de la enzima, o no existe, o es de 2º orden.

2. La velocidad global de la hidrólisis del almidón de harina de trigo con α -amilasa, a pH constante viene dada por:

$$r = S_0 \frac{dX}{dt} = C_1 \cdot E_0 \cdot S_0^{1.33} \cdot \exp(-7.72 X) \quad [6.2]$$

donde C_1 es función de la temperatura

$$C_1 = 1.048 \cdot 10^3 \cdot \exp \left(-\frac{3750}{T} \right) \quad [6.3]$$

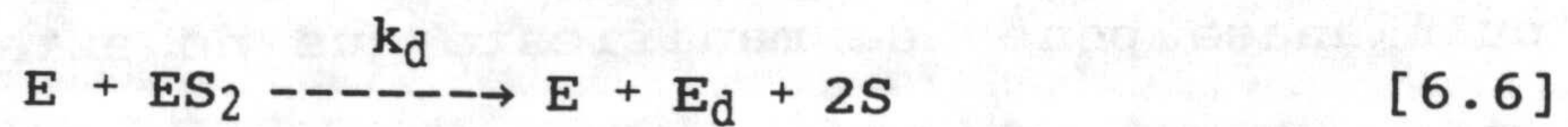
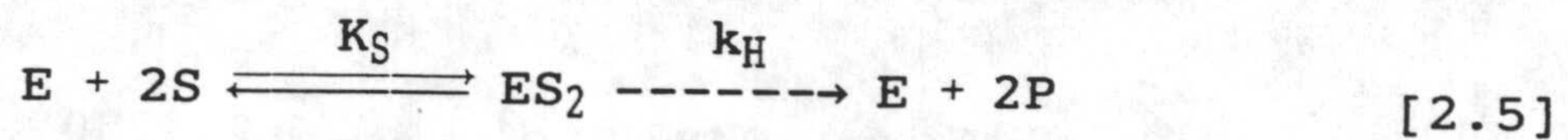
3. Los experimentos realizados con mezclas de α -amilasa y pululanasa ponen de manifiesto que no existe un efecto sinérgico apreciable durante la actuación conjunta de ambas enzimas.

4. Los valores de la conversión, a pH=5 y 50°C, para mezclas de α -amilasa y pululanasa, se pueden estimar mediante la expresión:

$$X = \frac{1}{7.72} \ln [7.72 \cdot a \cdot t + 1] \quad [6.4]$$

donde a es función de las concentraciones iniciales de α -amilasa y pululanasa. En cambio $b=7.72$; este dato es análogo al calculado durante la hidrólisis de almidón con α -amilasa.

5. Para explicar los resultados experimentales correspondientes a la hidrólisis del almidón con α -amilasa se propone el siguiente mecanismo:



Las ecuaciones cinéticas se simplifican, admitiendo que la mayor parte de la enzima está libre en la disolución y que la concentración instantánea de sustrato es proporcional a $S_0^{2/3}$. Esta hipótesis supone que la fase heterogénea es controlante y que el tamaño de los flóculos de almidón depende de la concentración inicial de sustrato.

6. La distribución de sacáridos en la fracción hidrolizada, a pH y temperatura constantes, depende del tipo de enzima, de la relación enzima/sustrato y de la conversión alcanzada.

7. En los experimentos realizados con α -amilasa, a pH=5 y 50°C, se pone de manifiesto que para una misma conversión, disminuyen los porcentajes de dextrinas conforme aumenta la

relación enzima/sustrato. En cambio crecen los porcentajes de glucosa y maltosa.

8. La utilización de mezclas de α -amilasa y pululanasa conduce a hidrolizados en los que la proporción de glucosa y maltosa aumenta conforme lo hace la concentración inicial de pululanasa, para E_0 , S_0 , pH y temperatura constantes.

9. La disminución del contenido en dextrinas de $D.P > 7$ y el aumento de la cantidad de mono y disacáridos conforme crece la concentración inicial de pululanasa, en unas mismas condiciones experimentales, sugiere que esta enzima hidroliza, en fase pseudohomogénea, los enlaces $\alpha(1,6)$ de maltodextrinas y cadenas de almidón, facilitando de esta forma la acción hidrolítica de la α -amilasa.

10. En los experimentos realizados con α -amilasa y con mezclas de esta enzima con pululanasa, se ha obtenido que la glucosa es el componente mayoritario en los hidrolizados y sus porcentajes, expresados como dextrosa equivalente, pueden alcanzar hasta 80%. Este hecho puede ser debido a que las enzimas empleadas son preparados comerciales y posiblemente contengan trazas de glucoamilasa.

11. Se ha comprobado que una licuación previa del almidón, seguida de un tratamiento térmico que desnaturaliza la α -amilasa y gelatiniza parcialmente al sustrato, conduce a hidrolizados ricos en dextrinas y de escasa proporción en glucosa.

7. NOMENCLATURA

a: Parámetro cinético, h^{-1} , ecuación [5.12].

A: Area de los cromatogramas.

A.R.: Azúcares reductores, g D.E./L.

A_{640nm} : Absorbancia medida a 640 nm.

b: Parámetro cinético, ecuación [5.12].

C: Concentración de sacáridos obtenidos por HPLC, g/L.

C-1: Glucosa.

C-2: Maltosa.

C-3: Maltotriosa.

C-4: Maltotetraosa.

C-5: Maltopentaosa.

C-6: Maltohexaosa.

C-7: Maltoheptaosa.

D.E.: Dextrosa Equivalente.

D.P.: Grado medio de polimerización.

d_s : Diamátro de la esfera equivalente, m.

dX/dt : Pendientes de las líneas X-t, h^{-1} .

e: Concentración de enzima activa, g/L.

e_0 : Concentración inicial de enzima activa, g/L.

E_d : Enzima desactivada.

E_0 : Concentración inicial de α -amilasa, g/L.

E_1 : Concentración inicial de pululanasa, g/L.

E_0/S_0 : Relación enzima/sustrato, g de enzima/g de sustrato.

- ES: Complejo enzima-sustrato, ecuación [5.43].
- ES₂: Complejo enzima-sustrato, ecuación [5.62].
- k_d: Constante cinética de desnaturalización térmica, g de sustrato/g de enzima.h.
- k_H: Constante cinética de hidrólisis, g de sustrato/g de enzima.h.
- K_I: Constante de inhibición competitiva de producto, ecuación [2.2].
- K_m: Constante de Michaelis-Menten, g/L.
- K'_M: Constante de Michaelis-Menten, ecuación [2.2].
- K_S: Constante de equilibrio, L/g, ecuación [5.44].
- K'_S: Constante de equilibrio, ecuación [5.63].
- M: Número de parejas de datos.
- Q: Cociente entre el peso molecular de un determinado sacárido y el de la glucosa.
- n: Orden de la reacción.
- N: Número de nodos.
- r: Velocidad global de reacción, g D.E./L.h.
- r₀: Velocidad inicial de reacción, g D.E./L.h.
- r_h: Velocidad global de hidrólisis, g D.E./L.min.
- r_m: Velocidad máxima de reacción, ecuación [2.18].
- r'_m: Velocidad máxima de reacción, ecuación [2.2].
- S: Concentración de sustrato, g/L.
- S₀: Concentración inicial de sustrato, g/L.
- S.S.R.: Sumatorio de cuadrados residuales, ecuación [5.10].

S_p : Superficie externa de las partículas de almidón, m^2 .

t: Tiempo de reacción, h.

T: Temperatura, $^{\circ}C$.

U.I.: Unidades Internacionales, μ moles de glucosa/g de enzima.min.

$V_{Na_2S_2O_3}$: Volumen de tiosulfato, mL.

X: conversión alcanzada, g D.E./g D.E. totales.

8- BIBLIOGRAFIA

-
- AVENDAÑO, M.C. y CORNEJO, I. : *"Formation of a raw-starch hydrolyzing α -amylase by Clostridium 2021: Effect of carbon sources"*. Biotechnol. Lett. 9 , 123-124 (1987).
 - AVENDAÑO, M.C. y CORNEJO, I.: *"Clasificación, características y aplicaciones de las enzimas amilolíticas de origen microbiano"*. Rev. Agrorquím. Tecnol. Aliment., 28, 449-461 (1988).
 - BARFOED, H. : *"Enzymes in starch processing"*. Cereal Foods World, 21, 588-593 (1976).
 - BATEY, I.L ; MISKELLY, D.M. y KONIC, C.M.: *"Wheat starch"*. Chem. Aust., 58, 362-64 (1991).
 - BATTCHAYRA, M. y HANNA, M.A. : *"Kinetics of starch gelatinization during extrusion-cooking"*. J. Food Sci., 52, 764-767 (1987).
 - BENDER, H. y WALLENFELS, K. : *"Pullulan: (II) specific decomposition by a bacterial enzymes"*. Biochem. Z , 234, 79-95 (1961).
 - BLANSHARD, J.V. : *"Starch granule: Structure and function. A physico-chemical approach"*. Crit. Rep. Appl. Chem., 1316-1354 (1987).
 - BORGLUM, S.A. : *"Starch hydrolysis for ethanol production"*. En: Fuels for biomass and wastes. Ed. Klass y Emert, Ann Arbor Science Publishers Inc. The Butterworth Group, England, 297-310 (1981).

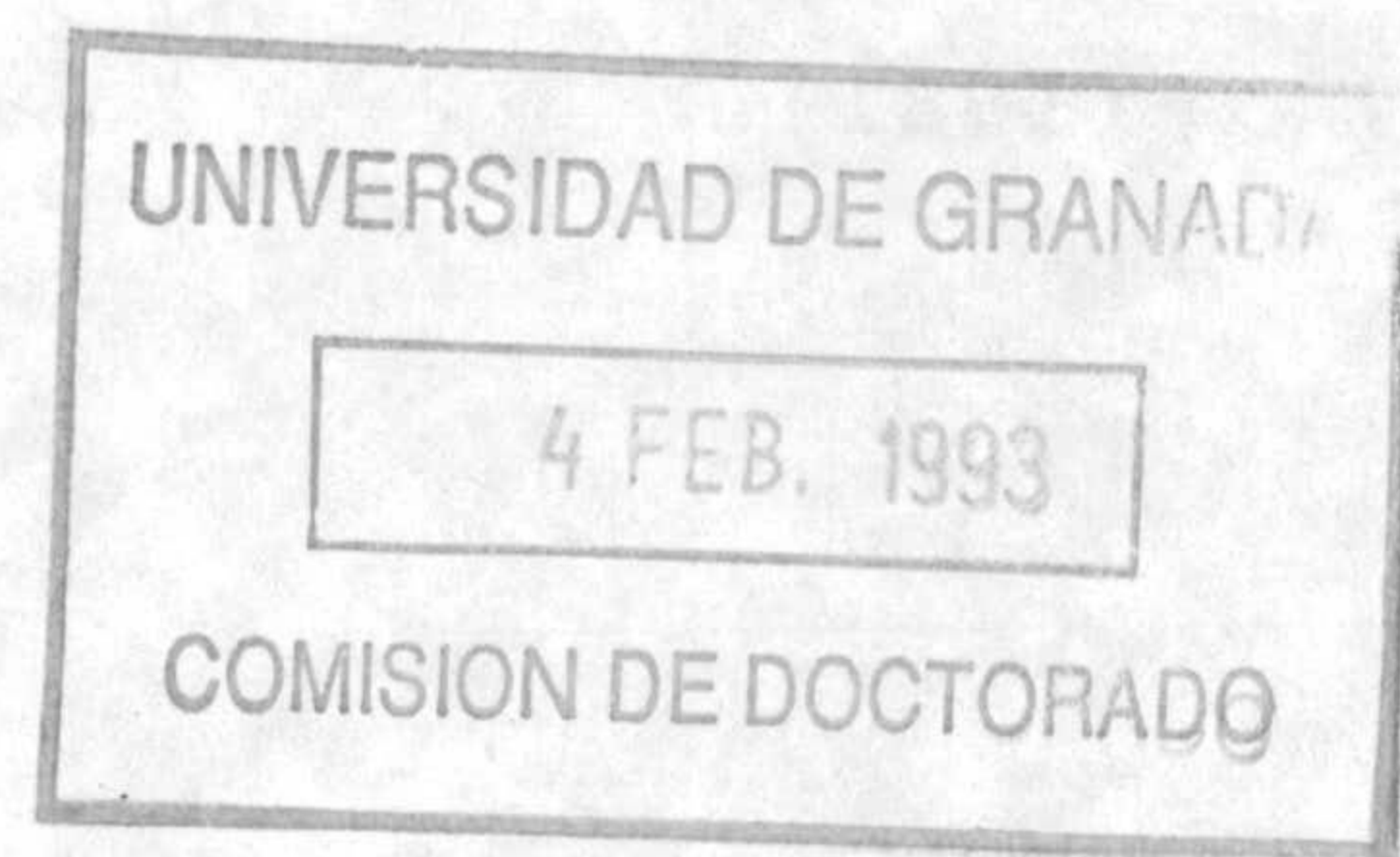
- BOS CORNELIS: *"The production of cristalline fructose"*.
Zückerindustrie, 115, 771-73 (1990).
- BROOKS, J.R. y GRIFFIN, V.K.: *"Liquefaction of rice starch from milled rice flour using heat stable α -amylase"*. J. Food Sci., 52, 712-719 (1987).
- BRUENMER, J.M.: *"Nutritional evaluation of foods on cereal basis"*. Ernaehrung, 15, 74,82 84-85 (1991).
- BUCKE, C. ; BIRCH, G.G. ; BLAKENBROUGH, N. y PARKER, K.H.: *"Enzymes and food processing"*. Ed. Applied Science Publishers, London, 51-72 (1981).
- BULEON, A. ; COLONNA, P. y LELOUP, V.: *"Les amidons et leurs dérivés dans les industries des cereales"*. Ind. Alim. Agric., 6, 515-532 (1990).
- BUISSIÈRE, G.: *"Les sucres invertis"*. Ind. Alim. Agric., 107 7-8, 645-649 (1990).
- CHEN, W.P. Y CHAN, Y.C.: *"Production of high fructose rice syrup and high protein rice flour from broken rice"*. J. Sci. Food Agric., 35, 1128-1133 (1984).
- COKER, L.E. y VANKATASUBRAMANIAN, K.: *"Starch covercion processes"*. En: Comprehensive Biotechnology. Ed. M. Moo-Young. Pergamon Press, Elmsford, 777-778 (1985).
- COLONNA, P. y MERCIER, C.: *"Macromolecule structure of wrinkled and smooth-pea starch components"*. Carbohydr. Res., 126, 233-247 (1984).

- COLONNA, P. y MERCIER, C.: "*Starch and enzymes: Innovations in the products, processes and uses*". *Chimicaoggi*, 9-14 (1988).
- COLONNA, P.; BULEON, A. y LEMARIE, F.: "*Action of Bacillus subtilis α -amylase on native wheat starch*". *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 895-904 (1988).
- DE VIZIA, B. : *J. Pediatr.*, 86, 50 (1975).
- DRIOU, A. ; SAINT PAUL, P. ; PAQUET, D. ; LE DEAUT, J.Y. y LINDEN, G. : *Ind. Alim. Agric.* , 102 , 311-315 (1985).
- DUCROO, P. : "*Utilisation industrielle des enzymes*". *Ind. Alim. Agric.* , 99 , 401 (1982).
- DUPRAT, F. ; GALLANT, D. ; GUILBOT, A. ; Mercier, C. y ROBIN, J.P. : "*L'amidon dans les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés*". Ed. B. Monties, Gauthier, Paris (1980).
- DZIEDZIC, S.Z. y KEARSLEY, M.W.: "*Physicochemical properties of glucose syrups*". En: *Glucose syrups: Science and technology*. 137-168. Ed. Dziejczic, S.Z. y Kearsley, M.W. Elsevier Appl. Sc. Publishers Ltd. (1984).
- ESPGAN : Comité de nutrición. Recomendaciones sobre la leche de continuación y Beikost. Estocolmo (1981).
- FLECHE, G.: *Ind. Alim. Agric.*, 96, 585-594 (1979).
- FOMON, S.J.: *Acta Pediatr. Scand.*, 172, (1981).
- FUCHS, A : "*Potentials for non-food utilization of fructose and insulin*". *Starch*, 39, 335-343 (1987).

- FUJII, M.; MURAKAMI, S.; YAMADA, Y.; ONA, T. Y NAKAMURA, T.:
"A kinetic equation for hydrolysis of polysaccharides by mixed exo- and endoenzyme systems". Biotechnol. Bioeng., 23, 1393-1398 (1981).
- FUJII, M. y KAWAMURA, Y.: *"Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch"*. Biotechnol. Bioeng., 17, 260-265 (1985).
- FUJII, M.; HOMMA, T. Y TANIGUSHI, M.: *"Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules"*. Biotechnol. Bioeng., 32, 910-915 (1988).
- FULLBROOK, P.D.: *"The enzymic production of glucose syrup"*. En: Glucose syrup: Science and Technology. 65-115. S.Z. Dziedzic y M.W. Kearsley, Elsevier Applied Publishers, 65-115 (1984).
- GEHLAWAT, J.K.: *"High fructose syrups as a substitute for sugars"*. J. Sci. Ind. Res., 50 (4), 289-300 (1991).
- GONZALEZ TELLO, P. ; CAMACHO RUBIO, F. y ROBLES MEDINA, A.: *"Hidrolizados enzimáticos de interés en la I.A.A. 1- Hidrolizados de cereales"*. Alim. Equip. Tecnol. 201-207 (1989).
- GONZALEZ TELLO, P.; CAMACHO, R.F.; JURADO, A. E. y SANCHEZ, R.R.: *"Cinética de la hidrólisis del almidón soluble con glucoamilasa"*. Anales de Química, 86, 728-732, (1990).
- GUADIX ESCOBAR, E.M.: Tesis Doctoral. Universidad de Granada (1992).

-
- GRUEGER, A. y GRUEGER, W.: *Biotechnol.*, **6**, 423-435. Ed: K. Kieslich Verlagchemie (1984).
 - HAKKARAIENEN, L. y LINKO, P.: "*State vector model for conth erm scraped surface heat exchanger used an enzyme reactor in wheat starch conversion*". *J. Food Eng.*, **4**, 135-53 (1985).
 - HANSEN, T.T.: "*New approaches to research on cereal carbohydrates*". 211-214. Ed: R.D. Hill y L. Munck. Elsevier Science Publishers, B.V. Amesterdam (1985).
 - HENDERSON, W.E. Y TEAGUE, W.M.: "*A kinetic model of Bacillus stearothermophilus α -amylase under process conditions*". *Starch*, **40**, 412-18 (1988).
 - HENRIKSNAS, H. y LOVGREN, T.: "*Chain-length distribution of strach hydrolyzed with and β -amylase action*". *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1303-1307 (1978).
 - HIZUKURI, S.: "*Polymodal distribution of the chain of amylo pectin and its signifiance*". *Carbohydr. Res.*, **147**, 342-347 (1986).
 - HOOVER, R.: "*Composition, structure, funcionality and chemical modification of legume starches*". *Can. J. Physiol.P harmacol.*, **69**, 79-92 (1991)
 - HOWLING, D.: En: "*Sugar, Science and Technology*". G.G Birch y K.J. Parker (Eds), Applied Science Publishers Ltd, London (1979).

- JHON, M. ; SCHMIDT, J. Y KNEIFEL, H.: "*Iodine maltosaccharine complexes: relation between chain lenght and coulour*". Carbohyd. Res., 119, 254-257 (1983).
- JOGLEKAR, R. ; CLERMAN, R.J. ; QUELETTE, R.P y CHERMISINOFF, P.N.: *Biotechnology in food Industry*. 73-97. Ed: Ann Arbor Science Publishers Ltd, London (1983).
- KEARSLEY, M.W.: EN: "*Glucose syrup. Science and technology*". Ed: Dziejdzic, S.W. y Kearsley, M.W. Elsevier Applied Publishers (1984).
- KLIBANOV, A.M.: Science, 219, 722 (1983).
- KLIBANOV, A.M.: Chemtech, 16, 354 (1986).
- KOMOLPRASERT, V. y OFOLI, R.Y.: "*Starch hydrolysis of Bacillus licheniformis α -amylase*". J. Chem. Tech. Biotechnol., 51, 209-223 (1991).
- KOREN, D.W. Y DURNJAK, Z.: "*Continuous production of fructose syrup and ethanol hydrolyzed Jerusalem artichoke juice*". J. Ind. Microbiol., 7, 131-135 (1991).
- KUSUNOKI, K.; KAWAKAMI, K.; SHIRAIISHI, F.; KATO, K. y KAI, M.: "A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase". Biotechnol. Bioeng., 24, 347 (1982).
- LEACH, S.A. ; AGALAMANYI, E.A y GREEN, R.M: En: "*Demineralization and remineralization of the teeth*". IRL Press , London, 51-73 (1983).



- LEE, Y.C. Y KIM, K.T.: "Gelatinization and liquefaction of starch with heat stable α -amylase". J. Food Sci., 55, 1365-1366, 1372 (1990).
- LELOUP, V. ; COLONNA, P. Y BULEON, A.: "Transformations enzymatiques des glucides". En: Biotransformations des produits céréaliers. Ed: Godon, B. Pub. Lavoisier, 79-128 (1990).
- LELOUP, V.: "Influence of amylose / amylopectin ratio on gel properties". J. Cereal Sc., 13 (1), 1-13 (1991).
- LENDERS, J.P y CHRICHTON, R.R.: "Chemical stabilization of glucoamylase from *Aspergillus niger* against inactivation". Biotechnol. Bioeng., 31, 267-277 (1988).
- LIGHT, J.M.: "Modified food starches: why, what, where and how". Cereal Foods World, 35, 1081-82, 1084-85, 1087-88, 1090-92 (1990).
- LINKO, P. ; COLONNA, P. Y MERCIER, C.: "HTST extrusion-cooking". En: Advances in cereal science and technology. Vol. IV, capít. 4, 145-231, Ed: Y. Pomeranz, A.A.C.C., USA (1981).
- LLOYD, N.E.: "Purification of aqueous glucose isomerase solutions". U.S Patent no. 4 567 142 Enero 28 (1986).
- LOPEZ SANTIN, J. ; SOLA, C. Y LEMA, J.M.: "Substrate and product inhibition significance in the kinetic of sucrose hydrolysis by invertase". Biotechnol. Bioeng., 24, 2741 (1981).

- MAC DONALD, M.: *"Uses of glucose syrup in the food industry"*. En: *Glucose syrup, Science and Technology*. Ed: S.Z. Dziedzic y M.W. Kearsley. Elsevier Applied Publishers, 247-263 (1984).
- MADGAVKAR, A.M.: *"A study of ultrafiltration membrane reactors in starch hydrolysis by solubilized and immobilized glucoamylase"*. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1719 (1977).
- MAC GREGOR, A.W. ; MAC GREGOR, E.A.; MARCHYLO, A. y WESELAKE, R.J.: *"The action of cereal α -amylases on solubilized starch and cereal granules"*. *Progress Biotechnol.*, 1, 149-160 (1985).
- MADSEN, G.B ; NORMAN, B.E y SLOTT, S.: *"A new bacterial amylase and its high temperature liquefaction"*. *Starch*, 25, 304-308 (1973).
- Male, M.: *"Les aliments diététiques de l'enfance"*. *Ind. Alim. Agric.*, 104, 825-828 (1985).
- MARC, A. Y ENGASSER, J.M.: *"A kinetic model of starch hydrolysis by α and β -amylase during mashing"*. *Bio technol. Bioeng.*, 25, 481-496 (19 83).
- MERCIER, C.: *"L'amidon et les enzymes en sucrochimie"*. *Ind. Alim. Agric.*, 99, 787-796 (1982).
- MERCIER, C.: *"Les enzymes amylolytiques"*. En: *Hydrolases et dépolymérasés*. Ed: Mouranche, A. y Costes, C.; Gauthier Villars, 109-142 (1985).
- MILES CATALOGUE: (1985).

- MORRIS, V.J.: *"Starch gelation and retrogradation"*. Trends Food Sci. Technol., 1, 2-6 (1990).
- Mousan, P. y Combes, D.: *"Applications of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions"*. Biotechnol Bioeng., 26, 347 (1984).
- MUEHLEMANN, H. y SCHMIDT, H.: *"Effect on rate carries of endogenous and exogenous hydrogen peroxyde"*. Swiss Patent no. 620 828 31 oct (1980).
- MUEHLEMANN, H. ; SAXER, P. y MASPOLI, R.A: *"Oral and dental treating agent"*. Eur. Pat. Appl. no. o 049 830 2 oct (1981).
- MUNCK, L. ; REXEN, F. y HAASTRUP, L.: *"Cereal starches within the European community: agricultural production, dry and wet milling and potential use in industry"*. Starch, 40/3, 81-87 (1988).
- NEBESNY, E.: *"Carbohydrate compositions and molecular structure of dextrans in enzymic high maltose syrup"*. Starch, 42 (11), 437-444 (1990).
- NOURI, MOHAMED: *"Interêt des techniques enzymatiques dans la production des sirops de glucose et de fructose"*. Ind. Alim. Agric., 108, 593-597 (1991).
- NOURI, MOHAMED: *"Catálisis ácida Vs hidrólisis enzimática en la industria almidonera: consideraciones cualitativas y energéticas"*. Alim. Equip. y Tecnol., 8, 141-145 (1991).
- NOVO INDUSTRI CATALOGUE: (1985).

- PASARI, A.B., KORUS, R.A. y HEIMSH, R.C.: "*Kinetics of the amylase system of Schwanniomyces castellii*". *Enzyme Microbil. Technol.* **10**, 156-160 (1988).
- PRUDHOMME, J.: "*Les enzymes en industries alimentaires*". *Ind. Alim. Agric.*, **99**, 851-853 (1982).
- PRENOSIL, J.E. ; STUKER, E. Y BOURNE, J.R.: "*Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: part 1: state of art*". *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1019-1025 (1987).
- RAM, A.K. Y VANKATASUBRAMANIAN, K.: "*Enhancement of starch conversion efficiency with free and immobilized pullulanase and α -1,4-glucosidase*". *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 355-369 (1982).
- Reilly, P.J.: "*Starch hydrolysis with soluble and immobilized glucoamylase*". 185-207. En: *Appl. Biochem. Bioeng.*, **2**, *Enzyme Technol.*, Ed: Wingard, L.B.; Katchalski, E.K. y Goldstein, L. Academic Press, London (1979). *Technol.*, **14**,
- REINIKAINEN, P.; SUORTTI, T.; OLKKU, J.; MALKKI, Y. y LINKO, P.: "*Extrusion-cooking in enzymatic liquefaction of wheat starch*". *Starch/stärke*, **38**, 20-26 (1986).
- ROLLINGS, J.E. Y THOMPSON, R.W.: "*Kinetic of enzymatic starch liquefaction: simulation of the high-molecular-weight product distribution*". *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1475-1484 (1984).
- ROSE, D. JR. Y ANDERSON, J.J.B.: "*Sweeteners in our society*". *World Rev. Nutr. Diet.*, **41**, 200-231. Ed: Kerger Basel (1983).

- SHIMASHITA, M.: *"Chemically modified starch"*. Denpum Kagaku, 38 (1), 55-63 (1991).
- SHIRAISHI, F.; KAWAKAMI, K. Y KUSUNOKI, K.: *"Kinetics of condensation of glucose into maltose and isomaltose in hydrolysis of starch by glucoamylase"*. Biotechnol. Bioeng., 27, 498-502 (1985).
- SICARD, P.J.: En: *"Nutritive Sweeteners"*. 145-170. Ed: G.G. Birch y K.J. Parker, Applied Science Publishers, London (1982).
- SLOMINSKA, L. Y STAROGARDZKA, G.: *"Studies on the application of maltogenic amylase in the production of maltose containing syrup"*. Starch, 38, 205-210 (1986).
- SOZABURO ONO; HIROMO, K. Y ZIMIBO, M.: *"Kinetic studies of glucoamylase (I) influence of chain lenght of linear substrates on the rate parameters"*. The Journal of Biochemistry, 55, 3 (1964).
- SREENATH, H.K. Y BEMILLER, J.: *"Effect of pullulanase and α -amylase on hydrolysis of waxy corn starch"*. Starch/stärke, 12, 482-486 (1990).
- STEVERSON, E.M.; KORUS, R.A.; WUDNEH, A. Y HEIMSC, R.C.: *"Kinetics of the amylase system of Saccharomyces fibuliger"*. Enzyme Microbiol. Technol., 6, 549-554 (1984).
- TEGGE, G. ; RICHTER, G. y RICHTER, C.: *"Optimization of the production of maltose syrups by different enzyme combinations"*. Starch, 38, 61-67 (1986).

- **TESTER, R.F.:** *"Swelling and gelatinization of cereal starches. I- Effect of amylose, amylopectin and lipids"*. Cereal Chem., **67**, 551-557 (1990).
- **THIBAUT, P.:** *"Les enzymes immobilisées: mise en oeuvre et applications"*. Ind. Alim. Agric., **101**, 885-889 (1984).
- **THURN, A. Y BLANSHARD, W.:** *"Heterogeneity in branching of amylopectin"*. Carbohydr. Polymers, **5**, 441-460 (1985).
- **TIAN, R. ; ZHANG, J. Y DUAN, M.:** *"Modification and conversion of starch"*. Kagaku sochi, **32**, 123-129 (1990).
- **UEDA, S.:** *"Fungal glucoamylase and raw starch digestion"*. Trends in Biochem. Sci., **3**, 89-93 (1981).
- **VALLAT, I. ; MOUSAN, P. Y RIBA, J.B.:** *"Maltodextrin hydrolysis in a fluidized bed immobilized enzyme reactor"*. Biotechnol. Bioeng., **28**, 151-159 (1986).
- **VERWAERDE, F. Y SICARD, P.J.:** *"Production of hydrogenated glucose syrups and some aspects of their use"*. En: Glucose syrups: Science and technology. 117-135. Ed: Dziejcz, S.Z. y Kearsley. M.W. Elsevier Appl. Science Publishers, Ltd (1984).
- **VIAN ORTUÑO, A.:** Curso de introducción a la química industrial, 402, Ed: Alhambra, Madrid (1970).
- **VISURI, K. Y KLIBANOV, A.:** *"Enzymatic production of HFCS containing 55% fructose in aqueous ethanol"*. Biotechnol. Bioeng., **30**, 917 (1987).

- WHELAN, W.J.J.; SMITH, E.E.; PARRISH, F.W.; BALL, D.H. Y ELWYN, T.: *"Actions of starch carbohydrases on chemically modified maltodextrins"*. Jap. Soc. Starch Sci., 23, 105-115 (1976).
- WILLIAMS, M.A.: *"Direct extrusion of convenience foods"*. Cereal Foods World, 22, 152-157 (1977).
- WOOTON, M. y CHAUDRY, M.A.: *"Gelatinization and in vitro digestibility of starch in backed products"*. J. Food Sci., 45, 1783-1787 (1980).
- YANKOV, D. ; DOBRIVA, E. ; BESHKOV, V. Y EMANUILOVA, E.: *"Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α -amylase"*. Enzyme Microbiol. Technol., 8, 663-667 (1986).
- ZELEZNAK, K.J. Y HOSENEY, R.C.: *"The glass transition in starch"*. Cereal Chem., 64, 121-124 (1987).
- ZOBEL, H.F.: *"Molecules to granules: a comprehensive starch review"*. Starch, 40, 44-50 (1988).