

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS DE HIDRÓLISIS ÁCIDA Y
ENZIMÁTICA DE BANANO (*MUSA CAVENDISH*) PARA LA OBTENCIÓN DE JARABE
DE GLUCOSA**

Carmen Elizabeth Rodríguez Reinoso

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención
del título de Ingeniería de Alimentos

Quito, Julio 2011

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS DE HIDRÓLISIS ÁCIDA Y
ENZIMÁTICA DE BANANO (*MUSA CAVENDISH*) PARA LA OBTENCIÓN DE JARABE
DE GLUCOSA**

Carmen Elizabeth Rodríguez Reinoso

Santacruz Terán Stalin Gustavo, Ph.D.

Director de Tesis y

Miembro del Comité de Tesis

Ramírez Cárdenas Lucía de los Ángeles, Ph.D.

Co-Directora de Tesis y

Miembro del Comité de Tesis

Garrido Espinoza Javier Alberto, MSc.

Coordinador de Ingeniería de Alimentos

Miembro del Comité de Tesis

Álvarez Bárbara Yamila, MSc.

Miembro del Comité de Tesis

Koziol Michael, Ph.D.

Decano del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición

Quito, Julio de 2011

© Derechos de autor
Carmen Elizabeth Rodríguez Reinoso
2011

Agradecimientos

Quiero expresar profundo agradecimiento a Stalin Santacruz y Lucía Ramírez, por su paciencia, tiempo y energía, a lo largo de todo este tiempo. ¡Muchas gracias son increíbles, sin su ayuda no lo hubiese logrado!

Gracias a todos los profesores del CAAN, por sus enseñanzas a lo largo de toda la carrera.

Manuel Chuquimarca y Jorge Gualotuña encargados de la planta piloto, gracias por todo y sobre todo por su paciencia en las interminables largas horas de espera en el autoclave.

A mi fantástica familia, por siempre creer en mí y motivarme a perseguir todos mis sueños y alcanzar mis metas. A Nicolás, por todo el apoyo a lo largo del camino.

A todos mis amigos gracias por su apoyo incondicional y por ser tan únicos y especiales.

Resumen

El presente trabajo demostró que, para elaborar jarabe de glucosa a partir de almidón de banano *Musa cavendish* se requiere utilizar banano en estado verde con un grado Brix máximo de 1.2. El proceso de hidrólisis ácida se evaluó haciendo un estudio del efecto de la temperatura y tiempo sobre el rendimiento del proceso así como de la cristalinidad del jarabe de glucosa. Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 2x3. Obteniéndose el mayor rendimiento (53.14%) al utilizar una temperatura de 120° C y 30min de hidrólisis. Este valor fue mucho menor que el obtenido a través de hidrólisis enzimática (90.14%). Respecto a la cristalinidad del jarabe de glucosa, se observó que los tratamientos más cristalinos fueron aquellos en los que se empleó menor tiempo y temperatura en el proceso de hidrólisis. La cristalinidad que se obtuvo con el método ácido fue mayor, que la que se obtuvo por medio del tratamiento enzimático. El análisis de cromatografía de permeación en gel (GPC) mostró que el jarabe de glucosa producto de la hidrólisis ácida tuvo un porcentaje aproximado de 46% en dextrinas de 11, 10 y 8 unidades de glucosa, mientras que el del proceso enzimático reveló alta pureza de glucosa.

Abstract

The following research shows that in order to obtain glucose syrup thorough the starch of banana *Musa cavendish*, is necessary to use fruits at a stage 2 of ripening (more green than yellow) and 1.2 Brix. This research evaluated the acid hydrolysis process in terms of yield and clearness in the final product; therefore it was necessary to study the influence of temperature and time in the rate of hydrolysis. The sample experimental plan was 2x3 with three replications each. The highest yield obtained thorough the acid process was 53.14%, it was necessary to use a temperature of 120°C and 30min of hydrolysis, which is lower than the yield obtained in the enzyme process. The clearness of the syrup was higher in the acid process than in the enzymatic process. The analysis of gel performance chromatography (GPC) showed that the glucose syrup in the acid process had 3 glucose polymers (11, 10, and 8) and a final component of glucose, meanwhile the enzyme process revealed high purity and yield of glucose.

Tabla de contenido

1.	Introducción	2
2.	Materiales y métodos	5
2.1	Preparación de la muestra de banano (<i>Musa cavendish</i>) para el proceso de hidrólisis ácida .	6
2.2	Análisis del sustrato y de la muestra de banano (<i>Musa cavendish</i>)	7
2.3	Cuantificación del almidón	7
2.4	Diseño experimental	8
2.5	Hidrólisis de la muestra de banano <i>Musa cavendish</i>	9
2.6	Cuantificación de glucosa en base a rendimiento	10
2.7	Determinación de cristalinidad a través de espectrofotometría	11
2.8	Cromatografía de permeación en gel	11
2.9	Determinación de carbohidratos a través del método Fenol-Acido sulfúrico.....	13
3.	Resultados y discusión	13
3.1	Determinación de grado de madurez en banano (<i>Musa cavendish</i>).....	13
3.2	Análisis del sustrato y de la muestra de banano (<i>Musa cavendish</i>)	15
3.3	Rendimiento.....	17
	En la Tabla 7, se resumen los datos obtenidos del rendimiento de los tratamientos analizados mediante ANOVA.	17
3.4	Cristalinidad (Absorbancia)	19
	En la Tabla 9, se resumen los datos obtenidos de cristalinidad de los tratamientos analizados mediante ANOVA.	19
3.5	Determinación de carbohidratos a través del método de Fenol-Acido Sulfúrico.....	20
3.6	Comparación de resultados obtenidos entre el método de hidrólisis ácida vs hidrólisis enzimática en la variable rendimiento	23
3.7	Comparación de resultados obtenidos entre el método de hidrólisis ácida vs hidrólisis enzimática en la variable cristalinidad.....	23
3.8	Análisis de las variables en el estudio.....	24
4.	Conclusiones	25
5.	Recomendaciones	27
6.	Bibliografía	28

Lista de Figuras

Tabla 1. Composición de la variedad de banano <i>Musa cavendish</i> por 100g de porción comestible	3
Tabla 2. Datos para realizar la Curva Patrón	8
Tabla 3. Tratamientos	9
Tabla 4. Determinación del índice de grados Brix del banano	15
Tabla 5. Composición del banano (base seca) Tabla 6. Composición del sustrato (base seca) ...	15
Tabla 7. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del Rendimiento en el proceso de hidrólisis ácida de los tratamientos	17
Tabla 8. Rendimiento de los tratamientos para el proceso de Hidrólisis Acida.....	18
Tabla 9. Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la Cristalinidad de los tratamientos en el proceso de Hidrólisis Acida	19
Tabla 10. Cristalinidad (Absorbancia $\lambda= 520\text{nm}$) de los tratamientos para el proceso de Hidrólisis Acida.....	20

1. Introducción

Cuando se habla de plátano o banano es importante mencionar las diferencias que existen entre ellos, ya que a pesar de que ambos pertenecen a la familia de las *Musáceas*, el plátano macho o para cocer pertenece a la variedad *Musa paradisiaca*, también conocida como “plátano de guisar o hartón”. Es más grande y menos dulce que el resto de variedades de su misma familia, siendo su peso el mayor, llegando hasta 200g o más cada unidad. La piel de esta variedad es gruesa y verdosa y su pulpa tiene un color blanco (Petryk, 2009).

El banano pertenece a la familia *Musa cavendish*, es originario de Vietnam y China, siendo la variedad de mayor consumo a nivel mundial (Castle Foods Tropical Fruit Exporters, 2009). Puede ser consumido directamente sin ningún tratamiento, su sabor es dulce, intenso y perfumado, tiene una forma algo curvada y alargada. Su peso oscila entre 100 y 120g por unidad. En estado maduro su pulpa es de color marfil y la piel es fina y amarilla, sin embargo cuando se vende en el mercado su piel es verde y luego se vuelve amarilla con la maduración (Petryk, 2009).

El hidrato de carbono que más predomina en el banano, es el almidón. Es un compuesto de almacenamiento, localizado en raíces, tubérculos, frutas y semillas de plantas. Está formado por, una mezcla de dos polisacáridos estructuralmente diferentes, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal formada por, 250 a 300 unidades de alfa-D-glucopiranosas enlazadas por uniones alfa-1,4. Mientras que la amilopectina es ramificada, constituida por 1000 a 3000 unidades de glucosa conectadas, por uniones alfa-1,4 y alfa-1,6, ésta última en los puntos de ramificación. A partir de este carbohidrato se obtienen distintos derivados, como la glucosa, las dextrinas y los almidones modificados, todos ellos son ampliamente utilizados en la

industria farmacéutica, textil, y alimentaria (Badui, 2006). En una dieta saludable, la mayor parte de energía es conseguida a partir del almidón y las unidades de glucosa en las cuales se hidroliza. Según la FAO, se calcula que anualmente se extraen 60 millones de toneladas de almidón de una gran variedad de cultivos; cereales, raíces, tubérculos, frutos, etc. El banano destaca por, su gran riqueza en hidratos de carbono de hasta un 21% (Méndez de la Cruz, 2010).

Flores-Gorosquera *et al.* (2004) al aislar diferentes muestras de almidón de banano en estado verde, encontraron que el contenido de almidón en base seca, en la fruta era de hasta 70%.

En la siguiente Tabla se presenta la composición del banano *Musa cavendish*.

Tabla 1. Composición de la variedad de banano *Musa cavendish* por 100g de porción comestible

Calorías: 87	Agua (g): 77,1
Grasa(g): 0,1	Hidratos de carbono totales(g): 21,1
Proteína(g): 0,9	Hidratos de carbono disponibles(g): 20,6
Ceniza(g): 0,8	Fibra dietética(g): 0,5
Vitamina C(mg): 11,2	Acido Fólico(µg): 20
Potasio (mg): 350	Magnesio (mg): 36,4

Fuente: FAO/LATINFOODS, 2002

El banano tipo cavendish, es el producto dentro del sector del banano que más exporta el Ecuador, con una participación del 94%. Otros tipos de banano fresco, representan el 2% de las exportaciones totales de banano. Los productos industrializados que han sido elaborados a base de banano, representan el 4% restante de las exportaciones del sector (MAGAP, 2010).

El banano es la segunda fuente de ingresos luego del petróleo (22,5% del total de las exportaciones nacionales) genera ingresos de \$701 millones de dólares anuales (MAGAP, 2010). Por lo tanto, el banano es un producto nacional de gran valor a nivel internacional. Es importante aprovechar el rechazo bananero (no apto para exportación), ya que constituye un recurso altamente subutilizado y relativamente barato. Debido al alto contenido de almidón, es una fuente potencial disponible para la producción de etanol, al igual que el maíz, yuca, melazas de caña, etc. (MAGAP, 2010). En los últimos años, la industria ecuatoriana ha importado cantidades significativas de glucosa y jarabe de glucosa de países como: Colombia y Estados Unidos (Banco Central del Ecuador, 2009).

El jarabe de glucosa, es uno de los productos más utilizados por la industria confitera y de alimentos procesados. En el caso de los helados, el jarabe de glucosa aporta textura, brillo y disminuye la temperatura de congelación (Revista I Alimentos, 2010).

En confitería, es utilizado como anticristalizante del azúcar, regulador del dulzor, generador de brillo, etc. En las carnes procesadas, incrementa el pardeamiento de la carne durante la cocción (Revista I Alimentos, 2010).

Uno de los principales métodos de producción de jarabe de glucosa antiguamente utilizado, consistía en calentar una solución de almidón a presión atmosférica por 36 horas con ácido sulfúrico (Schenck *et al.* 1992). En la actualidad no se utiliza ácido sulfúrico, porque en el producto terminado según Schenck *et al.* (1982) se forman sulfatos de calcio insolubles. El ácido sulfúrico fue rápidamente reemplazado por ácido clorhídrico, debido a que según Howling *et al.* (1992), el producto que se obtenía al final de la hidrólisis tenía buena apariencia, y podía ser utilizado en aplicaciones posteriores, por lo tanto el HCl presentaba menos complicaciones durante el procesamiento (Howling, 1992). Para el proceso de calentamiento se emplean intercambiadores de calor de tubo y carcasa. Las

temperaturas que se emplean son de 140°C y se obtienen jarabes de glucosa en pocos minutos (Schenck *et al.* 1992).

Un método muy utilizado en la producción de jarabes de glucosa es, la hidrólisis enzimática el que consiste en emplear alfa-amilasas, beta-amilasas y glucoamilasas, enzimas que se encargan de hidrolizar eficientemente al almidón (Howling, 1982). Los procesos industriales emplean en su mayoría éste método, debido a que es eficiente, evita la formación de precursores de color, lo cual otorga mayor estabilidad al producto, al mismo tiempo que se mejoran las condiciones organolépticas del jarabe (Howling, 1982).

Como se ha visto anteriormente, el banano es un importante recurso nacional que ha sido subutilizado, a pesar de que existen posibilidades de su aprovechamiento, en el desarrollo de productos de valor agregado, como los jarabes de glucosa. Es por ello que en el presente estudio, se realiza una comparación entre el método de hidrólisis ácida y enzimática, con el fin de evaluar el proceso que permita obtener un jarabe de glucosa con el más alto rendimiento y con las mejores características físicas y químicas.

2. Materiales y métodos

La variedad de banano que se utilizó fue *Musa cavendish*, la cual fue adquirida en el sector del Arenal en Tumbaco al noroccidente de la ciudad de Quito.

Para determinar el grado de madurez del banano *Musa cavendish*, se realizó una prueba de almacenamiento a 38 °C por 13 días, en los cuales se fueron midiendo los grados Brix, con un refractómetro marca ABBE (Método A.O.A.C 20.016), de una misma muestra de banano.

Todos los reactivos que se emplearon en la caracterización de la materia prima, fueron de grado analítico.

2.1 Preparación de la muestra de banano (*Musa cavendish*) para el proceso de hidrólisis ácida

El banano fue pelado manualmente y colocado en agua potable en proporción (1:1) (p/v). Posteriormente, el banano fue desintegrado con licuadora industrial.

El banano triturado, fue colocado en recipientes plásticos de 10L de capacidad, donde el material fue mezclado con agua potable. El agua de lavado, contenía ácido cítrico al 0.3%, para evitar pardeamiento. Se realizaron alrededor de 6 lavados con agua potable, dejando reposar 15 horas entre lavado y lavado Cabrera *et al.* (2007). La suspensión obtenida, fue dejada en sedimentación por aproximadamente 15 horas, luego de lo cual el sobrenadante fue descartado, con el objetivo de eliminar los sólidos solubles. Los lavados se realizaron hasta que, el líquido de salida (sobrenadante) no presentó color alguno (ocasionado por el pardeamiento del banano). La tonalidad del agua fue utilizada como indicador de la ausencia de sólidos solubles. Por lo tanto para identificar la presencia del “indicador” se realizó lecturas de absorbancia ($\lambda = 635\text{nm}$) en el agua de lavado, tomando como referencia el agua pura. El material sedimentado fue centrifugado a 4600rpm durante 10 min (Centrifuga Centra GP 8/ Thermo IEC). A continuación se secó el material en un secador de bandejas a una temperatura constante de 45°C durante 48h. El sustrato ya seco, fue molido en un molino (4E Grinding Mill) y almacenado en bolsas plásticas para posteriores análisis.

2.2 Análisis del sustrato y de la muestra de banano (*Musa cavendish*)

En el banano y sustrato se realizó la determinación de proteína (Método Kjeldhal A.O.A.C 2.057), humedad (Método A.O.A.C 14.003), ceniza (Método A.O.A.C 14.006), grasa (Método A.O.A.C 7.062), cuantificación de almidón (Método de Goñi, et al., 2000), carbohidratos por diferencia, sólidos solubles (Método A.O.A.C 20.016), Determinación del grado de madurez según la escala de coloración establecida por Soto (1992).

2.3 Cuantificación del almidón

Se pesó 50 mg de sustrato en tubos de capacidad de 10 mL. Se añadió 3 mL de agua destilada y 3mL de KOH 4M, mezclándose y agitándose vigorosamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron aproximadamente 5.5 mL de HCl 2M y 3mL de tampón acetato sódico 0.4M, ajustándose el pH a 4.75. A la solución obtenida se adicionó 60 μ L de amilogucosidasa y se incubó a 60°C por 45minutos en baño maría con agitación. Luego de la incubación se centrifugó por 15 minutos a 4600 rpm. El precipitado se lavó con 10mL de agua destilada y se repitió la centrifugación en dos ocasiones. Los sobrenadantes recogidos, se aforaron a un volumen de 100mL. Se realizó una lectura de absorbancia a ($\lambda = 635\text{nm}$), la cual reflejó la formación de un complejo coloreado como resultado de la interacción entre el almidón y el yodo. Mediante una curva patrón, se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la concentración de glucosa. La curva se elaboró con diluciones del estándar de glucosa (0.1mg/mL) como se muestra en la Tabla 2. A partir de la concentración de glucosa (ug/ml) se calculó el

contenido de almidón en el sustrato de acuerdo a la siguiente fórmula, (Ecuación 1; Goñi, et al., 2000).

$$\%Almidon\ total = \frac{glucosa\ \mu\frac{g}{ml} \times Volumen \times Dilucion \times 100 \times 0.9}{1000 \times Peso\ de\ muestra\ seca\ (mg)}$$

Ecuación 1: Porcentaje de Almidón Total

Tabla 2. Datos para realizar la Curva Patrón

Concentración (mg glucosa/ mL)	Solución de glucosa (0.1 mg/mL) en mL	GOD (reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa)	Agua Destilada en mL
0	0	0.5	1.5
0.01	0.1	0.5	1.4
0.025	0.25	0.5	1.25
0.05	0.5	0.5	1
0.1	1	0.5	0.5
0.11	1.1	0.5	0.4
0.125	1.25	0.5	0.25
0.14	1.4	0.5	0.1

2.4 Diseño experimental

Con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura y el tiempo en la hidrólisis ácida, los tratamientos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial **2x3**, correspondiente a la combinación de dos factores, temperatura y tiempo con 2 y 3 niveles respectivamente, con 3 repeticiones.

Los factores fueron Factor A temperatura (110 y 120°C) y Factor B tiempo (10,20, 30 min).

Las variables de respuesta analizadas fueron: Rendimiento y Cristalinidad de glucosa. En la Tabla 3 se presentan los tratamientos

Tabla 3. Tratamientos

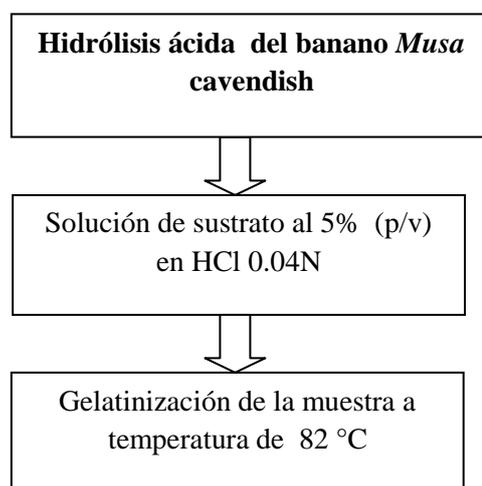
TRATAMIENTOS	
Tratamiento 1 (T1)	a_1b_1 (110°C-10min)
Tratamiento 2 (T2)	a_1b_2 (110°C-20min)
Tratamiento 3 (T3)	a_1b_3 (110°C-30min)
Tratamiento 4 (T4)	a_2b_1 (120°C-10min)
Tratamiento 5 (T5)	a_2b_2 (120°C-20min)
Tratamiento 6 (T6)	a_2b_3 (120°C-30min)

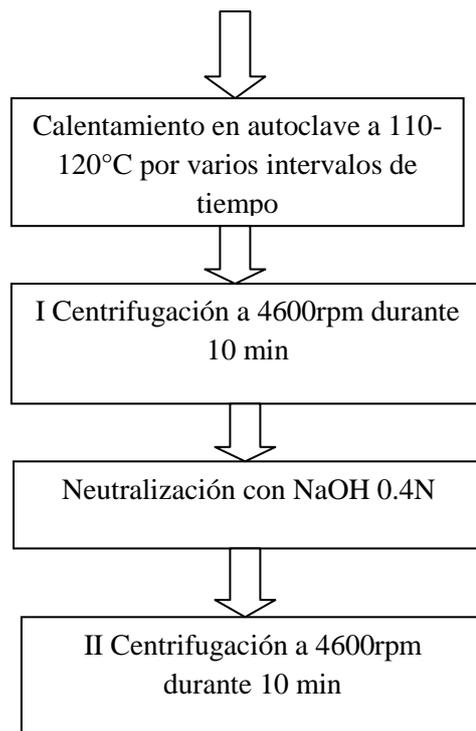
Los datos fueron interpretados por medio del análisis de varianza (ANOVA) de un factor y las medias fueron evaluadas por la prueba de Tukey al 5% de significancia.

2.5 Hidrólisis de la muestra de banano *Musa cavendish*

A continuación se presenta en la Figura 1, los pasos que se siguieron para realizar la hidrólisis ácida del banano *Musa cavendish*.

Figura 1. Proceso general de hidrólisis ácida del banano *Musa cavendish*





Con el objetivo de evitar sedimentación del sustrato en el proceso de autoclavado, fue necesario gelatinizar el almidón.

Paralelamente, la gelatinización del almidón permite obtener una estructura más desordenada, que puede ser fácilmente atacada por el ácido. El proceso de hidrólisis es bastante reproducible, siempre y cuando se mantengan constantes los parámetros de tiempo y temperatura (Howling, 1992).

2.6 Cuantificación de glucosa en base a rendimiento

La cantidad de glucosa obtenida, mediante la hidrólisis ácida, se cuantificó por el método de Fehling (Lane y Eynon, 1923).

2.7 Determinación de cristalinidad a través de espectrofotometría

La cristalinidad se determinó en base al método empleado por Quitiguiña y Santacruz (2010), en el cual se realizó lecturas de absorbancia a 520nm, en las muestras previamente hidrolizadas con ácido.

La relación que existe entre absorbancia y cristalinidad es inversa, es decir a mayor absorbancia, menor cristalinidad y viceversa (Skoog, 2001).

2.8 Cromatografía de permeación en gel

El análisis de cromatografía de permeación en gel se realizó en las muestras de mejor rendimiento (T6 120°-30min) y cristalinidad (T1 110°-10min) de la hidrólisis ácida. Biliaderis *et al.* (2000) fue el método a través del cual se realizó la determinación, se utilizó una columna de 1.17m de largo y 1cm de diámetro, empacada con el gel Sepharosa CL-6B (Sigma- Aldrich). Como fase móvil se utilizó KOH 0.25M, con un flujo de 21mL/h. Se inyectó 5mL de muestra al 1.25% (p/v) y se recogió alícuotas cada 15 min durante 9 horas.

En las Figuras 2 y 3 se indica los tiempos de elución de D-Maltosa y Maltoheptaosa respectivamente, estos gráficos fueron utilizados como estándares para identificar en base a los tiempos de elución, el número de unidades de glucosa de las dextrinas resultantes del análisis de cromatografía de permeación en gel de la hidrólisis ácida.

Figura 2. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) D-Maltosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharosa CL-6B (Quitiguiña, 2010).

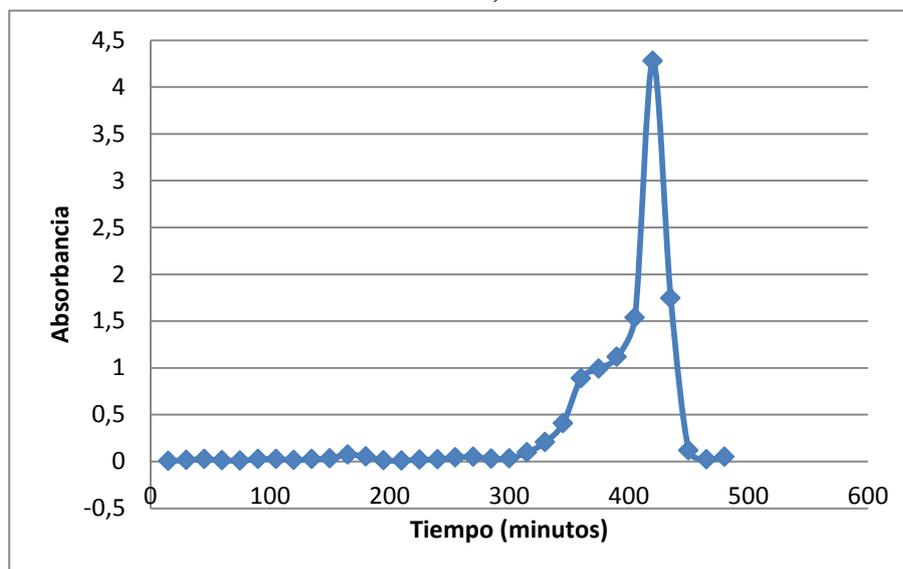
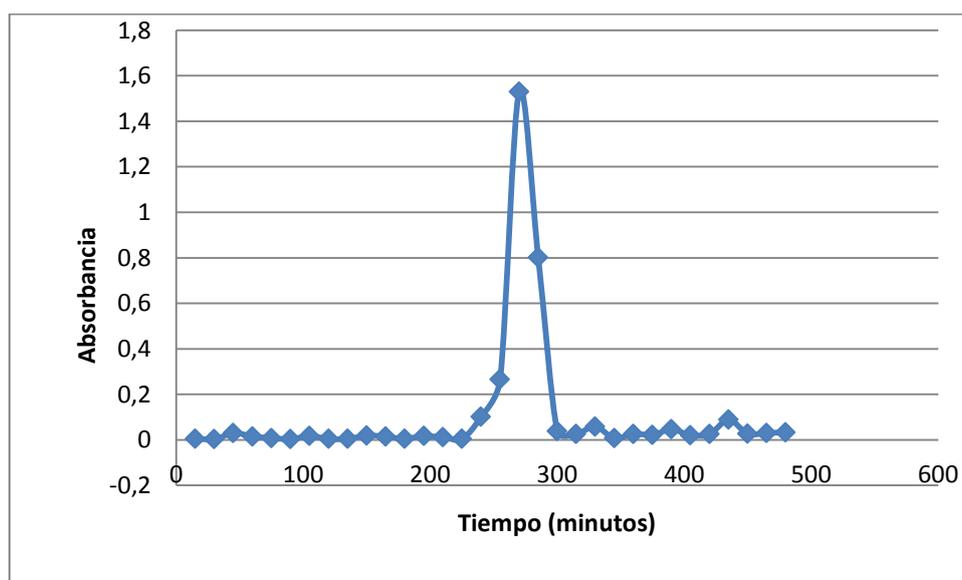


Figura 3. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) Maltoheptaosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharosa CL-6B (Quitiguiña, 2010).



2.9 Determinación de carbohidratos a través del método Fenol-

Acido sulfúrico

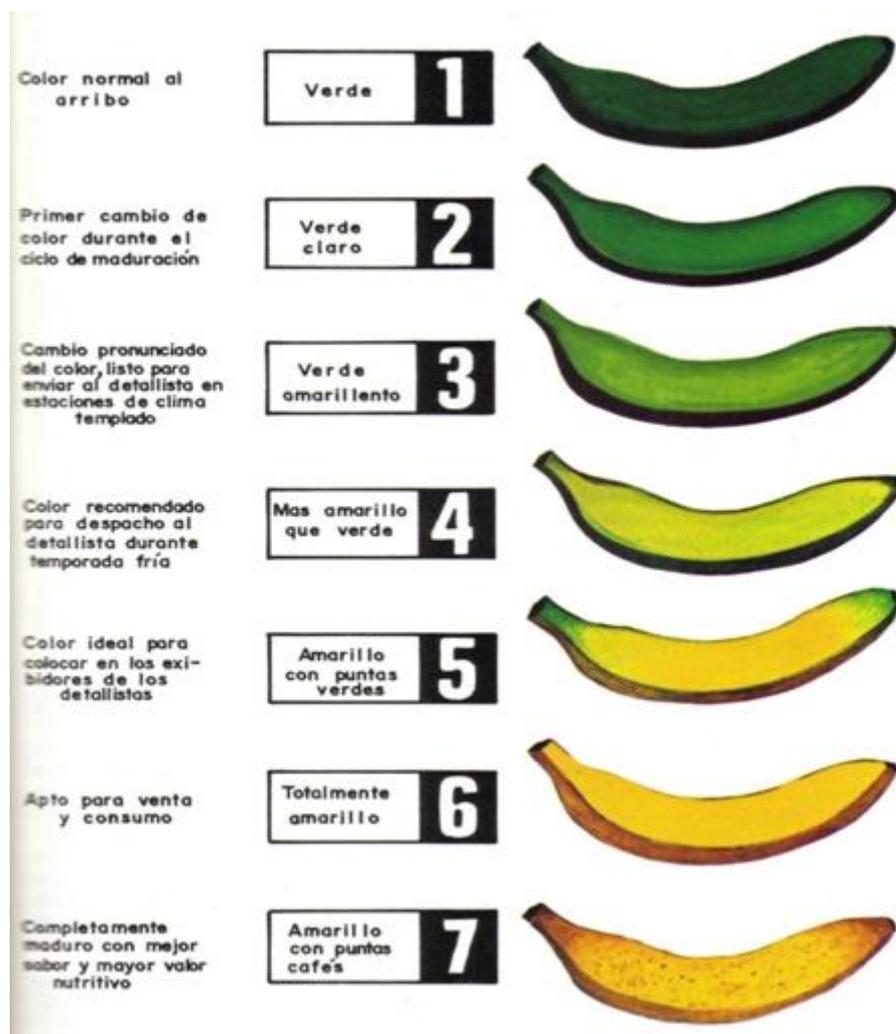
La determinación de carbohidratos se realizó en las alícuotas que se recogieron de las muestras de mejor rendimiento y cristalinidad de la hidrólisis ácida. El método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, 1956) fue el procedimiento a través del cual se realizó ésta determinación. Se colocó 0.5mL de muestra proveniente del análisis de cromatografía de permeación en gel, en un tubo de ensayo se adicionó 0.25mL de fenol al 5% y 1.25mL de H₂SO₄ concentrado. Se agitó los tubos en un vórtex para mezclar y capturar los residuos de ácido sulfúrico que podrían haber quedado en las paredes del tubo. Se dejó reposar las muestras por aproximadamente 15min, para luego leer su absorbancia a ($\lambda=492\text{nm}$). Por medio de las lecturas de absorbancia se determinó el perfil de elución de las muestras.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de grado de madurez en banano (Musa cavendish)

El banano óptimo a utilizarse fue el que tenía como máximo 1.2 de grados Brix. Este banano se encontraba en un grado de maduración 2 (Figura 4), según la escala de coloración establecida por Soto (1992).

Figura 4. Escala de Madurez del banano *Musa cavendish*



Fuente: Soto, 1992

Los grados Brix (Tabla 4) indican los sólidos solubles, presentes en una muestra. A medida que avanza el proceso de maduración, el almidón se hidroliza dando lugar a la formación de azúcares. Por lo tanto, un valor bajo de grados Brix indica una mayor cantidad de almidón presente. Es importante que los análisis de madurez en el banano *Musa cavendish* se realicen dentro los 6 primeros días posteriores a la compra, debido a que a partir del 7 día el valor de grados Brix se incrementa, lo que ocasionaría que el almidón se hidrolice y exista mayor presencia de azúcares, con lo cual el banano no sería un sustrato útil en el proceso de hidrólisis.

Tabla 4. Determinación del índice de grados Brix del banano

Días	Grados Brix
Día 1	1.2
Día 2	1.2
Día 3	1.2
Día 6	1.2
Día 7	1.4
Día 8	1.7
Día 9	2.2
Día 13	7.4

3.2 Análisis del sustrato y de la muestra de banano (*Musa cavendish*)

Tabla 5. Composición del banano (base seca)

Constituyente	g/100g
Grasa	1.92
Cenizas	3.76
Proteína	5
CHO Totales	89.32

*La humedad en el banano es 74 g/100

**La humedad en el sustrato es 13.10g

Tabla 6. Composición del sustrato (base seca)

Constituyente	g/ 100g
Grasa	1.23
Cenizas	0.34
Proteína	2.32
CHO Totales	95.53
Almidón	46.52

En la Tabla 5 se muestra la composición en base seca del banano. La composición del banano en proteína y ceniza fue 5g y 3.76g muy similar a 5.62g y 3.31g valores reportados por Lii *et al.* (1982), el contenido de grasa fue de 1.92g, el cual fue mayor que 0.84g reportado por Cabrera *et al.* (2004), y 0.80g por Lii *et al.* (1982). Según Romojaro *et al.* (2003), ésta diferencia se debe a la influencia de los factores ambientales (clima, naturaleza del suelo, intensidad y calidad de la luz, temperatura a la que el cultivo está expuesto, cantidad de CO₂ en el ambiente), genéticos de la fruta (variedad), y fisiológicos (estado de madurez en la recolección).

Este conjunto de factores provocan modificaciones en el contenido de proteína o ácidos grasos. Dentro de éste estudio se menciona que estos factores también pueden ocasionar un incremento o inhibición en el proceso de maduración en el banano y calabaza (Romojaro *et al.* 2003).

En la Tabla 6 se presenta la composición del sustrato (polvo de banano). Se obtuvo 1.23g de grasa el cual fue menor comparado con 2.45g y 2.31g reportados en Soto Azurduy, (2010) y en González-Soto *et al.* (2010) respectivamente. El valor de proteína en el sustrato fue 2.32g, valor menor a 3.32 obtenido por Soto Azurduy, (2010). La cantidad de ceniza en el sustrato fue 0.34g, valor similar a 0.45g en González-Soto *et al.* (2010). Por lo tanto a pesar de que el sustrato provenga de la misma variedad, su composición variará debido a los métodos de análisis empleados, a las diferencias intrínsecas de las mismas, y a los factores externos previamente mencionados.

La diferencia entre la Tabla 5 y 6 en los valores de grasa (1.92 - 1.23) y proteína (5 - 2.32) pudo ser porque, en la elaboración del sustrato se realizó varios lavados al banano con el objetivo de concentrar el almidón, por lo que pudieron darse pérdidas por lixiviación.

Adicionalmente para preparar el sustrato (polvo de banano) se centrifugó la muestra, al aplicar un fuerte campo centrífugo el almidón pudo haberse sedimentado con facilidad mientras que componentes como fibra, proteína, impurezas y demás componentes de menor densidad pudieron convertirse en sobrenadante y ser eliminados (International Starch Institute, 2002).

De acuerdo a Bello-Pérez *et al.* (1999), el elevado contenido de potasio en la fruta pudiese ser responsable por el elevado contenido de ceniza que se encontró en el banano 3.76g (Tabla 5). Al ser un macromineral soluble en agua pudo haberse eliminado a través de los lavados y centrifugación cuando se preparó el sustrato.

3.3 Rendimiento

En la Tabla 7, se resumen los datos obtenidos del rendimiento de los tratamientos analizados mediante ANOVA.

Tabla 7. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del Rendimiento en el proceso de hidrólisis ácida de los tratamientos

Fuentes	GL	SC	CM	F calculada	F crítica al 1%
TOTAL	17	3639.2	214.071	125.924	
TRATAMIENTOS	5	3618.8	723.76	425.741**	5.06
A (Temperatura)	1	3237.42	3237.42	1904.36**	9.73
B (Tiempo)	2	320.2	160.1	94.176**	6.93
Interacción AxB	2	61.18	30.59	17.99**	6.93
ERROR E	12	20.4	<u>1.7</u>		

** Significativo al 1% de probabilidad por la prueba F.

De acuerdo al análisis de ANOVA, si existe diferencia significativa de rendimiento entre los tratamientos. El rendimiento depende tanto del factor A (Temperatura), como de B (Tiempo). Con la determinación de la significación para la interacción se establece que los factores bajo estudio se complementarían para producir un efecto sobre el rendimiento en el proceso de hidrólisis ácida de los tratamientos.

En la Tabla 8 se presenta el porcentaje (%) de rendimiento de los tratamientos.

Tabla 8. Rendimiento de los tratamientos para el proceso de Hidrólisis Ácida

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (%)
1. (a ₂ b ₃) 120° – 30minutos (T6)	<u>53.14</u> a
2. (a ₂ b ₂) 120°- 20 minutos (T5)	<u>41.69</u> b
3. (a ₂ b ₁) 120°- 10 minutos (T4)	<u>39.42</u> b
4. (a ₁ b ₃) 110°-30minutos (T3)	<u>21.11</u> c
5. (a ₁ b ₂) 110°-20minutos (T2)	<u>17.71</u> cd
6. (a ₁ b ₁) 110°-10minutos (T1)	<u>14.97</u> d

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 1% de probabilidad por el test de Tukey.

El tratamiento con mejor rendimiento fue T6 (120°-30minutos) en el que se obtuvo 53.14%, éste mostró ser significativamente diferente al resto de tratamientos. No existe diferencia significativa entre T4-T5, T2-T3 ni entre T1 y T2. Los tratamientos con menor rendimiento fueron T1 y T2 en los que se obtuvo un rendimiento de 14.97% y 17.71% respectivamente.

Con hidrólisis ácida se obtuvo rendimientos en el rango de 14.97-53.14%. Siendo este resultado menor al obtenido mediante hidrólisis enzimática, en el cual el rango fue de 70.70-90.14% (Quitiguiña y Santacruz, 2010).

3.4 Cristalinidad (Absorbancia)

En la Tabla 9, se resumen los datos obtenidos de cristalinidad de los tratamientos analizados mediante ANOVA.

Tabla 9. Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) de la Cristalinidad de los tratamientos en el proceso de Hidrólisis Ácida

Fuentes	GL	SC	CM	F calculada	F crítica 1%	F crítica 5%
TOTAL	17	0.02114	0.001244	24.88		
TRATAMIENTOS	5	0.020535	0.004107	82.14 **	5.06	
A (Temperatura)	1	0.015485	0.015485	309.7 **	9.33	
B (Tiempo)	2	0.004371	0.002186	43.72 **	6.93	
Interacción AxB	2	0.000679	0.00034	6.8 *		3.88
ERROR E	12	0.000605	<u>0.00005</u>			

** Significativo al 1% de probabilidad para la prueba F.

*Significativo al 5% para la prueba F.

De acuerdo al análisis de ANOVA, si existió diferencia significativa entre los tratamientos para la variable cristalinidad. Se observa que el factor A (Temperatura), y el factor B (Tiempo) influyeron significativamente en la cristalinidad de los tratamientos. Con la determinación de la significación estadística para la interacción se establece que los factores bajo estudio se complementarían para producir un efecto sobre la cristalinidad en la hidrólisis ácida.

En la Tabla 10 se muestra la cristalinidad de los tratamientos.

Tabla 10. Cristalinidad (Absorbancia $\lambda= 520\text{nm}$) de los tratamientos para el proceso de Hidrólisis Ácida

TRATAMIENTO		ABSORBANCIA
1.	(a ₂ b ₃) 120° – 30minutos (T6)	0.60 a
2.	(a ₂ b ₂) 120°- 20 minutos (T5)	0.58 ab
3.	(a ₂ b ₁) 120°- 10 minutos (T4)	0.57 bc
4.	(a ₁ b ₃) 110°-30minutos (T3)	0.55 c
5.	(a ₁ b ₂) 110°-20minutos (T2)	0.51 d
6.	(a ₁ b ₁) 110°-10minutos (T1)	0.50 d

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 1% de probabilidad por el test de Tukey.

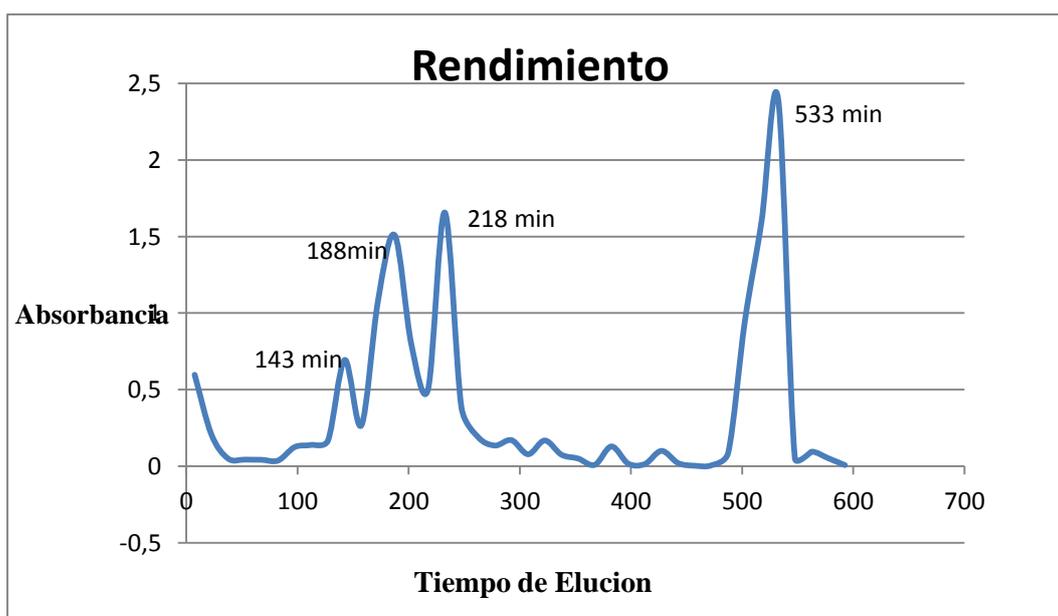
Los tratamientos T6-T5, T5-T4, T4-T3 y T2-T1 son iguales estadísticamente entre sí, Los de mayor absorbancia fueron T6, T5, T4 y T3, los de menor absorbancia fueron T1 y T2. Consecuentemente T6 y T5 fueron los menos cristalinos (más opaco) y T1 y T2 los más cristalinos, por lo tanto fueron los mejores tratamientos. En estas unidades experimentales, se manejó tiempos y temperaturas menos drásticas, que con el resto de tratamientos. Los factores mencionados anteriormente (temperatura y tiempo), ejercieron influencia directa en la cristalinidad del producto final.

3.5 Determinación de carbohidratos a través del método de Fenol-Ácido Sulfúrico

Con el objetivo de determinar el perfil de elución de las diferentes fracciones de polímeros de glucosa obtenidos en la hidrólisis ácida (Figuras 6 y 7) se utilizó el análisis de cromatografía de permeación en gel conjuntamente con el análisis de carbohidratos (Dubois, 1956). En la Figura 6, se muestra el perfil de elución para el

tratamiento ácido con mayor rendimiento de jarabe de glucosa (53.14%). Este valor es menor que el obtenido mediante hidrólisis enzimática. El pico a 143 minutos de elución corresponde a un polímero de 11 unidades de glucosa, seguido de dos picos a tiempos de elución de 188 y 218 minutos que corresponden a polímeros de 10 y 8 unidades de glucosa respectivamente. Finalmente se tiene un pico a 533 minutos que corresponde a glucosa. Este último, tiene mayor tamaño lo que indica presencia de glucosa en mayor cantidad en relación con los demás compuestos.

Figura 6. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) para el almidón de banano verde hidrolizado vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharosa CL-6B. Tratamiento con mayor rendimiento.

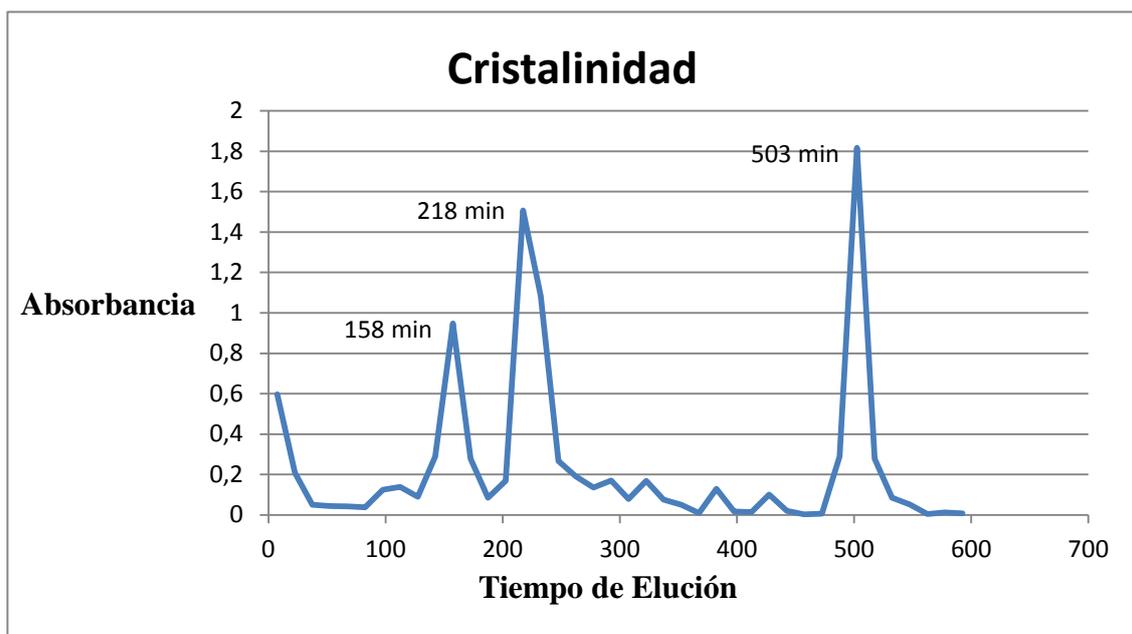


En la Figura 7 se muestra los picos obtenidos a través de las lecturas de absorbancia, de la muestra de banano con mayor cristalinidad. Para ésta variable se obtuvieron dos tratamientos de mayor cristalinidad T1 (110°-10minutos) y T2 (110°-20minutos), al ser ambos estadísticamente idénticos, cualquiera de los podía ser empleado en esta

determinación. El tratamiento escogido fue T1 debido a que se utilizó menor tiempo, lo cual hace que sea más conveniente desde el punto de vista económico.

El pico a aproximadamente 158 minutos de elución corresponde a un polímero de 11 unidades de glucosa, seguido de dos picos a tiempos de elución de 218 y 503 minutos que corresponden a polímeros de 8 y de glucosa respectivamente.

Figura 7. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) para el almidón de banano verde hidrolizado vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharosa CL-6B. Tratamiento con mayor cristalinidad.



Si se observa la Figura 6, se notará que existen 4 picos, en comparación con los tres presentes en la Figura 7. La ausencia del pico a los 188 minutos de elución en la Figura 7, pudo deberse al menor tiempo y temperatura en el proceso de hidrólisis. Lo cual pudo dar como resultado, un menor proceso de hidrólisis.

3.6 Comparación de resultados obtenidos entre el método de hidrólisis ácida vs hidrólisis enzimática en la variable rendimiento

En el proceso ácido se obtuvo un rango de rendimiento de 14.97- 53.14%, mientras que en el método enzimático los valores fueron de 70.70-90.14%. En la Figura 6 se puede observar un pico de mayor superficie a los 533 minutos de elución, que corrobora el rendimiento de 53.14% de glucosa citado anteriormente. El análisis de cromatografía de permeación en gel del producto de hidrólisis enzimática no se realizó, porque en este proceso se alcanzó un alto rendimiento de glucosa en base a almidón por lo tanto, fue bastante claro que la glucosa fue el compuesto predominante.

3.7 Comparación de resultados obtenidos entre el método de hidrólisis ácida vs hidrólisis enzimática en la variable cristalinidad

En la hidrólisis ácida se obtuvo un rango de absorbancia de 0.50-0.60, por lo tanto se determinó que T1 y T2 eran los mejores tratamientos, los valores de absorbancia fueron 0.50 y 0.51 respectivamente. Ambos tuvieron los valores de absorbancia más bajos en relación con los demás tratamientos. Cualquiera de los dos podían ser utilizados debido a que, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. En el proceso enzimático el rango de absorbancia fue desde 2.71-2.90 todos los tratamientos eran iguales entre sí, por tanto la cristalinidad de los

tratamientos en la hidrólisis enzimática fue menor, que la de los obtenidos por hidrólisis ácida.

3.8 Análisis de las variables en el estudio

Entre las dos variables que se analizaron en el presente trabajo (rendimiento y cristalinidad), la variable más representativa y de mayor importancia desde el punto de vista económico e industrial, fue el rendimiento, debido a que las impurezas que impiden la cristalinidad del producto final, podrían ser removidas a través de tratamientos posteriores. El hidrolizado podría ser clarificado con carbón activado, mediante filtración utilizando diatomeas o perlita como filtros, o a través de métodos de cromatografía de intercambio de iones (Lloyd y Nelson).

4. Conclusiones

Se pudo aprovechar un recurso nacional que ha sido subutilizado realizando un jarabe de glucosa a partir del banano *Musa cavendish*.

Al comparar el método enzimático con el ácido en la obtención de jarabe de glucosa, se observó que se obtuvo más rendimiento en el proceso enzimático que con el método ácido en el que se obtuvo mayor cristalinidad.

En el proceso ácido el rango de rendimiento en los seis tratamientos, fue desde 14.97 hasta 53.14%, siendo este último el valor más alto. Mientras que en el proceso enzimático los valores fueron desde 70.70 hasta 90.14%.

La relación que existe entre absorbancia y cristalinidad es inversa, es decir a mayor absorbancia, menor cristalinidad y viceversa. A través de lecturas de absorbancia se midió la cristalinidad, en hidrólisis ácida se obtuvo un rango de 0.50-0.60, siendo los tratamientos 1 (110°C-10min) y 2 (110°-20min) los más cristalinos y al no presentar una diferencia significativa el escogido fue T1, debido a que representaba un gasto de energía menor al emplear un tiempo de hidrólisis más corto. En el método enzimático, el rango de cristalinidad fue desde 2.71 hasta 2.90, estadísticamente todos los tratamientos fueron iguales, teniendo por lo tanto una cristalinidad menor a la obtenida por hidrólisis ácida. Consecuentemente la mayor cristalinidad se obtuvo en el proceso de hidrólisis ácida.

El coeficiente de variación (Error experimental) fue de 1.7% en la variable rendimiento y de 0.00005% para cristalinidad. Con lo que se demuestra que el proceso realizado a nivel de laboratorio se encuentra dentro del nivel de confianza establecido para análisis de laboratorio (5%).

El análisis de cromatografía de permeación en gel, reveló que el producto de la hidrólisis ácida tuvo cuatro componentes, esto es tres dextrinas de 11, 10, 8 unidades y un componente final que fue glucosa. No fue necesario realizar un análisis de cromatografía de permeación en gel en la hidrólisis enzimática debido a que se obtuvo rendimientos altos (desde 70.70 hasta 90.14%), puesto que el componente mayoritario en las muestras fue glucosa.

5. Recomendaciones

Realizar un estudio que combine el proceso ácido con el de hidrólisis enzimática.

Hacer un análisis de los costos de producción de jarabe de glucosa para definir la viabilidad o no del uso de enzimas.

Efectuar un refinamiento posterior, en el producto final con el objetivo de clarificar y mejorar las características del jarabe de glucosa.

En lugar de emplear un autoclave se debería utilizar intercambiadores de calor, con lo cual se obtendría jarabes de glucosa en pocos minutos, incrementando así el rendimiento y la eficiencia del proceso.

6. Bibliografía

Badui, Salvador. Química de los Alimentos. Ed. Pearson Adisson Wesley. Cuarta Edición. México, 2006.

“*Banano cavendish*”. Castle Foods Tropical Fruit Exporters. 7 julio, 2009
<http://www.castlefoods.ec/index.php/es/cavendish-banano>.

Biliaderis, C.G; Prokopowich, D.J.“Distribución de tamaño molecular de la amilopectina por filtración en gel. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (González-Soto, Mora-Escobedo y Humberto)para el desarrollo”. Manual de Métodos de caracterización de Carbohidratos. Graficas Guimar. Ecuador, 2000.

“Consulta de totales por Nandina- País (totales en miles) de importación de glucosa año 2007- 2008”. Banco Central del Ecuador. 29 junio, 2009
<http://www.bce.fin.ec/contenido.php?CNT=ARB0000203>

Dubois, M; Gilles, K.A; Hamilton J; Rebers, P and Smith “Método colorimétrico de fenol-sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales”. Química Analítica. 1956. 18 diciembre, 2010
<http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.2812CDP977/anexos.pdf>

Flores-G, E; García-Suárez, Francisco J; Flores-Huicochea, E; Núñez-Santiago, María C; Gonzales-Soto, Rosalía A y Bello-Pérez, Luis A. “Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (Musa

paradisiaca)”, Centro de desarrollo de productos bióticos del IPN. Morelos, México, 2004.

Goñi, I; García, L; Saura, F. “Cuantificación del almidón, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo”. Manual de Métodos de caracterización de Carbohidratos. Graficas Guimar. Ecuador, 2000.

González-Soto, Rosalía A; Mora-Escobedo, Rosalva; Hernández-Sánchez, Humberto; Bello-Pérez, Luis A. CEPROBI-IPN, ENCB. “Obtención y Caracterización de Almidón Resistente de Plátano (*Musa paradisiaca L*). Morelos, México, 2010.

Howling, David. “Glucose Syrup: Production, Properties, and Applications”. Cerestar UK Ltd. VCH Publishers. London, UK, 1992.

“La magia de los jarabes de maíz”. Revista I Alimentos. Edición 5. 18 diciembre, 2010

[http://www. revistaialimentos.com.co/ediciones/edicion5.htm](http://www.revistaialimentos.com.co/ediciones/edicion5.htm)

Lane, J.H y Eynon, L.J. “Determinación cuantitativa de azúcares reductores y totales”, Soc. Chem. Ind. 1923 (cit. en Quitiguiña, 2010).

Lloyd, Norman E y Nelson, William J. "Glucose and Fructose containing sweeteners from starch" 2nd ed. Academic Press. Connecticut, USA.

Méndez de la Cruz, Angela Elizabeth. "Evaluación de la extracción de almidón del banano verde (*Musa sapientum* variedad gran enano) producto de desecho de las industrias bananeras y evaluación de su función como excipiente en la formulación de comprimidos". Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONCYT. Proyecto FODECYT No. 059-2009. Guatemala, Junio, 2010. 18 diciembre, 2010.

<http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202009.59.pdf>.

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. 18 diciembre, 2010
<http://www.magap.gov.ec>

"Perfil del banano 2008". Centro de inteligencia comercial e información- CICO. CORPEL. 14 julio, 2009

<http://www.ecuadorexporta.org>

Petryk, Norberto. "Plátano/Banano". Origen y Variedades. 7 julio, 2009

<http://www.bitacoras.com/anotaciones/el-plátano-o-banana/16392189>

“Proyecto de Investigación precompetitiva XI.8 obtención y caracterización de carbohidratos para su aplicación en regímenes especiales”. Manual de métodos de caracterización de carbohidratos. Escuela Politécnica Nacional. Departamento de ciencia de alimentos y biotecnología. Quito-Ecuador. 2001.

Quitiguiña, Carla. “Obtención de Jarabe de Glucosa a Partir de la Hidrólisis Enzimática de Almidón de Banano *Musa cavendish*”. Tesis Ingeniería de Alimentos. 2010.

Schenck, Fred W; Hebeda, Ronald E. “Starch Hydrolysis Products: An Introduction and History”. Corn Products. VCH Publishers. London, UK, 1992.

Skoog, Douglas A. “Química Analítica”. Ed. Mc Graw Hill. Séptima Edición., México, 2003.

Soto Azurduy, Vania Soraya. “Cuantificación de Almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa cavendish*) y banana verde (*Musa paradisíaca*)”Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Cochabamba-Bolivia, 2010.

Soto, Moisés. “Bananos-Cultivo y Comercialización”. Litografía e Imprenta LIL, S.A. Segunda edición. Costa Rica, 1992.

“Tabla de Composición de Alimentos de América Latina”. FAO-LATINFOODS. 2002. 18 junio 2009

<http://www.rlc.fao.org/bases/alimento>

Zossi, Silvia; Navarro M. Eugenia; Sorol, Natalia; Sastre, Marcos y Ruiz, Marcelo. “Comparación de dos metodologías de determinación de almidón en azúcar”, Rev. Ind Agríc. Tucumán v. 85 n. 2. Las Talitas Jul-dic. 2008, Sao Paulo, Brasil (cit. en Quitiguiña, 2010).