

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Obtención De Jarabe de Glucosa A Partir De la Hidrólisis Enzimática de
Almidón De Banano *Musa Cavendish***

Carla Quitigüiña

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ing. en Alimentos

Resumen

El banano (*Musa Cavendish*) es una fruta que se produce en el Ecuador y una parte de su producción está siendo desechada. Por lo que en este trabajo se estudio la utilización de este recurso para la conversión de su almidón en jarabe de glucosa, por medio enzimático. Previo a la hidrólisis se preparó al sustrato mediante lavado y secado. El proceso de hidrólisis se realizó en dos etapas. En la primera se utilizó la enzima α -amilasa proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*; la cual permitió degradar el almidón hasta dextrinas. En esta etapa se realizaron pruebas para calcular el tiempo óptimo de hidrólisis, el cual fue de 2 horas. También se analizaron las dextrinas obtenidas mediante permeación en gel, obteniéndose dextrinas de 9, 10 y 11 unidades de glucosa. En la segunda etapa se utilizó la enzima amiloglucosidasa proveniente de *Aspergillus niger*. En esta etapa se realizó un diseño experimental completamente al azar con modelo factorial de 3^2 correspondiente a la combinación de tiempo y cantidad de enzima, con dos repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento y cristalinidad. El tratamiento recomendado fue de 1.5 mL de enzima y 14 horas de hidrólisis. Tratamiento que corresponde a un rendimiento de 90.14% y a una cristlinidad de 2.817.

Abstract

Banana (*Musa Cavendish*) is a fruit that takes place in Ecuador and a part of its production is being rejected. Reason for studying its utility in this project, like the conversion of its glucose syrup starch, by an enzymatic way. Previous to the hydrolysis needs to be prepared the substrate with a process of washing and drying the banana. The hydrolysis process was made in two stages. For the first hydrolysis the enzyme α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* was used; which allowed to degrade the starch until dextrins. In this stage some tests were made to calculate the optimal time for the hydrolysis, which was of 2 hours. Also dextrins obtained were analyzed by gel permeation, obtaining dextrins of 9, 10 and 11 glucose units. In the second stage the enzyme amiloglucosidasa from *Aspergillus Niger* was used. In this stage an experimental design was produced, this design was completely at random with factorial model of 3^2 , corresponding to the combination of time and amount of enzyme, with two repetitions. The studied variables were yield and cristalinity. The recommended treatment was of 1,5 mililiter of enzyme and 14 hours of hydrolysis. Treatment that corresponds to a yield of 90,14% and to a cristlinity of 2,817.

Tabla de Contenido

Introducción pags. 6-8

Materiales.....pag. 8

Métodos.....pags. 9

Discusiones y Resultados.....

Conclusiones

Bibliografía

Anexo 1.....

Lista de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1: Determinación del Índice de maduración mediante los grados Brix de banano

Tabla 2: Composición del banano (base seca)

Tabla 3: Composición del sustrato (base seca)

Tabla 4. Número unidades de glucosa y pesos moleculares de dextrinas obtenidas a partir de la hidrólisis de almidón de banano con alfa amilasa

Tabla 5. Tiempos y cantidades de enzima empleadas para la hidrólisis de dextrinas a jarabe de glucosa

Tabla 6: Resumen del análisis de Varianza (ANOVA) de la cristalinidad de los tratamientos

Tabla 7: Absorbancias ($\lambda=520$ nm) de jarabe de glucosa en varios tratamientos.

Tabla 8: Resumen del análisis de Varianza (ANOVA) del rendimiento de los tratamientos

Tabla 9: Rendimientos del jarabe de glucosa y prueba de Tukey (5%) de 9 tratamientos bajo diferentes combinaciones de amiloglucosidas y tiempo de hidrolisis.

Figuras

Figura 1. Absorbancia a $\lambda = 635$ nm del complejo almidón-yodo de muestras de banano verde sometidas a hidrólisis con α -amilasa

Figura 2. Absorbancia ($\lambda = 492$ nm) de almidón de banano verde hidrolizado vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B

Figura 3. Absorbancia ($\lambda = 492$ nm) de D-Maltosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B

Figura 4. Absorbancia ($\lambda = 492$ nm) de Maltoheptaosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B

Figura 5: Rendimientos promedio del jarabe de glucosa obtenidos a partir de almidón de banano para diferentes combinaciones enzima-tiempo

Obtención De Jarabe de Glucosa A Partir De la Hidrólisis Enzimática de Almidón De Banano *Musa Cavendish*

INTRODUCCIÓN

El banano es una fruta originaria de Asia la cual actualmente tiene gran capacidad de producción en países Sur y Centro Americanos. Los principales países productores de banano son Ecuador, Costa Rica, Filipinas y Colombia. Siendo Ecuador un país líder en las exportaciones de banano en el mundo, logrando un nivel de participación de alrededor de 30% frente al total de los países exportadores y con una exportación de 23449717 cajas mensuales (18.14 kg/caja). Lo cual convierte al banano en fuente básica del desarrollo económico en el país. (“Asociación de exportadores...”, 2010)

El maíz, el trigo y la papa son las principales fuentes de almidón usadas para propósitos industriales en el mundo (especialmente para las industrias de azúcar y alcohol) (Schenck y Hebeda, 1992). Siendo el banano un recurso de fácil acceso en nuestro país, el almidón obtenido a partir de este lo convierte en una alternativa más para ser usada en la industria.

A pesar de que el banano es usado para la exportación hay una parte de este que no reúne los requisitos mínimos para ser empacado y exportado, convirtiéndose en fruta de desecho. El banano de desecho con el cual se trabaja en este proyecto, presenta defectos graves o moderados (cicatrices, daño por insectos, dedos cortos, dedos deformes, lesiones por procesos, etc.) y se obtiene del saneamiento en la selección de las calidades mercadeables. La mayoría de esta fruta es destinada para el consumo fresco en los mercados locales y como fuente de materia prima en la industria. El porcentaje de la fruta desechada por la

selección depende de operaciones de cultivo, cuidados de la cosecha, condición ecológica imperante, y exigencias del mercado. Este porcentaje puede variar entre un 5 y 10 por ciento del total de fruta procesada (Soto, 1992), siendo alrededor de 510453.439 toneladas anuales (“Asociación de...”, 2010).

El almidón es un carbohidrato que posee dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. El primero se forma de largas cadenas lineales de entre 200 y 2500 unidades de glucosa y pesos moleculares de hasta un millón. Las cadenas lineales se forman de enlaces α -(1,4). La amilosa tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa. Por su parte la amilopectina contiene ramificaciones, con la forma molecular similar a un árbol cuyas ramas se unen por enlaces α -(1,6) localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa. El peso molecular de la amilopectina es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones. Generalmente los almidones tienen entre 17-27% de amilosa (Badui, 2006).

Los jarabes de glucosa son producto de la hidrólisis del almidón y todos estos son mezclas de polímeros de D-glucosa. Los jarabes de glucosa se usan de acuerdo a sus diversas concentraciones en varias industrias tales como: panadería, confitería, procesado de frutas, alimentos compuestos, bebidas alcohólicas, misceláneos, bebidas frías, etc. (Schenck y Hebeda, 1992).

Las reacciones para obtener jarabe de glucosa a partir del almidón pueden ser: Hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática en los últimos años ha desplazado a la hidrólisis ácida, debido a que se dispone de nuevas enzimas. La mayor parte de procesos que realizan hidrólisis de almidón usa un proceso enzimático. Esto se debe a las ventajas que ofrece el mismo, como lo es el control de la formación de productos no deseables.

Entre las enzimas que se usan para la hidrólisis del almidón se tienen la alfa-amilasa (α 1,4-D-Glucano-hidrolasa) que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa. El ataque se hace en forma no selectiva tipo endógeno sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, generando polímeros de 3 o más unidades de glucosa (Badui, 2006).

La amiloglucosidasa es una exohidrolasa (ataca la última unión glucosídica del extremo no reductor) también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y la amilopectina (Carrera, 2002).

En el Ecuador, según datos del Banco Central (“Análisis del mercado....”, 2003) no existe una producción nacional capaz de satisfacer la demanda requerida de glucosa, forzándose a importar ésta de diversas partes del mundo como Alemania e Italia. En consecuencia la investigación de nuevos recursos para la extracción de derivados del almidón, como lo es el jarabe de glucosa, es una necesidad prioritaria.

Por las razones antes expuestas el objetivo del presente trabajo es la obtención de jarabes de glucosa a partir de banano de desecho *Musa cavendish*.

MATERIALES

El banano utilizado fue de la variedad *Musa cavendish* fue comprado en el sector Tumbaco de la ciudad de Quito. El estado de maduración de este fue verde, en escala de 1 y 2 de acuerdo a Soto (1992).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

MÉTODOS

Selección del banano

Para saber el tiempo máximo de almacenamiento del banano comprado se realizó una prueba de almacenamiento a 38 °C por 13 días en los cuales se fue midiendo los grados Brix de una misma muestra de bananos.

Análisis proximal

Análisis de proteína por el método Kjeldhal (A.O.A.C 1930), Determinación de humedad (A.O.A.C, 1990), Determinación de ceniza (A.O.A.C, 1990), Determinación de grasa (A.O.A.C, 1990), Determinación de carbohidratos por diferencia.

Preparación del sustrato

El banano se pelo manualmente y se colocó en agua potable en proporción (1:1) con ácido cítrico al 0.3%, para luego proceder a desintegrarlo con una licuadora industrial a velocidad máxima. Al banano desintegrado se mezcló con agua potable en proporción (1:1) reposando hasta que los sólidos insolubles sedimentaran y eliminándose el sobrenadante. Se realizaron alrededor de 6 lavados con agua potable, dejando reposar de 9 a 15 horas entre lavado y lavado. El material sedimentado fue centrifugado por 10 minutos a 4600 rpm (centrífuga de piso GP8, Centra). El sedimento de la centrífuga se llevó a un secador de bandejas a 45 °C por alrededor de 48 horas. El sustrato ya seco fue molido en un molino (4E Grinding mil) y almacenado en bolsas plásticas para posteriores análisis.

Solubilización del almidón

Previo a las hidrólisis del banano se llevó el sustrato al 5% en agua p/p a una temperatura de 82°C con agitación constante y luego a un cocimiento en olla de presión por 5 minutos, con el fin de alcanzar la gelatinización y solubilización del almidón, es decir el dispersamiento de la amilosa y la amilopectina en la disolución, para facilitar la acción de las enzimas (Badui, 2006).

Hidrólisis de almidón

El proceso de hidrólisis se basó en Schenck y Hebeda (1992). Para la primera parte de este proceso se pesaron 25 g de sustrato a los cuales se les agregó 475g de agua. Se controló que el pH correspondiera al óptimo para la enzima, esto es de 5.5, luego de lo cual se llevó la suspensión a 82 °C con agitación constante. Una vez alcanzada esa temperatura, la solución se pasó a una olla de presión para su completa solubilización mediante calentamiento por 5 minutos. Después de esto la solución fue colocada a baño maría a una temperatura de 85°C, adicionandose 11 µL de enzima α -amilasa (α -amilasa proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*, Sigma) por un tiempo de dos horas con agitación.

El producto de la primera hidrólisis fue centrifugado por 15 minutos a 4600 rpm (centrífuga de piso GP8, Centra) y su sobrenadante se recolectó para iniciar la segunda hidrólisis. A este se le ajustó el pH con HCl 0.5N a un valor de 4.2 y la temperatura a 60°C. Seguidamente se agregó 1 mL de enzima (amiloglucosidasa proveniente de *Aspergillus niger*, Sigma) y se dejó incubar con agitación constante durante 14 horas. La solución obtenida se concentró

mediante evaporación en una plancha de calentamiento hasta llegar a una concentración de 50 °Brix.

Cuantificación de almidón

La cuantificación de almidón en el sustrato se la realizó de acuerdo a Goñi y col. (2000). Se pesaron 50 mg de sustrato en tubos de capacidad de 10 mL. Se añadieron 3 mL de agua destilada y 3mL de KOH 4M, luego de lo cual la solución se mezcló y agitó 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 le adicionaron 60µL 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 por dos ocasiones. Los sobrenadantes recogidos se aforaron a un volumen de 100mL. Para la determinación de glucosa en la solución obtenida se realizó una curva patrón mediante el empleo de estándares obtenidos a partir de la mezcla de solución de glucosa, GOD y agua destilada. Se midió la absorbancia a 500 nm y con este dato se procedió a usar la ecuación 1 para la determinación de almidón en el sustrato.

$$\%Almidon\ total = \frac{glucosa\ (\mu\frac{g}{ml}) \times Volumen \times Dilucion \times 100 \times 0.9}{1000 \times Peso\ de\ muestra\ seca\ (mg)} \quad (1)$$

Índice de absorción de yodo

Durante la primera hidrólisis se tomaron muestras cada 30 minutos para determinar el progreso de la hidrólisis y el tiempo óptimo para ésta.

Para determinar la presencia de almidón luego de la primera hidrólisis se procedió de acuerdo a (Zossi y col., 2008). De cada una de las muestras tomadas cada 30 minutos se tomo 1 mL, al cual se le agregó 1mL de solución de yodo (6g KI + 5g I₂ por cada 100 mL agua destilada) y 1 mL de agua destilada. A la solución resultante se le midió su absorbancia a 635 nm.

Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular se realizó de acuerdo a Biliaderis y col. (2000). Se empleó una columna de 1.17 m de largo y 1 cm de diámetro empacada con Sepharosa CL-6B (Sigma). La fase móvil fue KOH 0.25M con un flujo de 21mL/h. Se inyectaron 5mL de muestra al 1.25% (p/v) y se recogieron alícuotas cada 15 minutos durante 8 horas.

Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó mediante el método de Fenol-Acido Sulfúrico de acuerdo a Dubois (1956). Se tomaron 0.5mL de cada muestra proveniente de la columna, en tubos de ensayo. Se adicionaron 0.25 mL de solución de fenol al 5% y 1.25mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron los tubos en un vortex para mezclar y capturar restos de ácido que estuvieran en las paredes del tubo y se dejaron reposar los tubos por alrededor de 15 minutos en un baño de agua a 30°C. Finalmente se transfirió el contenido de los tubos a celdas para leer su absorbancia a 492 nm. Mediante la absorbancia se determinó los picos para las muestras de dextrinas, maltoheptaosa y maltosa.

Diseño Experimental

El diseño experimental empleado para la segunda hidrólisis fue completamente al azar con modelo factorial de 3^2 correspondiente a la combinación de dos factores (tiempo y cantidad de enzima) con tres niveles cada uno, con dos repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento y cristalinidad.

Los datos testados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias testadas mediante la prueba de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Selección del banano

El estado de madurez del banano es muy importante ya que este debe encontrarse en un grado de maduración de máximo 2 (Soto, 1992) para que su contenido de almidón sea mayor y pueda obtenerse un jarabe con un alto contenido de glucosa a través de la hidrólisis del almidón.

En base a los resultados presentes en la Tabla 1 se determinó que el banano óptimo a utilizarse era el que tenía como máximo, grados Brix de 1.2. Es decir que se podía usar el banano hasta el sexto día después de su compra. Este banano se encontraba en un grado de maduración 2 según lo determinado por Soto (1992) en cuanto a su coloración. Los grados Brix indican los sólidos solubles presentes en una muestra por lo tanto mientras menores sean estos mejores resultados se obtendrán ya que esto significa que la muestra de banano no ha madurado por lo tanto no posee azúcares los cuales son solubles y existe almidón para ser hidrolizado.

Tabla 1: Determinación del Índice de maduración mediante los grados Brix de banano

Días	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

Análisis del sustrato y del banano

El sustrato y el banano presentaron variaciones en su composición como se muestra en las Tablas 2 y 3 respectivamente. Se puede observar que los valores de ceniza del sustrato son bastante bajos en relación al banano que no ha sido sometido a procesos de lavado, siendo este un resultado positivo para el proceso de lavado. En cuanto a la proteína y grasa existe una variación entre sustrato y banano que puede deberse a pérdidas por los lavados en la preparación del sustrato. Y respecto a los carbohidratos se puede ver que se han concentrado, en el proceso de lavado y secado del banano siendo este mayor en el sustrato. Y donde el almidón corresponde a 69.78 g/100g.

Tabla 2: Composición del banano (base seca)

Constituyente	g/100g
Grasa	1.92
Cenizas	3.76
Proteína	5
CHO (Diferencia)	89.30

*Humedad de 74 g/100g

Tabla 3: Composición del sustrato (base seca)

Constituyente	g/ 100g
Grasa	0.53
Cenizas	0.30
Proteína	1.39
CHO (Diferencia)	84.07
Almidón	46.52

*Humedad de 13.71 g/100g

Cuantificación del Almidón

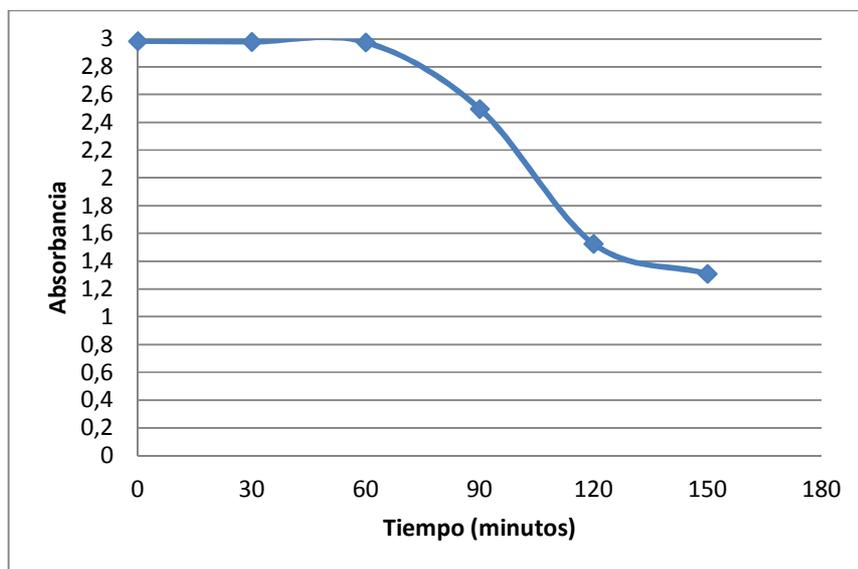
Siguiendo el procedimiento de Goñi y col. (2000) se gráfico la curva patrón y por regresión lineal se obtuvo los mg de glucosa para la muestra de sustrato analizada. Con los mg de glucosa y usando la ecuación 1 se determinó el porcentaje de almidón en el sustrato. El cual fue de 46.52% (Anexo 1). El porcentaje de almidón total obtenido fue del 46.52%, el cual es menor que los valores reportados en bibliografía de alrededor del 70% (Bello-Pérez y col, 2004). La diferencia entre estos dos valores, es decir 24% podría explicarse por la formación de almidón

resistente en el banano. Almidón resistente que resiste el ataque enzimático empleado en la cuantificación de almidón en el sustrato. Trabajos realizados anteriormente (Bello-Pérez y col., 2009; Faisant y col, 1995) reportan valores de almidón resistente de hasta el 43% para plátano macho (*Musa paradisiaca*) mientras que Pacheco y Delahaye (2002) reportan valores de almidón resistente de aproximadamente 15% para *Musa* spp. La información anterior corrobora el hecho de que en el presente trabajo se subestime el contenido de Almidón en el sustrato.

Primera reacción de hidrólisis. Reacción con alfa amilasa

Los resultados del índice de absorción de yodo (Figura 1) muestran que la absorbancia de las muestras sometidas a hidrólisis con α -amilasa permanecen constantes hasta 60 minutos después de haber iniciado la hidrólisis, luego de lo cual la absorbancia desciende hasta llegar a un valor asintótico a los 120 minutos de iniciada la reacción. La α -amilasa actúa de forma aleatoria en los enlaces α -(1-4) de la amilosa y la amilopectina, originando así dextrinas de 10 a 20 unidades de glucosa. Esta llega a romper las uniones glucosídicas adyacentes de ambos lados del enlace α -(1-6) de la amilopectina, pero no ataca específicamente este enlace (Badui, 2006). La absorbancia a 635 nm refleja la formación de un complejo coloreado resultante de la interacción entre el almidón y el yodo (Zossi y col., 2008). La menor absorbancia del producto hidrolizado por lo tanto refleja la menor presencia de almidón debido a que este ha sido degradado dando como resultado la formación de dextrinas. El valor asintótico de absorbancia a los 120 minutos indica que es el tiempo en el cual la mayor parte del almidón habrá sido hidrolizado a dextrinas por acción de la alfa amilasa.

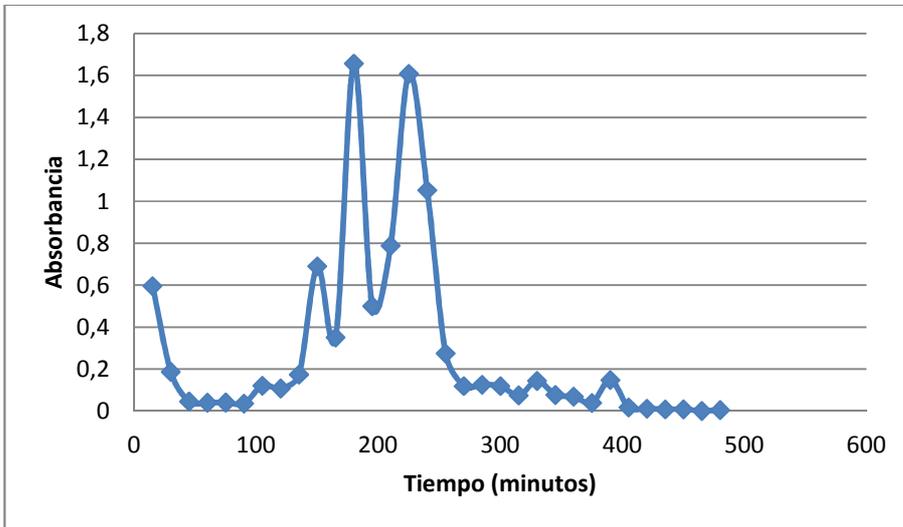
Figura 1. Absorbancia a $\lambda = 635$ nm del complejo almidón-yodo de muestras de banana verde sometidas a hidrólisis con α -amilasa



Determinación de tamaño molecular en dextrinas

La muestra resultante del tiempo óptimo de la primera hidrólisis, esto es 120 minutos, fue evaluada en su peso molecular mediante cromatografía de permeación en gel con el objeto de ver el tamaño de las dextrinas resultantes de la hidrólisis. La Figura 2 muestra 3 picos claramente identificados que eluyeron a los tiempos de 150, 180 y 225 minutos, correspondiendo a dextrinas de 3 tamaños diferentes.

Figura 2. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) de almidón de banano verde hidrolizado vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B



Con el objeto de determinar el tamaño de las dextrinas obtenidas se realizó la determinación de los tiempos de elución de D-Maltosa y Maltoheptaosa (Figuras 3 y 4) para la comparación de los mismos con los de las dextrinas y poder determinar su tamaño molecular.

Figura 3. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) de D-Maltosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B

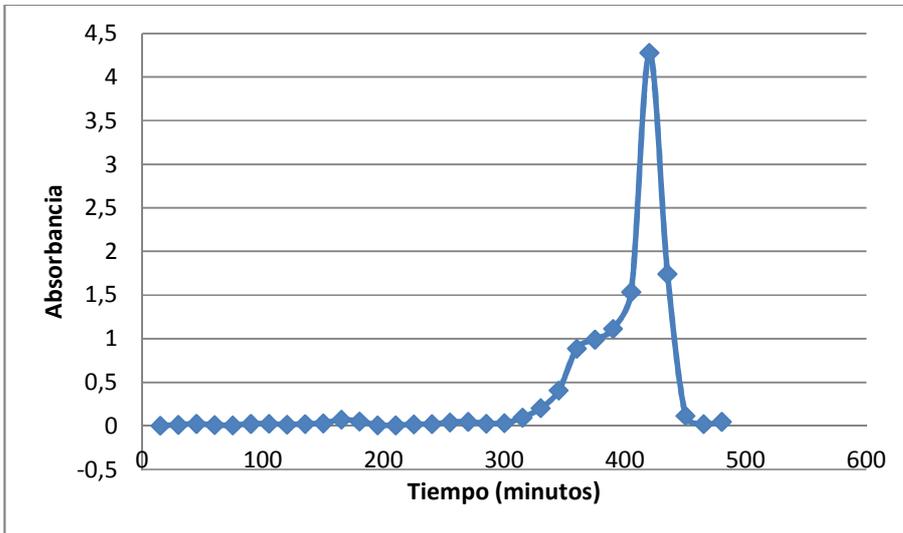
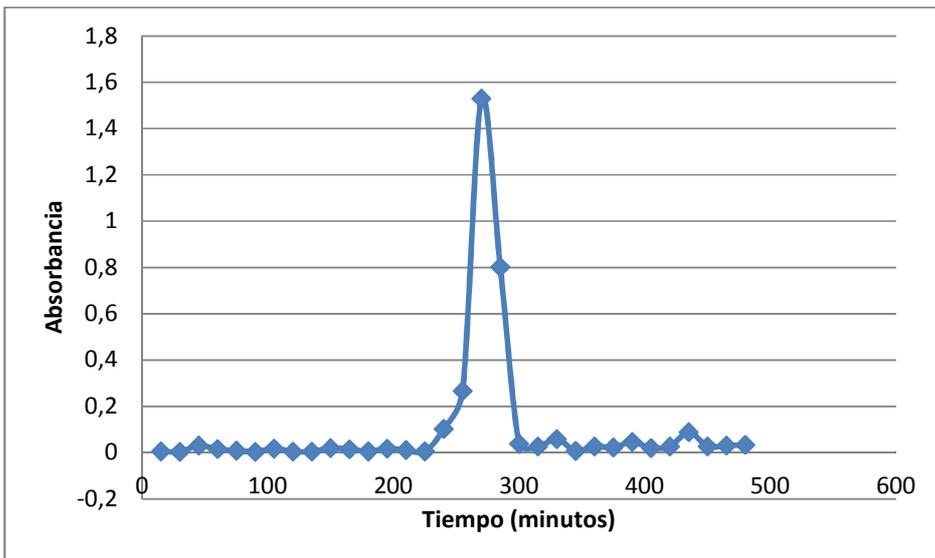


Figura 4. Absorbancia ($\lambda= 492\text{nm}$) de Maltoheptaosa vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B



En la Tabla 4 se puede ver el número de unidades de glucosa de las dextrinas obtenidas de la hidrólisis con alfa amilasa. De acuerdo a la Figura 2 y a los resultados de la Tabla 4 el producto resultante de la hidrólisis con alfa amilasa tiene una mayor cantidad de dextrinas de 11 unidades de glucosa y una menor cantidad de dextrinas de 9 unidades de glucosa con cantidad intermedia para las maltodextrinas de 10 unidades de glucosa.

Tabla 4. Número unidades de glucosa y pesos moleculares de dextrinas obtenidas a partir de la hidrólisis de almidón de banano con alfa amilasa

Tiempo de elución (minutos)	Número Unidades de Glucosa	Peso molecular (g/mol)
150	11	1980
180	10	1800
225	9	1620

Segunda reacción de hidrólisis. Reacción con amiloglucosidasa

El tiempo de hidrólisis se determinó en base a varios autores que recomiendan un tiempo de 14 a 20 horas. Por lo que se realizó pruebas usando 1mL de enzima a estos dos tiempos y sus resultados no variaron. Dándose tiempos de 14 horas e inferiores y variando la cantidad de enzima como data la Tabla 5.

Tabla 5. Tiempos y cantidades de enzima empleadas para la hidrólisis de dextrinas a jarabe de glucosa

Tratamientos	Tiempo (horas) y Cantidad de enzima amiloglucosidasa (<i>Aspergillus niger</i> , Sigma)
T1	2 horas de hidrólisis + 0.5 mL de enzima
T2	2 horas de hidrólisis + 1 mL de enzima
T3	2 horas de hidrólisis + 1.5 mL de enzima
T4	8 horas de hidrólisis + 0.5 mL de enzima
T5	8 horas de hidrólisis + 1 mL de enzima
T6	8 horas de hidrólisis + 1.5 mL de enzima
T7	14 horas de hidrólisis + 0.5 mL de enzima
T8	14 horas de hidrólisis + 1 mL de enzima
T9	14 horas de hidrólisis + 1.5 mL de enzima

La cristalinidad del jarabe de glucosa al 50% se midió mediante absorbancia a 520nm, mientras que el rendimiento (glucosa/almidón) se evaluó mediante el método de Fehlings respecto a azúcares (Lane y Eynon, 1923).

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) los resultados para la cristalinidad se muestran en la Tabla 6 donde se aceptó la hipótesis nula para tratamientos y en la que no existe diferencia entre tratamientos. Aunque el tratamiento que presentó una mayor aceptación de acuerdo a la Tabla 7 fue el número 1, ya que presentó una menor absorbancia y por lo tanto una menor coloración para el jarabe de glucosa.

Tabla 6: Resumen del análisis de Varianza de la cristalinidad de los tratamientos

FV	SC	GL	CM	Fo	Valor F	Significancia
Cantidad de enzima (C)	0.0348	2	0.0174	4.4070	4.26	S
Tiempo (T)	0.0009	2	0.0004	0.1176	4.26	N S
CxT	0.0149	4	0.0037	1	3.63	N S
Tratamientos (t)	0.0507	8	0.0063	1.6040	3.23	N S
Error	0.0356	9	0.0039			
Total	0.0863	17				

NS = No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

S = Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

Tabla 7: Absorbancias ($\lambda=520$ nm) de jarabe de glucosa en varios tratamientos.

Tratamientos	Absorbancia
T1	2.711
T7	2.748
T4	2.755
T2	2.793
T8	2.796
T6	2.811
T9	2.817
T5	2.84
T3	2.904

En lo que respecta al rendimiento de glucosa, el análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 8 estableció que si existía diferencia significativa entre los tratamientos, anulando la hipótesis nula. Y utilizando la prueba de Tukey al 5% se fijó la diferencia existente entre medias como se muestra en la Tabla 9. No existiendo diferencia significativa entre los tratamientos 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 pero si de todos estos con correspondientes al tratamiento 1. Los tratamientos 2, 3, 5, 6, 8 y 9 difieren estadísticamente del tratamiento 4. Los tratamientos 1 y 4 no presentan diferencia significativa entre ellos.

Analizando estos resultados el tratamiento recomendado sería el T9 con un rendimiento del 90.14% glucosa/almidón.

Tabla 8: Resumen del análisis de Varianza (ANOVA) del rendimiento de los tratamientos

FV	SC	GL	CM	Fo	Fc	Significancia
Cantidad de enzima (C)	387.5286	2	193.7643	36.7297	4.26	S
Tiempo (T)	207.0342	2	103.5171	19.6226	4.26	S
CxT	26.9895	4	6.7473	1.2790	3.63	N S
Tratamientos (t)	621.5524	8	77.6940	14.7276	3.23	S
Error	47.4786	9	5.2754			
Total	669.031	17				

NS = No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

S = Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

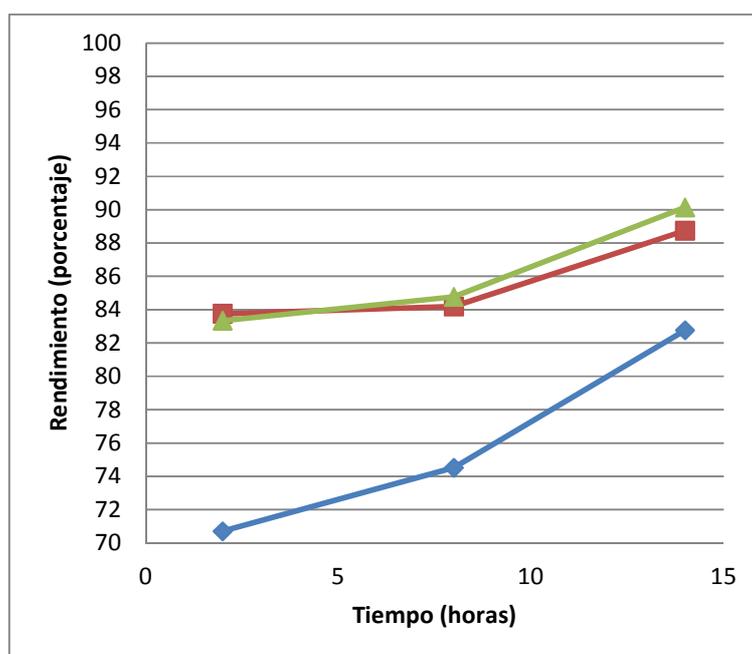
Tabla 9: Rendimientos del jarabe de glucosa y prueba de Tukey (5%) de 9 tratamientos bajo diferentes combinaciones de amiloglucosidas y tiempo de hidrolisis.

Tratamientos	Rendimiento (% promedio)
T1	70.705 c
T4	74.515 c/b
T7	82.765 b/a
T3	83.345 a
T2	83.755 a
T5	84.195 a
T6	84.775 a
T8	88.75 a
T9	90.145 a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

En la Figura 5 se puede ver los nueve tratamientos representados gráficamente. Deduciendo que conforme aumenta la cantidad de enzima el rendimiento del jarabe de glucosa en base del almidón es mayor.

Figura 5: Rendimientos promedio del jarabe de glucosa obtenidos a partir de almidón de banano para diferentes combinaciones enzima-tiempo



El porcentaje de almidón total obtenido fue del 46.52%, el cual es menor que los valores reportados en bibliografía de alrededor del 70% (Bello-Pérez y col, 2004). La diferencia entre estos dos valores, es decir 24% podría explicarse por la formación de almidón resistente en el banano. Almidón resistente que resiste el ataque enzimático empleado en la cuantificación de almidón en el sustrato. Trabajos realizados anteriormente (Bello-Pérez y col., 2009; Faisant y col., 1995) reportan valores de almidón resistente de hasta el 43% para plátano macho (*Musa paradisiaca*) mientras que Pacheco y Delahaye (2002) reportan valores de almidón resistente de aproximadamente 15% para *Musa* spp. La información anterior corrobora el hecho de que en el presente trabajo se subestime el contenido de Almidón en el sustrato.

Durante el proceso de elaboración de jarabe de glucosa se emplea un proceso de solubilización sobre los 100 °C. Esta alta temperatura puede permitir la solubilización del almidón retrogradado (principalmente amilosa retrogradada) haciéndolo susceptible al ataque enzimático para la formación de glucosa. Garzón (2006) reporta temperaturas de fusión de la amilosa retrogradada de alrededor de 115 °C.

Cabe anotar que los cálculos de rendimiento para el presente trabajo se realizaron con contenido de almidón del 70%, valor que como se dijo anteriormente incluye la posible presencia de almidón resistente.

El porcentaje de 90.14% correspondiente al rendimiento, en comparación con el rendimiento del almidón de yuca es mayor, siendo este de 40.72%. El banano de rechazo podría llegar a ser una materia prima que reemplace a la yuca, la cual es una de las materias primas más usadas en Latinoamérica para la producción de jarabe de glucosa. Y llegar a abastecer las necesidades de jarabe de glucosa existentes en el Ecuador.

Es importante recalcar que el jarabe de glucosa no ha pasado por ningún proceso de refinación, por lo tanto, la comparación con el jarabe de glucosa de yuca o jarabe de glucosa de otras fuentes sería más precisa si se contara con jarabe de glucosa del banano refinada (libre de impurezas, color u olor).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo se concluye que la materia prima, banano de rechazo *Musa Cavendish*, es un buen recurso para la obtención de jarabe de glucosa ya que posee un rendimiento de 90.14% de glucosa a partir del almidón de banano y una cristalinidad

de 2.817 nm datos correspondientes a un tratamientos de 14 horas de hidrólisis y 1.5 mL de enzima amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*, Sigma).

BIBLIOGRAFIA

- Badui, Salvador, “Química de los Alimentos”, cuarta edición, Pearson Educación, México, 2006.
- Soto, Moises, “Bananos-Cultivo y Comercialización”, segunda edición, Litografía e Imprenta LIL, S.A. Costa Rica, 1992.
- Schenck –Hebeda, “Starch Hydrolysis Products”, VCH Publishers Inc, USA, 1992
- 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.
- Biliaderis C.G., Prokopowich, D.J., “Distribución de tamaño molecular de la amilopectina por filtración en gel”. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, “Manual de Métodos de caracterización de Carbohidratos”, Graficas Guimar, Ecuador, 2000.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton J., Rebers, P and Smith “Método colorimétrico de fenol-sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales”, Química Analítica, 1956.
- Carrera, Jorge, Módulos de Biotecnología. Enzimas industriales, Universidad del Cauca, Primer edición 2002.

- Asociación de exportadores de Banano del Ecuador, 31/03/2010, <http://www.aebe.com.ec>
- “Análisis del mercado mundial bananero y la situación del ecuador 2003”, 31/03/2010, <http://www.sica.gov.ec>
- Sandell, E.B. y Kolthoff, I.M. (1934) Journal of the American Chemical, Society, 56, 1426.
- “Detección de hidratos de carbono en alimentos”, 02/05/2010, abcal.iespana.es.
- Lane J.H. y L.Eynon J. “Determinación cuantitativa de azúcares reductores y totales”, Soc. Chem. Ind, 1923
- Mera, Ingrid y Carrera Jorge, “Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*”, Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol 3 No.1, Cauca, 2005
- 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, Brazil
- Bernfeld, P, Meth. Enzymol. 1,149 (1955)
- Manjunath, P, et al., J. Appl. Biochem. 5, 235 (1983)
- Schwartzkopf, C.L., Barford, J.P., Biotechnol.Lett.3, 603 (1981)
- Rastall, R.A., et al., Biotechnol. Lett. 13, 501 (1991)
- Flores-G., Garcia, Flores-H., Nunez, Gonzales y Bello, “Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*)”, Centro de desarrollo de productos bióticos del IPN, Mexico, 2004.

- Pacheco Emperatriz- Delahaye, “Evaluacion nutricional de hojuelas fritas y estudio de la digestibilidad del almidón del platano verde (*Musa spp.*)” Rev. Fac. Agron. (Maracay), 2002.
- Faisant, ., Gallant, D. J., Bouchet, B., and Champ, M, Banana starch breakdown in the human small intestine studied by electron microscopy. European Journal of Clinical Nutrition, 49, 98-104, 1995.

ANEXO 1

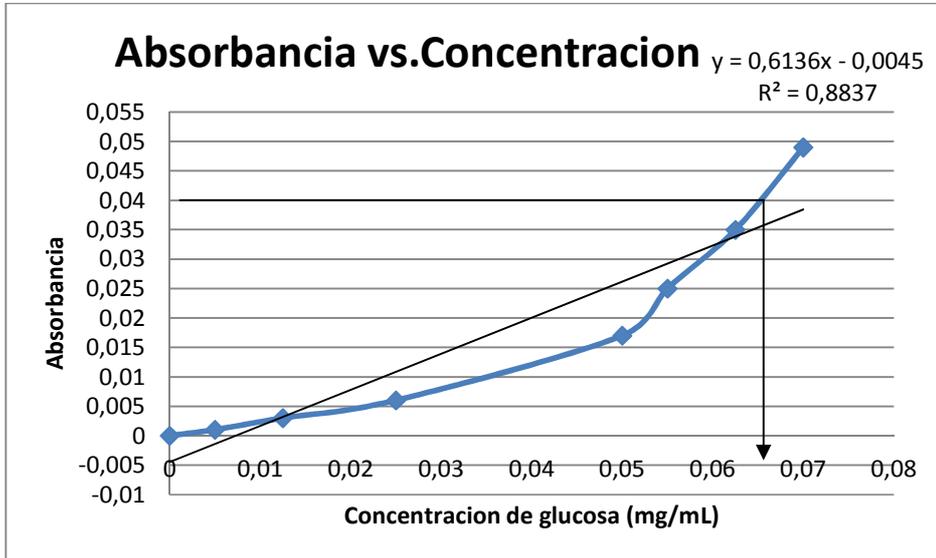
Tabla 10. Datos para curva patrón en la determinación de la concentración de glucosa

Concentración (mg glucosa/mL)	mL de Solución de glucosa al 0.1 mg/mL	Reactivo GOD	Agua destilada
0	0	0.5	1.5
0.005	0.1	0.5	1.4
0.0125	0.25	0.5	1.25
0.025	0.5	0.5	1
0.05	1	0.5	0.5
0.055	1.1	0.5	0.4
0.0625	1.25	0.5	0.25
0.07	1.4	0.5	0.1

Tabla 11: Concentraciones y absorbancias ($\lambda = 500$ nm) para la curva patrón

Concentración (mg glucosa/mL)	Absorbancia
0	0
0.01	0.001
0.025	0.003
0.05	0.006
0.1	0.017
0.11	0.025
0.125	0.035
0.14	0.049

Figura 6. Curva patrón para la determinación de Almidón en el sustrato



Absorbancia muestra = 0.040 nm

mg glucosa = 0.065 mg

_____ (1)