



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA  
DE PAPA (*Solanum tuberosum*)**

**TESIS presentada por**

**RAUL DELGADO DELGADO**

**A la División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Ingeniería Química como  
requisito parcial para obtener el  
grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN  
INGENIERÍA QUÍMICA**

**Morelia, Mich.**

**Mayo 2009**



## División de estudios de posgrado



**Asunto: Aprobación de Impresión de Tesis**

**Oficio número 306/2009.**

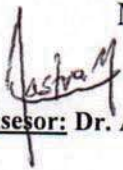
**C. Ingeniero Roberto Chávez Pérez**  
**Jefe del Departamento de Titulación de la**  
**U.M.S.N.H.**  
**Presente.-**

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera mas atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "Optimización de la hidrólisis enzimática de papa (*Solanum tuberosum*)" después de haber revisado el manuscrito que presentó el Ingeniero **Raúl Delgado Delgado**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

**Atentamente.**

**Morelia, Michoacán a 24 de Febrero de 2009.**

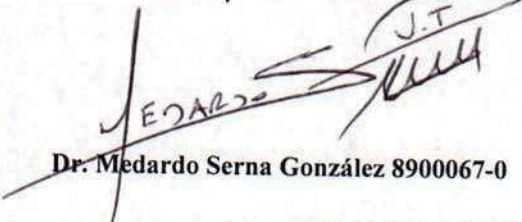
  
**Presidente o Asesor: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya 0100017-9**

**Secretario:**

  
**Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002**

**Vocales:**

  
**Dr. Jaime Saucedo Luna 89000498**

  
**Dr. Medardo Serna González 8900067-0**

  
**Dr. Pedro Alberto Quintana Hernández 01001396**

---

---

## RESUMEN

### OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PAPA (*Solanum tuberosum*)

Por

Raúl Delgado Delgado

Mayo de 2009

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

La demanda mundial de recursos fósiles tanto para la producción de energéticos, como para la producción de la mayoría de los iniciadores de las cadenas productivas, ha llevado a un decremento considerable en las reservas probadas de estos, con tendencia a la escasez. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías para la conversión de materias primas renovables en productos que sostengan el nivel de vida de la sociedad.

La papa, un tubérculo rico en almidón, puede ser aprovechada para obtener glucosa por hidrólisis enzimática, los cuales pueden ser transformados en productos de interés en procesos fermentativos. Este trabajo trata del estudio, modelado y optimización de la hidrólisis enzimática de papa, catalizada por las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa. Utilizando un diseño de experimentos Box-Behnken y aplicando el método de superficie de respuesta, se estudió el efecto de la temperatura, el tiempo, la concentración de sustrato, la relación unidades actividad/sustrato y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa, en la concentración de glucosa producida.

Utilizando  $\alpha$ -amilasa sola y glucoamilasa sola, se obtuvieron rendimientos bajos (42.2 %) de producción de glucosa, sugiriendo una combinación enzimática.

Aplicando la metodología de superficie de respuesta, se concluyó que las condiciones óptimas de hidrólisis son: concentración de sustrato, 6 % (p/p); temperatura, 67 °C; tiempo, 60 min; relación unidades de actividad/sustrato, 100 U/g y fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa, 0.14. A tales condiciones y utilizando el modelo matemático obtenido, se calculó una concentración de glucosa de 38.9 g/L (rendimiento, 98.8 %), la cual es adecuada para propósitos fermentativos. Un conjunto de experimentos fue realizado a condiciones aleatorias para validar el modelo; la diferencia entre el valor predicho y el valor medido fue de  $0.6 \pm 0.5$  g/L, confirmando su precisión.

---

---

## ABSTRACT

### OPTIMIZATION OF THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF POTATO (*Solanum tuberosum*)

By

Raúl Delgado Delgado

May of 2009

Master in Sciences of Chemical Engineering

Advisor: Ph. D. Agustín Jaime Castro Montoya

The world demand of fossil resources as much for the energetic production, as for the production of most of the initiators of the productive chains, has caused a considerable decrement in the proven reservations of these, with tendency to the shortage. For this reason, it is necessary the search new technologies for the conversion of renewable raw matters in products that sustain the level of life of the society.

Potato is a tuber that mainly contains starch and it can be useful to obtain sugars by enzymatic hydrolysis. Sugars can be transformed in desired products by fermentative processes. This work deals with the study, modeling and optimization of the enzymatic hydrolysis of potato catalyzed by the  $\alpha$ -amylase and glucoamylase enzymes. The effect of temperature, time, substrate concentration, activity units/substrate ratio, and activity fraction of  $\alpha$ -amylase, on the concentration of produced glucose was studied using an experiment design Box-Behnken and applying the response surface methodology.

Using  $\alpha$ -amylase alone and glucoamylase alone, low yields (42.2 %) of production of glucose were obtained, suggesting an enzymatic mixture.

Applying the response surface methodology, the optimal conditions of the hydrolysis were: substrate concentration (6 % w/w), temperature (67 °C), time (60 min), activity units/substrate ratio (100 U/g) and activity fraction of  $\alpha$ -amylase (0.14). At these conditions and using the mathematical model obtained, a glucose concentration of 38.9 g/L (yield, 98.8 %) was calculated, which is adequate for fermentative purposes. A set of experiments of validation was carried out at random conditions. The difference between the predicted value and the measured value was  $0.6 \pm 0.5$  g/L, confirming the accuracy of the model.

---

---

## DEDICATORIA

*In Memoriam*

**A Manuel Delgado Rodríguez.**

Mi Padre

Dedico este trabajo a:

**Ma. Del Rosario Delgado Vizcaino**

Mi Madre

**Manuel, Ma. De Lourdes, Jorge y Oscar**

Mis Hermanos

**Daniel, Julián, Oscar, Rigoberto y Manuel**

Compañeros y Amigos

**Ananías, Daniel, Isabel, Verónica y Hussein**

Amigos de Galicia

Finalmente, doy gracias a **Dios** por la magnífica vida que me ha brindado.

---

---

## ÍNDICE

|                                                        |      |
|--------------------------------------------------------|------|
| <b>Resumen</b>                                         | iii  |
| <b>Abstract</b>                                        | iv   |
| <b>Lista de tablas</b>                                 | viii |
| <b>Lista de figuras</b>                                | ix   |
| <b>Nomenclatura</b>                                    | xi   |
| <b>Agradecimientos</b>                                 | xii  |
| <b>Capítulo 1. Introducción</b>                        | 1    |
| 1.1. Generalidades                                     | 1    |
| 1.2. Objetivo                                          | 6    |
| 1.3. Justificación                                     | 6    |
| 1.4. Hipótesis                                         | 7    |
| <b>Capítulo 2. Marco teórico</b>                       | 8    |
| 2.1. Biomasa                                           | 8    |
| 2.2. Carbohidratos                                     | 8    |
| 2.3. Papa                                              | 9    |
| 2.4. Almidón                                           | 9    |
| 2.5. Hidrólisis                                        | 12   |
| 2.6. Hidrólisis ácida cuantitativa                     | 14   |
| 2.7. Hidrólisis enzimática                             | 14   |
| 2.8. $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa                  | 16   |
| 2.9. Mecanismo de reacción de la hidrólisis enzimática | 16   |
| <b>Capítulo 3. Metodología</b>                         | 19   |
| 3.1. Sustrato                                          | 19   |
| 3.2. Determinación de humedad                          | 19   |
| 3.3. Hidrólisis ácida cuantitativa                     | 20   |
| 3.4. Enzimas                                           | 23   |
| 3.5. Determinación de actividad enzimática             | 23   |
| 3.6. Pretratamiento                                    | 25   |
| 3.7. Hidrólisis enzimática                             | 26   |

---

---

|                                                                                                                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.8. Métodos analíticos                                                                                                                                                                                                                    | 29        |
| 3.9. Métodos estadísticos                                                                                                                                                                                                                  | 32        |
| <b>Capítulo 4. Resultados y discusiones</b>                                                                                                                                                                                                | <b>33</b> |
| 4.1. Composición del sustrato                                                                                                                                                                                                              | 33        |
| 4.2. Actividades de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa                                                                                                                                                                                       | 34        |
| 4.3. Hidrólisis enzimática utilizando una combinación de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa                                                                                                                                                  | 34        |
| 4.4. Hidrólisis enzimática catalizada por $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa por separado                                                                                                                                                    | 38        |
| 4.5. Modelo matemático general para la hidrólisis enzimática catalizada por la combinación de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa                                                                                                             | 40        |
| 4.6. Estudio para la dependencia de la concentración de azúcares reductores con la concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo, utilizando el método de superficie de respuesta                                                  | 42        |
| 4.7. Optimización de la concentración de glucosa en función de la temperatura, el tiempo, la relación unidades de actividad/sustrato y la fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa, utilizando la metodología de superficie de respuesta | 51        |
| <b>Capítulo 5. Conclusiones</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>62</b> |
| <b>Referencias</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>63</b> |
| <b>Anexo</b>                                                                                                                                                                                                                               | <b>68</b> |

---

---

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 4.1. Composición en polisacáridos y lignina del sustrato                                                                                                                                    | 33 |
| Tabla 4.2. Concentración de azúcares reductores obtenida de la hidrólisis de 24 g/L de sustrato a diferentes temperaturas                                                                         | 35 |
| Tabla 4.3. Parámetros de ajuste a la ecuación 4.2, para los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa     | 36 |
| Tabla 4.4. Parámetros de ajuste a la ecuación 4.2, para los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del sustrato a 70 °C usando solamente $\alpha$ -amilasa o glucoamilasa | 40 |
| Tabla 4.5. Variables involucradas en el diseño de experimentos Box-Behnken, para la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla constante de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa            | 44 |
| Tabla 4.6. Diseño de experimentos Box-Behnken con las variables descritas en la tabla 4.5, para el estudio de superficie de respuesta                                                             | 45 |
| Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático con interacciones (ecuación 4.9), para el diseño experimental de la tabla 4.6                                                       | 46 |
| Tabla 4.8. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo reducido (ecuación 4.10), para el diseño experimental de la tabla 4.6                                                                          | 47 |
| Tabla 4.9. Variables involucradas en el diseño experimental Box-Behnken, para la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla variable de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa                | 51 |
| Tabla 4.10. Diseño de experimentos Box-Behnken para las variables descritas en la tabla 4.9, para el estudio de superficie de respuesta                                                           | 53 |
| Tabla 4.11. Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste de los datos experimentales al modelo cuadrático (ecuación 4.17), para el diseño experimental de la tabla 4.10                                | 55 |
| Tabla 4.12. Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste de los datos experimentales al modelo cuadrático modificado (ecuación 4.18), para el diseño experimental de la tabla 4.10                     | 56 |

---

---

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1. Reservas probadas de petróleo en México. (PEMEX, 2008)                                                                                                                                                | 1  |
| Figura 1.2. Diagrama de flujo generalizado para la obtención de diferentes productos a partir de recursos fósiles. (U.S. Department of Energy, 2004)                                                              | 2  |
| Figura 1.3. Diagrama de flujo generalizado para la obtención de diferentes productos a partir de biomasa. (U.S. Department of Energy, 2004)                                                                       | 3  |
| Figura 1.4. Producción nacional de papa. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, 2008)                                                                                          | 4  |
| Figura 1.5. Principales Estados productores de papa en México. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, 2008)                                                                    | 5  |
| Figura 2.1. Dibujo representativo de la planta de la papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ). (Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1989) | 9  |
| Figura 2.2. Gránulos del almidón de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ). (Gumul <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                               | 10 |
| Figura 2.3. Estructura de la amilosa. (Heredia, 2008)                                                                                                                                                             | 10 |
| Figura 2.4. Estructura tridimensional de la amilopectina. (Heredia, 2008)                                                                                                                                         | 11 |
| Figura 2.5. Gránulos del almidón de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) gelatinizado. (Rosa <i>et al.</i> , 2004)                                                                                                   | 12 |
| Figura 2.6. Representación del enlace glucosídico en la unión de dos moléculas de glucosa. (Dirección Nacional de Servicios Académicos Virtuales de la Universidad Nacional de Colombia, 2005)                    | 13 |
| Figura 2.7. Hidrólisis de un polisacárido ejemplificada por la hidrólisis de un disacárido. (Vázquez, 2003)                                                                                                       | 13 |
| Figura 2.8. Mecanismo de hidrólisis del enlace glucosídico mediante glucosidasas. (Polaina, 2004)                                                                                                                 | 15 |
| Figura 3.1. Reacción del ácido 3,5 dinitrosalicílico con la glucosa. (Chaplin, 1986)                                                                                                                              | 30 |
| Figura 3.2. Cromatograma de una solución patrón que contiene glucosa entre otros compuestos, obtenido por HPLC                                                                                                    | 31 |
| Figura 4.1. Diagrama de flujo experimental del primer estudio                                                                                                                                                     | 34 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.2. Dependencia experimental y predicha de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) liberados durante la hidrólisis de 24 g/L de sustrato usando una relación unidades de actividad/sustrato (materia seca) de 6 U/g con una fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa de 0.35 a diferentes temperaturas: (■) 40 °C, (▲) 45 °C, (◆) 55 °C, (●) 70 °C y (Δ) 75 °C | 37 |
| Figura 4.3. Dependencia experimental y predicha de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) liberados durante la hidrólisis de 24 g/L de sustrato, utilizando 6 U/g de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa por separado a 70 °C                                                                                                                                              | 39 |
| Figura 4.4. Predicción del modelo generalizado para la dependencia de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) con la temperatura y el tiempo                                                                                                                                                                                                                             | 41 |
| Figura 4.5. Predicción del modelo para la dependencia del rendimiento de hidrólisis con la temperatura y el tiempo                                                                                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| Figura 4.6. Valores predichos por el modelo matemático <i>versus</i> valores experimentales de la concentración de azúcares reductores                                                                                                                                                                                                                                                | 48 |
| Figura 4.7. Distancia de Cook para los datos experimentales de la concentración de azúcares reductores de la tabla 4.6, ajustados al modelo de la ecuación 4.12                                                                                                                                                                                                                       | 49 |
| Figura 4.8. Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) con el tiempo (t) y la concentración de sustrato ( $C_S$ ) para una temperatura (T) entre 68-72°C                                                                                                                                                                       | 50 |
| Figura 4.9. Valores predichos por el modelo matemático <i>versus</i> valores experimentales de la concentración de glucosa                                                                                                                                                                                                                                                            | 57 |
| Figura 4.10. Distancia de Cook para los datos experimentales de la concentración de glucosa de la tabla 4.10, ajustados al modelo de la ecuación 4.20                                                                                                                                                                                                                                 | 58 |
| Figura 4.11. Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de glucosa ( $C_G$ ) con la temperatura (T) y el tiempo (t), para una concentración de sustrato ( $C_S$ ) de 6 %, a condiciones de relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), bajas, medias y altas                                     | 59 |
| Figura 4.12. Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de glucosa ( $C_G$ ) con la relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y la fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), a las condiciones de temperatura óptima (T) de 67 °C y de tiempo deseado (t) de 60 min, para una concentración de sustrato ( $C_S$ ) de 6 %                   | 60 |

---

---

## NOMENCLATURA

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| T:                | Temperatura                                           |
| t:                | Tiempo                                                |
| $C_{AR}$ :        | Concentración de Azúcares Reductores                  |
| $k_1$ :           | Constante Cinética                                    |
| $k_{-1}$ :        | Constante Cinética                                    |
| k:                | Constante                                             |
| $(C_{AR})_{eq}$ : | Concentración de Azúcares Reductores en el Equilibrio |
| $C_A$ :           | Concentración de Agua                                 |
| $R^2$ :           | Coeficiente de Determinación                          |
| $R^2_{aj}$ :      | Coeficiente de Determinación Ajustado                 |
| $CM_G$ :          | Concentración Máxima de Glucosa que se puede obtener  |
| $x_S$ :           | Fracción de Almidón en el Sustrato (Materia Seca)     |
| $C_S$ :           | Concentración de Sustrato (Materia Seca)              |
| $R_{E/S}$ :       | Relación Unidades de Actividad/Sustrato               |
| $F_T$ :           | Fracción de Actividad de $\alpha$ -amilasa            |
| $C_G$ :           | Concentración de Glucosa                              |

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi especial gratitud a:

**Manuel Vázquez Vázquez**, porque me abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad de Santiago de Compostela y por haberme dado un ejemplo de profesionalidad y pasión científica.

**Agustín Jaime Castro Montoya**, mi profesor, mi asesor de tesis y un gran amigo.

La transmisión de las experiencias de estos dos seres humanos, ha sido crucial para mi desarrollo profesional.

También agradezco a las personas que integraron el **Comité Tutorial**, por su apoyo en la revisión de esta tesis.

Además, expreso mi gratitud a las siguientes Instituciones:

**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)**

**Universidad de Santiago de Compostela (USC)**

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

**Ministerio Español de Educación y Ciencia (MEEC)**

Por el apoyo económico aportado para la realización de este trabajo.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades.

La demanda mundial de recursos fósiles tanto para la producción de energéticos, como para la producción de la mayoría de los iniciadores de las cadenas productivas ha llevado a un decremento en las reservas probadas mundiales. En México se estima que en un periodo no mayor de dos décadas se tendrá problemas por la escasez del petróleo; tal como lo muestra la figura 1.1. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan la conversión de materias primas renovables en productos de consumo que sostengan el nivel de vida de la sociedad (Perlack *et al.*, 2005).



**Figura 1.1. Reservas probadas de petróleo en México. (PEMEX, 2008).**

En demanda de soluciones a esta problemática, en el año 2004 el Departamento de Energía de los Estados Unidos, publicó un estudio en el cual coloca a los azúcares como compuestos potencialmente útiles para ser transformados biológicamente en materias primas para la mayoría de las cadenas productivas existentes; así como para la producción de combustibles, como el etanol. Este estudio, parte de una analogía entre una refinería de recursos fósiles y lo que

podría ser una biorefinería. A partir de recursos fósiles, una gama de productos de consumo pueden ser obtenidos por vía química, tal como lo muestra el diagrama de flujo de la figura 1.2. Partiendo de biomasa, un recurso natural renovable que se encuentra distribuido en plantas y en residuos agrícolas, pecuarios, forestales municipales e industriales, es posible obtener un conjunto de azúcares fermentables para su posterior conversión. La figura 1.3 muestra un diagrama generalizado de las rutas que puede seguir la conversión de la biomasa hacia toda una gama de productos de interés que actualmente se obtienen de recursos fósiles y principalmente del petróleo.

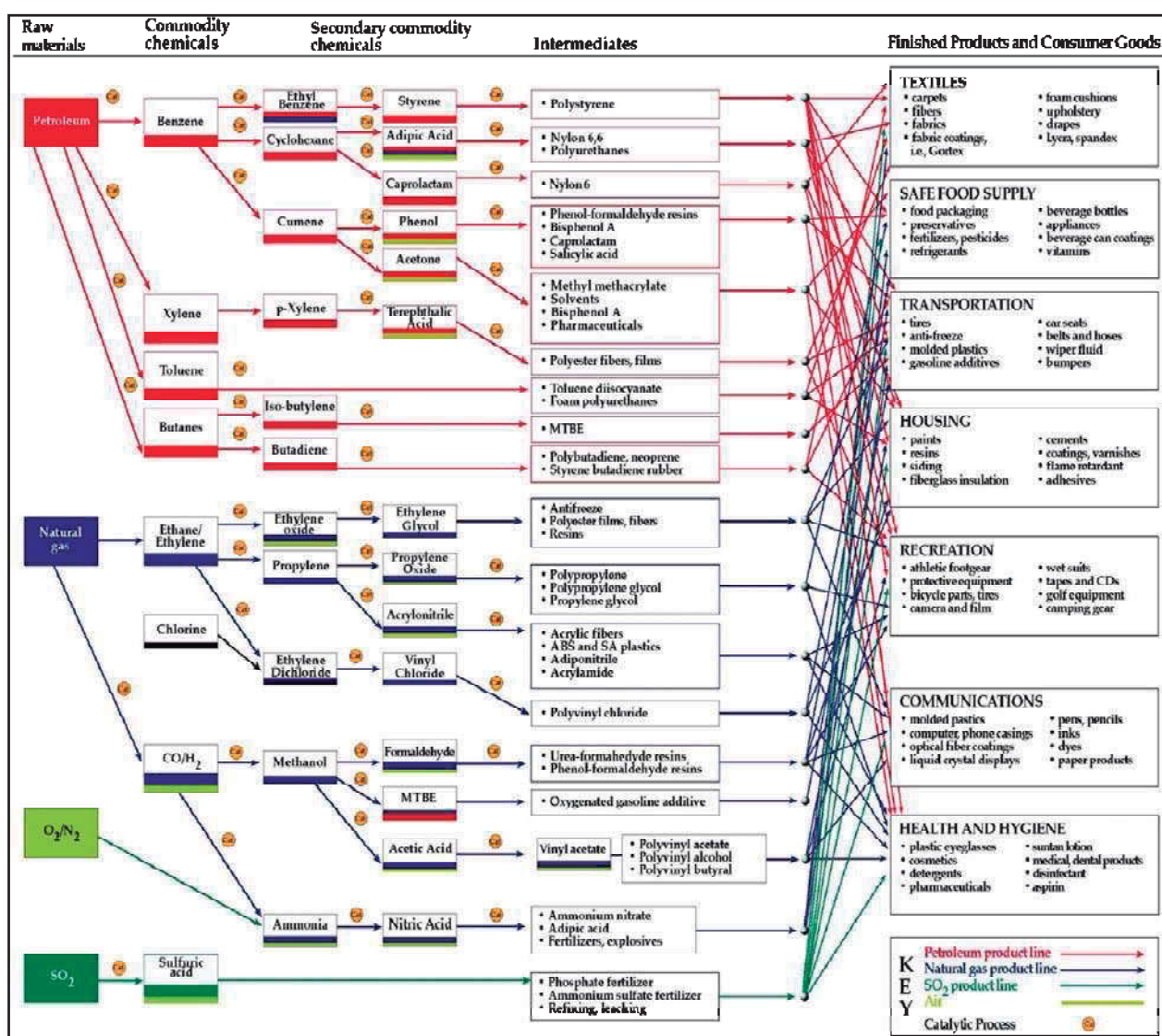
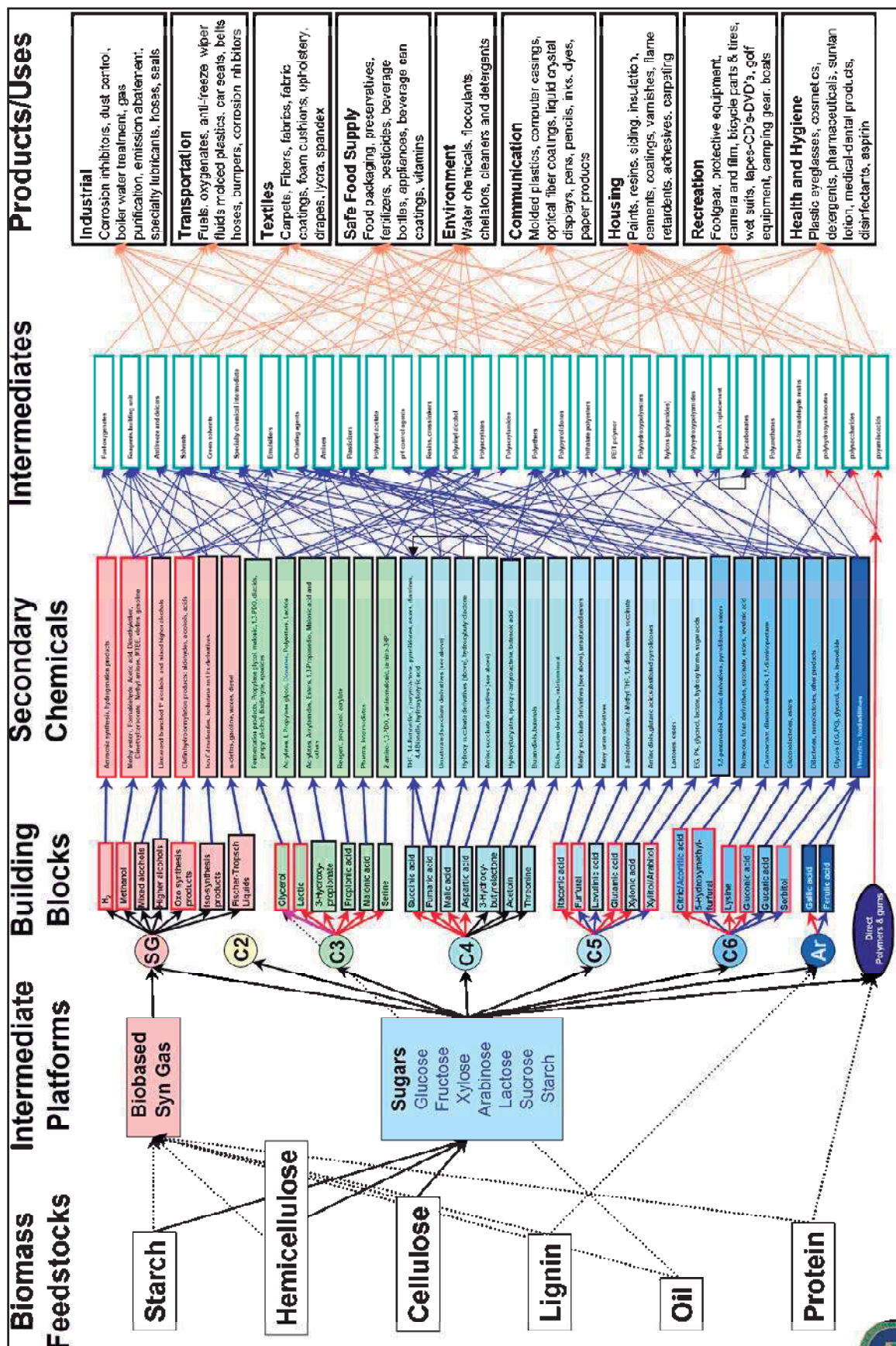


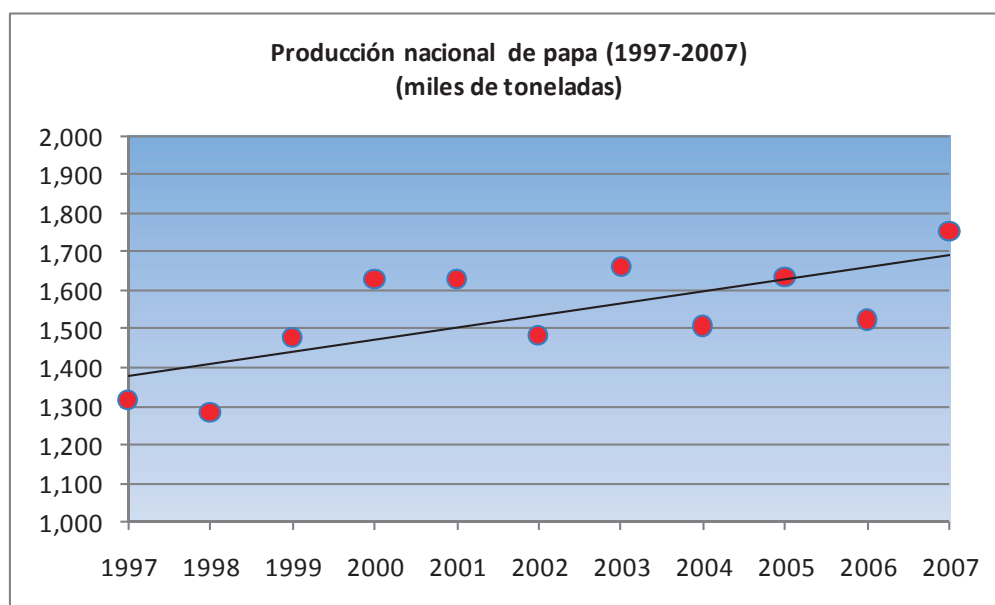
Figura 1.2. Diagrama de flujo generalizado para la obtención de diferentes productos a partir de recursos fósiles. (U.S. Department of Energy, 2004).



La biomasa y en particular los polisacáridos como la celulosa y el almidón pueden ser transformados en azúcares mediante hidrólisis química o enzimática (Sun *et al.*, 2008; Tatsumi y Katano, 2005; Nakazawa y Wang, 2003; Aguilar *et al.*, 2002). El almidón puede ser hidrolizado y llevado a azúcares fermentables, como la glucosa, mediante la acción catalizadora de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa (López *et al.*, 2006; López *et al.*, 2004; Liu, 2002).

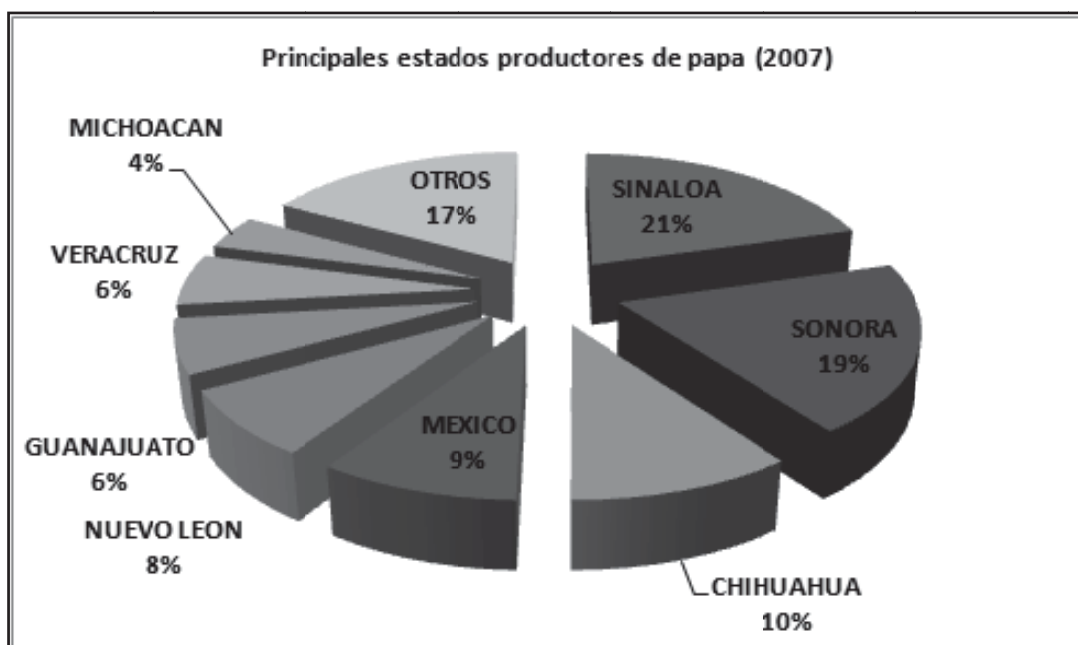
Los tubérculos, tales como la papa, el camote y la yuca, almacenan cantidades considerables de almidón en su raíz; y esta característica los hace atractivos para ser usados como materias primas en la producción de azúcares (Shariffa *et al.*, 2008; López *et al.*, 2004; Gaouar *et al.*, 1997). La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo ampliamente distribuido; su producción mundial es de alrededor de 300 millones de toneladas por año y el área plantada cubre más de 18 millones de hectáreas. Los países con mayor producción son China (20% de la producción mundial), Rusia (12%), India (8%) y Estados Unidos (8%) (Miranda y Aguilera, 2006).

La papa es una de las principales hortalizas que se cultivan en México; su producción sólo es superada por el maíz, el frijol, el trigo y el arroz (CONPAPA, 2007). La figura 1.4 muestra la producción de papa en México desde el año 1997 hasta el año 2007 y aunque su producción ha sufrido fluctuaciones considerables, la gráfica presenta una tendencia ascendente.



**Figura 1.4. Producción nacional de papa.** (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, 2008).

El cultivo de este tubérculo se realiza actualmente en 25 Estados de la República Mexicana durante todo el año, tanto en el ciclo Primavera-Verano como en el ciclo Otoño-Invierno (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, 2008; CONPAPA, 2007). La figura 1.5 muestra los principales Estados productores de papa para el año 2007.



**Figura 1.5. Principales Estados productores de papa en México. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, 2008).**

El uso de la papa (fresca o de desecho), como materia prima para la obtención de azúcares fermentables mediante el proceso de hidrólisis, es una alternativa para darle valor agregado a este producto (Liu, 2002; Ćurić *et al.*, 1998).

Con el objetivo de conocer el potencial que tiene la papa como materia prima para la producción de azúcares fermentables, así como, de establecer bases para estudios posteriores de la hidrólisis de otros tubérculos; este proyecto trata del estudio y optimización de la hidrólisis enzimática de papa (*Solanum tuberosum*).

## 1.2. Objetivo.

Objetivo general:

Estudiar, modelar y optimizar la reacción de hidrólisis enzimática de la papa (*Solanum tuberosum*) para producir glucosa mediante la utilización de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.

Objetivos específicos:

- Conocer el efecto de la temperatura, el tiempo de reacción, la concentración de sustrato, la relación unidades de actividad/sustrato y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa en la mezcla  $\alpha$ -amilasa-glucoamilasa, en la hidrólisis enzimática de la papa.
- Corroborar que la acción catalítica de una mezcla enzimática de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis enzimática de papa, es mejor que la acción catalítica utilizando las enzimas por separado.
- Obtener modelos matemáticos válidos que permitan la predicción de la concentración de azúcares reductores y glucosa en la hidrólisis enzimática de la papa a partir de datos experimentales.
- Encontrar las condiciones óptimas para una concentración adecuada de glucosa en la hidrólisis enzimática de la papa.

## 1.3. Justificación.

La explotación acelerada de los recursos fósiles ha llevado a un aumento en los precios del petróleo, al grado de haber alcanzado los 150 dólares/barril; además, por ser una fuente no renovable, la reservas probadas se extinguen día a día, por lo que es necesario y urgente emprender el desarrollo de nuevas tecnologías que subsanen la futura escasez de los recursos fósiles. Una alternativa podría ser, la conversión de biomasa, como la papa, en azúcares fermentables, los cuales pueden ser transformados en diferentes compuestos mediante procesos de fermentación en las industrias biotecnológicas. Una gran variedad de los compuestos que se obtienen en las fermentaciones, se pueden aprovechar como materias primas en la mayoría de las industrias de transformación.

La papa se encuentra sembrada en grandes cantidades en la superficie terrestre (FAO, 2008; Miranda y Aguilera, 2006); y por su alto contenido en almidón puede ser transformada en azúcares.

La hidrólisis ácida, así como, la enzimática son procesos ampliamente estudiados para la conversión de polisacáridos en azúcares, sin embargo, la utilización de enzimas como catalizador en la hidrólisis tiene ventajas sobre la hidrólisis ácida, puesto que esta última genera caldos azucarados con un pH muy ácido, no apto para los microorganismos, por lo cual se necesita agregar una etapa de neutralización que impacta en costos, además de reducir la concentración final de azúcares (Larsson *et al.*, 1999).

#### **1.4. Hipótesis.**

La producción de jarabes azucarados con concentraciones de glucosa adecuadas para propósitos fermentativos, mediante la hidrólisis enzimática de la papa (*Solanum tuberosum*) fresca o de desecho, se puede realizar mediante la acción catalizadora de una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.

## MARCO TEÓRICO

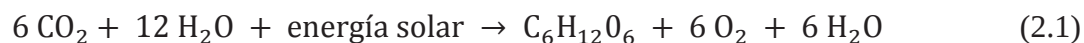
### 2.1. Biomasa.

La biomasa es materia orgánica utilizable como fuente de energía, originada en el proceso biológico denominado fotosíntesis, el cual se inicia con la captura de la energía luminosa y termina con la formación de carbohidratos (Peña, 1988).

Las fuentes de biomasa incluyen a la madera, a los cultivos agrícolas y a sus respectivos residuos, a las plantas acuáticas y algas; así como, a residuos urbanos, desechos de animales, y algunos desechos industriales. La biomasa es usada para satisfacer una gran variedad de necesidades de energía, incluida la generación de electricidad, calefacción de hogares, combustibles para coches y suministro de calor para instalaciones industriales. Las tecnologías de conversión para la utilización de biomasa pueden ser separadas en 4 categorías: procesos de combustión directa, procesos termoquímicos, procesos bioquímicos y procesos agroquímicos (Demirba, 2001).

### 2.2. Carbohidratos.

Los carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y actúan como almacén energético; representan el material que capta la energía del sol y permite que la utilicen los seres vivos. Los azúcares o monosacáridos son el producto inmediato de la fotosíntesis; con la energía solar y a partir de dióxido de carbono y agua, se sintetiza la glucosa como primer producto (Peña, 1988). La ecuación 2.1 muestra la reacción de fotosíntesis:



A partir de los monosacáridos, las plantas generan polisacáridos, tales como: celulosa y/o almidón. La encargada de aportar rigidez a la planta es la celulosa, mientras que, el almidón funciona como material de reserva, el cual es utilizado por la planta en condiciones en que no le es posible obtener azúcares.

### 2.3. Papa.

La papa (*Solanum tuberosum*) es un vegetal que se clasifica dentro de los tubérculos y almacena sus reservas de energía como almidón, en la raíz o tubérculo tal como se muestra en la figura 2.1. La papa generalmente presenta la composición siguiente (base húmeda % p/p): agua ( $80 \pm 2$  %), almidón ( $18 \pm 2$  %), celulosa y hemicelulosas ( $1.5 \pm 0.5$  %), glucosa ( $0.4 \pm 0.3$  %) y proteínas ( $2 \pm 1.5$  %) (Woolfe, 1987). Por lo tanto, el almidón es su mayor componente. Se ha estimado que entre el 65 y 87 % de materia seca consiste en este carbohidrato (Vasanthan *et al.*, 1999).

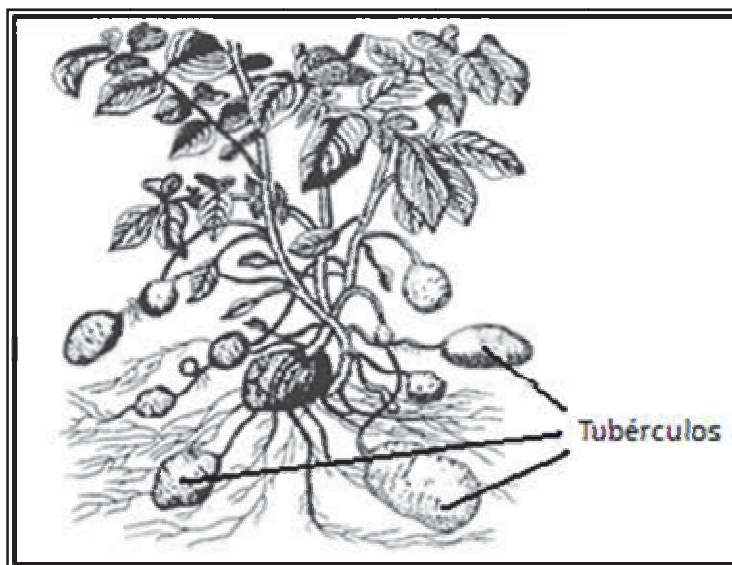


Figura 2.1. Dibujo representativo de la planta de la papa (*Solanum tuberosum*). (Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1989).

### 2.4. Almidón.

El almidón es el principal componente de muchos productos agrícolas como el maíz, el arroz, el trigo y los tubérculos como el camote, la yuca y la papa; se encuentra en las células de las plantas como material de reserva para el organismo en forma de gránulos, los cuales son insolubles en agua fría (Hansen *et al.*, 2008; Polaina y Maccabe, 2007). La figura 2.2 muestra una fotografía de la conformación de los gránulos de almidón de la papa (*Solanum tuberosum*).

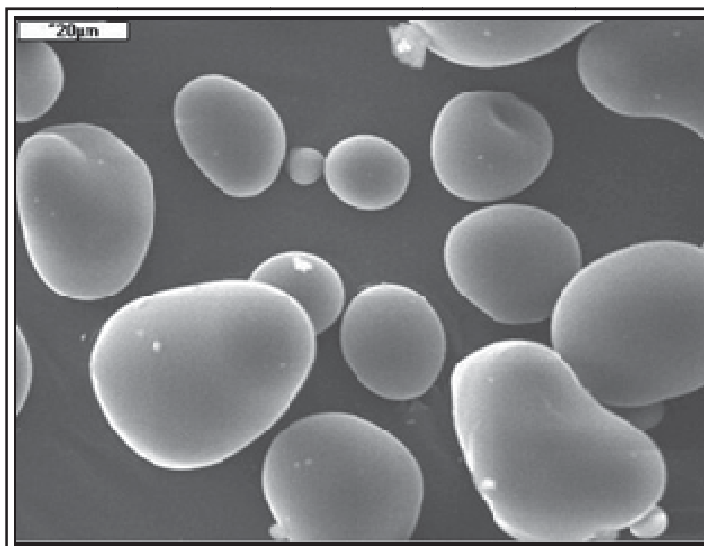


Figura 2.2. Gránulos del almidón de papa (*Solanum tuberosum*). (Gumul *et al.*, 2005).

Los gránulos de almidón están constituidos de dos tipos de moléculas poliméricas compuestas por unidades de  $\alpha$ -D-glucosa llamada amilosa (10-30) y amilopectina (70-90) (Hansen *et al.*, 2008; Heredia, 2008; Bertoft, 2007; Firouzabadi *et al.*, 2007). Stawski, 2008, determinó que el almidón en la papa contiene 26.9% de amilosa.

La amilosa es un polisacárido lineal formado por monómeros de glucosa en enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4), que le permite adoptar una disposición tridimensional de tipo helicoidal (Badui, 2006) como se muestra en la figura 2.3.

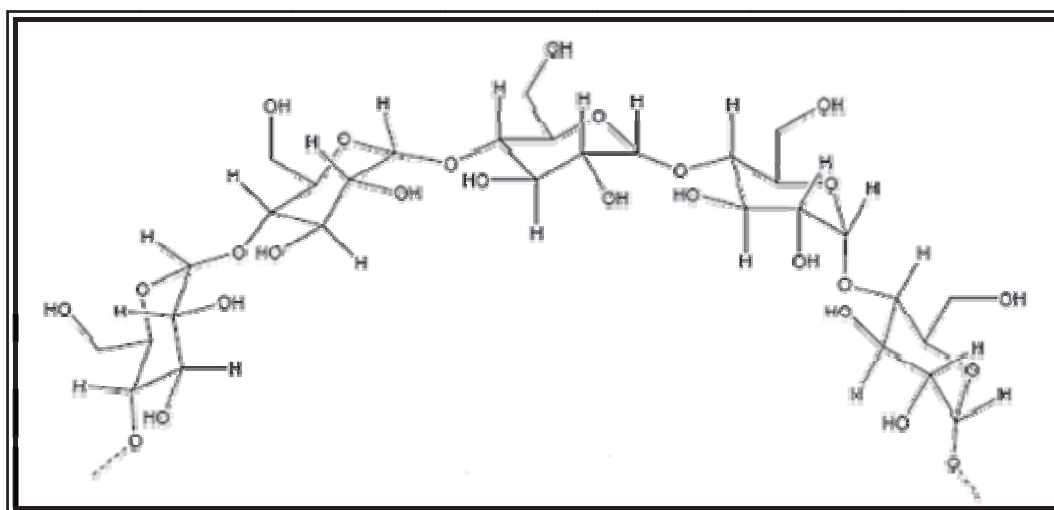
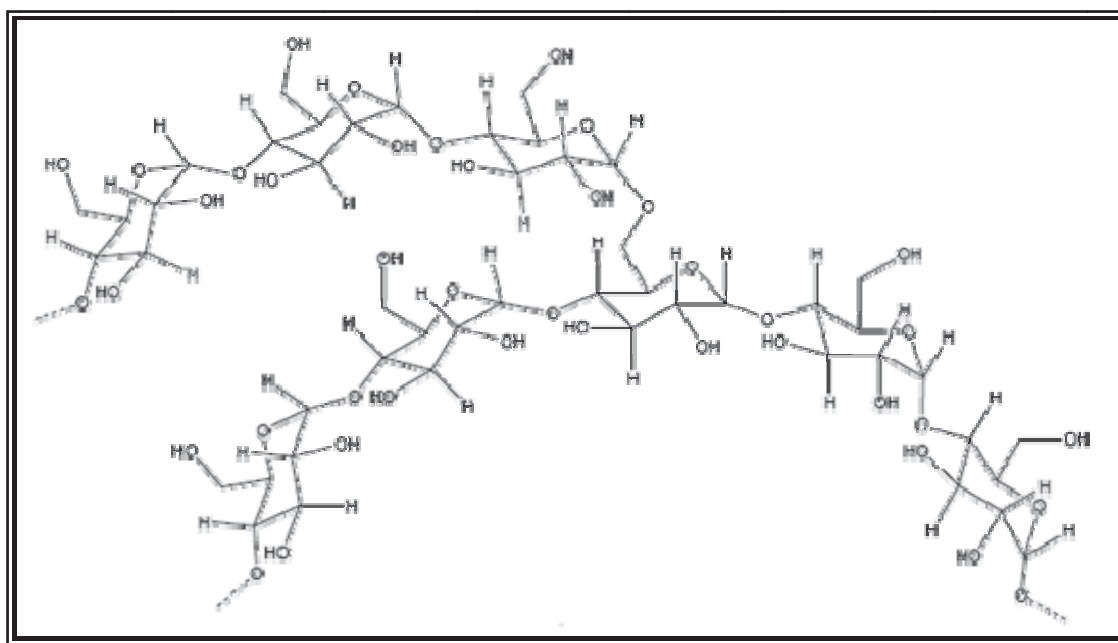


Figura 2.3. Estructura de la amilosa. (Heredia, 2008).

La amilopectina contiene ramificaciones que le dan una estructura molecular semejante a la de un árbol, cuyas ramificaciones están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15 a 25 unidades lineales de glucosa.

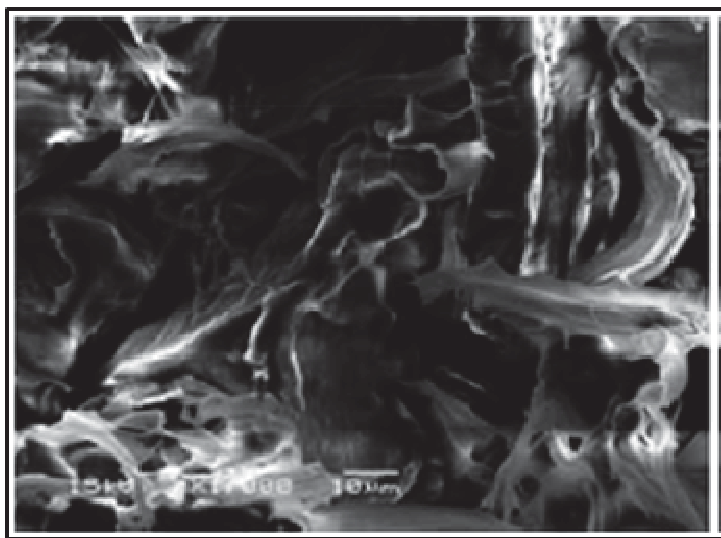
La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes, aunque se pueden encontrar algunos que están constituidos exclusivamente por amilopectina, llamados almidones céreos. La amilopectina de papa es la única que posee en su molécula grupos éster fosfato, unidos frecuentemente en una posición O-6, mientras que el tercio restante lo hace en posición O-3. La figura 2.4 muestra la estructura de la amilopectina.



**Figura 2.4. Estructura tridimensional de la amilopectina. (Heredia, 2008).**

Puesto que los gránulos de almidón son parcialmente cristalinos, difícilmente puede mezclarse e interactuar con otras sustancias, por lo que debe ser convertido en un material esencialmente amorfo y homogéneo. La gelatinización involucra el fundido del polímero en un medio acuoso. Cuando una suspensión agua-almidón es calentada, el almidón sufre una transición de fase entre 60 y 70 °C. El hinchamiento de los gránulos se incrementa con la temperatura y llega a ser irreversible cuando la gelatinización ocurre. El hinchamiento corresponde a una transferencia de masa de agua en exceso en la suspensión de agua asociada a los componentes del almidón (amilosa y amilopectina). La estructura del gránulo es generalmente

dispersada cuando el tratamiento con calor alcanza un cierto nivel y la solubilización de las cadenas de amilosa ocasionan un incremento en la viscosidad. Este cambio en la viscosidad se manifiesta por cambios irreversibles en propiedades tales como la perturbación en la estructura semicristalina, visto como una pérdida de birrefringencia y la solubilización del almidón. El fenómeno que sigue de la gelatinización durante la disolución del almidón y eventualmente alcanzar el total de la perturbación de los gránulos es conocido como gelatinizado. Durante la fase de enfriamiento, el almidón sufre retrogradación en la cual las cadenas comienzan a asociarse en una estructura ordenada y es acompañado por otro crecimiento en la viscosidad, generalmente denominado revés (Wójtowicz y Jan van der Goot, 2005; Rosa *et al.*, 2004). La figura 2.5 muestra una fotografía para el almidón gelatinizado.



**Figura 2.5.** Gránulos del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) gelatinizado. (Rosa *et al.*, 2004).

### 2.5. Hidrólisis.

La hidrólisis es la reacción del agua con otro compuesto. Los polisacáridos, son compuestos que pueden ser transformados en sus respectivos monómeros por reacción de hidrólisis.

En el almidón, los monómeros de glucosa se encuentran unidos mediante un enlace carbono-oxígeno, denominado enlace glucosídico, tal como lo muestra la figura 2.6.

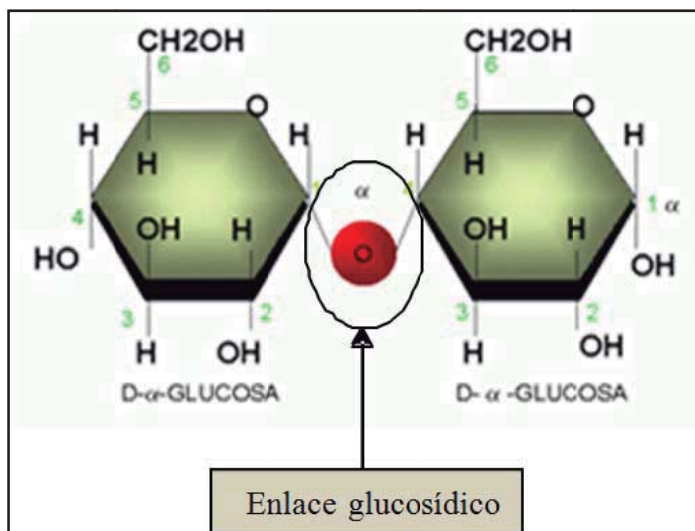


Figura 2.6. Representación del enlace glucosídico en la unión de dos moléculas de glucosa. (Dirección Nacional de Servicios Académicos Virtuales de la Universidad Nacional de Colombia, 2005).

La hidrólisis se lleva a cabo cuando se rompe el enlace glucosídico mediante la adición de una molécula de agua, tal como lo muestra la figura 2.7.

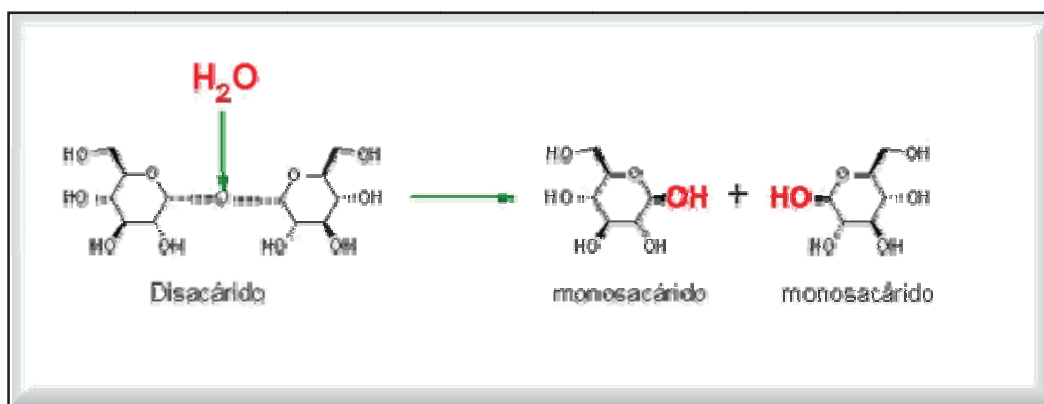


Figura 2.7. Hidrólisis de un polisacárido ejemplificada por la hidrólisis de un disacárido. (Vázquez, 2003).

Generalmente, en las reacciones de hidrólisis es necesaria la intervención de catalizadores. Cuando una hidrólisis se lleva a cabo mediante la acción catalítica de un ácido, se le llama hidrólisis ácida. Por otro lado, si el catalizador es una enzima, se le llama hidrólisis enzimática.

## 2.6. Hidrólisis ácida cuantitativa.

La hidrólisis ácida cuantitativa es una reacción en la que todos los polímeros son transformados a sus respectivos monómeros. Los monómeros son detectados mediante algún método analítico y se determina la cantidad total de cada polímero en el material. Los polímeros son expresados por lo general como glucanos, que son aquellos polímeros conformados por azúcares de seis carbonos; los xilanos y los arabanos, los cuales se conforman por azúcares de cinco carbonos (Garrote *et al.*, 1999).

## 2.7. Hidrólisis enzimática.

A una reacción de hidrólisis catalizada por enzimas, se le denomina hidrólisis enzimática. Las enzimas son proteínas que tienen actividad catalítica para llevar a cabo reacciones químicas.

Las enzimas encargadas de catalizar las hidrólisis son las hidrolasas. Dentro de estas se encuentran las glucosidasas, las cuales tienen la facultad de catalizar los enlaces de unión (enlaces glucosídicos) entre los azúcares en los polisacáridos.

En la figura 2.8 se muestra un mecanismo de hidrólisis del enlace glucosídico mediante glucosidasas. La hidrólisis del enlace glucosídico catalizada por las glucosidasas está mediada por la acción de dos residuos catalíticos presentes en el centro activo, uno de los cuales actúa como donador de protones y el otro como nucleófilo o base. En la mayor parte de los casos son dos residuos carboxílicos. El enlace glucosídico puede hidrolizarse de dos formas distintas, atendiendo a cual sea la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. Una primera posibilidad es que la configuración anomérica cambie. A la reacción hidrolítica que se desarrolla de esta forma se la designa como mecanismo de inversión. La posibilidad alternativa es que la configuración anomérica se mantenga. Es lo que se denomina mecanismo de retención. En las glucosidasas que operan mediante inversión, la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración del enlace, la separación es alrededor de 5 Å. El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico

y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento. En este proceso ocurre el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico. Como resultado se logra la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glucosídico; y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima (Polaina, 2004).

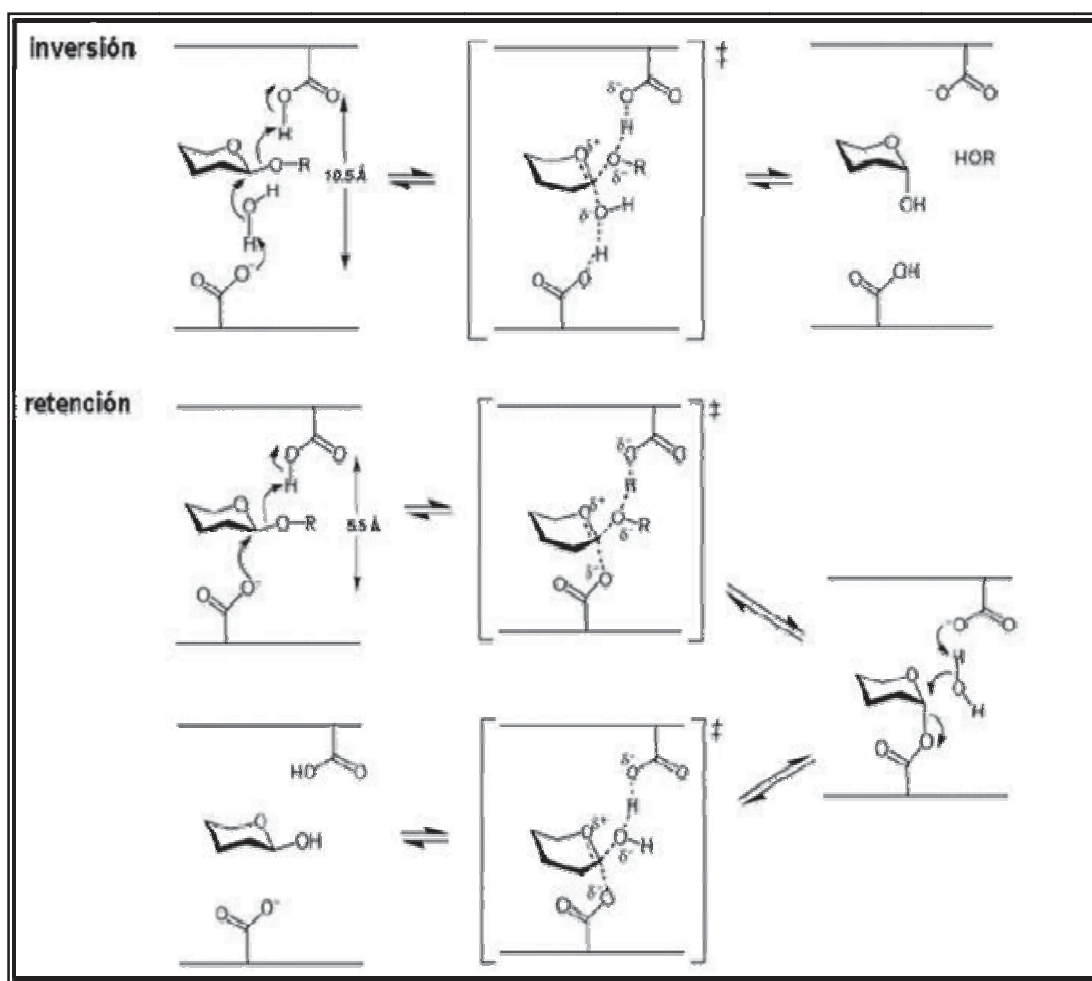


Figura 2.8. Mecanismo de hidrólisis del enlace glucosídico mediante glucosidasas. (Polaina, 2004).

## 2.8. $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.

Dentro del grupo de las glucosidasas, dos enzimas: la  $\alpha$ -amilasa y la glucoamilasa han sido aplicadas como catalizadores en la hidrólisis enzimática de materiales con alto contenido en almidón como el puré de castaña (López *et al.*, 2006; Liu, 2002).

La  $\alpha$ -amilasa puede hidrolizar el almidón a maltosa, glucosa y maltotriosa al romper los enlaces entre unidades de glucosa adyacentes en la cadena lineal de amilosa y los enlaces 1,4- $\alpha$ -D-glucosídicos de la amilopectina (Bravo *et al.*, 2006). Esta enzima puede ser obtenida de fuentes animales o microbianas. Actualmente la  $\alpha$ -amilasa es producida industrialmente por microorganismos. Los más comúnmente usados son *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* (Salieri *et al.*, 1995). Las especies de *Bacillus* han atraído mucho interés en las últimas décadas por su capacidad para producir enzimas extracelulares que son estables a altos valores de pH (Baysal *et al.*, 2008).

La glucoamilasa hidroliza los glucanos por los extremos no reductores de la amilosa y la amilopectina de una manera efectiva y su acción prolongada puede convertir todo el almidón en glucosa como único producto final. A diferencia de la  $\alpha$ -amilasa, la glucoamilasa también pueden hidrolizar el enlace  $\alpha$  (1,6) en los puntos de ramificación de la amilopectina, aunque a más baja velocidad que los enlaces  $\alpha$  (1,4) (Gangadharan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Las glucoamilasas son producidas por un diverso grupo de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos; sin embargo las enzimas comercialmente usadas son producidas por especies de *Aspergillus* y *Rhizopus* (Varzakas *et al.*, 2007; Norouzian *et al.*, 2006).

## 2.9. Mecanismo de reacción de la hidrólisis enzimática.

De manera general, las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo en dos etapas: la primera consiste en una reacción reversible en la que se forma un complejo enzima-sustrato; en la segunda etapa, se efectúa una reacción irreversible, donde ocurre la liberación de los productos de hidrólisis y la enzima. Para el caso de una reacción en la que interviene un solo sustrato, el mecanismo de reacción se puede representar por la ecuación 2.2 (Aehle 2004; Bisswanger, 2002).



Donde:

E: enzima

A: sustrato

EA: complejo enzima-sustrato

$k_1$  y  $k_{-1}$ : constantes cinéticas

En general, la velocidad de reacción de la segunda etapa es muy rápida, por lo que se puede reducir al mecanismo de la ecuación 2.3.



En el caso particular de la reacción de hidrólisis enzimática del almidón, la reacción se puede representar por la ecuación 2.4.



Los productos pueden variar de acuerdo a las condiciones de la reacción, se puede obtener glucosa, azúcares reductores y/o algunos oligómeros.

Si en la ecuación 2.4, se tiene un exceso de agua de alrededor de 55.56 mol/L (Bisswanger, 2002), la ecuación cinética para esta reacción se puede representar por la ecuación 2.5.

$$C_P = (C_P)_{eq} [1 - e^{-kt}] \quad (2.5)$$

Donde:

$C_P$ : concentración de producto, g/L

$(C_P)_{eq}$ : concentración de producto en el equilibrio, g/L

$k$ : es una constante,  $\text{min}^{-1}$  (está en función de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_{-1}$  y de la concentración inicial de agua en exceso)

$t$ : tiempo, min

Los datos experimentales de la concentración de producto a diferentes tiempos se pueden ajustar a la ecuación 2.5 para obtener el modelo cinético correspondiente a la hidrólisis enzimática del almidón de la papa.

## METODOLOGÍA

### 3.1. Sustrato.

Las papas fueron obtenidas de mercados locales de la comunidad de Galicia, España, con la característica de desecho. El sustrato utilizado en este estudio fue un polvo de papa seca que se obtuvo al someter a las papas frescas a un proceso de lavado, rebanado, secado y molienda. Para el secado se utilizó un deshidratador de corriente de aire (Excalibur<sup>®</sup>, Carolina del Norte, EEUU) que se operó a una temperatura de 60 °C y del cual se extrajo el 80.35 % (p/p) de agua del peso total de las papas frescas.

En la etapa de molienda se utilizó un molino para café (Moulinex<sup>®</sup>, Ecully, Francia). La papa seca molida se tamizó a 40 mesh (estándar de tamiz).

### 3.2. Determinación de humedad.

El porcentaje de humedad remanente en el sustrato, se determinó de la siguiente manera:

1. Se introdujeron 3 vidrios de reloj en una estufa a 105 °C durante 24 h aproximadamente.
2. Se extrajeron y se dejaron enfriar en un desecador con sílica-gel durante 5 min.
3. Se determinó su peso individual ( $w_{c(i-1)}$ ) en una balanza analítica.
4. Se volvieron a introducir a la estufa.
5. Después de un tiempo, se repitió el paso 2 y se volvieron a obtener sus pesos ( $w_{c(i)}$ ).
6. Se comparó el peso  $w_{c(i-1)}$  con  $w_{c(i)}$ . Si eran iguales, el peso de cada vidrio de reloj quedaba determinado; de lo contrario, se repetían los pasos 4,5 y 6 hasta alcanzar un peso constante ( $w_c$ ).
7. Se pesaron pequeñas cantidades conocidas (alrededor de 5 gramos) de sustrato húmedo ( $w_{mh}$ ) dentro de los vidrios de reloj.
8. Se volvieron a introducir a la estufa durante aproximadamente 24 h hasta alcanzar un peso seco constante del vidrio de reloj con el de la muestra seca ( $w_{cms}$ ).
9. Por diferencia entre  $w_{cms}$  y  $w_c$  se calculó el peso de la muestra seca ( $w_{ms}$ ).

10. Se calculó el porcentaje en peso de humedad para cada una de las 3 pruebas con la ecuación 3.1:

$$\mathcal{H} = \frac{w_{mh} - w_{ms}}{w_{mh}} * 100 \quad (3.1)$$

11. Se obtuvo una media del porcentaje de humedad para ser utilizado en el estudio.

### 3.3. Hidrólisis ácida cuantitativa.

La composición del sustrato se determinó mediante la aplicación de una hidrólisis ácida cuantitativa (Garrote *et al.*, 1999).

El procedimiento consiste en una hidrólisis ácida en dos etapas de una hora cada una, utilizando ácido sulfúrico. En la primera etapa se lleva a cabo una hidrólisis con una solución de ácido al 72 % (p/p) a una temperatura de 30 °C; y en la segunda se diluye la solución de ácido al 4 %, (p/p) y se hidroliza a una temperatura de 121 °C. La metodología se presenta con detalle a continuación.

- Primera etapa
  1. Se pesó una cantidad perfectamente conocida de sustrato (Alrededor de 0.5 g de materia seca con 0.0001 g de precisión en una balanza analítica) en un tubo de ensayo preferiblemente bajo y ancho.
  2. Se añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % ( $\rho = 1.6338$ ) en peso y con una varilla de vidrio se homogenizó la mezcla.
  3. Se colocaron los tubos en un baño de agua a 30 °C durante 1 h, agitando cada 5-10 min.
  4. Se tomó el peso de un frasco tapado y seco con capacidad suficiente para llevar a cabo la dilución del ácido sulfúrico de 72 % al 4 % de concentración.
  5. Se retiraron los tubos y se pasó el contenido al frasco preparado en el paso 4. Se llevó a cabo una dilución con agua destilada hasta lograr una concentración de ácido

sulfúrico del 4 %. El peso total en el frasco, previamente tarado, se puede estimar con la ecuación 3.2 ó 3.3:

$$w_{\text{total}} = \left[ \frac{(w_{\text{ms}})}{(1-\mathcal{H})} \right] + \left[ \frac{x_{72\%} * V_{72\%} * \rho_{72\%}}{x_{4\%}} \right] \quad (3.2)$$

Donde:

$w_{\text{total}}$ : peso de la solución en el frasco antes de autoclave, g

$w_{\text{ms}}$ : peso de sustrato (materia seca), g

$x_{72\%}$ : fracción masa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 %, g/g

$V_{72\%}$ : volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 %, mL

$\rho_{72\%}$ : densidad de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 %, g/mL

$x_{4\%}$ : fracción masa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 4 %, g/g

Sustituyendo los valores, se obtiene:

$$w_{\text{total}} = \left[ \frac{(0.5 \pm 0.0001)}{(1-\mathcal{H})} \right] + \left[ \frac{0.72 * 5 * 1.6338}{0.04} \right] \quad (3.3)$$

En este punto había una mezcla en 2 fases, una sólida, que contenía lignina con resto de polisacáridos y una líquida, que contenía algunos azúcares y principalmente oligómeros.

- Segunda etapa

1. El frasco bien cerrado se introdujo en una autoclave a 121 °C y 1 atm; y se dejó reaccionar la mezcla durante 1 h.
2. Se dejó enfriar el frasco hasta aproximadamente la temperatura ambiente.
3. Se secó perfectamente y se determinó su peso. La diferencia entre este peso y el peso antes de introducirlo a la autoclave fueron las pérdidas, las cuales se restaron al peso de la solución ( $w_{\text{total}}$ ) contenida en el frasco.

En este punto la mezcla contenía un sólido (lignina de *Klason*) y un líquido (azúcares y posibles restos de oligómeros).

- Determinación de la lignina de *Klason*

1. Se seleccionó un crisol de peso seco conocido.
2. Se filtró la solución a través de una membrana de peso seco conocido de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se separó una alícuota del filtrado para su análisis.
3. El filtro con el residuo sólido se secó a 105 °C durante 24 h.
4. El incremento de peso seco correspondió a la lignina de *Klason*. Y se calculó con la ecuación 3.4:

$$C_{LK}(\%) = \frac{w_{cLKs} - w_{cs}}{0.5 \pm 0.0001} * 100 = \frac{w_{LK}}{0.5 \pm 0.0001} * 100 \quad (3.4)$$

Donde:

$C_{LK}$ : porcentaje en peso de lignina de *Klason*, g/100 g de sustrato (materia seca)

$w_{cLKs}$ : peso del crisol y la lignina de *Klason* seco, g

$w_{cs}$ : peso del crisol seco, g

$w_{LK}$ : peso de la lignina de *Klason*, g

- Determinación de los polisacáridos

1. El contenido de polisacáridos expresados como glucanos, xilanos y arabanos, se calculó mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, en siglas Inglesas) en la cual se midió el contenido de azúcares.

La ecuación 3.5 se utilizó para calcular el porcentaje en peso de polisacáridos contenido en el sustrato:

$$C_P(\%) = \frac{M_{mdh}}{M_m} \cdot F_G \cdot \frac{C_m}{1025} \cdot \frac{w_{total\ corregido} - w_{LK} + \left[ \frac{(0.5 \pm 0.0001)}{(1-H)} * H \right]}{0.5 \pm 0.0001} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Donde:

$C_P$ : porcentaje en peso de glucano, xilano o arabano, g/100 g sustrato (materia seca)

$\mathcal{M}_{\text{mdh}}$ : peso molecular del monómero deshidratado. Para glucosa, 162 g/mol; para xilosa y arabinosa, 132 g/mol

$\mathcal{M}_{\text{m}}$ : peso molecular del monómero. Para glucosa 180 g/L; para xilosa y arabinosa, 150 g/L

$F_{\text{G}}$ : factor de corrección por las pérdidas en la hidrólisis. De 1.025-1.04 (Browning, 1967)

$C_{\text{m}}$ : concentración de monómero, g/L, (medida por HPLC)

### 3.4. Enzimas.

Las enzimas usadas en este trabajo fueron  $\alpha$ -amilasa comercial (Termamyl SC DS<sup>®</sup>) y glucoamilasa comercial (Saczyme<sup>®</sup>), proveídas por Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca.

Termamyl SC DS<sup>®</sup> fue producida por fermentación de *Bacillus licheniformis*. La enzima comercial contiene metionina, cloruro de sodio y sacarosa como estabilizadores.

Saczyme<sup>®</sup> fue producida por fermentación de *Aspergillus niger*. La enzima fue separada y purificada del medio de producción. La solución comercial contiene también sacarosa y glucosa como estabilizadores; y sorbato de potasio y benzoato de sodio como conservadores.

### 3.5. Determinación de actividad enzimática.

La metodología que se siguió para la determinación de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa (Termamyl SC DS<sup>®</sup>) y la glucoamilasa (Saczyme<sup>®</sup>) se describe a continuación (López *et al.*, 2006; Murado *et al.*, 1993):

1. Se preparó una solución de almidón al 4 %.
2. Utilizando ácido cítrico y fosfato di-básico de sodio, se preparó una solución tampón cítrico-fosfato 150 mM, pH 5.0.
3. Se preparó una solución tamponada de almidón al 2.4 % siguiendo las siguientes relaciones en volumen: 0.6 v/v de solución de almidón al 4 % + 0.4 v/v de solución tampón cítrico-fosfato.
4. Se prepararon 4 tubos de 10 mL con tapón de rosca.

5. Se agregaron 0.4 mL de solución tamponada de almidón a cada tubo y se colocaron en un baño de agua a 40 °C. Aproximadamente 5 min, para temperar.
6. Se separaron las pruebas.
  - a. 2 tubos se utilizaron para hacer pruebas a tiempos de reacción de 10 min.
  - b. 2 tubos para hacer pruebas al tiempo 0.
7. Se llevó a cabo una hidrólisis enzimática del almidón.

Las enzimas libres se diluyeron como sigue:

- i. Termamyl SC DS<sup>®</sup> (dilución 1/55000).
- ii. Saczyme<sup>®</sup> (dilución 1/7500).

Para t = 0

- a. Se añadieron 0.48 mL de ácido 3,5-dinitroresorcinol (DNS) a cada tubo.
- b. Se añadieron 0.08 mL de solución de enzima diluida.

Para t = 10

- a. Se añadieron 0.08 mL de solución de enzima diluida a cada tubo, se agitó y dejaron incubar en un baño de agua a 40 °C por 10 min.
- b. Se sacaron y se añadieron inmediatamente 0.48 mL de solución de ácido 3,5-dinitroresorcinol (DNS) y se agitó en un *Vortex*. El pH alcalino del DNS detiene la reacción.
8. Se taparon los tubos y se dejaron durante 5 min en un baño de agua a ebullición a su temperatura de ebullición normal.
9. Se retiraron, se les añadieron 5 mL de agua destilada y se agitaron.
10. Se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro V-670 (Jasco, Tokio, Japón). Para los del tiempo 0, se midió una absorbancia ABS (0) y para los del tiempo de 10 min una absorbancia ABS (t).
11. La actividad enzimática se calculó con la ecuación 3.6:

$$\text{ACTIVIDAD} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \{ [ \text{ABS}(t) - \text{ABS}(0) ] * \text{PENDIENTE (curva de calibración)} \} + \text{ORDENADA (curva de calibración)} * \left\{ \frac{\text{DILUCIÓN}}{\text{mL de solución de enzima diluida}} * \frac{1}{10} \right\} \quad (3.6)$$

Donde:

U: cantidad de azúcares reductores generados por minuto en un litro de solución, g/L · min

De manera particular, la actividad enzimática para cada enzima se calculó con las ecuaciones 3.7 y 3.8:

- Para el lote de Termamyl SC DS<sup>®</sup>

$$\text{ACTIVIDAD} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \{ [ \text{ABS}(t) - \text{ABS}(0) ] * \text{PENDIENTE (curva de calibración)} \} + \text{ORDENADA (curva de calibración)} * \left\{ \frac{55000}{0.08} * \frac{1}{10} \right\} \quad (3.7)$$

- Para el lote de Saczyme<sup>®</sup>

$$\text{ACTIVIDAD} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \{ [ \text{ABS}(t) - \text{ABS}(0) ] * \text{PENDIENTE (curva de calibración)} \} + \text{ORDENADA (curva de calibración)} * \left\{ \frac{7500}{0.08} * \frac{1}{10} \right\} \quad (3.8)$$

La curva de calibración se preparó utilizando soluciones de azúcar a diferentes concentraciones y midiendo la absorbancia a 540 nm.

### 3.6. Pretratamiento.

Todos los experimentos fueron efectuados manejando 100 g de mezcla de reacción. Se le aplicó el mismo pretratamiento a cada uno de los experimentos realizados en este estudio.

La metodología para llevar a cabo el pretratamiento fue la siguiente (López *et al.*, 2006):

1. De acuerdo al porcentaje en peso de papa requerido; se pesó cierta cantidad de sustrato (materia seca) para preparar 100 g de mezcla de reacción en frascos de vidrio con rosca de 250 mL.
2. Se añadió agua hasta lograr alrededor de 50 g (la cantidad exacta depende de la cantidad de enzima que se ha de agregar) de mezcla papa-agua.

3. Se calentó con agitación en un frasco con rosca a 500 rpm hasta alcanzar la temperatura de ebullición. Esto se logró mediante una placa de calentamiento con agitación magnética y sensor de temperatura (IKA<sup>®</sup> RCT basic/safety control, Staufen, Alemania).
4. Se añadieron 40 g de solución tampón cítrico-fosfato 150 mM, pH 5.0, preparado con ácido cítrico y fosfato dibásico de sodio.

En este punto se tuvo una solución viscosa (SP) de pH 5.0 que contenía el almidón del sustrato gelatinizado, al cual se le aplicaron las enzimas para la hidrólisis.

### 3.7. Hidrólisis enzimática.

Los experimentos de hidrólisis enzimática fueron divididos en 3 estudios. En el primer estudio, se hizo un estudio preliminar con la finalidad de conocer los niveles más adecuados que pueden tomar las variables, tiempo y temperatura, que influyen en la hidrólisis, así como corroborar que la acción catalítica de la combinación enzimática es mejor que la de cada enzima por separado. En el segundo estudio, se hizo un diseño de experimentos y un análisis de superficie de respuesta que incluía como variables independientes a la temperatura, el tiempo y la concentración de sustrato. El tercer estudio trató de un diseño de experimentos y la aplicación de la metodología de superficie de respuesta, tomando como variables independientes la temperatura, el tiempo, la relación unidades de actividad/sustrato y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa.

La relación unidades de actividad/sustrato se refiere a las unidades de actividad enzimática (unidades de actividad de  $\alpha$ -amilasa + glucoamilasa) que deben añadirse por una determinada masa de sustrato (materia seca) en la mezcla de reacción.

La fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa se refiere a la cantidad de unidades de actividad de  $\alpha$ -amilasa que contiene una unidad de actividad de la mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa. La fracción de actividad de glucoamilasa, es la unidad menos la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa.

Para el primera y segundo estudio se midió como variable de respuesta o variable dependiente, la concentración de azúcares reductores en g/L y para el tercer estudio, se midió la concentración de glucosa en g/L.

A continuación se presenta una metodología detallada para cada uno de los 3 estudios.

- Metodología de hidrólisis enzimática para el primer estudio

En este estudio se llevaron a cabo hidrólisis enzimáticas utilizando una combinación de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa a diferentes temperaturas. Posteriormente se efectuaron experimentos con  $\alpha$ -amilasa sola y glucoamilasa sola a la temperatura óptima en el uso de la mezcla.

1. Se llevó una solución pretratada (SP) con una concentración de sustrato (materia seca) de 2.4 % hasta la temperatura de reacción, manteniendo una agitación de 600 rpm mediante una placa de calentamiento con agitación magnética y sensor de temperatura (IKA<sup>®</sup> RCT basic/safety control, Staufen, Alemania).

Las temperaturas de reacción para las diferentes cinéticas fueron 40, 45, 55, 70 y 75 °C.

2. Se añadieron las cantidades adecuadas de enzimas. Con base a López *et al.* (2004), se mantuvo una relación unidades de actividad/sustrato de 6 U/g y una fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa 0.35 para el uso de una mezcla.

Las cantidades exactas de enzimas se calcularon con las ecuaciones 3.9 y 3.10. Estas ecuaciones también fueron utilizadas para el cálculo de las cantidades exactas de enzimas en las hidrólisis de los otros estudios.

$$V_{\alpha\text{-amilasa}}(\text{mL}) = \text{Concentración de sustrato} \left( \frac{\text{g}}{\text{g}} \right) * \text{Masa mezcla de reacción}(\text{g}) * \left( \frac{\text{Relación unidades de actividad}}{\text{Sustrato}} \right) \left( \frac{\text{U}}{\text{g}} \right) * (\text{Fracción de actividad de } \alpha\text{-amilasa}) \left( \frac{\text{U}}{\text{U}} \right) * \left( \frac{1}{\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa}} \right) \left( \frac{\text{mL}}{\text{U}} \right) \quad (3.9)$$

$$V_{\text{glucoamilasa}}(\text{mL}) = \text{Concentración de sustrato} \left( \frac{\text{g}}{\text{g}} \right) * \text{Masa mezcla de reacción}(\text{g}) * \left( \frac{\text{Relación unidades de actividad}}{\text{Sustrato}} \right) \left( \frac{\text{U}}{\text{g}} \right) * (1 - \text{Fracción de actividad de } \alpha\text{-amilasa}) \left( \frac{\text{U}}{\text{U}} \right) * \left( \frac{1}{\text{Actividad de glucoamilasa}} \right) \left( \frac{\text{mL}}{\text{U}} \right) \quad (3.10)$$

3. Comenzó la reacción y se tomaron muestras a diferentes tiempos.
  4. Cada muestra fue centrifugada y el sobrenadante fue analizado inmediatamente para evitar retrogradación.
  5. El muestro concluyó cuando se alcanzó un estado estable en la concentración de azúcares reductores, aproximadamente a los 180 min.
- Metodología de hidrólisis enzimática para el segundo estudio

Los parámetros explorados en el primer estudio dieron la base para llevar a cabo un diseño de experimentos en el cual se seleccionaron los mejores niveles para las variables independientes temperatura y tiempo. Además, la concentración de sustrato se incluyó como variable independiente. La metodología de superficie de respuesta fue utilizada en este estudio (Larrazábal y Camacho, 2008; Vázquez y Martin, 1998; Roberto, *et al.*, 1995).

1. Se hizo un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken (Box y Behnken, 1960). Las variables fijadas fueron la agitación (600 rpm), la relación unidades de actividad/sustrato (6 U/g) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa (0.35). Las variables independientes (factores) y sus respectivos niveles fueron la concentración de sustrato (2, 4, 6 %), la temperatura (68, 70, 72 °C), el tiempo (60, 120, 180 min). La concentración de azúcares reductores fue la única variable dependiente.
2. Se ejecutaron los experimentos respetando su aleatoriedad.
3. Para cada experimento, se llevó a la solución pretratada (SP) hasta la temperatura de reacción manteniendo una agitación de 600 rpm.
4. Se añadieron las cantidades adecuadas de enzimas.
5. Se detuvo la reacción al tiempo dado por el experimento efectuado.
6. Inmediatamente, se filtró la mezcla de reacción por una membrana de 0.45  $\mu$ m (diámetro de poro).
7. Se determinó la concentración de azúcares de reductores del filtrado.

- Metodología de hidrólisis enzimática para el tercer estudio

La relación unidades de actividad/sustrato y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa fueron consideradas como constantes en los dos estudios anteriores. Para conocer el efecto de la variación de estas dos variables sobre la eficiencia de la hidrólisis enzimática se llevó cabo otro estudio de superficie de respuesta.

1. Se hizo un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken. Las variables fijadas fueron la agitación (600 rpm) y la concentración de sustrato (6 %). Las variables independientes (factores) y sus respectivos niveles fueron la temperatura (64, 67, 70 °C), el tiempo (60, 135, 210 min), la relación unidades de actividad/sustrato (3, 51.5, 100 U/g) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa (0.1, 0.5, 0.9). La concentración de glucosa fue la única variable dependiente.
2. Se ejecutaron los experimentos respetando su aleatoriedad.
3. Para cada experimento, se llevó a la solución pretratada (SP) hasta la temperatura de reacción manteniendo una agitación de 600 rpm.
4. Se añadieron las cantidades adecuadas de enzimas.
5. Se detuvo la reacción al tiempo dado por el experimento efectuado.
6. Inmediatamente, se filtró la mezcla de reacción por un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m (tamaño de poro).
7. Se determinó la concentración de glucosa del filtrado.

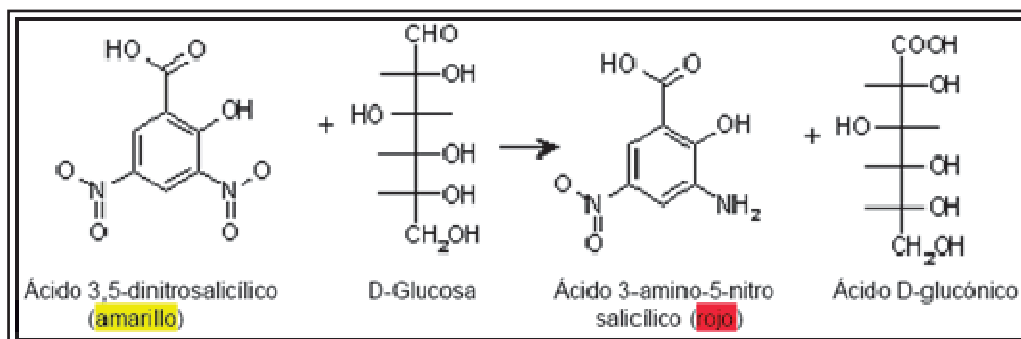
### 3.8. Métodos analíticos.

- Determinación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores fue medida utilizando el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (López *et al.*, 2004; Murado *et al.*, 1993; Chaplin, 1986).

1. Se tomaron 0.050 mL de líquido filtrado y se depositó en un tubo de 15 mL con tapón de rosca; se agregó 0.450 mL de agua para lograr una dilución 1:10.

2. Se agregaron 0.500 mL de DNS.
3. Se tapó el tubo y se dejó en un baño de agua en ebullición por 5 min. Este compuesto amarillo es reducido por los azúcares reductores como la glucosa y se libera un producto de color rojizo (ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico), tal como lo muestra la el esquema de reacción figura 3.1.



**Figura 3.1. Reacción del ácido 3,5 dinitrosalicílico con la glucosa. (Chaplin, 1986).**

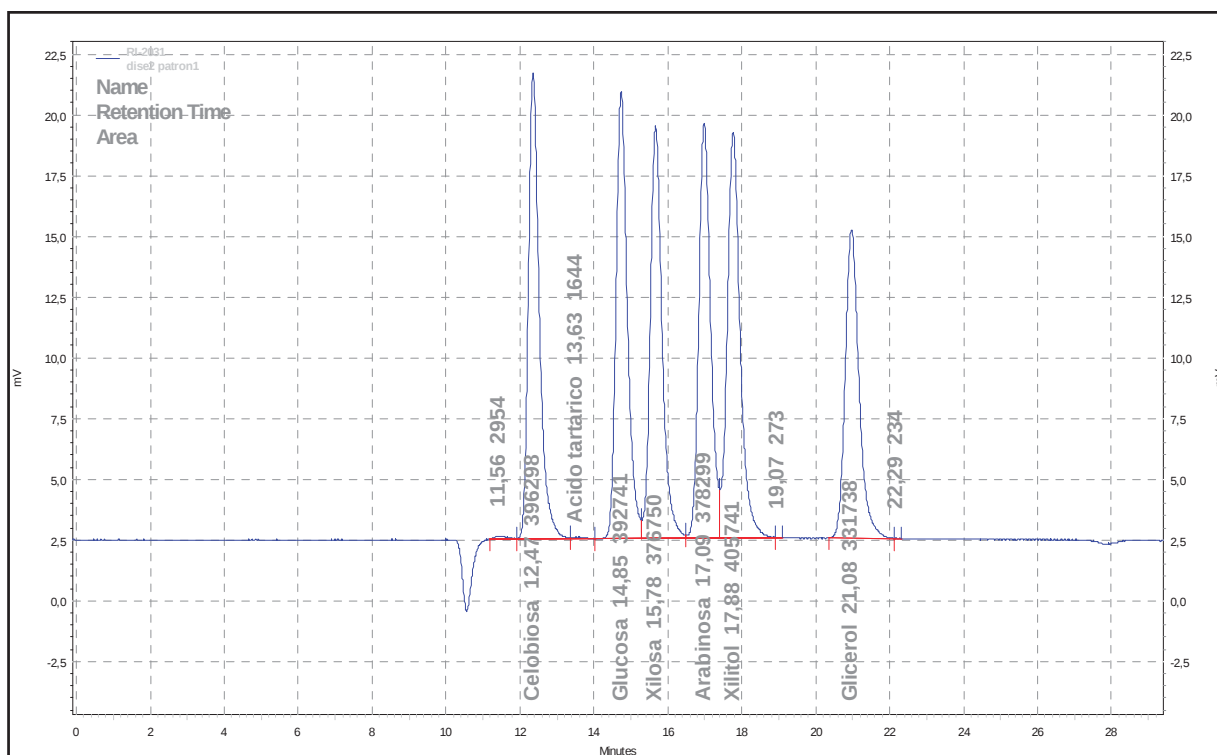
4. Se agregaron 5 mL de agua destilada.
5. El líquido coloreado se vació en una cubeta de plástico a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , colocada en una jeringa de 10 mL.
6. La absorbancia fue medida a 540 nm en un espectrofotómetro (V-670, Jasco, Tokio, Japón).
7. La concentración de azúcares reductores fue determinada por una curva de calibración usando glucosa como estándar.

- **Determinación de glucosa**

La glucosa liberada en la hidrólisis fue medida por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en sus siglas en Ingles. Esto se llevó a cabo usando una columna analítica (300 x 7.80 mm) para azúcares y ácidos orgánicos (Modelo Rezex RHM, Phenomenex, Torrance, California, EUA) con elución isocrática (velocidad de flujo de 0.400 ml/min y fase móvil de ácido sulfúrico 0.025 M), una temperatura de 45 °C y un detector de índice de refracción (LC 2000 plus, Jasco, Tokio, Japón).

La muestra introducida al cromatógrafo se preparó de la manera siguiente:

1. Se tomaron 0.5 mL del filtrado y se le aplicó una dilución 1:20, añadiendo 9.5 mL de agua destilada.
2. Mediante la utilización de una jeringa de 10 mL y una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , se llenó un vial para HPLC con la dilución 1:20.
3. Se analizó por HPLC hasta un tiempo de 30 min.
4. Se obtuvieron cromatogramas para cada muestra y se determinó la concentración (g/L) de glucosa por comparación con el cromatograma de una solución patrón. La figura 3.2 muestra un cromatograma de índice de refracción (mV) vs tiempo (min) para una solución patrón de concentraciones conocidas de Arabinosa, Glucosa, Celobiosa, Xilosa, Glicerol, Etanol y Xilitol. El pico de glucosa se sitúa en un tiempo de retención entre 14 y 15 min y tiene un área bajo la curva de 1485392741 que corresponde a una concentración de 0.993 g/L.



**Figura 3.2.** Cromatograma de una solución patrón que contiene glucosa entre otros compuestos, obtenido por HPLC.

### **3.9. Métodos estadísticos.**

El diseño y manejo de los datos experimentales fue llevado a cabo utilizando la hoja de cálculo MS-Excel<sup>®</sup> 2007 (Microsoft corp., Redmond, Washington, EUA) y el programa estadístico Design Expert<sup>®</sup> 7.1.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Minnesota, EUA). Los modelos fueron validados estadísticamente mediante el análisis de varianza y el cálculo del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Composición del sustrato.

El contenido de humedad en el sustrato obtenido fue de 8.13 %.

La composición del polvo de papa utilizado como sustrato fue determinada por triplicado mediante hidrólisis ácida cuantitativa (Garrote *et al.*, 1999). La composición (base seca) obtenida se muestra en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1. Composición en polisacáridos y lignina del sustrato.**

| Componentes | Composición de materia seca (% p/p) |
|-------------|-------------------------------------|
| Glucanos    | 65.09 $\pm$ 1.52                    |
| Xilanos     | 3.94 $\pm$ 0.54                     |
| Arabanos    | 2.55 $\pm$ 0.56                     |
| Lignina     | 0.82 $\pm$ 0.14                     |

La cantidad de glucanos que fue determinada podría provenir de las hemicelulosas, celulosa y/o almidón. Los xilanos y arabanos provienen específicamente de las hemicelulosas y debido a sus bajas concentraciones, se puede inferir que la cantidad de hemicelulosas es pequeña; por lo tanto, los glucanos provenientes de estas, son despreciables.

Por otro lado, las hemicelulosas actúan como ligandos entre la celulosa y la lignina, formando una red, dando rigidez a las plantas (Hendriks y Zeeman, 2008). La baja concentración de lignina y de hemicelulosas indica que la red celulosa-hemicelulosa-lignina es pequeña, por lo que el porcentaje de celulosa en el sustrato es mínima y por lo tanto se puede suponer que la cantidad de glucanos determinada en el análisis proviene en su totalidad del almidón.

Para propósitos comparativos, la composición de los tallos de papa también fue determinada por hidrólisis ácida cuantitativa, obteniendo la siguiente composición (base seca): glucanos, 33.11 %  $\pm$  1.56 %; xilanos, 7.52 %  $\pm$  0.80 %; arabanos, 2.56 %  $\pm$  0.56 %; lignina de Klason, 11.33 %  $\pm$  0.44 %.

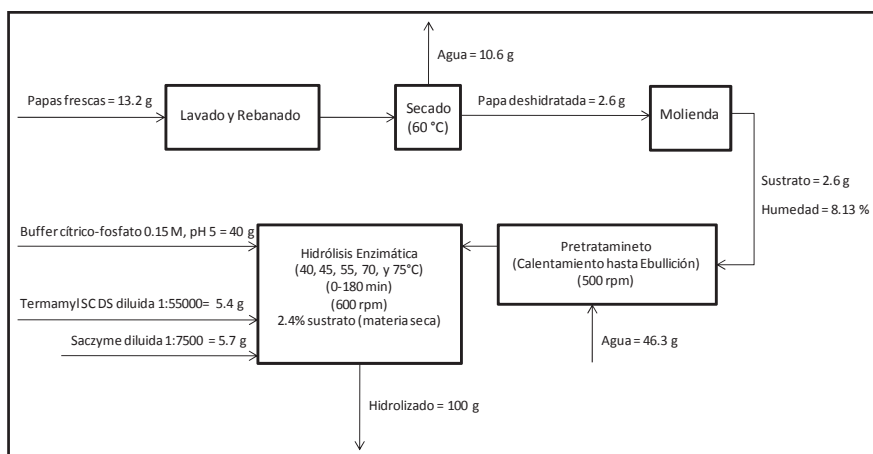
La alta concentración de lignina y xilanos sugiere que los glucanos en este caso proceden de la celulosa y las hemicelulosas.

## 4.2. Actividades de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.

Las actividades enzimáticas de los lotes de enzimas utilizados en este trabajo fueron determinadas. El valor de actividad de la  $\alpha$ -amilasa (Termamyl SC DS<sup>®</sup>) fue 51273 U/ml y para la glucoamilasa (Saczyme<sup>®</sup>) fue 12313 U/ml. López *et al.* (2004) determinaron actividades para otra  $\alpha$ -amilasa comercial (Termamyl 120L (S)<sup>®</sup>) y otra glucoamilasa comercial (AMG 300L<sup>®</sup>), obteniendo valores más bajos, 734 U/ml y 245.9 U/ml, respectivamente. Entonces, la enzima Termamyl SC DS<sup>®</sup> fue 70 veces más activa que la enzima Termamyl 120L (S)<sup>®</sup> y la enzima Saczyme<sup>®</sup> fue 50 veces más activa que la enzima AMG 300L<sup>®</sup>.

## 4.3. Hidrólisis enzimática utilizando una combinación de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.

Una mezcla de reacción (100 g) al 2.4 % (p/p) de sustrato seco fue hidrolizada a diferentes temperaturas. Se manejó una relación unidades de actividad/sustrato de 6 U/g y una fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa de 0.35 (López *et al.*, 2004). La figura 4.1 muestra la secuencia experimental que se siguió en este primer estudio, cuyas etapas fueron: lavado y rebanado, secado, molienda, pretratamiento e hidrólisis enzimática.



**Figura 4.1. Diagrama de flujo experimental del primer estudio.**

La solución Termamyl SC DS<sup>®</sup> fue diluida 55000 veces y la solución de Saczyme<sup>®</sup> fue diluida 7500 veces para obtener cantidades medibles y poder adicionarlas en los experimentos de

hidrólisis. Las densidades de las soluciones de enzima y la mezcla de reacción se consideraron igual a la densidad del agua líquida (1 g/mL) por la dilución.

Los resultados experimentales de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) durante el transcurso de la hidrólisis de 24 g/L de sustrato a diferentes temperaturas están presentados en la tabla 4.2. La máxima concentración de azúcares reductores fue alcanzada a 180 min para todas las temperaturas. Un efecto positivo de la temperatura sobre la concentración máxima de azúcares reductores fue observado dentro del intervalo de 40 a 70 °C, alcanzando hasta 14.1 g/L a 70 °C. Trabajando a una temperatura de 75 °C el valor máximo de la concentración de azúcares reductores observado fue solo de 8.6 g/L.

**Tabla 4.2. Concentración de azúcares reductores obtenida de la hidrólisis de 24 g/L de sustrato a diferentes temperaturas.**

| Tiempo (t), min | 40 °C          | 45 °C          | 55 °C          | 70 °C          | 75 °C          |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 | $C_{AR}$ , g/L | $C_{AR}$ , g/L | $C_{AR}$ , g/L | $C_{AR}$ , g/L | $C_{AR}$ , g/L |
| 0               | 0.001          | 0.001          | 0.001          | 0.01           | 0.01           |
| 20              | 2.12           | 2.06           | 4.99           | 5.50           | 5.32           |
| 40              | 4.69           | 4.91           | 7.08           | 8.11           | 6.90           |
| 60              | 5.34           | 6.35           | 8.76           | 10.24          | 7.73           |
| 80              | 6.45           | 7.32           | 9.82           | 11.36          | ---            |
| 100             | 7.44           | 8.64           | 10.17          | 12.11          | 8.19           |
| 120             | 7.97           | 9.18           | 11.30          | 12.49          | 8.89           |
| 140             | ---            | ---            | ---            | 12.86          | ---            |
| 150             | 9.28           | 10.15          | 12.41          | ---            | 8.34           |
| 160             | ---            | ---            | ---            | 13.57          | ---            |
| 180             | 9.55           | 10.75          | 12.89          | 14.10          | 8.58           |

La hidrólisis enzimática puede ser estudiada como una reacción reversible de primer orden, en la que el almidón es el único polímero que se ve afectado por la acción de las dos enzimas utilizadas en este estudio; y el cual es transformado en azúcares reductores, tal como lo muestra la ecuación 4.1.



El modelo matemático representado por la ecuación 4.2, fue obtenido a partir de un balance de materia aplicado a la reacción de la ecuación 4.1, donde se tomó en consideración que la concentración de agua de aproximadamente 53.45 mol/L, está en exceso (ver apartado 2.9).

$$C_{AR} = (C_{AR})_{eq}(1 - e^{-kt}) \quad (4.2)$$

Donde:

$C_{AR}$ : concentración de azúcares reductores, g/L

$(C_{AR})_{eq}$ : concentración de azúcares reductores en el equilibrio, g/L

$k = (k_1 C_A + k_{-1})$ : constante,  $\text{min}^{-1}$

$C_A$ : concentración de agua, g/L

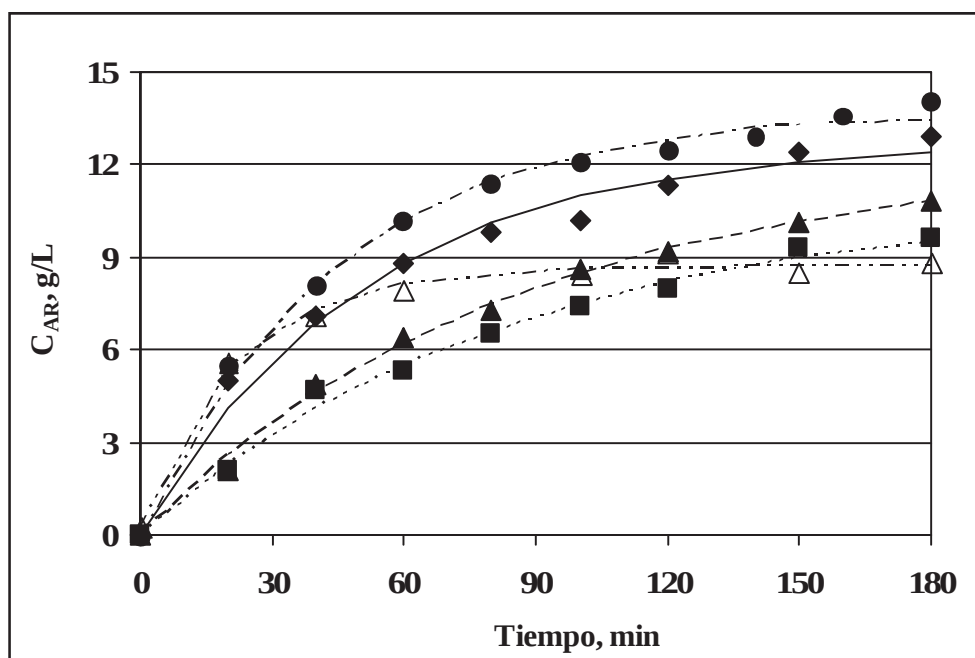
t: tiempo, min

Los datos experimentales fueron ajustados al modelo matemático de la ecuación 4.2. La tabla 4.3 muestra los resultados cinéticos y estadísticos ajustados de los datos experimentales. El coeficiente de determinación muestra una buena concordancia entre los datos experimentales y los valores predichos. La constante (k) se incrementó con la temperatura. Sin embargo, la concentración de azúcares reductores en el equilibrio ( $(C_{AR})_{eq}$ ) se incremento con la temperatura únicamente en el rango de temperatura de 40 a 70 °C, alcanzando valores de 10.8 a 13.8 g/L; pero decreció a 75 °C con un valor de 8.5 g/L, lo que indica que existe desnaturalización enzimática por efecto de la temperatura.

**Tabla 4.3. Parámetros de ajuste a la ecuación 4.2, para los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.**

| T (°C) | k ( $\text{min}^{-1}$ ) | $(C_{AR})_{eq}$ (g/L) | Coeficiente de determinación, $R^2$ |
|--------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 40     | 0.0118                  | 10.8                  | 0.9928                              |
| 45     | 0.0119                  | 12.2                  | 0.9962                              |
| 55     | 0.0196                  | 12.8                  | 0.9870                              |
| 70     | 0.0225                  | 13.8                  | 0.9950                              |
| 75     | 0.0454                  | 8.5                   | 0.9933                              |

La figura 4.2 representa las cinéticas de los datos experimentales y los datos ajustados al modelo matemático de la ecuación 4.2 a diferentes temperaturas en la que un buen ajuste puede observarse. La tendencia exponencial es similar para cada temperatura y se puede notar que a un tiempo de 60 min se logra el máximo crecimiento de la concentración de azúcares reductores. Tiempos arriba de 60 min, incrementan muy poco la concentración de azúcares reductores puesto que se acercan a los tiempos de equilibrio. A 75 °C se alcanza una concentración de azúcares reductores mínima.



**Figura 4.2.** Dependencia experimental y predicha de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) liberados durante la hidrólisis de 24 g/L de sustrato usando una relación unidades de actividad/sustrato (materia seca) de 6 U/g con una fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa de 0.35 a diferentes temperaturas: (■) 40 °C, (▲) 45 °C, (◆) 55 °C, (●) 70 °C y (△) 75 °C.

Considerando una reacción completa, donde el peso de una molécula del almidón es  $162 \cdot n$  gramos y las  $n$  moléculas de glucosas liberadas tienen un peso de  $180 \cdot n$  gramos, el factor estequiométrico es  $180 \cdot n / 162 \cdot n$  g de glucosa liberados por g de almidón. Por lo tanto, la concentración máxima de glucosa que puede obtener se puede calcular con la ecuación 4.3.

$$CM_G = \frac{180}{162} x_S C_S \quad (4.3)$$

Donde:

$CM_G$ : concentración máxima de glucosa que se puede obtener, g/L

$x_S$ : fracción de almidón en el sustrato (materia seca), g/g

$C_S$ : concentración de sustrato (materia seca) en la mezcla de reacción, g/L

A partir de la ecuación 4.3, se puede definir el rendimiento de la hidrólisis con la ecuación 4.4.

$$\text{Rendimiento de hidrólisis} = \frac{C_{AR}}{CM_G} * 100 \quad (4.4)$$

En el estudio,  $C_S$  fue 24 g/L y  $x_S$  fue 0.6509 g/g, consecuentemente la concentración máxima de glucosa que puede ser obtenida es 17.3 g/L. De acuerdo con la concentración de azúcares reductores de 14.1 g/L, obtenida a los 180 min, utilizando la combinación de enzimas  $\alpha$ -amilasa-glucoamilasa), el rendimiento de hidrólisis alcanzado fue del 81.5 % de la cantidad de glucosa que podría obtenerse. La cantidad de glucosa en los azúcares reductores no fue obtenida por fines prácticos del estudio. En esta primera etapa solo se pretendía explorar las magnitudes aproximadas de los parámetros temperatura (T) y tiempo (t) que afectan la hidrólisis.

El rendimiento obtenido de 81.5 % es bajo y puede deberse a que comparado con otros almidones, el almidón de papa tiene una concentración alta de fosfatos enlazados covalentemente (Hizukuri *et al.*, 1970). Como las enzimas amilolíticas son incapaces de evitar el residuo glucosil fosforilado; fosforil-oligosacáridos son liberados de la digestión del almidón de papa con amilasa (Kamasaka *et al.*, 1995). El alto contenido de fósforo en el almidón de la papa probablemente afecta en una reducción de la digestibilidad enzimática del almidón gelatinizado.

#### 4.4. Hidrólisis enzimática catalizada por $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa por separado.

Una hidrólisis enzimática del sustrato fue llevada a cabo usando solamente  $\alpha$ -amilasa y otra, usando solamente glucoamilasa. La temperatura de trabajo fue de 70 °C, puesto que, a esta temperatura se logró mayor producción de azúcares reductores cuando se utilizó una combinación de estas dos enzimas (ver apartado 4.3). En este estudio, una actividad enzimática de 6 U/g de sustrato (materia seca), fue utilizada. La figura 4.3 muestra los valores

experimentales de la concentración de azúcares reductores obtenidos en la cual se aprecia que con  $\alpha$ -amilasa, una concentración de azúcares reductores de 6.4 g/L fue obtenida a un tiempo de 60 min. Tiempos más largos no incrementaron en gran medida la concentración, puesto que, solamente se alcanzaron 7.3 g/L de azúcares reductores a los 180 min, lo que corresponde a un incremento, en 2 horas, de 0.9 g de azúcares reductores por litro. Un resultado similar fue obtenido con glucoamilasa, donde una concentración de azúcares reductores de 6.1 g/L fue obtenida a los 60 min y una concentración de 7.3 g/L a los 180 min, lo que equivale a un incremento de 1.2 g/L en 2 h. El rendimiento alcanzado a los 180 min, fue de 42.2 % para ambos casos.

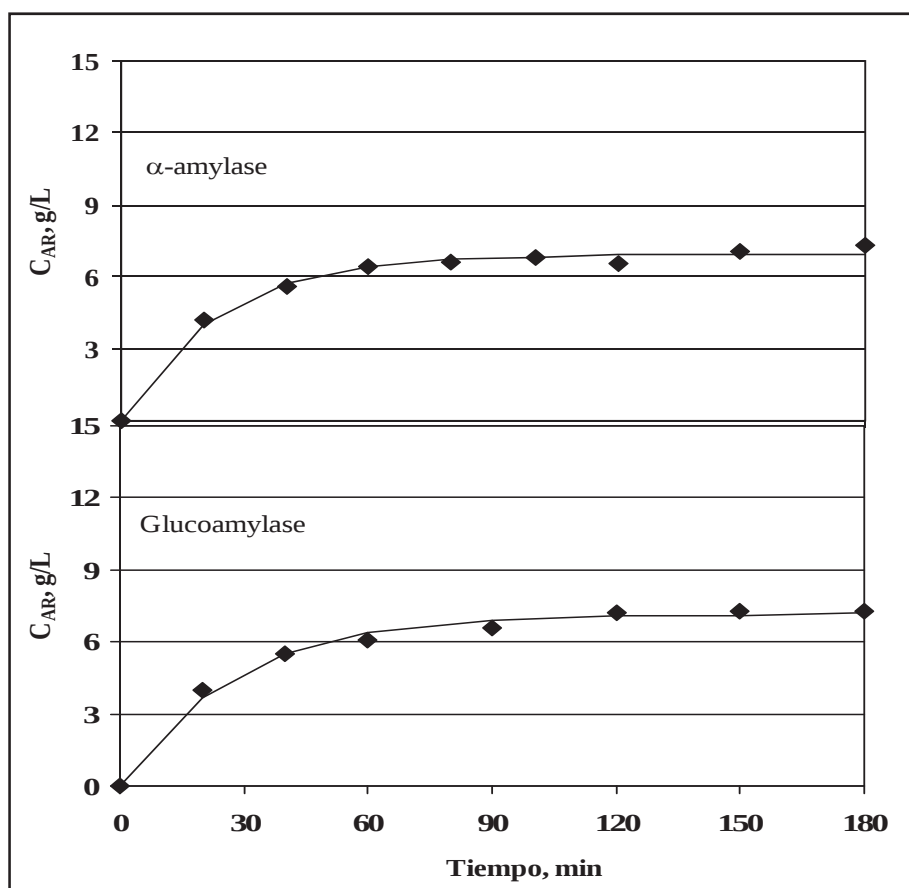


Figura 4.3. Dependencia experimental y predicha de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) liberados durante la hidrólisis de 24 g/L de sustrato, utilizando 6 U/g de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa por separado a 70 °C.

Un ajuste al modelo matemático descrito por la ecuación 4.2 fue llevado a cabo, obteniendo los parámetros cinéticos y estadísticos mostrados en la tabla 4.4. La figura 4.3 muestra las tendencias exponenciales aproximadas por los modelos y su concordancia con los datos experimentales.

**Tabla 4.4. Parámetros de ajuste a la ecuación 4.2, para los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del sustrato a 70 °C usando solamente  $\alpha$ -amilasa o glucoamilasa.**

| Enzima            | k (min <sup>-1</sup> ) | (C <sub>AR</sub> ) <sub>eq</sub> (g/L) | Coefficiente de determinación, R <sup>2</sup> |
|-------------------|------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| $\alpha$ -amilasa | 0.0434                 | 6.9                                    | 0.9915                                        |
| glucoamilasa      | 0.0361                 | 7.2                                    | 0.9935                                        |

La concentración de azúcares reductores alcanzada usando una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa a 70 °C fue claramente más alta que utilizando ambas enzimas por separado (93 % más). Lo que corroboró que el uso combinado de estas enzimas es necesario para lograr mejores hidrólisis. Notar que las mismas unidades de actividad enzimática (6 U/g) fueron usadas en ambos experimentos.

#### **4.5. Modelo matemático general para la hidrólisis enzimática catalizada por la combinación de $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.**

La constante (k) y la concentración de azúcares reductores en el equilibrio ((C<sub>AR</sub>)<sub>eq</sub>) fueron correlacionadas como una función lineal de la temperatura en el intervalo de 40 a 70 °C. El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> fue 0.9116 para k y 0.8916 para (C<sub>AR</sub>)<sub>eq</sub>, demostrando el buen ajuste al modelo.

Las constantes k y (C<sub>AR</sub>)<sub>eq</sub> a 75 °C no fueron incluidas en el modelo, puesto que, no siguen la tendencia mencionada. Además, llevar a cabo reacciones a esa temperatura de operación, no es adecuado para fines prácticos debido a los bajos rendimientos que presenta.

Los resultados de las regresiones lineales para estas dos funciones fueron incluidos en la ecuación 4.2 para obtener el modelo generalizado de la ecuación 4.5.

$$C_{AR} = [8.7 \times 10^{-2}T + 7.8][1 - e^{-(3.9 \times 10^{-4}T - 4.2 \times 10^{-3})t}] \quad (4.5)$$

La figura 4.4 muestra la superficie de respuesta del modelo generalizado para la dependencia de  $C_{AR}$  con el tiempo y la temperatura en el intervalo de estudio. Estos tipos de figuras permiten evaluar visualmente las interacciones entre las variables involucradas en los procesos. En la figura 4.4 se puede observar que la concentración de azúcares reductores se incrementa con la temperatura y el tiempo, presentando mayor sensibilidad al tiempo que a la temperatura. Para el proceso de hidrólisis enzimática que se está estudiando, es posible seleccionar las condiciones bajo las cuales la concentración de azúcares reductores es la más alta o la más conveniente y con base en la figura 4.4, la concentración máxima de azúcares reductores que se logró fue a los 70 °C y 180 min, con un valor de 13.9 g/L.

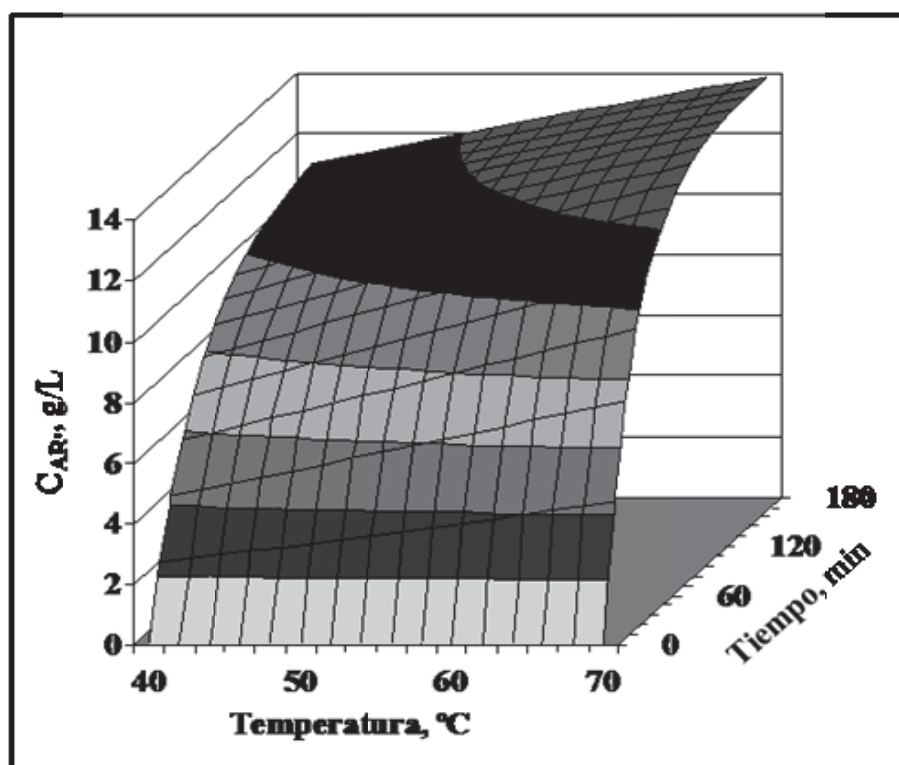


Figura 4.4. Predicción del modelo generalizado para la dependencia de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) con la temperatura y el tiempo.

La evaluación estadística entre el modelo de la ecuación 4.5 y los datos experimentales de concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) arrojó un valor de  $R^2$  de 0.9882. Por tal razón, este modelo se considera válido en el intervalo de temperaturas estudiado de 40 a 70 °C.

Para proporcionar un mejor entendimiento del proceso. La figura 4.5, muestra la superficie de respuesta para el rendimiento de hidrólisis en el rango de estudio (40-70 °C y 0-180 min) calculado por la ecuación 4.4. El efecto del tiempo tuvo más influencia en el rendimiento que la temperatura. Sin embargo, una interacción de la concentración de azúcares reductores y la temperatura fue observada. El rendimiento de hidrólisis máximo (80 %) fue predicho a 70 °C y 180 min, el cual no se alejó mucho del rendimiento experimental (81.5 %).

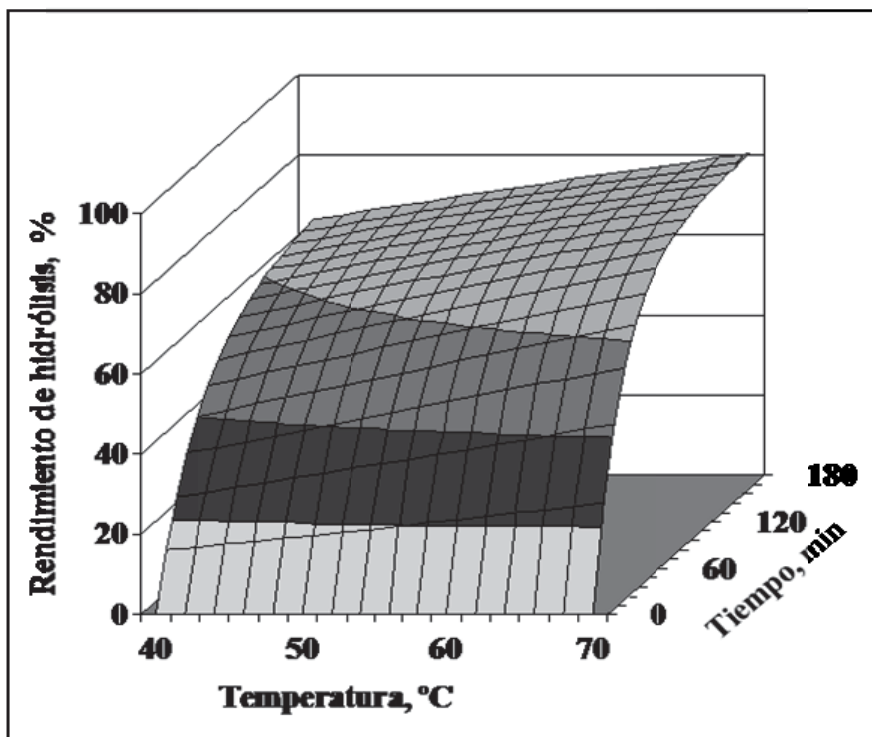


Figura 4.5. Predicción del modelo para la dependencia del rendimiento de hidrólisis con la temperatura y el tiempo.

#### 4.6. Estudio para la dependencia de la concentración de azúcares reductores con la concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo, utilizando el método de superficie de respuesta.

Los resultados previos mostraron que la concentración máxima de azúcares reductores obtenida fue de alrededor de 14 g/L, la cual es baja para ser utilizada para algunos procesos fermentativos. Considerando los efectos y las interacciones importantes del tiempo y la temperatura, un segundo estudio fue llevado a cabo incluyendo la concentración de sustrato como

nueva variable, esto para poder incrementar la concentración de azúcares reductores. La influencia de la concentración de sustrato, temperatura y tiempo durante la hidrólisis enzimática de papa fue estudiada usando la metodología de superficie de respuesta, la cual ha sido exitosamente utilizada para optimizar procesos bioquímicos y biotecnológicos (Roberto *et al.*, 1995; Vázquez y Martín, 1998; Larrazábal y Camacho, 2008).

La concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo, denotadas por  $C_S$ ,  $T$  y  $t$ , respectivamente, fueron consideradas como variables independientes o variables de operación; y sus efectos en la variable dependiente, la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ), fueron calculados. Para propósitos computacionales, una normalización de las variables independientes fue llevada a cabo y se definieron las variables  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  por las ecuaciones 4.6, 4.7 y 4.8.

$$x_1 = \frac{C_S - 4}{2} \quad (4.6)$$

$$x_2 = \frac{T - 70}{2} \quad (4.7)$$

$$x_3 = \frac{t - 120}{60} \quad (4.8)$$

El conjunto de experimentos siguieron un diseño Box-Behnken. Este diseño está formado de la combinación de un diseño factorial 2 niveles con un diseño de bloque incompleto. Este procedimiento crea diseños experimentales con propiedades estadísticas deseables, pero lo más importante es que se requieren solo una fracción de los experimentos que se requerirían en un diseño factorial de 3 niveles. Esta especialmente diseñado para el manejo de tres niveles, codificados como -1, 0, y +1 (Box y Behnken, 1960).

La tabla 4.5 resume las variables involucradas en el diseño de experimentos para la hidrólisis enzimática del sustrato (polvo de papa seca) utilizando una mezcla constante de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa. La relación unidades de actividad/sustrato fue fijada en 6 U/g y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa fue fijada en 0.35 en base a los estudios previos (López *et al.*, 2004). La concentración de sustrato ( $C_S$ ) fue seleccionada en el rango 2-6 % (materia seca), debido a que, 6 % fue la concentración más alta que permitió una mezcla con una relación sólido/líquido adecuada tal que, la viscosidad permitiera llevar a cabo una buena agitación

durante el pretratamiento. Puesto que la distancia entre las temperatura manejadas en las cinéticas de los estudios anteriores fue amplia (ver apartado 4.3); se seleccionó como nivel bajo de temperatura un valor de 68 °C y como nivel alto, un valor de 72 °C con la finalidad de ver si la óptima era realmente de 70 °C o se encontraba por encima o por debajo de este valor. Los niveles alto y bajo para el tiempo fueron de 60 y 180 min respectivamente, seleccionados de acuerdo a los estudios previos.

**Tabla 4.5. Variables involucradas en el diseño de experimentos Box-Behnken, para la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla constante de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.**

|                                                                  | Nomenclatura | Unidades | Niveles        |
|------------------------------------------------------------------|--------------|----------|----------------|
| <i>(a) Variables fijadas</i>                                     |              |          |                |
| Agitación                                                        |              | rpm      | 600            |
| Relación unidades de actividad/sustrato                          |              | U/g      | 6              |
| Fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa                       |              | U/U      | 0.35           |
| <i>(a) Variables independientes (factores)</i>                   |              |          |                |
| Concentración de sustrato (materia seca)                         | $C_S$        | % (p/p)  | (2, 4, 6)      |
| Temperatura                                                      | $T$          | °C       | (68, 70, 72)   |
| Tiempo                                                           | $t$          | min      | (60, 120, 180) |
| <i>(b) Adimensionales, variables independientes normalizadas</i> |              |          |                |
| Concentración de sustrato                                        | $x_1$        |          | (-1, 0, 1)     |
| Temperatura                                                      | $x_2$        |          | (-1, 0, 1)     |
| Tiempo                                                           | $x_3$        |          | (-1, 0, 1)     |
| <i>(c) Variable dependiente (respuesta)</i>                      |              |          |                |
| Concentración de azúcares reductores                             | $C_{AR}$     | g/L      |                |

Las condiciones de operación ensayadas (en términos de las variables de operación dimensionales y adimensionales), así como los resultados experimentales determinados para  $C_{AR}$  son mostrados en la tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Diseño de experimentos Box-Behnken con las variables descritas en la tabla 4.5, para el estudio de superficie de respuesta.**

| Experimento | Variables independientes |    |     |                |    |    | Variable dependiente |
|-------------|--------------------------|----|-----|----------------|----|----|----------------------|
|             | Dimensionales            |    |     | Adimensionales |    |    |                      |
|             | C <sub>S</sub>           | T  | t   | x1             | x2 | x3 |                      |
| 1           | 6                        | 70 | 60  | 1              | 0  | -1 | 19.09                |
| 2           | 4                        | 72 | 60  | 0              | 1  | -1 | 12.53                |
| 3           | 4                        | 70 | 120 | 0              | 0  | 0  | 16.07                |
| 4           | 2                        | 68 | 120 | -1             | -1 | 0  | 9.11                 |
| 5           | 6                        | 70 | 180 | 1              | 0  | 1  | 29.32                |
| 6           | 4                        | 72 | 180 | 0              | 1  | 1  | 20.52                |
| 7           | 2                        | 70 | 180 | -1             | 0  | 1  | 10.71                |
| 8           | 6                        | 68 | 120 | 1              | -1 | 0  | 27.65                |
| 9           | 4                        | 68 | 180 | 0              | -1 | 1  | 23.18                |
| 10          | 6                        | 72 | 120 | 1              | 1  | 0  | 20.04                |
| 11          | 2                        | 72 | 120 | -1             | 1  | 0  | 9.48                 |
| 12          | 4                        | 70 | 120 | 0              | 0  | 0  | 19.82                |
| 13          | 4                        | 70 | 120 | 0              | 0  | 0  | 17.10                |
| 14          | 4                        | 68 | 60  | 0              | -1 | -1 | 15.93                |
| 15          | 2                        | 70 | 60  | -1             | 0  | -1 | 6.99                 |

La relación entre la variable dependiente y las variables de operación puede ser establecida por medio de una ecuación de segundo orden con interacciones. El modelo matemático utilizado como primera aproximación se muestra en la ecuación 4.9.

$$C_{AR} = a_0 + \sum_i a_i x_i + \sum_i b_i x_i^2 + \sum_i \sum_j c_{ij} x_i x_j \quad (4.9)$$

Donde:

C<sub>AR</sub>: concentración de azúcares reductores liberados, g/L

x<sub>i</sub>: variables de operación normalizadas

a<sub>0</sub>, a<sub>i</sub>, b<sub>i</sub> y c<sub>ij</sub>: coeficientes de regresión calculados por ajuste de los datos experimentales por regresión múltiple

La tabla 4.7 muestra el análisis de varianza (ANOVA) el modelo completo. Valores de  $p$  menor que 0.05 indica que la fuente de variabilidad es significativa. Los términos cuyo valor de  $p$  sea mayor que 0.1000 se descartarán del modelo, puesto que no son significantes. Términos con valores de  $p$ , entre 0.1 y 0.05 fueron evaluados para ver el efecto en la mejora del modelo.

**Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático con interacciones (ecuación 4.9), para el diseño experimental de la tabla 4.6.**

| Fuente de variabilidad | Suma de cuadrados | gl | Media de cuadrados | Valor F | Valor p de Prob > F |
|------------------------|-------------------|----|--------------------|---------|---------------------|
| Modelo                 | 609.27            | 9  | 67.70              | 41.21   | 0.0004              |
| $x_1$ ( $C_S$ )        | 447.15            | 1  | 447.15             | 272.21  | < 0.0001            |
| $x_2$ (Temperatura)    | 22.11             | 1  | 22.11              | 13.46   | 0.0145              |
| $x_3$ (Tiempo)         | 106.51            | 1  | 106.51             | 64.84   | 0.0005              |
| $x_1 \cdot x_2$        | 15.92             | 1  | 15.92              | 9.69    | 0.0265              |
| $x_1 \cdot x_3$        | 10.60             | 1  | 10.60              | 6.45    | 0.0519              |
| $x_2 \cdot x_3$        | 0.14              | 1  | 0.14               | 0.08    | 0.7844              |
| $x_1^2$                | 6.27              | 1  | 6.27               | 3.82    | 0.1082              |
| $x_2^2$                | 0.16              | 1  | 0.16               | 0.10    | 0.7660              |
| $x_3^2$                | 0.10              | 1  | 0.10               | 0.06    | 0.8122              |
| Residual               | 8.21              | 5  | 1.64               |         |                     |
| Total con media        | 617.49            | 14 |                    |         |                     |

Los términos significativos del modelo  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_1 \cdot x_2$  y  $x_1 \cdot x_3$  y los no significativos, fueron los términos cuadráticos, así como la interacción  $x_2 \cdot x_3$ , por lo que se eliminaron del modelo propuesto. La significancia de la interacción  $x_1 \cdot x_3$ , fue evaluada. La ecuación 4.10 muestra el modelo matemático reducido para la concentración de azúcares reductores  $C_{AR}$  como función de las variables normalizadas.

$$C_{AR} = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + c_1x_1x_2 + c_2x_1x_3 \quad (4.10)$$

La tabla 4.8 muestra los coeficientes calculados por el ANOVA para la ecuación 4.10. Para el modelo, el valor de  $p$  fue menor a 0.0001. Para la interacción  $x_1 \cdot x_3$ , se calculó un valor de  $p$  de 0.0337 por lo que demuestra significancia.

**Tabla 4.8. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo reducido (ecuación 4.10), para el diseño experimental de la tabla 4.6.**

| Fuente de variabilidad | Suma de cuadrados | gl | Media de cuadrados | Valor F      | Valor p de Prob > F |
|------------------------|-------------------|----|--------------------|--------------|---------------------|
| Modelo                 | 602.24            | 5  | 120.45             | <u>71.26</u> | < 0.0001            |
| $x_1$ ( $C_S$ )        | 447.07            | 1  | 447.07             | 264.48       | < 0.0001            |
| $x_2$ (Temperatura)    | 22.1              | 1  | 22.1               | 13.07        | 0.0056              |
| $x_3$ (Tiempo)         | 106.53            | 1  | 106.53             | 63.03        | < 0.0001            |
| $x_1 \cdot x_2$        | 15.95             | 1  | 15.95              | 9.44         | 0.0133              |
| $x_1 \cdot x_3$        | 10.59             | 1  | 10.59              | 6.26         | 0.0337              |
| Residual               | 15.21             | 9  | 1.69               |              |                     |
| Total con media        | 617.46            | 14 |                    |              |                     |

El valor del coeficiente de determinación  $R^2$  fue de 0.9754. Aunque este parámetro estadístico es usualmente utilizado para determinar la calidad de correlación de un modelo con los datos experimentales, suele incrementarse al añadirle términos al modelo, aún cuando estos no sean significativos, por lo que, el cálculo de un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) puede realizarse. Este parámetro disminuye su valor al añadir términos no significativos al modelo y se recomienda que esté por encima de 0.7.

El valor de  $R^2_{aj}$  para el modelo fue de 0.9420, lo que muestra una buena concordancia con los datos experimentales.

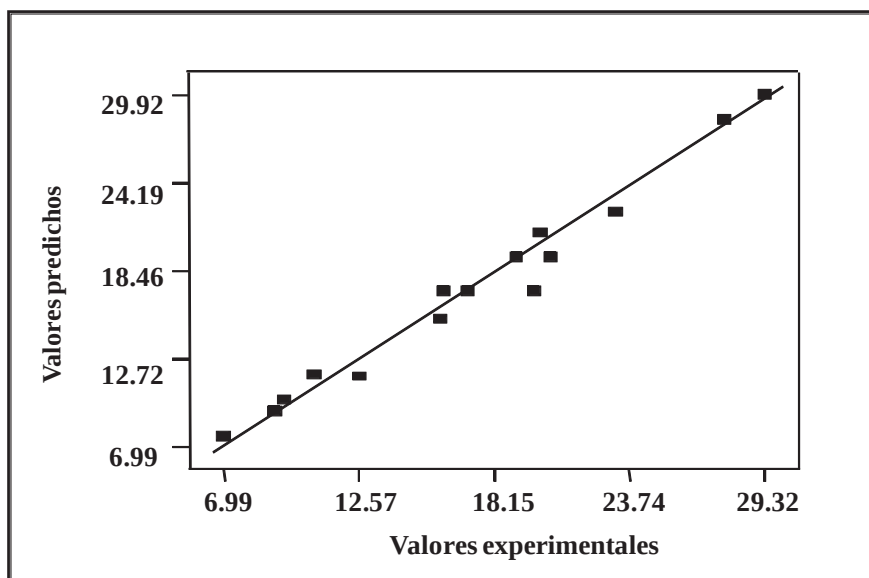
Estos parámetros confirman que la ecuación empírica 4.11 obtenida para las variables codificadas puede ser utilizada como modelo para predecir la concentración de azúcares reductores en el proceso de hidrólisis dentro del espacio estudiado.

$$C_{AR} = 17.17 + 7.48x_1 - 1.66x_2 + 3.65x_3 - 2.00x_1x_2 + 1.63x_1x_3 \quad (4.11)$$

Además del cálculo de los coeficientes de las variables codificadas de la ecuación 4.11, se determinaron los coeficientes para la obtención de  $C_{AR}$  en función de las variables reales, tal como lo muestra la ecuación 4.12.

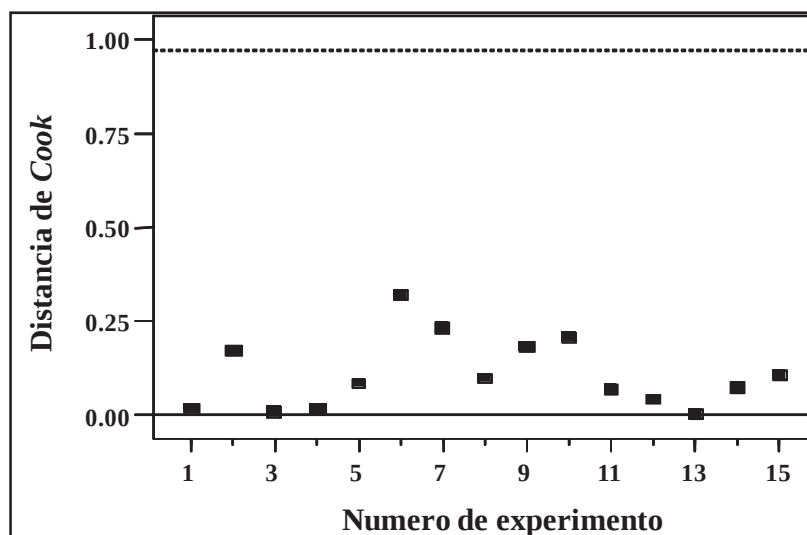
$$C_{AR} = -80.03 + 37.02C_S - 1.16T + 6.56 \times 10^{-3}t - 0.4988C_S T + 0.0136C_S t \quad (4.12)$$

La figura 4.6 muestra los valores predichos contra los valores experimentales de la concentración de azúcares reductores. Grupos de puntos arriba o debajo de la línea podría indicar áreas de predicción sub o sobreestimadas. Se puede observar que los puntos fueron repartidos al azar a lo largo de la línea de 45 grados. Para evaluar la fuerza del modelo también fue efectuada una prueba del residual.



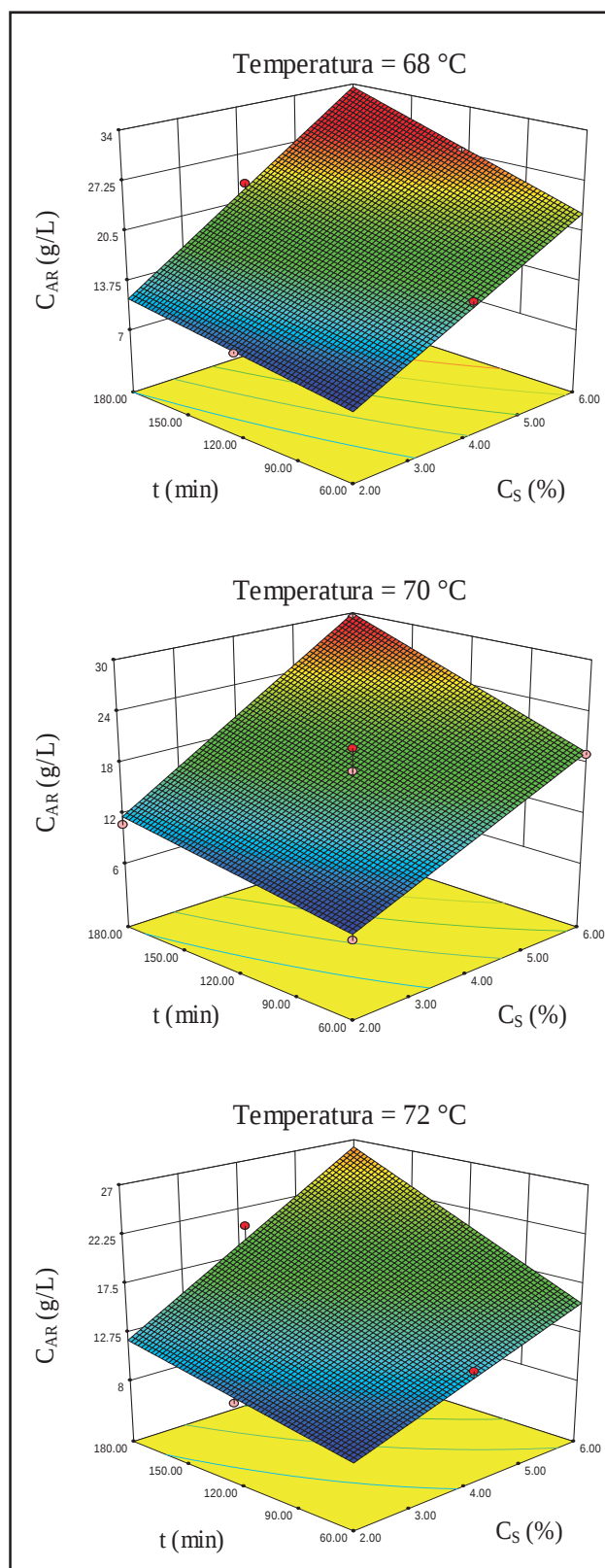
**Figura 4.6. Valores predichos por el modelo matemático versus valores experimentales de la concentración de azúcares reductores.**

La distancia de *Cook* es una medida de cuanto cambia el ajuste de la regresión, si una muestra es eliminada (Montgomery *et al.*, 2001). Valores grandes deberían ser investigados, ya que pueden ser causados por malas lecturas, un modelo incorrecto o un ensayo erróneo. Se considera un valor grande a un punto que está de 2-3 veces mayor que la media. La figura 4.7 muestra la distancia de *Cook* para el modelo. Se puede observar que no hay ningún caso sobre la línea punteada (2-3 veces mayor a la media). Esto confirma que el modelo matemático es bueno.



**Figura 4.7.** Distancia de Cook para los datos experimentales de la concentración de azúcares reductores de la tabla 4.6, ajustados al modelo de la ecuación 4.12.

La superficie de respuesta del modelo es mostrada en la figura 4.8. En esta figura la temperatura fue fijada en sus tres niveles (68, 70 y 72 °C), puesto que fue la variable que mostró la menor influencia. Una respuesta máxima fue obtenida en un borde del espacio de estudio. Las condiciones para obtener la respuesta máxima fueron a una concentración de sustrato ( $C_S$ ), 6 %; temperatura ( $T$ ), 68 °C y tiempo ( $t$ ), 180 min, donde una concentración de 32.62 g/L de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) fue predicha. El rendimiento correspondiente fue de 75.17 %, con respecto a la concentración de azúcares reductores que se puede obtener de 43.39 g/L. Una verificación de experimentos fue llevada a cabo con el propósito de confirmar el máximo valor. La hidrólisis enzimática a las condiciones correspondientes al máximo de azúcares reductores, dio 33.57 g/L, confirmando la precisión del modelo. El modelo de la ecuación 4.12 también puede ser usado para obtener otras condiciones óptimas de acuerdo a ciertos criterios de operación. Concentraciones de azúcares reductores por encima de 20 g/L son adecuadas para algunas aplicaciones biotecnológicas. Por lo tanto, se puede minimizar el tiempo, tal que se logre una concentración deseable. Utilizando las siguientes condiciones:  $C_S$ , 6 %;  $T$ , 68 °C y  $t$ , 60 min, el modelo predice una concentración de 23.03 g/L de azúcares reductores. De este modo, los hidrolizados obtenidos son indicados para aplicaciones fermentativas. Los resultados muestran la factibilidad de los procesos estudiados y la utilidad de los modelos obtenidos.



**Figura 4.8.** Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de azúcares reductores ( $C_{AR}$ ) con el tiempo ( $t$ ) y la concentración de sustrato ( $C_S$ ) para una temperatura ( $T$ ) entre 68-72°C.

#### 4.7. Optimización de la concentración de glucosa en función de la temperatura, el tiempo, la relación unidades de actividad/sustrato y la fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa, utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Los estudios previos han mostrado las variables que afectan la hidrólisis enzimática (ver apartado 4.6). Las variables de operación utilizadas en este estudio fueron seleccionadas de acuerdo a la literatura (López *et al.*, 2004; Liu, 2002). Sus efectos en la variable dependiente seleccionada fueron estudiados usando la metodología de superficie de respuesta.

Las variables independientes y dependientes, así como las variables independientes normalizadas y fijadas involucradas en este tercer estudio y sus respectivas variaciones en sus niveles se muestran en la tabla 4.9.

**Tabla 4.9. Variables involucradas en el diseño experimental Box-Behnken, para la hidrólisis enzimática del sustrato usando una mezcla variable de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa.**

|                                                                  | Nomenclatura | Unidades           | Niveles       |
|------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|---------------|
| <i>(a) Variables Fijadas</i>                                     |              |                    |               |
| Agitación                                                        |              | rpm                | 600           |
| Concentración de sustrato                                        | $C_S$        | % (p/p)            | 6             |
| <i>(b) Variables independientes (factores)</i>                   |              |                    |               |
| Temperatura                                                      | $T$          | $^{\circ}\text{C}$ | (64,67,70)    |
| Tiempo                                                           | $t$          | min                | (60,135,210)  |
| Relación unidades de actividad /sustrato                         | $R_{E/S}$    | U/g                | (3,51.5,100)  |
| Fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa                       | $F_T$        | U/U                | (0.1,0.5,0.9) |
| <i>(c) Adimensionales, variables independientes normalizadas</i> |              |                    |               |
| Temperatura                                                      | $x_1$        |                    | (-1,0,1)      |
| Tiempo                                                           | $x_2$        |                    | (-1,0,1)      |
| Relación unidades de actividad /sustrato                         | $x_3$        |                    | (-1,0,1)      |
| Fracción de actividad de $\alpha$ -amilasa                       | $x_4$        |                    | (-1,0,1)      |
| <i>(d) Variable dependiente (respuesta)</i>                      |              |                    |               |
| Concentración de glucosa                                         | $C_G$        | g/L                |               |

La concentración de sustrato ( $C_S$ ) fue establecida en 6 % (p/p) puesto que estudios previos han mostrado que los hidrolizados de mezclas gelatinizadas de papa seca con esa concentración (60 g/L), puede producir jarabes azucarados convenientes para propósitos industriales. Además, esta concentración permitió una adecuada agitación a 600 rpm para lograr una buena mezcla sólido-líquido y la humectación de todo el sustrato (ver apartado 4.6).

El rango de temperatura ( $T$ ) (64-70°C) fue elegido basado en los estudios del apartado 4.6, donde la temperatura óptima para alcanzar mayor rendimiento de hidrólisis fue alrededor de 68 °C. La finalidad de bajar el nivel inferior de temperatura a 64 °C fue para encontrar un máximo de temperatura bajo las cuales se obtenga el mayor rendimiento. El tiempo ( $t$ ), en un rango de 60-210 min fue seleccionado en base a previos estudios. Un amplio rango (3-100 U/g) de relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) fue manejado. La fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ) fue seleccionada en el rango de 0.1-0.9 U de  $\alpha$ -amilasa/U total. La concentración de glucosa ( $C_G$ ) en g/L fue la variable dependiente, así los resultados que se obtengan en este estudio puede ser utilizados para su aplicación en fermentaciones posteriores, ya que al conocer la concentración de glucosa en el hidrolizado, se pueden buscar los microorganismos que al consumir específicamente a este azúcar me produzcan compuestos de interés.

El conjunto de pruebas siguió un diseño experimental Box-Benkhen utilizando cuatro factores (variables independientes) y tres niveles. La tabla 4.10 muestra las condiciones de operación ensayadas, (expresadas como variables dimensionales y adimensionales), así como los resultados experimentales determinados para  $C_G$ .

**Tabla 4.10. Diseño de experimentos Box-Behnken con las variables descritas en la tabla 4.9, para el estudio de superficie de respuesta.**

| Experimento | Variables independientes |     |                  |                |                |                |                |                | Variables dependientes |
|-------------|--------------------------|-----|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|
|             | Dimensionales            |     |                  |                | Adimensionales |                |                |                |                        |
|             | T                        | t   | R <sub>E/S</sub> | F <sub>T</sub> | x <sub>I</sub> | x <sub>2</sub> | x <sub>3</sub> | x <sub>4</sub> |                        |
| 1           | 67                       | 135 | 3.0              | 0.1            | 0              | 0              | -1             | -1             | 11.6                   |
| 2           | 67                       | 135 | 51.5             | 0.5            | 0              | 0              | 0              | 0              | 34.1                   |
| 3           | 64                       | 210 | 51.5             | 0.5            | -1             | 1              | 0              | 0              | 38.0                   |
| 4           | 67                       | 135 | 100.0            | 0.1            | 0              | 0              | 1              | -1             | 46.8                   |
| 5           | 70                       | 210 | 51.5             | 0.5            | 1              | 1              | 0              | 0              | 36.7                   |
| 6           | 64                       | 135 | 3.0              | 0.5            | -1             | 0              | -1             | 0              | 10.8                   |
| 7           | 67                       | 60  | 51.5             | 0.9            | 0              | -1             | 0              | 1              | 18.1                   |
| 8           | 67                       | 210 | 51.5             | 0.1            | 0              | 1              | 0              | -1             | 43.8                   |
| 9           | 70                       | 135 | 51.5             | 0.9            | 1              | 0              | 0              | 1              | 15.1                   |
| 10          | 64                       | 60  | 51.5             | 0.5            | -1             | -1             | 0              | 0              | 27.0                   |
| 11          | 67                       | 210 | 51.5             | 0.9            | 0              | 1              | 0              | 1              | 22.8                   |
| 12          | 70                       | 60  | 51.5             | 0.5            | 1              | -1             | 0              | 0              | 26.1                   |
| 13          | 67                       | 60  | 3.0              | 0.5            | 0              | -1             | -1             | 0              | 5.9                    |
| 14          | 70                       | 135 | 51.5             | 0.1            | 1              | 0              | 0              | -1             | 32.6                   |
| 15          | 64                       | 135 | 51.5             | 0.1            | -1             | 0              | 0              | -1             | 34.6                   |
| 16          | 70                       | 135 | 3.0              | 0.5            | 1              | 0              | -1             | 0              | 5.7                    |
| 17          | 67                       | 60  | 51.5             | 0.1            | 0              | -1             | 0              | -1             | 35.6                   |
| 18          | 67                       | 135 | 51.5             | 0.5            | 0              | 0              | 0              | 0              | 31.5                   |
| 19          | 67                       | 135 | 51.5             | 0.5            | 0              | 0              | 0              | 0              | 39.4                   |
| 20          | 67                       | 135 | 51.5             | 0.5            | 0              | 0              | 0              | 0              | 32.9                   |
| 21          | 67                       | 60  | 100.0            | 0.5            | 0              | -1             | 1              | 0              | 39.4                   |
| 22          | 67                       | 135 | 3.0              | 0.9            | 0              | 0              | -1             | 1              | 4.6                    |
| 23          | 67                       | 135 | 100.0            | 0.9            | 0              | 0              | 1              | 1              | 29.7                   |
| 24          | 64                       | 135 | 51.5             | 0.9            | -1             | 0              | 0              | 1              | 20.8                   |
| 25          | 64                       | 135 | 100.0            | 0.5            | -1             | 0              | 1              | 0              | 43.0                   |
| 26          | 67                       | 210 | 3.0              | 0.5            | 0              | 1              | -1             | 0              | 10.2                   |
| 27          | 70                       | 135 | 100.0            | 0.5            | 1              | 0              | 1              | 0              | 41.4                   |
| 28          | 67                       | 135 | 51.5             | 0.5            | 0              | 0              | 0              | 0              | 32.7                   |
| 29          | 67                       | 210 | 100.0            | 0.5            | 0              | 1              | 1              | 0              | 44.2                   |

Una normalización (adimensionalización) de las variables de operación fue realizada para efectos de cómputo. Estas variables adimensionales fueron expresadas como función de las variables reales, tal como lo muestran las ecuaciones 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16.

$$x_1 = \frac{T-67}{3} \quad (4.13)$$

$$x_2 = \frac{t-135}{75} \quad (4.14)$$

$$x_3 = \frac{R_E/S-51.5}{48.5} \quad (4.15)$$

$$x_4 = \frac{F_T-0.50}{0.40} \quad (4.16)$$

La relación entre las variables independientes y la variable dependiente puede ser establecida a través de una ecuación polinomial de segundo orden con interacciones. El modelo matemático que se utilizó como primera aproximación, se muestra en la ecuación 4.17.

$$C_G = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_3x_3^2 + b_4x_4^2 + c_{12}x_1x_2 + c_{13}x_1x_3 + c_{14}x_1x_4 + c_{23}x_2x_3 + c_{24}x_2x_4 + c_{34}x_3x_4 \quad (4.17)$$

Donde:

$C_G$ : concentración de glucosa, g/L

$x_i$ : variables normalizadas adimensionales

$a_i$ ,  $b_i$  y  $c_{ij}$ : coeficientes de regresión calculados a partir de los datos experimentales

La tabla 4.11 muestra el análisis de varianza (ANOVA) del ajuste de los datos experimentales al modelo cuadrático de la ecuación 4.17. Valores de  $p$  menor que 0.05 indica que la fuente de variabilidad es significativa. Términos con valores de  $p$ , entre 0.1 y 0.05 fueron evaluados para ver el efecto en la mejora del modelo. Las fuentes de variabilidad cuyo valor de  $p$  sea mayor que 0.1000 se descartarán del modelo, puesto que no son significantes.

**Tabla 4.11. Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste de los datos experimentales al modelo cuadrático (ecuación 4.17), para el diseño experimental de la tabla 4.10.**

| Fuente de variabilidad    | Suma de cuadrados | gl | Media de cuadrados | Valor F | Valor p de Prob > F |
|---------------------------|-------------------|----|--------------------|---------|---------------------|
| Modelo                    | 4563.78           | 14 | 325.98             | 36.42   | < 0.0001            |
| $x_1$ (T)                 | 22.96             | 1  | 22.96              | 2.57    | 0.1315              |
| $x_2$ (t)                 | 158.41            | 1  | 158.41             | 17.70   | 0.0009              |
| $x_3$ (R <sub>E/S</sub> ) | 3191.54           | 1  | 3191.54            | 356.54  | < 0.0001            |
| $x_4$ (F <sub>T</sub> )   | 734.77            | 1  | 734.77             | 82.08   | < 0.0001            |
| $x_1 x_2$                 | 0.04              | 1  | 0.04               | 0.00    | 0.9476              |
| $x_1 x_3$                 | 3.06              | 1  | 3.06               | 0.34    | 0.5679              |
| $x_1 x_4$                 | 3.42              | 1  | 3.42               | 0.38    | 0.5463              |
| $x_2 x_3$                 | 0.06              | 1  | 0.06               | 0.01    | 0.9346              |
| $x_2 x_4$                 | 3.06              | 1  | 3.06               | 0.34    | 0.5679              |
| $x_3 x_4$                 | 25.50             | 1  | 25.50              | 2.85    | 0.1136              |
| $x_1^2$                   | 38.59             | 1  | 38.59              | 4.31    | 0.0568              |
| $x_2^2$                   | 1.25              | 1  | 1.25               | 0.14    | 0.7141              |
| $x_3^2$                   | 341.10            | 1  | 341.10             | 38.11   | < 0.0001            |
| $x_4^2$                   | 125.67            | 1  | 125.67             | 14.04   | 0.0022              |
| Residual                  | 125.32            | 14 | 8.95               |         |                     |
| Total con media           | 4689.10           | 28 |                    |         |                     |

El análisis la tabla 4.11 condujo a la selección del modelo cuadrático modificado representado por la ecuación 4.18; en el cual, se incluyeron los términos  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$ ,  $x_3^2$  y  $x_4^2$ , puesto que son significativos. El término  $x_1^2$ , con valor p de 0.0568, también fue añadido al modelo para su evaluación; mientras que,  $x_2^2$  y todas las interacciones entre las variables fueron eliminadas del modelo por ser no significativas.

$$C_G = a_0 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + b_1x_1^2 + b_3x_3^2 + b_4x_4^2 \quad (4.18)$$

El análisis de varianza (ANOVA) para el ajuste de los datos experimentales al modelo de la ecuación 4.18, se muestra en la tabla 4.12.

**Tabla 4.12. Análisis de varianza (ANOVA) del ajuste de los datos experimentales al modelo cuadrático modificado (ecuación 4.18), para el diseño experimental de la tabla 4.10.**

| Fuente de variabilidad | Suma de cuadrados | gl | Media de cuadrados | Valor F | Valor p de Prob > F |
|------------------------|-------------------|----|--------------------|---------|---------------------|
| Modelo                 | 4504.41           | 6  | 750.74             | 89.43   | < 0.0001            |
| $x_2(t)$               | 158.41            | 1  | 158.41             | 18.87   | 0.0003              |
| $x_3(R_{E/S})$         | 3191.54           | 1  | 3191.54            | 380.18  | < 0.0001            |
| $x_4(F_T)$             | 734.77            | 1  | 734.77             | 87.53   | < 0.0001            |
| $x_1^2(T^2)$           | 37.34             | 1  | 37.34              | 4.45    | 0.0465              |
| $x_3^2$                | 345.70            | 1  | 345.70             | 41.18   | < 0.0001            |
| $x_4^2$                | 125.46            | 1  | 125.46             | 14.95   | 0.0008              |
| Residual               | 184.69            | 22 | 8.39               |         |                     |
| Total con media        | 4689.10           | 28 |                    |         |                     |

El modelo cuadrático modificado es significativo puesto que presento un valor de p menor que 0.0001. Lo que indica que existe un riesgo menor al 0.01 % de que el modelo sea inapropiado.

El valor de p de 0.0465, para el término  $x_1^2$ , indica la significancia de este, por lo que quedará incluido en el modelo.

Los valores de los coeficientes de determinación  $R^2$  y  $R^2_{aj}$  para la regresión fueron de 0.9606 y 0.9499 respectivamente, lo que demuestra un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de la ecuación 4.18.

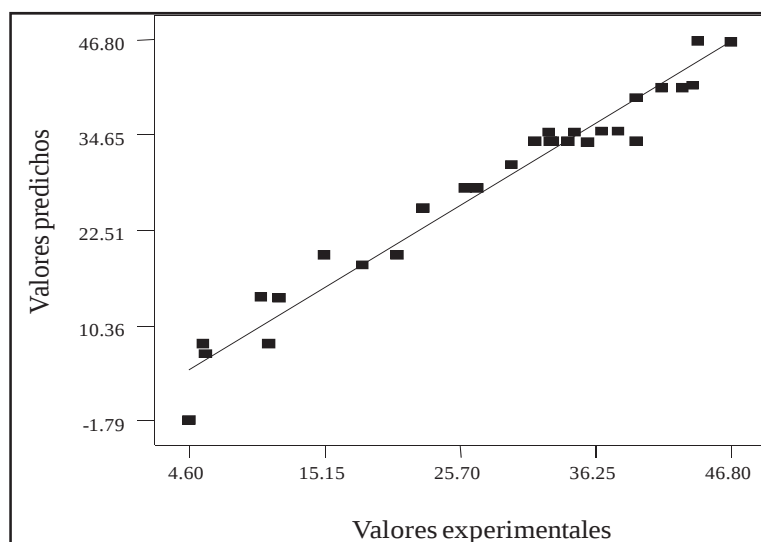
El cálculo de los coeficientes de regresión condujo a la obtención del modelo matemático para la concentración de glucosa en función de las variables adimensionales, el cual es mostrado en la ecuación 4.19.

$$C_G = 33.84 + 3.63x_2 + 16.31x_3 - 7.83x_4 - 2.36x_1^2 - 7.17x_3^2 - 4.32x_4^2 \quad (4.19)$$

Sustituyendo las variables adimensionales por sus respectivas funciones (ecuaciones 4.13 a 4.16), se obtuvo el modelo para la concentración de glucosa en función de las variables reales, el cual se representa por la ecuación 4.20.

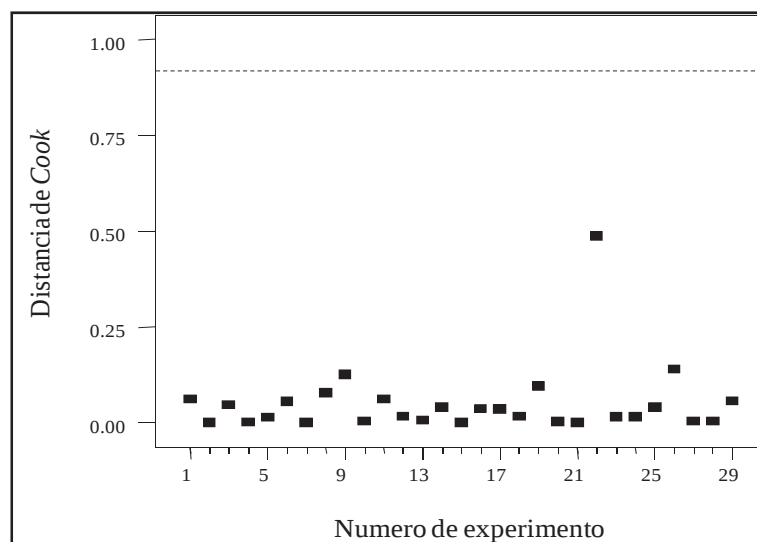
$$C_G = -1170.23 + 35.08T + 0.05t + 0.65R_{E/S} + 7.43F_T - 0.26T^2 - 0.003R_{E/S}^2 - 26.991F_T^2 \quad (4.20)$$

La figura 4.9 muestra que existe una buena concordancia entre los datos experimentales y los valores predichos de la concentración de glucosa. Grupos de puntos arriba o debajo de la línea podría indicar áreas de predicción sub o sobreestimadas.



**Figura 4.9. Valores predichos por el modelo matemático versus valores experimentales de la concentración de glucosa.**

Una manera de conocer la existencia de puntos experimentales no deseados, esto es, valores experimentales erróneos que pudieran interferir en un mejor ajuste al modelo, es mediante la distancia de *Cook*. La figura 4.10 muestra la distancia de *Cook* para los datos experimentales de la concentración de glucosa de la tabla 4.10 ajustados al modelo matemático representado por la ecuación 4.20. Puntos experimentales por encima de la línea discontinua deberán ser rechazados para un mejor ajuste; y puesto que en la figura 4.20 no existen casos de puntos colocados sobre la línea discontinua, se confirma que el modelo se ajustó a valores experimentales confiables.



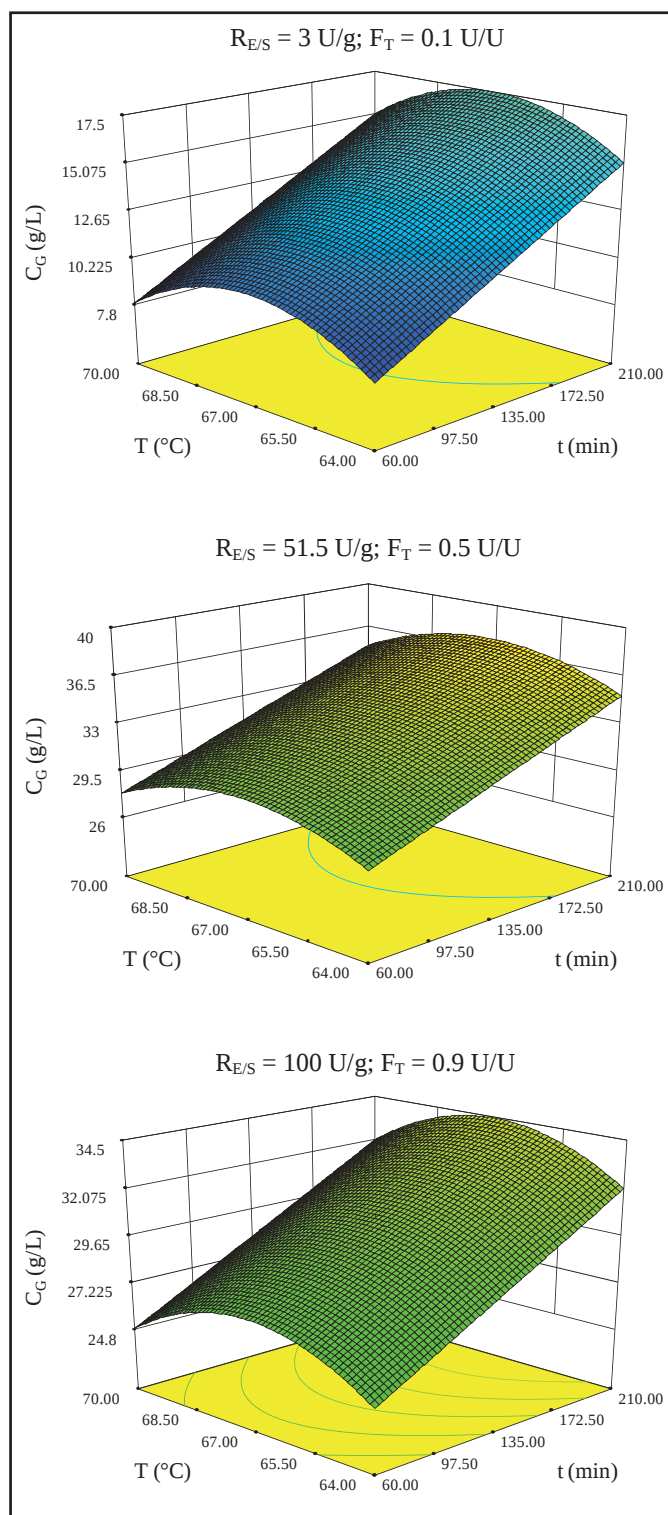
**Figura 4.10.** Distancia de Cook para los datos experimentales de la concentración de glucosa de la tabla 4.10, ajustados al modelo de la ecuación 4.20.

La figura 4.11 muestra superficies de respuesta para la concentración de glucosa ( $C_G$ ) predicha por el modelo cuadrático reducido (ecuación 4.20) como función de la temperatura y el tiempo. La relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ) fueron fijados en sus niveles bajos ( $R_{E/S}$ , 3 y  $F_T$ , 0.1), medios ( $R_{E/S}$ , 51.5 y  $F_T$ , 0.5) y altos ( $R_{E/S}$ , 100 y  $F_T$ , 0.9), respectivamente.

La repuesta más alta de concentración de glucosa para los tres casos fue alcanzada a un tiempo de 210 min; aunque el crecimiento de glucosa fue mayor en los primeros 60 min, que en el transcurso de tiempo del intervalo estudiado (60 a 210 min) equivalente a 150 min, concordando con las tendencias del estudio preeliminar (ver apartado 4.3). Llevando a la elaboración de caldos azucarados hacia una actividad económica, el tiempo de producción de glucosa puede llegar a ser una limitante económica, por lo que se puede considerar como alternativa, el manejo de un tiempo de hidrólisis de 60 min, ya que es considerablemente bajo.

Con respecto a la temperatura, en este estudio se logró encontrar la óptima exacta, puesto que en la figura 4.11 se aprecia notablemente un máximo de 67 °C.

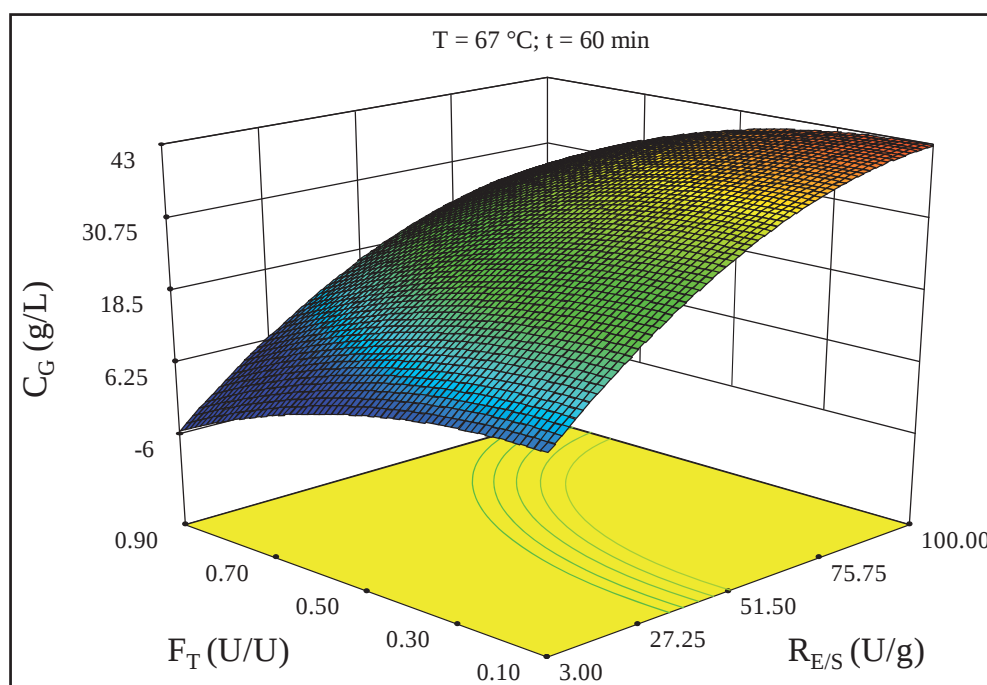
A niveles bajos de relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), se obtuvo una mínima concentración de glucosa, incrementándose en los siguientes niveles (niveles medios) de  $R_{E/S}$  y  $F_T$  y decreciendo en sus niveles altos. Por lo que se llevó a cabo una gráfica para ver el efecto de estas dos variables en la concentración de glucosa.



**Figura 4.11.** Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de glucosa ( $C_G$ ) con la temperatura ( $T$ ) y el tiempo ( $t$ ), para una concentración de sustrato ( $C_S$ ) de 6 %, a condiciones de relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), bajas, medias y altas.

La figura 4.12 muestra la superficie de respuesta para la dependencia de la concentración de glucosa con la relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), para las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de 67 °C y 60 min, respectivamente. El efecto de la relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) en la concentración de glucosa fue positivo, puesto que, un incremento en  $R_{E/S}$  corresponde a un aumento en la producción de glucosa. También puede observarse la tendencia hacia un estado estable de  $C_G$  al incrementarse  $R_{E/S}$ , el cual se alcanzó a un valor de  $R_{E/S}$  de 100 U/g. Si el costo de las enzimas es muy elevado, se podría considerar la reducción de  $R_{E/S}$  para propósitos económicos. El valor de la relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) podría fijarse en determinado valor, de acuerdo a su efecto en la concentración de glucosa ( $C_G$ ).

Con respecto al efecto que tiene la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ) en la concentración de glucosa ( $C_G$ ); a un valor de  $F_T$  de 0.14, se puede apreciar que se logra un máximo en la concentración glucosa; después de ese valor, el efecto de  $F_T$  en  $C_G$  es negativo.



**Figura 4.12.** Predicción del modelo para la dependencia de la concentración de glucosa ( $C_G$ ) con la relación unidades de actividad/sustrato ( $R_{E/S}$ ) y la fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa ( $F_T$ ), a las condiciones de temperatura óptima ( $T$ ) de 67 °C y de tiempo deseado ( $t$ ) de 60 min, para una concentración de sustrato ( $C_S$ ) de 6 %.

Por lo tanto, las condiciones óptimas encontradas fueron: temperatura, 67 °C; tiempo, 60 min; relación unidades de actividad/sustrato, 100 U/g y fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa, 0.14. Usando estas condiciones, una concentración de glucosa de 42.9 g/L fue predicha.

Un conjunto de experimentos de validación del modelo matemático obtenido fue realizado a unas condiciones seleccionadas aleatoriamente, las cuales fueron: T, 70 °C; t, 60 min;  $R_{E/S}$ , 100 U/g;  $F_T$ , 0.14. El valor de concentración de glucosa ( $C_G$ ) predicho fue de 37.4 g/L, mientras que los valores experimentales arrojaron una media de 38.0 g/L  $\pm$  0.5 g/L, confirmando la precisión del modelo.

Se determinó el rendimiento de hidrólisis mediante la ecuación 4.21.

$$\text{Rendimiento de hidrólisis} = \frac{C_G}{CM_G} \quad (4.21)$$

El rendimiento de hidrólisis (42.9/43.4) fue 98.8 %, por lo que el modelo obtenido (ecuación 4.20) puede ser incluido en futuros estudios técnicos y económicos de simulación de procesos.

## CONCLUSIONES

Las enzimas  $\alpha$ -amilasa con nombre comercial Termamyl SC DS<sup>®</sup> y glucoamilasa con nombre comercial Saczyme<sup>®</sup> pueden ser utilizadas para hidrolizar el almidón contenido en la papa (*Solanum tuberosum*).

A las mismas condiciones, la aplicación combinada de las dos enzimas en la reacción de hidrólisis enzimática proporciona rendimientos más altos que el uso individual de cada enzima.

La concentración de sustrato de 6 % (p/p) en la mezcla de reacción es adecuada para lograr una buena gelatinización del almidón, así como una buena agitación durante la hidrólisis enzimática; además no causa desnaturalización enzimática.

La concentración de glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática de la papa (*Solanum tuberosum*) se puede predecir por el modelo matemático obtenido dentro del espacio estudiado.

Las condiciones óptimas para la mayor concentración de glucosa fueron: concentración de sustrato, 6 % (p/p); tiempo, 60 min; temperatura, 67 °C; relación unidades de actividad/sustrato, 100 U/g y fracción de actividad de  $\alpha$ -amilasa, 0.14 U/U. Bajo estas condiciones, el modelo matemático predijo una concentración de glucosa de 38.9 g/L (rendimiento de 98.8 %), la cual es adecuada para propósitos fermentativos.

Un conjunto de experimentos de validación del modelo fue realizado a condiciones aleatorias. La diferencia entre el valor de la concentración de glucosa predicho y el medido fue de  $0.6 \pm 0.5$  g/L, confirmando la precisión del modelo.

El estudio de los parámetros manejados en este trabajo puede servir como base para investigaciones futuras de hidrólisis enzimática de otros tubérculos.

---

---

## REFERENCIAS

- Aehle, W. (2004). *Enzymes in Industry*. Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- Aguilar, R., Ramírez, J.A., Garrote, G., y Vázquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, 55, 309–318.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Pearson Educación. México.
- Baysal, Z., Uyar, F., Dođru, M., y Alkan, H. (2008). Production of extracellular alkaline  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation with a newly isolated *Bacillus* sp. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38, 184-190.
- Bertoft, E. (2007). Composition of clusters and their arrangement in potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 68, 433-446.
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics (principles and methods)*. Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- Box, G., y Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Bravo, V., Jurado, E., Martínez, J.F., Reyes, A., y García, A.I. (2006). Enzymatic hydrolysis of soluble starch with an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Progress*, 22, 718 -722.
- Browning, B.L. (1967). *Methods of Wood Chemistry*. Wiley, New York, USA.
- Chaplin, M.F. (1986). Monosaccharides. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, England.
- CONPAPA (Confederación Nacional de Productores de Papa de la República Mexicana). (2007). <http://www.conpapa.org.mx/panoramexico.html>
- Ćurić, D., Karlović, D., Tripalo, B., y Ježek, D. (1998). Enzymatic conversion of corn starch in twin-screw extruder. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 12(2), 63-71.
- Demirba, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 42(11), 1357-1378.
- Dirección Nacional de Servicios Académicos Virtuales de la Universidad Nacional de Colombia. (2005). <http://www.virtual.unal.edu.co>

- 
- 
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2008). FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Firouzabadi, F.N., Vincken, J.P., Ji, Q., Suurs, L.C.J.M., Buléon, A., y Visser, R.G.F. (2007). Accumulation of multiple-repeat starch-binding domains (SBD2–SBD5) does not reduce amylose content of potato starch granules. *Planta*, 225(4), 0032-0935.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., y Pandey, A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99, 4597-4602.
- Gaouar, O., Aymard, C., Zakhia, N., y Rios, G.M. (1997). Enzymatic hydrolysis of cassava starch into maltose syrup in a continuous membrane reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69, 367-375.
- Garrote, G., Domínguez, H., y Parajó, J.C. (1999). Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(11), 1101-1109.
- Gumul, D., Gambuś, H., y Gibiński, M. (2005). Air oxidation of potato starch over zinc (ii) catalyst. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 8(4), 85.
- Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., Nørgaard, L., y Engelsen, S.B. (2008). Gel texture and chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1551-1566.
- Hendriks, A.T.W.M., y Zeeman, G. (2008). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, in press.
- Heredia, A.S. (2008). Degradación del almidón mediante amilasa salival. *Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 5, 101-106.
- Hizukuri, S., Tabata, S., y Nikuni, Z. (1970). Studies on starch phosphate: Part 1. Estimation of glucose 6-phosphate residues in starch and the presence of tuber bound phosphate(s). *Starch-Stärke*, 22, 338-343.
- Kamasaka, H., Uchida, M., Kusaka, K., Yoshikawa, K., Yamamoto, K., Okada, S., y Ichikawa, T. (1995). Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(8), 1412-1416.

- 
- 
- Larrazábal, M.J., y Camacho, M.M. (2008). Characteristics of the salmon marinated in dry and for immersion in osmotic solution. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 20-26.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., y Nilvebrant, N. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 151-159.
- Liu, Q. (2002). A study of enzymatic hydrolysis of starch in potato pulp. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2113-2117.
- López, C., Torrado, A., Fuciños, P., Guerra, N.P., y Pastrana, L. (2004). Enzymatic hydrolysis of chestnut purée: Process optimization using mixtures of  $\alpha$ -Amylase and glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2907-2914.
- López, C., Torrado, A., Fuciños, P., Guerra, N.P., y Pastrana, L. (2006). Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylases mixture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 252-258.
- Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (1989). *Compendio de agronomía tropical, Tomo II*. IICA, San José, Costa Rica.
- Miranda, M.L., y Aguilera J.M. (2006). Structure and texture properties of fried potato products. *Food Reviews International*, 22(2), 173-201.
- Montgomery, D.C., Peck, E.A., y Vining, G.G. (2001). *Introduction to Linear Regression Analysis*. John Wiley & Sons.
- Murado, M.A., Siso, M.I.G., Gonzalez M.P., Montemayor, M.I., Pastrana, L., y Pintado, J. (1993). Characterization of microbial biomasses and amylolytic preparations obtained from mussel processing waste treatment. *Bioresource Technology*, 43, 117-125.
- Nakazawa, Y., y Wang, Y. (2003). Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, 338, 2871-2882.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J.M., y Young, M.M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnololy Advances*, 24, 80-85.
- PEMEX. (2008). Anuario estadístico. <http://www.pemex.com>
- Peña, A. (1988). *Bioquímica*. Limusa. México.
- Perlack, R.D., Wright, L.L., Turhollow, A.F., Graham, R.L., Stokes, B.J., Erbach, D.C., y OAK RIDGE NATIONAL LAB TN. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and

- 
- 
- bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. *Technical report of storming media of pentagon*, A357634.
- Polaina, J. (2004). Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *UNAM, Mensaje Bioquímico*, (28).
- Polaina, J., y MacCabe, A.P. (2007). *Industrial Enzymes: Structure, function and applications*. Springer. Reino Unido.
- Roberto, I.C., Sato, S., Mancilha, I.M., y Tacheda, M.E.S. (1995). Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 17, 1223-1228.
- Rosa, D.S., Guedes, C.G.F., y Pedroso, A.G. (2004). Gelatinized and nongelatinized corn starch/poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends: characterization by rheological, mechanical and morphological properties. *Polímeros*, 14(3), 181-186.
- Salieri, G., Vinci, G., y Antonelli, M.L. (1995). Microcalorimetric study of the enzymatic hydrolysis of starch: An  $\alpha$ -amylase catalyzed reaction. *Analytica Chimica Acta*, 300, 287-292.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) de la SAGARPA. (2008). Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Shariffa, Y.N., Karim, A.A., Fazilah, A., y Zaidul, I.S.M. (2008). Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, in press.
- Stawski, D. (2008). New determination method of amylose content in potato starch. *Food Chemistry*, 110(3), 777-781.
- Sun, Y., Lin, L., Deng, H., Peng, H., Li, J., Sun, R., y Liu, S. (2008). Hydrolysis of bamboo fiber cellulose in formic acid. *Frontiers of Forestry in China*, 3(4), 480-486.
- Tatsumi, H., y Katano, H. (2005). Kinetics of the surface hydrolysis of raw starch by glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8123-8127.
- U.S. Department of Energy - The National Renewable Energy Laboratory. (2004). Top value added chemicals from biomass: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *Biomass*, 1, 10-11.

- 
- 
- Varzakas, T.H., Roussos, S., y Arvanitoyannis, I.S. (2007). Glucoamylases production of *Aspergillus niger* in solid state fermentation using a continuous counter-current reactor. *International Journal Food Science & Technology*, 43, 1159-1168.
- Vasanthan, T., Bergthaller, W., Driedger, D., Yeung J., y Sporns, P. (1999). Starch from Alberta potatoes: wet-isolation and some physicochemical properties. *Food Research International*, 32, 355-365.
- Vázquez, E. (2003). Bioquímica y biología molecular en línea. Instituto de Química (UNAM). <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html>
- Vázquez, M., y Martin, A.M. (1998). Optimization of *Phaffia rhodozyma* culture through response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 314-320.
- Wang, Q., Wang, X., Wang, X., y Ma, H. (2008). Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 43, 280-286.
- Wójtowicz, A., y Jan van der Goot, A. (2005). The influence of water and glycerol addition on thermal processing, rheology and microstructure changes of potato starch. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 8(4), 51.
- Woolfe, J.A. (1987). *The Potato in the Human Diet*. Cambridge: Cambridge University Press.

---

---

## ANEXO

- Artículo denominado “A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*)”, publicado en la revista “LWT - Food Science and Technology”.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)



# A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*)

R. Delgado<sup>a</sup>, A.J. Castro<sup>a</sup>, M. Vázquez<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Postgraduate Studies, Faculty of Chemical Engineering, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>b</sup> Area of Food Technology, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form

8 October 2008

Accepted 6 November 2008

### Keywords:

$\alpha$ -Amylase

Glucosylase

Potato

Enzymatic hydrolysis

Kinetics

## ABSTRACT

The biotechnology industry demands raw materials to prepare growth media for fermentative processes. These media contain a carbon source which can be obtained from potato, an abundant source of starch. This work deals with the modelling of the enzymatic hydrolysis of potato using  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. Several strategies were evaluated, including the use of those enzymes alone, in a mixture and under different conditions of temperature, time and substrate concentration. Using  $\alpha$ -amylase alone or glucoamylase alone, both enzymes reached the same hydrolysis yield (0.42 g/g). The hydrolysis using a mixture of both enzymes allowed obtaining hydrolysates with reducing sugar concentrations up to 14.1 g/L at 70 °C. In this case, the yield of hydrolysis was increased up to 0.82 g/g. Considering the important effect and interactions of time and temperature, a statistical Box–Behnken design was conducted including substrate concentration, time and temperature as operational variables and reducing sugar concentration released as dependent variable. The conditions to obtain the maximum response were 6% DM of substrate concentration, 68 °C and 180 min, where 32.62 g/L of reducing sugar concentration was predicted. Verification experiments gave a mean value of 33.57 g/L, confirming the accuracy of the model.

© 2008 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Many cereal seeds and tubers/roots store starch. Potato is an abundant material that mainly contains (fresh matter w/w): moisture (80 ± 2%), starch (18 ± 2%), cellulose and hemicelluloses (1.5 ± 0.5%), glucose (0.4 ± 0.3%) and proteins (2 ± 1.5%) (Woolfe, 1987). Its annual world production is around 300 million tons, and areas planted cover more than 18 million ha. Major producing countries (and the world's share of production) are China (20%), Russia (12%), India (8%), and United States (8%) (Miranda & Aguilera, 2006).

Biotechnology industries demand raw materials to prepare growth media for the fermentative processes. These media contain a carbon source which can be obtained from vegetables with high monosaccharide contents such as sucrose of sugar cane (*Saccharum officinarum*) (Patil et al., 2006; Sánchez & Cardona, 2008), high polysaccharide contents such as cellulose and hemicelluloses of sugar cane bagasse (Al Arni, Zilli, & Converti, 2007; Cheng et al., 2008) or starch of potato (*Solanum tuberosum*) (Čurić, Karlović, Tripalo, & Ježek, 1998; Liu, 2002). The polysaccharides (cellulose or starch) should be transformed into monosaccharides by acid or enzymatic hydrolysis.

Hydrolysates containing glucose can be obtained from potato starch. The acid hydrolysis generates an acid solution that needs neutralization to be used for fermentative purposes while the enzymatic hydrolysis has the advantage that generates a glucose solution that can be fermented without more treatments.

Starch is generally composed of two kinds of  $\alpha$ -glucan polymers: i) amylose, a linear polymer consisting almost exclusively of  $\alpha$ -1,4-linked glucose residues and ii) amylopectin, which in addition to linear chains of  $\alpha$ -1,4-linked glucose, also contains  $\alpha$ -1,6-linked branch points (Hansen, Blennow, Pederson, Nørgaard, & Engelsen, 2008). Therefore, the amylose fraction is essentially linear, whereas amylopectin is highly branched. The amylose content is 26.9% for potato (Stawski, 2008).

Gelatinization occurs when starch is heated in water. After cooling, the gelatinized starch forms a textural gel network provided the starch concentration has reached a critical concentration. Gelatinization allows enzymes to penetrate easily into starch structures contributing to a more efficient reaction (Hansen et al., 2008). Two enzymes,  $\alpha$ -amylase (E.C. 3.2.1.1) and glucoamylase (E.C. 3.2.1.3), have been applied as catalysts for enzymatic hydrolysis of materials with high content of starch as chestnut purée (López, Torrado, Fuciños, Guerra, & Pastrana, 2006).

The  $\alpha$ -amylase can hydrolyze starch into maltose, glucose and maltotriose by cleaving the 1,4- $\alpha$ -D-glucosidic linkages between adjacent glucose units in the linear amylose chain. This enzyme can be obtained from several fungi, yeasts, bacteria and actinomycetes.

\* Corresponding author.

E-mail address: [manuel.vazquez@usc.es](mailto:manuel.vazquez@usc.es) (M. Vázquez).

However, fungal and bacterial sources have the main applications in food industry. Alkalophilic microorganisms, in particular *Bacillus* species like *Bacillus licheniformis*, have attracted much interest in the past few decades because of their ability to produce extracellular enzymes that are stable at high pH value (Baysal, Uyar, Doğru, & Alkan, 2008).

Glucoamylase hydrolyses single glucose units from the non-reducing ends of amylose and amylopectin in a stepwise manner, and produces glucose as the sole end-product from starch and related polymers. Unlike  $\alpha$ -amylase, most glucoamylases are also able to hydrolyze the 1,6- $\alpha$ -linkages at the branching points of amylopectin, although at a lower rate than 1,4-linkages (Gangadharan, Sivaramakrishnan, Nampoothiri, Sukumaran, & Pandey, 2008; Liu, 2002; Wang, Wang, Wang, & Ma, 2008). Glucoamylases are produced by a diverse group of microorganisms, including bacteria, yeasts and moulds; however the commercially used enzymes are produced by species of *Aspergillus* and *Rhizopus* (Norouzzian, Akbarzadeh, Schärer, & Young, 2006).

This work deals with the modelling and optimization of the enzymatic hydrolysis of dried potatoes with  $\alpha$ -amylase and glucoamylase.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Substrate and enzymes

Potatoes supplied by local farmers (Diz, Dozón, Spain) were washed, sliced, dried and ground to be used in this work. The water extracted from potatoes was 80.35% of the fresh weight. The dried potatoes contained a residual of 8.13% moisture.

The enzymes used in this study were commercial  $\alpha$ -amylase (Termamyl SC DS<sup>®</sup>) and glucoamylase (Saczyme<sup>®</sup>). They were kindly supplied by Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark. Termamyl SC DS<sup>®</sup> was produced by submerged fermentation of *Bacillus licheniformis*. The commercial enzyme contains methionine, sodium chloride and sucrose as stabilisers. Saczyme<sup>®</sup> was produced by submerged fermentation of *Aspergillus niger*. The enzyme was separated and purified from the production organism. The commercial solution contains also sucrose and glucose as stabilisers and potassium sorbate and sodium benzoate as preservatives.

Dilutions of the commercial solutions were prepared to obtain the enzyme/substrate ratios needed.

### 2.2. Pretreatment

A 60 g solution was prepared of dried potato on water (4% w/w) in sealed 250 mL bottles. The solution was heated to boiling with agitation of 500 rpm to allow gelatinization. Subsequently, 40 g of 0.15 M phosphate–citric buffer solution (pH 5.0) was added obtaining a final solution of 2.4% of dried potatoes. The mixtures were immediately used for the hydrolysis. In the experimental design study the initial concentration of dried potato was varied to obtain the final substrate concentration needed in the range 2–6%.

### 2.3. Hydrolysis conditions

The enzymatic hydrolysis of dried potato was carried out with agitation (600 rpm) and at different temperatures in a warming plate with temperature controller. The enzyme/substrate ratio was set up at 6 units (U)/g of dried potato (dry matter). The fraction of activity  $\alpha$ -amylase/total enzymes was 0.35 U/U. These parameters were taken from López, Torrado, Fuciños, Guerra, and Pastrana (2004). The ratio of liquid/solid was 40.9 g/g.

In the kinetic studies, samples were taken and analyzed several times until the reducing sugar concentration remained stable.

### 2.4. Overall process

The overall process studied in this work is shown in Fig. 1. 100 kg of potatoes were washed and sliced. Then they were dried at 60 °C where 85.35 kg of moisture was removed, yielding 0.1965 kg of dried potato/kg of fresh potato. The residual moisture was 8.13%. The dried potatoes were ground and treated at 100 °C with a water/solid ratio of 19.47 g/g, forming a gel. Then, it was mixed with a buffer solution to reach pH 5 and diluted enzyme solution was added to start the hydrolysis reaction. The water/solid ratio was 40.9 g/g in the hydrolysis step. At the end of the reaction, the hydrolysate was filtered and the liquid (755.85 kg) is the glucose solution that can be used as substrate for the growth of

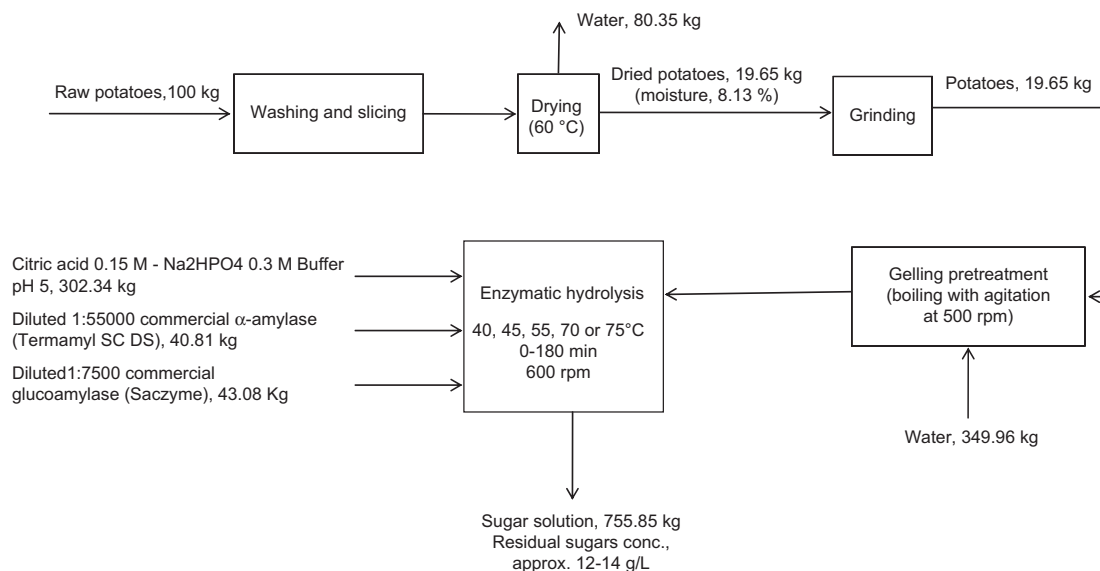


Fig. 1. Overall process proposed for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of potato.

microorganism for different industrial purposes. Obviously, the concentration of glucose depends on the hydrolysis conditions.

### 2.5. Analytical methods

The composition of the dried substrate was obtained through a quantitative acid hydrolysis under standard conditions (Garrote, Domínguez, & Parajó, 1999).

The enzymatic activity of each enzyme was measured with the method used by López et al. (2006) with the difference that they defined enzymatic activity units as the concentration of reducing sugar released at 40 °C during 10 min and we expressed the activity unit as the concentration of reducing sugar released at 40 °C during 1 min.

The glucose released by the hydrolysis was measured as reducing sugar concentration ( $C_{RS}$ ) using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method. This method is adequate because glucose is the unique reducing sugar of the starch (López et al., 2004). This compound is reduced by glucose toward a coloured product (3-amino-5-dinitrosalicylic acid). The absorbance was measured at 540 nm (V-670 spectrophotometer, Jasco, Tokio, Japan) and reducing sugar concentration was determined by a calibration curve using glucose as standard.

### 2.6. Modelling and statistical methods

Adjustment of experimental data to model was performed using the solver utility of MS-Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA). The model was statistically validated through the calculated values of regression coefficient ( $r^2$ ) and Fisher test probability. The experiment design was analyzed using the Design Expert® 7.1.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA).

## 3. Results and discussion

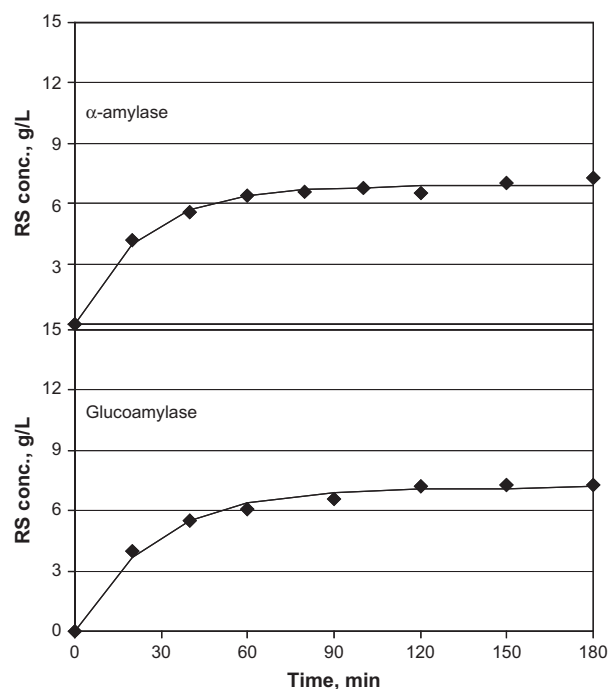
The composition obtained was (dry matter): starch expressed as glucan,  $64.91 \pm 3.34\%$ ; xylan,  $2.81 \pm 0.24\%$ ; araban,  $0.47 \pm 0.36\%$ . Klason lignin was very low as can be expected ( $0.82 \pm 0.14\%$ ). The low concentration of lignin confirms that all the glucan detected was proceeded from the starch and not from cellulose which is linked with lignin and hemicelluloses. Acetyl groups were not detected.

### 3.1. Determination of the $\alpha$ -amylase and glucoamylase activities

Enzyme activities of the lots used in this work were determined. The activity value of  $\alpha$ -amylase (Termamyl SC DS®) was 51,273 U/ml and for glucoamylase (Saczyme®) was 12,313 U/ml. López et al. (2004) determined activities for other commercial  $\alpha$ -amylase (Termamyl 120L (S)®) and glucoamylase (AMG 300L®), obtaining lower values, 734 U/ml and 245.9 U/ml, respectively. Therefore, Termamyl SC DS®  $\alpha$ -amylase was 70-fold more active than Termamyl 120L (S)® and Saczyme® was 50-fold more active than AMG 300L®. Therefore, Termamyl SC DS® solution was diluted 55,000-fold and Saczyme® solution was diluted 7500-fold to be in the range of unit needed in this study.

### 3.2. Enzymatic hydrolysis with $\alpha$ -amylase alone or glucoamylase alone

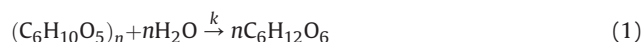
Enzymatic hydrolysis of dried potatoes was performed using  $\alpha$ -amylase alone or glucoamylase alone. The temperature was set up at 70 °C on the basis of the study of hydrolysis of chestnut starch (López et al., 2004). In our study, 6 U/g (DM) of dried potatoes were used. Samples at several times were taken, centrifuged and reducing sugars were analyzed in the supernatant. Fig. 2 shows the



**Fig. 2.** Experimental (dots) and predicted (line) dependence of the reducing sugars released during the hydrolysis of 24 g/L of dried potato using 6 U of  $\alpha$ -amylase (Termamyl SC DS®)/g or glucoamylase (Saczyme®)/g alone at 70 °C.

experimental values obtained for glucose released expressed as reducing sugars (RS). Using  $\alpha$ -amylase alone, 6.4 g/L was obtained at 60 min. Longer times did not increased the concentration too much, reaching up to 7.3 g/L at 180 min. A similar result was obtained using glucoamylase alone, where 6.1 g/L was obtained at 60 min and 7.3 g/L at 180 min.

Although models modifying the Michaelis–Menden equation can be found in the literature (López et al., 2004), due to the difficulty in finding a strict mechanism for hydrolysis reactions, it is common to simplify the models to determine the kinetics of the hydrolysis. The hydrolysis of the dried potatoes can be studied as an irreversible first order reaction of decomposition of a polysaccharide (starch as main component) toward glucose as it is shown in equation (1).



The experimental data using both enzymes alone were fitted to a mathematical model adopted from the acid hydrolysis of sorghum straw (Herrera, Téllez-Luis, Ramírez, & Vázquez, 2003). Solving the differential equations, the following model predicts the concentration of glucose (expressed as reducing sugars):

$$C_{RS} = C_{PRS} (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

where  $C_{RS}$  is the reducing sugar concentration released (g/L),  $C_{PRS}$  is the potential concentration of reducing sugars (g/L),  $k$  is the rate of reducing sugars released ( $\text{min}^{-1}$ ) and  $t$  is the reaction time (min).

**Table 1**

Kinetic and statistical parameters of reducing sugars released during the enzymatic hydrolysis of dried potatoes at 70 °C using  $\alpha$ -amylase or glucoamylase.

| Enzyme            | $k$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $C_{PRS}$ (g/L) | $r^2$  | Probability Fisher test |
|-------------------|---------------------------|-----------------|--------|-------------------------|
| $\alpha$ -amylase | 0.0434                    | 6.9             | 0.9915 | 0.9936                  |
| glucoamylase      | 0.0361                    | 7.2             | 0.9935 | 0.9802                  |

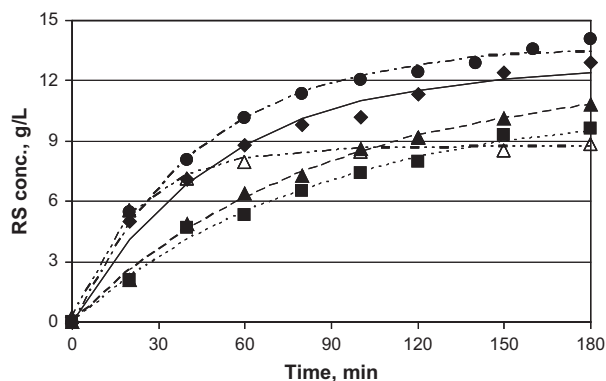


Fig. 3. Experimental (dots) and predicted dependence (lines) of the reducing sugars released during the hydrolysis of 24 g/L dried potato using 6 total units/g with a fraction of 0.35 U of amylase per total units at several temperatures: (■) 40 °C, (▲) 45 °C, (◆) 55 °C, (●) 70 °C and (▼) 75 °C.

Table 1 shows the results of fitting to equation (2) to the enzymatic hydrolysis catalyzed by  $\alpha$ -amylase alone or glucoamylase alone at 70 °C and the parameters for its statistical evaluation (coefficient of determination  $r^2$  and  $F$ -test probability). The value of  $C_{PRS}$  was 6.9 g/L using  $\alpha$ -amylase and 7.2 g/L using glucoamylase, close to the experimental values. The statistical parameters showed a good agreement between experimental and predicted data. Fig. 2 shows the values predicted by the model and experimental data. The value of the rate of reducing sugars released was slightly higher for  $\alpha$ -amylase than for glucoamylase.

Considering a complete reaction, where the molecular weight (MW) of starch is  $162 \cdot n$  and the  $n$  glucose molecules released have a MW of 180, the ratio of the stoichiometric factors is  $180/162$  g of released glucose/g of starch. Then the maximum concentration of glucose that can be obtained can be calculated as following:

$$CM_{RS} = \frac{180}{162} x_S C_S \quad (3)$$

where  $CM_{RS}$  is maximum concentration of reducing sugars that can be obtained (g/L),  $C_S$  is dried potato concentration in the hydrolysis media (g DM/L) and  $x_S$  is the starch fraction in dried potato.

In our study,  $C_S$  was 24 g/L and  $x_S$  was 0.6491 g/g, consequently the maximum concentration of reducing sugars that can be obtained is 17.29 g/L. According to the reducing sugar concentration obtained using  $\alpha$ -amylase alone or glucoamylase alone, both enzymes hydrolyzed only 42.22% of the maximum concentration, suggesting that a combination of both enzymes could give a higher degree of hydrolysis.

### 3.3. Hydrolysis kinetics catalyzed by an $\alpha$ -amylase and glucoamylase mixture

A mixture containing a ratio of 0.35 U  $\alpha$ -amylase/0.65 U glucoamylase was tested. The results of the hydrolysis kinetics of dried potatoes (24 g/L) at several temperatures using 6 U/g of dried

Table 2  
Kinetic and statistical parameters of reducing sugars released during the enzymatic hydrolysis of dried potatoes using a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase.

| $T$ (°C) | $k$ (min <sup>-1</sup> ) | $C_{PRS}$ (g/L) | $r^2$  | Probability Fisher test |
|----------|--------------------------|-----------------|--------|-------------------------|
| 40       | 0.0118                   | 10.8            | 0.9928 | 0.9976                  |
| 45       | 0.0119                   | 12.2            | 0.9962 | 0.9687                  |
| 55       | 0.0196                   | 12.8            | 0.9870 | 0.9503                  |
| 70       | 0.0225                   | 13.8            | 0.9950 | 0.9726                  |
| 75       | 0.0454                   | 8.5             | 0.9933 | 0.9913                  |

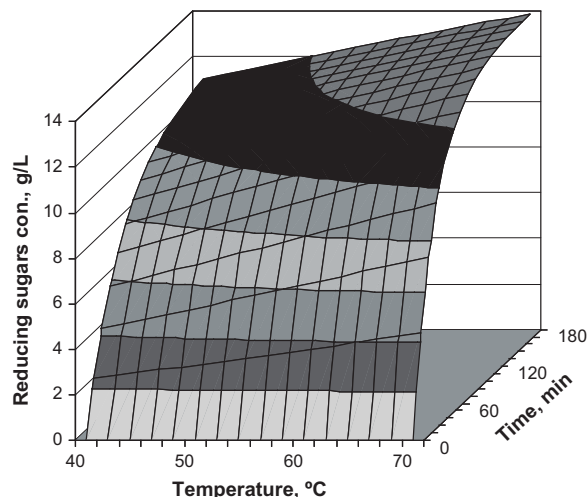


Fig. 4. Prediction of the generalized model for the dependence of reducing sugar concentration on time and temperature.

potato with  $\alpha$ -amylase fraction of 0.35 U per one total unit are shown in Fig. 3. The maximum concentration of reducing sugar was reached at 180 min for all temperatures. A positive effect of temperature over the maximum concentration of reducing sugars was observed within the interval from 40 to 70 °C, reaching up to 14.1 g/L at 70 °C. In this case, the yield of hydrolysis was 0.8155 g/g. Using a temperature of 75 °C, the maximum value of the reducing sugar concentration observed was only 8.6 g/L while the yield of hydrolysis was 0.4974 g/g. It suggests that the enzymes initiate to denature at this temperature.

The reducing sugar concentration using a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase at 70 °C was clearly higher than that using both enzymes alone (93% higher). Note that the same enzyme activity was used in both experiments (6 U/g).

The experimental data of the reducing sugar concentration observed in Fig. 3 were fitted to the mathematical model proposed in equation (2). Table 2 shows the results for fitting of experimental data. The statistical parameters showed a good agreement between experimental and predicted data. The rate of reducing sugars released ( $k$ ) increased with the temperature. However, the

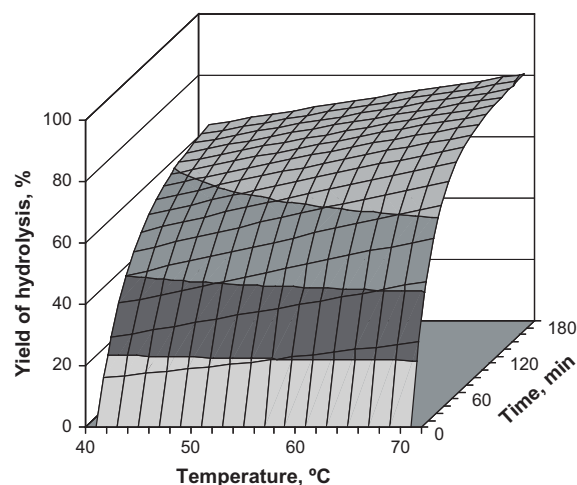


Fig. 5. Prediction of the model for hydrolysis yield for the dependence on time and temperature.

potential concentration of reducing sugars ( $C_{PRS}$ ) increased with the temperature from 40 to 70 °C, reaching values of 10.8–13.8 g/L, but decreased at 75 °C with a value of 8.5 g/L. This confirms the suggestion of the denaturation of the enzymes at 75 °C.

The maximum value obtained (14.1 g/L at 70 °C and 180 min) is far from the maximum concentration calculated using equation (3), 17.29 g/L. This can be due to that compared with other starches; potato starch has a higher concentration of covalently bound phosphate (Hizukuri, Tabata, & Nikuni, 1970). As amylolytic enzymes are incapable of bypassing the phosphorylated glucosyl residue, phosphoryl-oligosaccharides are released from the digestion of potato starch with amylase (Kamasaka et al., 1995). It is likely that this high phosphorus content in potato starch might reduce the enzymatic digestibility of gelatinized starch.

### 3.4. Generalized kinetic model of hydrolysis

The effects of the temperature on the rate of reducing sugars released ( $k$ ) and the potential concentration of reducing sugars ( $C_{PRS}$ ) were correlated as a linear function in the range of 40–70 °C. The correlation coefficient  $r^2$  was 0.9116 for  $k$  and 0.8916 for  $C_{PRS}$ . The probability of  $F$ -test was 0.9400 and 0.9271, respectively, showing the good agreement of the models.

The results of the linear regressions to these two functions were included in equation (2) to obtain the generalized model of equation (4).

$$C_{RS} = [8.7 \times 10^{-2}T + 7.8] \left(1 - e^{-(3.9 \times 10^{-4}T - 4.2 \times 10^{-3})t}\right) \quad (4)$$

Fig. 4 shows the response surface of the generalized model for the dependence of  $C_{RS}$  on time and temperature in the range of the study. This kind of figure allows a visual evaluation of the models. Therefore, it is possible to select conditions under which the reducing sugar concentration is the highest. According to Fig. 4, the maximum concentration of reducing sugar was reached at 70 °C and 180 min, with a value of 13.9 g/L.

The statistical evaluation between the model of equation (4) and the observed data of reducing sugar concentration ( $C_{RS}$ ) gave a value of  $r^2$  of 0.9882 and an  $F$ -test probability of 0.9842. Thus, the model can be considered valid.

In order to provide a better understanding of the process, a derived model of equation (4) for the yield of hydrolysis can be calculated as  $C_{RS}/CM_{RS}$ . Fig. 5 shows the response surface for the hydrolysis yield in the range of study (40–70 °C and 0–180 min). The effect of the time had more influence on the yield than that of temperature. However, an interaction between time and

**Table 3**

Variables involved in the experiments design (Box–Behnken) for the enzymatic hydrolysis of dried potatoes using a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase.

|                                                     | Nomenclature | Units     | Variation levels |
|-----------------------------------------------------|--------------|-----------|------------------|
| (a) Fixed variables                                 |              |           |                  |
| Agitation                                           |              | rpm       | 600              |
| Ratio enzyme/substrate                              |              | U/g       | 6                |
| Fraction of activity                                |              | U/total U | 0.35             |
| $\alpha$ -amylase/total enzymes                     |              |           |                  |
| (b) Independent variables (factors)                 |              |           |                  |
| Dried potato concentration                          | $S_0$        | % (w/w)   | (2, 4, 6)        |
| Temperature                                         | $T$          | °C        | (68, 70, 72)     |
| Time                                                | $t$          | min       | (60, 120, 180)   |
| (c) Dimensionless, normalized independent variables |              |           |                  |
| Dried potato concentration                          | $x_1$        |           | (−1, 0, 1)       |
| Temperature                                         | $x_2$        |           | (−1, 0, 1)       |
| Time                                                | $x_3$        |           | (−1, 0, 1)       |
| (d) Dependent variable (response)                   |              |           |                  |
| Reducing sugar concentration                        | $C_{RS}$     | g/L       |                  |

**Table 4**

Operational conditions assayed and experimental results achieved.

| Experiment | Independent variables |     |     |               |       |       | Dependent variable |
|------------|-----------------------|-----|-----|---------------|-------|-------|--------------------|
|            | Dimensional           |     |     | Dimensionless |       |       | $C_{RS}$           |
|            | $S_0$                 | $T$ | $t$ | $x_1$         | $x_2$ | $x_3$ |                    |
| 1          | 6                     | 70  | 60  | 1             | 0     | −1    | 19.09              |
| 2          | 4                     | 72  | 60  | 0             | 1     | −1    | 12.53              |
| 3          | 4                     | 70  | 120 | 0             | 0     | 0     | 16.07              |
| 4          | 2                     | 68  | 120 | −1            | −1    | 0     | 9.11               |
| 5          | 6                     | 70  | 180 | 1             | 0     | 1     | 29.32              |
| 6          | 4                     | 72  | 180 | 0             | 1     | 1     | 20.52              |
| 7          | 2                     | 70  | 180 | −1            | 0     | 1     | 10.71              |
| 8          | 6                     | 68  | 120 | 1             | −1    | 0     | 27.65              |
| 9          | 4                     | 68  | 180 | 0             | −1    | 1     | 23.18              |
| 10         | 6                     | 72  | 120 | 1             | 1     | 0     | 20.04              |
| 11         | 2                     | 72  | 120 | −1            | 1     | 0     | 9.48               |
| 12         | 4                     | 70  | 120 | 0             | 0     | 0     | 19.82              |
| 13         | 4                     | 70  | 120 | 0             | 0     | 0     | 17.10              |
| 14         | 4                     | 68  | 60  | 0             | −1    | −1    | 15.93              |
| 15         | 2                     | 70  | 60  | −1            | 0     | −1    | 6.99               |

temperature was observed. The maximum yield of hydrolysis (0.80 g/g) was predicted at 70 °C and 180 min.

### 3.5. Response surface of the dependence of reducing sugar concentration on substrate concentration, temperature and time

The previous results showed that the maximum concentration of reducing sugars obtained was low (around 14 g/L) to be used for some fermentative processes. Considering the important effects and interaction of time and temperature, a new study was conducted including a new variable (substrate concentration) to increase this concentration. The influence of substrate concentration, temperature and time during the enzymatic hydrolysis of potato was assessed using the response surface methodology which has been successfully used to optimize biochemistry and biotechnology processes related with food systems (Larrazábal & Camacho, 2008; Roberto, Sato, Mancilha, & Tacheda, 1995; Vázquez & Martin, 1998).

The set of experiments followed a second-order, incomplete, factorial structure. The substrate concentration, temperature and time were considered as operational variables (denoted  $S_0$ ,  $T$  and  $t$ , respectively) and their effects on the selected dependent variable (reducing sugar concentration) were calculated. For computation purposes, the normalized, dimensionless variables  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  were defined as:

$$x_1 = \frac{S_0 - 4}{2} \quad (5)$$

$$x_2 = \frac{T - 70}{2} \quad (6)$$

$$x_3 = \frac{t - 120}{60} \quad (7)$$

**Table 5**

Summary of the sequential model sum of squares.

| Source             | Sum of squares | df | Mean square | F-value | p-value<br>probability > F |
|--------------------|----------------|----|-------------|---------|----------------------------|
| Mean vs Total      | 4421.7         | 1  | 4421.7      |         |                            |
| Linear vs Mean     | 575.71         | 3  | 191.9       | 50.56   | <0.0001                    |
| 2FI vs Linear      | 26.67          | 3  | 8.89        | 4.72    | 0.0353                     |
| Quadratic vs 2FI   | 6.85           | 3  | 2.28        | 1.39    | 0.3483                     |
| Cubic vs Quadratic | 0.71           | 3  | 0.24        | 0.063   | 0.9749                     |
| Residual           | 7.52           | 2  | 3.76        |         |                            |
| Total              | 5039.16        | 15 | 335.94      |         |                            |

**Table 6**  
Analysis of variance (ANOVA) for 2FI Model.

| Source          | Sum of squares | df | Mean square | F-value | p-value<br>probability > F |
|-----------------|----------------|----|-------------|---------|----------------------------|
| Model           | 602.37         | 6  | 100.39      | 53.26   | <0.0001                    |
| $x_1$ ( $S_0$ ) | 447.07         | 1  | 447.07      | 237.18  | <0.0001                    |
| $x_2$ (Temp)    | 22.10          | 1  | 22.10       | 11.72   | 0.0090                     |
| $x_3$ (Time)    | 106.53         | 1  | 106.53      | 56.51   | <0.0001                    |
| $x_1 \cdot x_2$ | 15.94          | 1  | 15.94       | 8.46    | 0.0196                     |
| $x_1 \cdot x_3$ | 10.58          | 1  | 10.58       | 5.61    | 0.0452                     |
| $x_2 \cdot x_3$ | 0.13           | 1  | 0.13        | 0.07    | 0.7966                     |
| Residual        | 15.07          | 8  | 1.88        |         |                            |
| Lack of fit     | 7.55           | 6  | 1.25        | 0.33    | 0.8740                     |
| Pure error      | 7.52           | 2  | 3.76        |         |                            |
| Cor total       | 617.45         | 14 |             |         |                            |

The set of experiments followed the Box–Behnken design (Box & Behnken, 1960). This design was formed by combining two-level factorial designs with incomplete block designs. This procedure creates designs with desirable statistical properties but, most importantly, with only a fraction of the experiments required for a three-level factorial design.

Table 3 summarizes the variables involved in the experimental design for the enzymatic hydrolysis of dried potatoes using a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. The ratio activity units/substrate was set up at 6 U/g and the fraction of  $\alpha$ -amylase was set up at 0.35  $\alpha$ -amylase U/total U on the basis of the previous studies. The variable dried potato concentration ( $S_0$ ) was selected in the range of 2–6% (DM) because 6% was the higher concentration that allowed that all the matter was wetted and a good solid/liquid mixture. The range for temperature (68–72 °C) and time (60–180 min) was selected on the basis of the previous studies.

The operational conditions assayed (in terms of dimensional and dimensionless operational variables) as well as the experimental results determined for  $C_{RS}$  are shown in Table 4. The interrelationship between operational and dependent variables can be established through an equation including linear, interaction and second-order terms. The mathematical model used as first approach was a polynomial model of quadratic order as shown in equation (8).

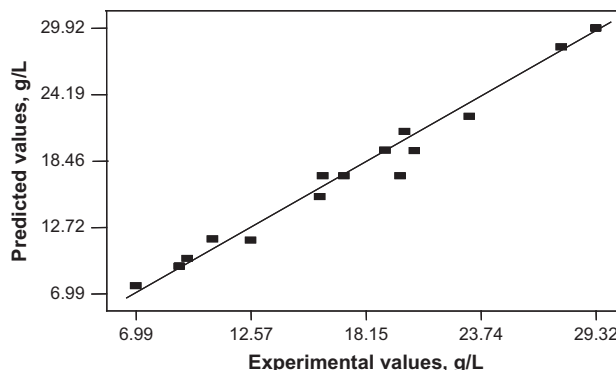
$$C_{RS} = a_0 + \sum_i a_i x_i + \sum_i b_i x_i^2 + \sum_i \sum_j c_{ij} x_i x_j \quad (8)$$

where  $C_{RS}$  is reducing sugar concentration released, g/L;  $x_i$  are the normalized dimensionless variables ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ) and  $a_0$ ,  $a_i$ ,  $b_i$  and  $c_{ij}$  are regression coefficients calculated fitting the experimental data by multiple regression. Partial models of the quadratic model were also fitted.

Table 5 shows the sum of squares for the partial and complete models. Data fitted well to a 2-factor interaction model (2FI) due to the lowest value (0.0353) for the  $p$ -value calculated. Therefore, the mathematical model 2FI for  $C_{RS}$  as function of the normalized variables was selected as following:

**Table 7**  
Analysis of variance (ANOVA) for 2FI Model deleting the term  $x_2 \cdot x_3$  (interaction temperature and time).

| Source          | Sum of squares | Mean square | F-value | p-value<br>probability > F |
|-----------------|----------------|-------------|---------|----------------------------|
| Model           | 602.24         | 5           | 120.45  | 71.26                      |
| $x_1$ ( $S_0$ ) | 447.07         | 1           | 447.07  | 264.48                     |
| $x_2$ (Temp)    | 22.1           | 1           | 22.1    | 13.07                      |
| $x_3$ (Time)    | 106.53         | 1           | 106.53  | 63.03                      |
| $x_1 \cdot x_2$ | 15.95          | 1           | 15.95   | 9.44                       |
| $x_1 \cdot x_3$ | 10.59          | 1           | 10.59   | 6.26                       |
| Residual        | 15.21          | 9           | 1.69    |                            |
| Lack of fit     | 7.69           | 7           | 1.1     | 0.29                       |
| Pure error      | 7.52           | 2           | 3.76    | 0.908                      |
| Cor total       | 617.46         | 14          |         |                            |



**Fig. 6.** Predicted values by the mathematical model vs actual values (experimental data) of reducing sugar concentration.

$$C_{RS} = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + c_1 x_1 x_2 + c_2 x_1 x_3 + c_3 x_2 x_3 \quad (9)$$

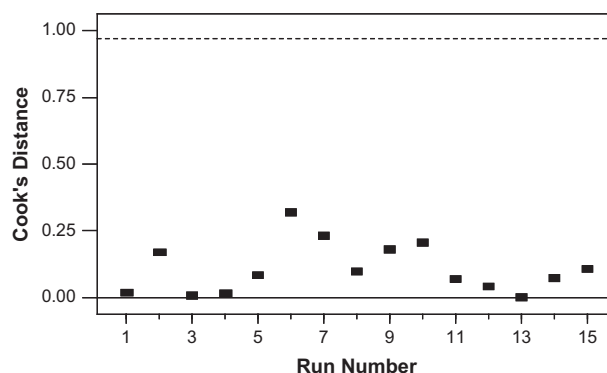
Table 6 shows the coefficients calculated by an Analysis of Variance (ANOVA). The  $F$ -value of 53.26 implies that the model is significant. There is only a 0.01% chance that this large “Model  $F$ -value” could occur due to noise. The value of “ $p$ -value probability >  $F$ ” was lower than 0.0001. Values of “prob >  $F$ ” less than 0.0500 indicate that the model terms are significant. The model terms  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_1 \cdot x_2$  and  $x_1 \cdot x_3$  were significant. But the term  $x_2 \cdot x_3$  was not significant (value of 0.7966) and can be deleted to improve the robustness of the model. Therefore a new fitting was performed for the reduced model showed in equation (10).

$$C_{RS} = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + c_1 x_1 x_2 + c_2 x_1 x_3 \quad (10)$$

Table 7 showed the coefficients calculated by ANOVA for the equation (10). The  $F$ -value increased up to 71.26. The value of “ $p$ -value probability >  $F$ ” was also lower than 0.0001. The “lack of fit  $F$ -value” of 0.29 implies that the lack of fit is not significant relative to the pure error (non-significant lack of fit is good).

The value of  $r^2$  was 0.9754. This statistical parameter is usually utilized to determine the correlation of a model. However, this is a measure of the amount of variation around the mean explained by the model and does not give useful information about if this model can be used for all the population and not only for the samples.

It is better to compare the values of “adjusted  $r^2$ ” and “predicted  $r^2$ ”. Parameter “adjusted  $r^2$ ” is a measure of the amount of variation around the mean explained by the model, adjusted for the number of terms in the model. The “adjusted  $r^2$ ” decreases as the number of terms in the model increases if those additional terms do not add



**Fig. 7.** Cook's Distance for the case of the model.

value to the model. The “predicted  $r^2$ ” is a measure of the amount of variation in new data explained by the model. The “predicted  $r^2$ ” obtained (0.9420) is in reasonable agreement with the “adjusted  $r^2$ ” obtained (0.9617). The predicted  $R$ -squared and the adjusted  $r^2$  should be within 0.20 of each other. Otherwise, there may be a problem with either the data or the model. “Adequate precision” measures the signal/noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. The ratio obtained (27) indicates an adequate signal. These

parameters confirm that the empirical equation (11) obtained can be used to model the process of hydrolysis in the design space.

$$C_{RS} = 17.17 + 7.48x_1 - 1.66x_2 + 3.65x_3 - 2x_1x_2 + 1.63x_1x_3 \quad (11)$$

Fig. 6 shows the predicted vs experimental values of reducing sugar concentration. Groups of points above or below the line could indicate areas of over or under prediction. It can be observed that the points were randomly scattered along the 45-degree line. To evaluate the strength of the model also a residual test was performed. Cook's Distance is a measure of how much the regression changes if a sample is deleted (Douglas, Montgomery, Kowalski, Peck, & Vining, 2001). Relatively large values are associated with cases with high leverage and large studentized residuals. Large values should be investigated because they could be caused by recording errors, an incorrect model, or a design point far from the remaining cases. “Large” is defined as a point that is 2–3 times larger than the other points. Fig. 7 shows Cook's Distance for the model. It can be seen that no case is over the dot line (2–3 times larger than mean). It confirms that the mathematical model is good.

The response surface of the model is shown in Fig. 8. In this figure temperature was fixed at 3 levels (68, 70 and 72 °C) because it was the variable that showed a lower influence. A maximum response was obtained at an edge of the space of study. The conditions to obtain the maximum response were  $S_0$ , 6%, temperature, 68 °C and time, 180 min, where a concentration of 32.62 g/L of reducing sugars was predicted. Verification experiments were performed with the purpose of confirming the maximum values. The new hydrolysis gave 33.57 g/L, confirming the accuracy of the model. The model of equation (11) can be used to obtain other optimal conditions obtained with restrictions. Reducing sugar concentrations over 20 g/L are adequate for many biotechnological applications. Therefore restrictions can be minimizing the time and to obtain more than 20 g/L. The model gave an optimal using these conditions:  $S_0$ , 6%, temperature, 68 °C and time, 66.6 min, predicting a concentration of 23.60 g/L of reducing sugar. Thus, the hydrolysates obtained are suitable for fermentative applications. The results show the feasibility of the process studied and the use of the models obtained.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) for the financial support of this work (Project: AGL2006-08250/ALI). A grant (# 206489) from CONACYT (Mexico) to author Delgado is gratefully acknowledged.

## References

- Al Arni, S., Zilli, M., & Converti, A. (2007). Solubilization of lignin components of food concern from sugarcane bagasse by alkaline hydrolysis. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 271–277.
- Baysal, Z., Uyar, F., Doğru, M., & Alkan, H. (2008). Production of extracellular alkaline  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation with a newly isolated *Bacillus* sp. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38(2), 184–190.
- Box, G., & Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–475.
- Cheng, K., Cai, B., Zhang, J., Ling, H., Zhou, Y., Ge, J., et al. (2008). Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, 38(1), 105–109.
- Čurić, D., Karlović, D., Tripalo, B., & Ježek, D. (1998). Enzymatic conversion of cornstarch in twin-screw extruder. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 12(2), 63–71.
- Douglas, C., Montgomery, S. M., Kowalski, E. A., Peck, & Vining, G. G. (2001). *Introduction to linear regression analysis*. John Wiley & Sons.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4597–4602.

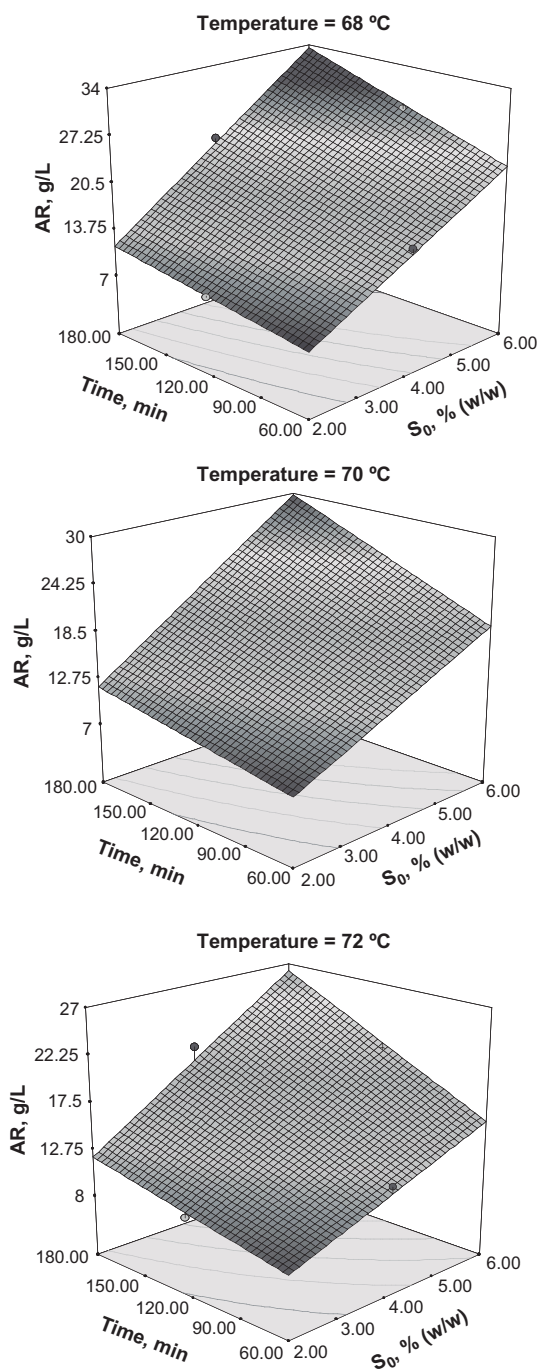


Fig. 8. Prediction of the model for the dependence of reducing sugar concentration on time and temperature for substrate concentration up to 6%.

- Garrote, G., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (1999). Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(11), 1101–1109.
- Hansen, M. R., Blennow, A., Pedersen, S., Nørgaard, L., & Engelsen, S. B. (2008). Gel texture and chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1551–1566.
- Herrera, A., Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2003). Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *Journal of Cereal Science*, 3, 267–274.
- Hizukuri, S., Tabata, S., & Nikuni, Z. (1970). Studies on starch phosphate: part 1. Estimation of glucose-6-phosphate residues in starch and the presence of tuber bound phosphate(s). *Starch-Stärke*, 22, 338–343.
- Kamasaka, H., Uchida, M., Kusaka, K., Yoshikawa, K., Yamamoto, K., Okada, S., et al. (1995). Inhibitory effect of phosphorylated oligosaccharides prepared from potato starch on the formation of calcium phosphate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(8), 1412–1416.
- Larrazábal, M. J., & Camacho, M. M. (2008). Characteristics of the salmon marinated in dry and for immersion in osmotic solution. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 20–26.
- Liu, Q. (2002). A study of enzymatic hydrolysis of starch in potato pulp. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2113–2117.
- López, C., Torrado, A., Fuciños, P., Guerra, N. P., & Pastrana, L. (2004). Enzymatic hydrolysis of chestnut purée: process optimization using mixtures of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2907–2914.
- López, C., Torrado, A., Fuciños, P., Guerra, N. P., & Pastrana, L. (2006). Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylases mixture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 252–258.
- Miranda, M. L., & Aguilera, J. M. (2006). Structure and texture properties of fried potato products. *Food Reviews International*, 22(2), 173–201.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M., & Young, M. M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*, 24(1), 80–85.
- Patil, S. S., Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2006). Production of lactic acid and fructose from media with cane sugar using mutant of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365. *Letters in Applied Microbiology*, 43(1), 53–57.
- Roberto, I. C., Sato, S., Mancilha, I. M., & Tacheda, M. E. S. (1995). Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 17, 1223–1228.
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–5295.
- Stawski, D. (2008). New determination method of amylose content in potato starch. *Food Chemistry*, 110(3), 777–781.
- Vázquez, M., & Martín, A. M. (1998). Optimization of *Phaffia rhodozyma* culture through response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 314–320.
- Wang, Q., Wang, X., Wang, X., & Ma, H. (2008). Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 43(3), 280–286.
- Woolfe, J. A. (1987). *The potato in the human diet*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.