

OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE BANANO, *MUSA CAVENDISH*

Carla Quitiguiña, Stalin Santacruz *

Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición (CAAN), Ingeniería de Alimentos, Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito-Ecuador

Received: 02/05/12

Approved: 17/06/12

Published: 30/06/12

Keywords: hidrólisis del almidón, banano, α -amilasa, amilogucosidasa

ABSTRACT

Banana (*Musa cavendish*) is a fruit that takes place in Ecuador and a part of its production is being rejected. For this reason this project is focused on the usage of this resource in order to obtain glucose syrup from its starch by an enzymatic pathway. Previous to hydrolysis the substrate needs to be prepared using a process of washing and drying of banana fruits. Hydrolysis was made in two stages. For the first hydrolysis α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* was used; which allowed to degrade starch to dextrans. In this stage some tests were made to calculate the optimal time for the hydrolysis, which was of 2 hours. Also, dextrans obtained were analyzed by gel permeation chromatography, obtaining dextrans of 9, 10 and 11 glucose units. In the second stage amylogucosidase from *Aspergillus niger* was used. In this stage an experimental design was performed; such design was completely at random with factorial model of 3^2 , corresponding to the combination of time and amount of enzyme, with two repetitions. The studied variables were yield and crystallinity. The recommended treatment was of 1,5 milliliters of enzyme and 14 hours of hydrolysis. Treatment that corresponds to a glucose yield of 90,14%.

*Corresponding author: stalin.santacruz@gmail.com

RESUMEN

El banano (*Musa cavendish*) es una fruta que se produce en el Ecuador y una parte de su producción está siendo desechada. Por lo que en este trabajo se estudió la utilización de este recurso para la conversión de su almidón en jarabe de glucosa, por medio enzimático. Previo a la hidrólisis se preparó un sustrato mediante lavado y secado. El proceso de hidrólisis se realizó en dos etapas. En la primera se utilizó α -amilasa proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*; la cual permitió degradar el almidón hasta dextrinas. En esta etapa se realizaron pruebas para calcular el tiempo óptimo de hidrólisis, el cual fue de 2 horas. También se analizaron las dextrinas obtenidas de la hidrólisis mediante cromatografía de permeación en gel, siendo estas de 9, 10 y 11 unidades de glucosa. En la segunda etapa del proceso se utilizó amilogucosidasa proveniente de *Aspergillus niger*. En esta etapa se realizó un diseño experimental completamente al azar con modelo factorial de 3^2 correspondiente a la combinación de tiempo y cantidad de enzima, con dos repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento y cristalinidad. El tratamiento recomendado fue de 1,5 ml de enzima y 14 horas de hidrólisis. Tratamiento que corresponde a un rendimiento de glucosa del 90,14%.

INTRODUCCIÓN

El banano es una fruta originaria de Asia la cual actualmente tiene gran capacidad de producción en países Sur y Centro Americanos. Los principales países productores de banano son Ecuador, Costa Rica, Filipinas y Colombia. Siendo Ecuador un país líder en las exportaciones de banano en el mundo, logrando un nivel de participación de alrededor de 30% frente al total de los países exportadores y con una exportación de 425 400 toneladas mensuales. Lo cual convierte al banano en fuente básica del desarrollo económico en el país (1). El maíz, el trigo y la papa son las principales fuentes de almidón usadas para propósitos industriales en el mundo (especialmente para las industrias de azúcar y alcohol) (2). Siendo el banano un recurso de fácil acceso en nuestro país, el almidón obtenido a partir de éste lo convierte en una alternativa más para ser usada en la industria. A pesar de que el banano es usado para la exportación, hay una parte de éste que no reúne los requisitos mínimos para ser empacado y exportado,

convirtiéndose en fruta de desecho. El banano de desecho con el cual se trabaja en este proyecto, presenta defectos graves o moderados (cicatrices, daño por insectos, dedos cortos, dedos deformes, lesiones por procesos, etc.) y se obtiene del saneamiento en la selección de las calidades mercadeables. La mayoría de esta fruta es destinada para el consumo fresco en los mercados locales y como fuente de materia prima en la industria. El porcentaje de la fruta desechada por la selección depende de operaciones de cultivo, cuidados de la cosecha, condición ecológica imperante, y exigencias del mercado. Este porcentaje puede variar entre un 5 y 10 por ciento del total de fruta procesada (Soto, 1992), siendo alrededor de 510 000 toneladas anuales (1). El almidón es un carbohidrato que posee dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. El primero se forma de largas cadenas lineales de entre 200 y 2 500 unidades de glucosa y pesos moleculares de hasta un millón. Las cadenas lineales se forman de enlaces α -(1,4). Por su parte la amilopectina contiene ramificaciones, con la forma molecular similar a un árbol cuyas ramas se unen por enlaces α -(1,6) localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa. El peso molecular de la amilopectina es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones. Generalmente los almidones tienen entre 17-27% de amilosa (3). Los jarabes de glucosa son producto de la hidrólisis del almidón y todos estos son mezclas de polímeros de D-glucosa. Los jarabes de glucosa se usan de acuerdo a sus diversas concentraciones en varias industrias tales como: panadería, confitería, procesado de frutas, alimentos compuestos, bebidas alcohólicas, misceláneos, bebidas frías, etc. (2). Las reacciones para obtener jarabe de glucosa a partir del almidón pueden ser: Hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática en los últimos años ha desplazado a la hidrólisis ácida, debido a que se dispone de nuevas enzimas. La mayor parte de procesos que realizan hidrólisis de almidón usan proceso enzimático. Esto se debe a las ventajas que ofrece el mismo, como lo es el control de la formación de productos no deseables. Entre las enzimas que se usan para la hidrólisis del almidón se tienen la α -amilasa (α 1,4-D-Glucano-hidrolasa) que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa. El ataque se hace en forma no selectiva tipo endógeno sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, generando polímeros de 3 o más unidades de glucosa (3). La amiloglucosidasa es una exohidrolasa (ataca la última unión glucosídica del extremo no reductor) también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y la amilopectina (4). En el Ecuador, según datos del Banco Central (5) no existe una producción nacional capaz de satisfacer la demanda requerida de glucosa, forzándose a importar ésta de diversas partes del mundo. En consecuencia la investigación de nuevos recursos para la extracción de derivados del almidón, como lo es el jarabe de glucosa, es una necesidad prioritaria. Por las razones antes expuestas el presente trabajo tiene como objetivo la utilización de los excedentes de exportación del banano (*Musa cavendish*) para la obtención de un producto de valor agregado como es el jarabe de glucosa.

SECCION EXPERIMENTAL

MATERIALES

El banano utilizado fue de la variedad *Musa cavendish* fue comprado en el sector Tumbaco de la ciudad de Quito. El estado de maduración de este fue verde, en escala de 1 y 2 de acuerdo a Soto (6). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

MÉTODOS

Selección del banano

Con el objeto de conocer el estado de maduración óptimo del banano a utilizar se realizó una prueba de almacenamiento a 38°C por 13 días durante los cuales se midieron los grados Brix de la fruta.

Análisis proximal

Análisis de proteína por el método Kjeldahl (7), Determinación de humedad (7), Determinación de ceniza (7), Determinación de grasa (7), Determinación de carbohidratos por diferencia.

Preparación del sustrato

El banano se peló manualmente y se colocó en agua potable en proporción (1:1) con ácido cítrico al 0,3%, para luego proceder a desintegrarlo con una licuadora industrial a velocidad máxima. Al banano desintegrado se mezcló con agua potable en proporción (1:1) reposando hasta que los sólidos insolubles sedimentaran, eliminándose el

sobrenadante. Se realizaron alrededor de 6 lavados con agua potable, dejando reposar de 9 a 15 horas entre lavado y lavado. Luego de los procesos de lavado, el material sedimentado fue centrifugado por 10 minutos a 1 000 x g (centrífuga de piso GP8, Centra). El sedimento de la centrífuga se llevó a un secador de bandejas a 45°C por alrededor de 48 horas. El sustrato ya seco fue molido en un molino (4E Grinding mill) y almacenado en bolsas plásticas para posteriores análisis.

Solubilización del almidón

Previo a la hidrólisis, una solución de sustrato en agua al 5% se calentó hasta llegar a una temperatura de 82°C con agitación constante. Posteriormente se sometió a calentamiento en autoclave por 5 minutos, con el fin de alcanzar una mayor solubilización del almidón, y por ende facilitar la acción de las enzimas (3).

Hidrólisis de almidón

El proceso de hidrólisis se basó en Schenck y Hebeda (2). Para la primera parte de este proceso se reguló el pH de 500 ml de la solución de sustrato al 5% hasta alcanzar el valor de 5,5, luego de lo cual se llevó la suspensión a 82°C con agitación constante. Una vez alcanzada esa temperatura, se sometió a calentamiento adicional con un autoclave por 5 minutos. Luego de ello la solución se llevó a una temperatura de 85°C, adicionándose 11 µl de α-amilasa (*Bacillus amyloliquefaciens*, 250 U/g, Sigma) y manteniendo con agitación a dicha temperatura por un tiempo de dos horas. El producto de la primera hidrólisis fue centrifugado por 15 minutos a 1 000 x g (centrífuga de piso GP8, Centra) recolectándose el sobrenadante. A este se le ajustó el pH a 4,4 con HCl 0,5N previo al calentamiento hasta 60°C. Seguidamente se agregó 1mL de amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*, 300 U/ml, Sigma) y se dejó incubar con agitación constante durante 14 horas. La solución obtenida se concentró mediante evaporación hasta llegar a una concentración de 50°Brix.

Cuantificación de almidón

La cuantificación de almidón en el sustrato se la realizó de acuerdo a Goñi y col. (8). Se pesaron 50 mg de sustrato en tubos de capacidad de 10ml. Se añadieron 3ml de agua destilada y 3ml de KOH 4M. Posteriormente la solución se mezcló y agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron aproximadamente 5,5 ml de HCl 2M y 3ml de tampón acetato sódico 0,4M, ajustándose el pH a 4,75. A la solución obtenida se le adicionaron 60 µl de amiloglucosidasa y se incubó a 60°C por 45 minutos en baño maría con agitación. Luego de la incubación se centrifugó por 15 minutos a 1 000 x g. El precipitado se lavó con 10 ml de agua destilada y se repitió la centrifugación por dos ocasiones. Los sobrenadantes recogidos se aforaron a un volumen de 100 ml. Para la determinación de glucosa en la solución obtenida se realizó una curva patrón mediante el empleo de estándares obtenidos a partir de la mezcla de solución de glucosa, glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD) y agua destilada. Se midió la absorbancia a 500 nm y con este dato se procedió a usar la Ecuación 1 para la determinación de almidón en el sustrato.

$$\% \text{Almidón total} = \frac{\text{glucosa } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \times \text{Volumen} \times \text{Dilución} \times 100 \times 0,9}{1000 \times \text{Peso de muestra seca (mg)}}$$

Ecuación 1. Determinación de porcentaje de almidón total

Índice de absorción de iodo

Durante la hidrólisis con α-amilasa se tomaron muestras cada 30 minutos para determinar el progreso de la misma. Para determinar la presencia de almidón durante la hidrólisis se procedió de acuerdo a Zossi y col. (9). De cada una de las muestras tomadas cada 30 minutos se tomo 1 ml, al cual se le agregó 1ml de solución de iodo (6 g KI + 5 g I₂ por cada 100 ml agua destilada) y 1ml de agua destilada. A la solución resultante se le midió su absorbancia a 635 nm.

Análisis de cromatografía de permeación en gel

La determinación del peso molecular se realizó de acuerdo a Biliaderis y col. (10). Se empleó una columna de 1,17 m de largo y 1 cm de diámetro empacada con Sepharosa CL-6B (Sigma). La fase móvil fue KOH 0,25M con un flujo de 21 ml/h. Se inyectaron 5ml de muestra al 1,25% (p/v) y se recogieron alícuotas cada 15 minutos durante 8 horas. La determinación de carbohidratos en las fracciones se realizó de acuerdo al método de Fenol-Acido Sulfúrico de Dubois (11). El grado de polimerización de las dextrinas presentes en las fracciones colectadas se determinó mediante el uso de estándares de maltosa y maltoheptaosa.

Diseño Experimental

El diseño experimental empleado para la hidrólisis con amilogucosidasa fue completamente al azar con modelo factorial de 3² correspondiente a la combinación de dos factores (tiempo y cantidad de enzima) con tres niveles cada uno y con dos repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento y cristalinidad.

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

RESULTADOS Y DISCUSION*Selección del banano*

Se encontró que el estado de madurez del banano debe encontrarse en un grado máximo de 2 (2) para que su contenido de almidón sea elevado. Esto corresponde a un banano que tiene como máximo 1,2 grados Brix (Tabla 1).

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

Días	Brix
Día 1 *	1,2
Día 2	1,2
Día 3	1,2
Día 6	1,2
Día 7	1,4
Día 8	1,7
Día 9	2,2
Día 13	7,4

*banano de estado de madurez 2

Análisis del sustrato y del banano

El sustrato y el banano presentaron variaciones en su composición como se muestra en las Tablas 2 y 3 respectivamente. Se puede observar que los valores de ceniza del sustrato son bastante bajos en relación al banano que no ha sido sometido a procesos de lavado. En cuanto a la proteína, grasa y carbohidratos existe una variación entre sustrato y banano que puede deberse a pérdidas por los lavados en la preparación del sustrato. En relación a los carbohidratos, la disminución de los mismos en el sustrato puede deberse a pérdidas de azúcares durante el lavado. Cabe anotar que el contenido de almidón en el sustrato fue de 70,00 g/100g.

Tabla 2. Composición del banano* (base seca)

Constituyente	g/100g
Grasa	1,92
Cenizas	3,76
Proteína	5
CHO (Diferencia)	89,30

*Humedad de 74 g/100g

Tabla 3. Composición del sustrato* (base seca)

Constituyente	g/ 100g
Grasa	0,53
Cenizas	0,30
Proteína	1,39
CHO (Diferencia)	84,07
Almidón	70,00

*Humedad de 13,71 g/100g

Solubilización del almidón

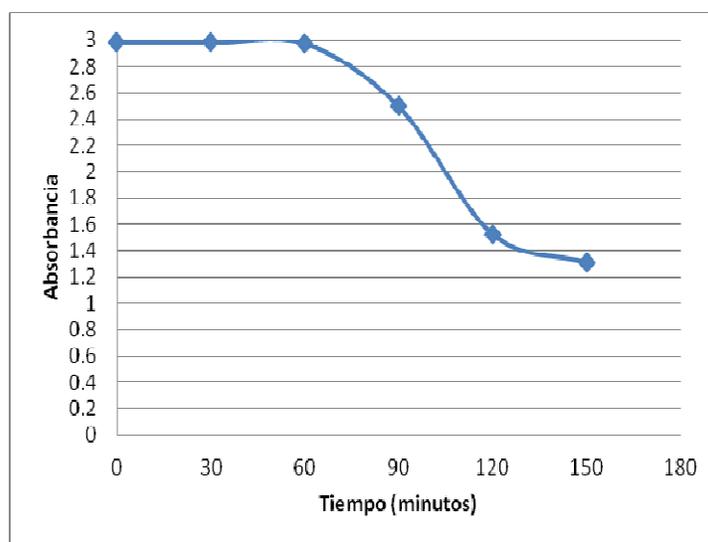
Durante el proceso de elaboración de jarabe de glucosa se emplea un proceso de solubilización adicional con autoclave con el objeto de garantizar una mayor solubilización del almidón, haciéndolo susceptible al ataque enzimático para la formación de glucosa (12).

Cuantificación del Almidón

Siguiendo el procedimiento de Goñi y col. (8) se gráfico la curva patrón y por regresión lineal se obtuvo los mg de glucosa para la muestra de sustrato analizada. Con los mg de glucosa y usando la ecuación 1 se determinó el porcentaje de almidón en el sustrato. El cual fue del 70%, el cual es muy similar a valores reportados en bibliografía (13).

Reacción de hidrólisis con α -amilasa

Los resultados del índice de absorción de yodo (Figura 1) muestran que la absorbancia de las muestras sometidas a hidrólisis con α -amilasa permanecen constantes hasta 60 minutos después de haber iniciado la misma, luego de lo cual la absorbancia desciende hasta llegar a un valor asintótico a los 120 minutos de iniciada la reacción. La menor absorbancia del producto hidrolizado refleja la menor presencia de almidón debido a que este ha sido degradado dando como resultado la formación de dextrinas. El valor asintótico de absorbancia a los 120 minutos indica que es el tiempo en el cual la mayor parte del almidón habrá sido hidrolizado a dextrinas por acción de la α -amilasa.

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

Cromatografía de permeación en gel

La muestra resultante del tiempo óptimo de la hidrólisis con α -amilasa, esto es 120 minutos, fue evaluada mediante cromatografía de permeación en gel con el objeto de ver el tamaño de las dextrinas resultantes de la hidrólisis. La Figura 2 muestra 3 picos claramente identificados que eluyeron a los tiempos de 150, 180 y 225 minutos. Estos picos corresponden a dextrinas de 11, 10 y 9 unidades de glucosa, respectivamente.

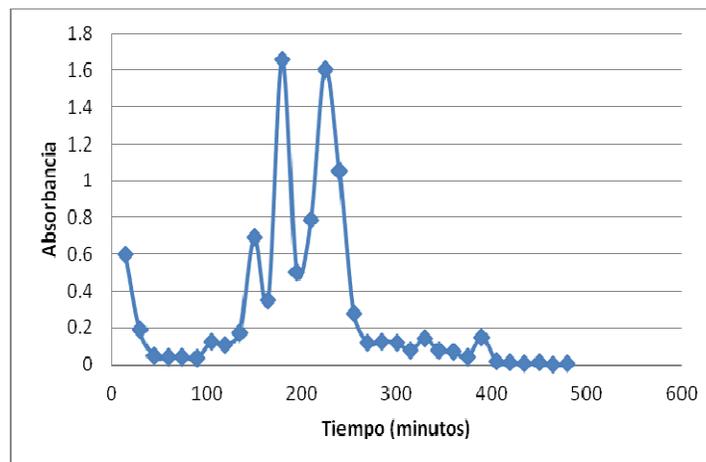


Figura 2. Absorbancia ($\lambda = 492$ nm) de almidón de banana verde hidrolizado vs tiempo de elución analizados por cromatografía de permeación en gel con Sepharose CL-6B

Reacción de hidrólisis con amiloglucosidasa

El tiempo de hidrólisis se determinó en base a varios autores que recomiendan un tiempo entre 14 y 20 horas. Se realizaron pruebas usando 1ml de enzima a estos dos tiempos y sus resultados no variaron. Por lo tanto se examinaron tiempos de hasta 14 horas conjuntamente con la variación de la cantidad de amiloglucosidasa como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 4. Tiempos y cantidades de enzima empleadas para la hidrólisis de dextrinas a jarabe de glucosa

Tratamientos	Tiempo (horas) y Cantidad de enzima amiloglucosidasa (<i>Aspergillus niger</i> , Sigma)
T1	2 horas de hidrólisis + 0,5 ml de enzima
T2	2 horas de hidrólisis + 1 ml de enzima
T3	2 horas de hidrólisis + 1,5 ml de enzima
T4	8 horas de hidrólisis + 0,5 ml de enzima
T5	8 horas de hidrólisis + 1 ml de enzima
T6	8 horas de hidrólisis + 1,5 ml de enzima
T7	14 horas de hidrólisis + 0,5 ml de enzima
T8	14 horas de hidrólisis + 1 ml de enzima
T9	14 horas de hidrólisis + 1,5 ml de enzima

La cristalinidad del jarabe de glucosa al 50% se midió mediante absorbancia a 520 nm, mientras que la cuantificación de glucosa (rendimiento) se evaluó mediante el método de Fehling respecto a azúcares (14).

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

Tabla 5. Resumen del análisis de Varianza de la cristalinidad de los tratamientos

FV	SC	GL	CM	Fo	Valor F	Significancia
Cantidad de enzima (C)	0,0348	2	0,0174	4,4070	4,26	S
Tiempo (T)	0,0009	2	0,0004	0,1176	4,26	N S
CxT	0,0149	4	0,0037	1	3,63	N S
Tratamientos (t)	0,0507	8	0,0063	1,6040	3,23	N S
Error	0,0356	9	0,0039			
Total	0,0863	17				

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

Tabla 6. Absorbancias ($\lambda=520$ nm) de jarabe de glucosa en varios tratamientos.

Tratamientos	Absorbancia
T1	2,711
T7	2,748
T4	2,755
T2	2,793
T8	2,796
T6	2,811
T9	2,817
T5	2,84
T3	2,904

En lo que respecta al rendimiento de glucosa, el análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 8 estableció que si existía diferencia significativa entre los tratamientos, anulando la hipótesis nula. Utilizando la prueba de Tukey al 5% se fijó la diferencia existente entre medias como se muestra en la Tabla 9. No existiendo diferencia significativa entre los tratamientos 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 pero si de todos estos con correspondientes al tratamiento 1. Los tratamientos 2, 3, 5, 6, 8 y 9 difieren estadísticamente del tratamiento 4. Los tratamientos 1 y 4 no presentan diferencia significativa entre ellos. Analizando estos resultados el tratamiento recomendado sería el T9 con un rendimiento del 90,14% glucosa respecto al almidón presente en el sustrato.

Tabla 7. Resumen del análisis de Varianza (ANOVA) del rendimiento de los tratamientos

FV	SC	GL	CM	Fo	Fc	Significancia
Cantidad de enzima (C)	387,5286	2	193,7643	36,7297	4,26	S
Tiempo (T)	207,0342	2	103,5171	19,6226	4,26	S
CxT	26,9895	4	6,7473	1,2790	3,63	N S
Tratamientos (t)	621,5524	8	77,6940	14,7276	3,23	S
Error	47,4786	9	5,2754			
Total	669,031	17				

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

Tabla 8. Rendimientos del jarabe de glucosa y prueba de Tukey (5%) de 9 tratamientos bajo diferentes combinaciones de amiloglucosidas y tiempo de hidrolisis. * Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

Tratamientos	Rendimiento (% promedio)*	Tratamientos	Rendimiento (% promedio)*
T1	70,705 c	T2	83,755 a
T4	74,515 c/b	T5	84,195 a
T7	82,765 b/a	T6	84,775 a
T3	83,345 a	T8	88,75 a
		T9	90,145 a

CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo se concluye que la materia prima, banano *Musa cavendish*, es un buen recurso para la obtención de jarabe de glucosa con rendimientos del proceso de 90,14% respecto al almidón presente en el banano. Con el objeto de mejorar la calidad del jarabe obtenido se debería emplear un proceso de decoloración con carbón activado u otro.

REFERENCIAS

1. Asociación de exportadores de Banano del Ecuador. (s.f.). Recuperado el 31 de Marzo de 2010, de <http://www.aebe.com.ec>
2. Schenck, & Hebeda. (1992). *Starch Hydrolysis Products*. USA: VCH Publishers Inc.
3. Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta ed.). México: Pearson Educación.
4. Carrera, J. (2002). Enzimas Industriales. En *Módulos de Biotecnología* (Primera ed.). Colombia: Universidad del Cauca.
5. *Análisis del mercado mundial bananero y la situación del Ecuador*. (2003). Recuperado el 31 de Marzo de 2010, de <http://www.sica.gov.ec>
6. Soto, M. (1992). *Bananos-Cultivo y Comercialización* (Segunda ed.). Costa Rica: Litografía e Imprenta LIL, S.A.
7. AOAC
8. Goñi, I.; García, L.; Saura, F.; Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. (2000). Cuantificación del almidón. *Manual de Métodos de caracterización de Carbohidratos*.
9. Zossi, S., Navarro, E., Sorol, N., Sastre, M., & Ruíz, M. (2008). Comparación de dos metodologías de determinación de almidón en azúcar. *Rev. Ind. Agric Tucumán*, 85 (2).
10. Biliaderis, C. G.; Prokopowich, D. J.; Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. (2000). Distribución de tamaño molecular de la amilopeptina por filtración en gel. *Manual de Métodos de caracterización de Carbohidratos*.
11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith. (1956). Método colorimétrico de fenol-sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales. En *Química Analítica*.
12. Garzón, M. d. (2006). Almidón retrogradado para su uso en compresión directa. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37 (001), 18-28.
13. Flores, G., García, Flores, H., Nuñez, Gonzales, & Bello. (2004). *Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano*. México: Centro de desarrollo de productos bióticos del IPN.
14. Lane, J. H., & Eynon, J. (1923). Determinación cuantitativa de azúcares reductores y totales. *Soc. Chem. Ind.*