

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS DE
ALMIDÓN DE YUCA INTEGRANDO TECNOLOGÍA MEMBRANARIA**

FERNANDO ANDRÉS AMAYA SALAZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FALCULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS DE
ALMIDÓN DE YUCA INTEGRANDO TECNOLOGÍA MEMBRANARIA**

FERNANDO ANDRÉS AMAYA SALAZAR

Trabajo de grado para optar por el título de INGENIERO QUÍMICO

Director:

**Prof. CARLOS JESÚS MUVDI NOVA
Ingeniero Químico, Msc., PhD**

Codirector:

**Prof. DANIEL MOLINA VELASCO
Químico, Msc., PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FALCULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme y guiarme siempre en mi camino.

*A mi querida y hermosa madre por ser la persona que siempre me
ha estado impulsando, dándome ánimo, apoyo, amor y la
comprensión que hicieron posible este logro.*

A mi papá que ha sido ejemplo para mí de respeto y honestidad.

*A mis amigos que de una u otra manera estuvieron conmigo en este
arduo camino lleno de alegrías y dificultades.*

Fernando Andrés Amaya Salazar.

AGRADECIMIENTOS

El autor de este trabajo expresa sus agradecimientos a:

Dios, por proveer siempre de las enseñanzas experiencias vividas.

La **Universidad Industrial de Santander**, por hacer parte como ente educativo para mi formación como profesional.

Colciencias, por ser la entidad que dio los recursos para el logro de esta investigación.

Profesor **Carlos Jesús Muvdi Nova**, por su gran colaboración, enseñanza y apoyo técnico y científico.

Profesor **Andrés Rueda**, por su colaboración y conocimiento.

Técnicos del **Laboratorio de Procesos de la Escuela de Ingeniería Química**, señores **Eduardo Carreño** y **Wilson Carreño** del laboratorio de procesos, por brindar el espacio de trabajo y su aporte técnico en la solución de problemas.

Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos **CICTA**, por la disposición de sus instalaciones.

Laboratorio de Investigación en Química Sostenible **LIQS**, por el espacio brindado. La empresa **PROMITEC SANTANDER S.A.S.** por la colaboración y el interés puesto en esta investigación.

Mi familia y amigos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1.DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	20
1.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO GENERAL.	20
1.2 ESTUDIO DE LA FILTRACIÓN DE LA MEZCLA GLUCOAMILASA-AGUA A 45°C A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.	21
1.3 ESTUDIO DE LA FILTRACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA CLARIFICADOS.	22
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.	23
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
2.1 HISTOGRAMA DE PERMEABILIDAD NORMALIZADA AL AGUA (NWP).	27
2.2 FILTRACIONES GLUCOAMILASA-AGUA A 45 °C A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.	28
2.3 FILTRACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA.	32
3. CONCLUSIONES	36
4. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO A. PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE YUCA.	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de (a) amilosa y (b) amilopectina (Corradini <i>et al.</i> , 2005).	13
Figura 2. Ilustración de la filtración membranaria.	15
Figura 3. Diagrama metodológico general	20
Figura 4. Piloto membranario de UF (Becerra, 2011).	23
Tabla 4. Equipos y elementos del sistema de UF (Figura 4).	24
Figura 5. Curva de calibración de reactivo Bradford.	25
Figura 6. Pruebas de permeabilidad normalizada al agua (NWP) realizadas a una PTM de 7,5 psi, caudal de 6 l/min y a temperatura de 25 °C.	27
Figura 7. Permeabilidad mezcla glucoamilasa-agua con variación de temperatura; a) caudal de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, y b) caudal de 6 l/min y PTM de 15 psi.	29
Figura 8. Concentración de glucoamilasa en el retenido a través del tiempo; a) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, b) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 15 psi.	30
Figura 9. Actividad enzimática de la glucoamilasa a distintas temperaturas, a) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, b) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 15 psi.	31
Figura 10. Permeabilidad de hidrolizados de almidón de yuca con caudal de alimentación de 6 l/min, PTM de 15 psi, temperatura de 25 °C y diferentes tiempos de reacción. a) licuefacción: 15 min, sacarificación: 45 min y b) licuefacción: 3 min, sacarificación: 20 min.	33
Figura 11. ° Brix en el tiempo comparado entre la prueba 1 (licuefacción 15 min, sacarificación 45 min) y la prueba 6 (licuefacción 3 min, sacarificación 20 min) (Tabla 3).	34

Figura 12. Cromatogramas HPLC de los permeados obtenidos en la, a) prueba 1 (licuefacción 15 min, sacarificación 45 min) y b) prueba 6 (licuefacción 3 min, sacarificación 20 min) (Tabla 3).

35

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Implementación de las técnicas de membrana aplicadas a la obtención de jarabes malto-glucosados.	17
Tabla 2. Condiciones de realización de las pruebas glucoamilasa-agua.	21
Tabla 3. Condiciones para la hidrólisis de cada experimento.	22
Tabla 4. Equipos y elementos del sistema de UF (Figura 4).	24

RESUMEN

Título: ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA INTEGRANDO TECNOLOGÍA MEMBRANARIA.

Autor: Fernando Andrés Amaya Salazar**

Palabras claves: almidón, yuca, hidrolizado, glucoamilasa, membrana, permeabilidad, ultrafiltración.

Este trabajo se enfoca en la aplicación de la técnica de membrana de ultrafiltración de flujo cruzado, con una membrana Millipore® de polietersulfona de 10kDa y superficie membranaria de 0,5m² para la clarificación de hidrolizados de almidón de yuca. Se realizaron filtraciones en dos etapas, una con solución ideal (mezcla glucoamilasa-agua) y otra con solución real (hidrolizados de almidón de yuca). La primera etapa se trabajó a unas condiciones de operación con temperatura de 45°C, presión transmembranaria (PTM) de 7,5 y 15 psi y caudales de alimentación de 3 y 6 l/min; propiedades de permeabilidad, cuantificación de enzima y actividad enzimática fueron evaluadas en función de la membrana utilizada. La segunda etapa se operó con temperatura de 25°C, PTM de 15 psi y caudal de alimentación de 6 l/min. Los hidrolizados de almidón de yuca fueron preparados a distintos tiempos de reacción aplicados en las etapas de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación); se determinaron permeabilidades, °Brix y contenido de glucosa para todos los hidrolizados.

La membrana utilizada presentó permeabilidades del orden de 208 l/m².h para la solución ideal, con una retención de enzima superior al 98,5% sin que esto afecte su selectividad; la actividad enzimática no se afecta en el curso de la filtración. Para la solución real, las permeabilidades se estabilizan después de 1h de filtración cerca de 58 l/m².h en todos los hidrolizados, sin efecto de colmatación significativa de la membrana. Los °Brix no mostraron variación en el tiempo y el contenido de glucosa en los hidrolizados fue alto (superior al 95%). Esto es positivo debido a que se pueden reducir los tiempos de reacción de la hidrólisis enzimática, sin afectar la cantidad de sólidos totales disueltos (azúcares simples y oligosacáridos), ni el rendimiento de la reacción, ni la productividad del proceso de clarificación.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova Ph.D, Codirector: Daniel Molina Velasco Ph.D.

ABSTRACT

Title: PRODUCTION PROCESS STUDY OF CASSAVA STARCH HYDROLYSATES INTEGRATING MEMBRANE TECHNOLOGY*.

Author: Fernando Andrés Amaya Salazar**

Keywords: starch, cassava, hydrolysate, glucoamylase, membrane, permeability, ultrafiltration.

This paper is focused on application of the technique of membrane cross-flow ultrafiltration, with a Millipore® membrane 10kDa polyethersulfone and membrane surface of 0,5m² for the clarification of cassava starch hydrolysates. Filtrations were performed in two stages, one with ideal solution (glucoamylase-water mixture) and other with real solution (cassava starch hydrolysates). The first stage was worked under operating conditions with temperature of 45°C, transmembrane pressure (TMP) of 7,5 y 15 psi and feed rates of 3 y 6 l/min; permeability properties, enzyme quantification and enzyme activity were evaluated in function of the used membrane. The second stage was operated with temperature of 25°C, TMP of 15 psi and feed rates 6 l/min. The cassava starch hydrolysates were prepared at different reaction times applied to the enzymatic hydrolysis stages (liquefaction and saccharification); permeabilities were determinated, °Brix and glucose content for all hydrolyzated.

The membrane used in the order presented permeabilities of 208 l/m².h for the ideal solution, with higher retention enzyme of 98,5% without affecting its selectivity; the enzyme activity is not affected in the course of filtration. For real solution, the permeabilities is stabilized after 1h of filtration about 58 l/m².h in all the hydrolyzed, without significant clogging effect of the membrane. The °Brix did not show variation in the time and the glucose content in the hydrolysates was high (over 95%). This is positive due to the reduction of times of enzymatic hydrolysis, without affecting the amount of total dissolved solids (simple sugars and oligosaccharides), neither the reaction yield, neither the clarification process productivity. not the performance of the reaction, not productivity clarification of process.

*Degree work

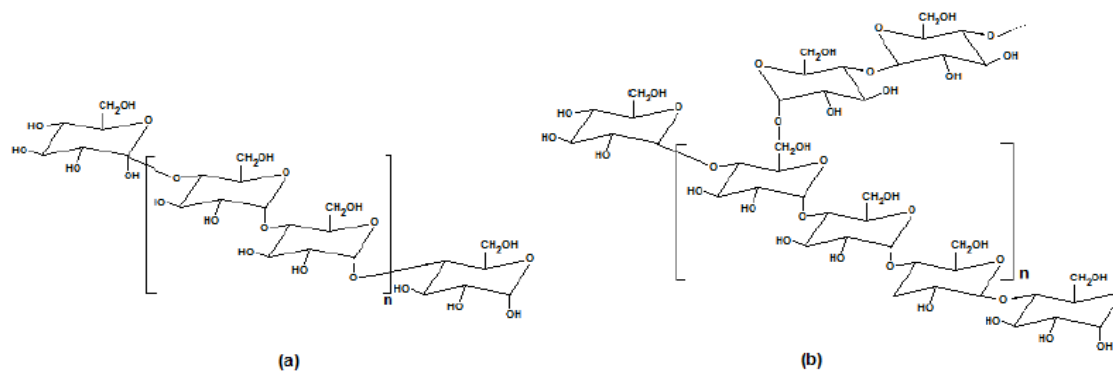
**Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical engineering department. Advisor: Carlos Jesús Muvdi Nova PhD. Reviewer: Daniel Molina Velasco PhD.

INTRODUCCIÓN

La yuca es uno de los cultivos precursores en las regiones de clima tropical (Morales *et al.*, 2008). En Colombia, su productividad aumenta a medida que se implementan nuevas tecnologías. En Santander es utilizado como fuente alternativa de almidón, tanto en la producción de etanol como para la obtención de jarabes de glucosa y otros tipos de oligosacáridos (Ruíz, 2009).

El almidón es una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa (molécula lineal) y la amilopectina (molécula ramificada). Estos dos polisacáridos están compuestos de glucosa y están densamente empaquetados en un estado semicristalino con enlaces inter e intramoleculares que son insolubles en agua a temperatura ambiente (Uthumporn *et al.*, 2010).

Figura 1. Estructura química de (a) amilosa y (b) amilopectina



Fuente: Corradini *et al.*, 2005

Los jarabes de glucosa, las maltodextrinas y la dextrosa son producidos a partir de la hidrólisis del almidón por medio ácido o enzimático, seguido por una filtración para separar y eliminar los materiales residuales (remoción del lodo: lípidos, proteínas y colorantes) (Slominska y Niedbach, 2009; Slominska y Grzeskowiak-

Przywecka, 2004). La hidrólisis enzimática es una de las más estudiadas en biotecnología de alimentos para obtener hidrolizados de almidón (Mironescu, 2012). Sin importar el tipo de almidón utilizado, consta de dos etapas: En la primera etapa (licuefacción), la enzima α -amilasa depolimeriza el almidón convirtiendo parcialmente los gránulos de almidón insoluble en fragmentos de polímeros solubles (maltodextrinas); y en la segunda etapa (sacarificación), las maltodextrinas se hidrolizan completamente a glucosa por otra enzima llamada glucoamilasa (Slominska y Grzeskowiak-Przywecka, 2004; Johnson *et al.*, 2009).

Los productos más importantes, obtenidos a partir de los hidrolizados de almidón son las maltodextrinas, los jarabes de glucosa y maltosa. Las maltodextrinas consisten en cadenas de almidón parcialmente hidrolizado con dextrosa equivalente (DE) (grado de conversión de almidón en glucosa) por debajo de 30, y los jarabes de glucosa y maltosa son mezclas que contienen monosacáridos, disacáridos y algunos sacáridos superiores con DE por encima de 40 (Baks *et al.*, 2008).

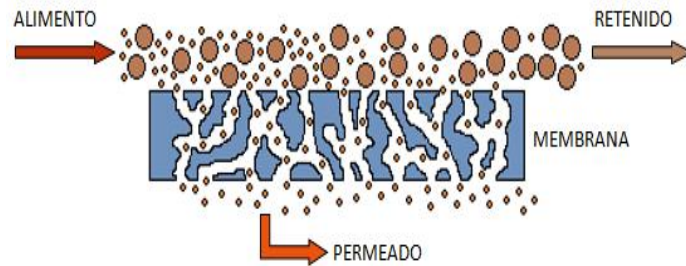
En el proceso convencional de clarificación, el almidón hidrolizado es tratado con carbón activado para eliminar componentes de color y sabor por medio de filtros prensa o filtros rotatorios de vacío precubiertos con tierras diatomeas como auxiliar filtrante (Hinkova *et al.*, 2004; Slominska y Niedbach, 2009). El objetivo de clarificar el almidón es la mayor eliminación posible de partículas finas (turbidez) y disueltas de alto y de bajo peso molecular de compuestos no azucarados que se encuentran en suspensión (Hinkova *et al.*, 2004).

Una solución alternativa a los procesos de separación tradicional es la tecnología basada en técnicas de separación con membranas.

Una membrana puede ser definida esencialmente como una barrera semipermeable que permite el paso de determinadas partículas, en forma

selectiva, contenidas en un fluido. La fracción de flujo que pasa a través de la membrana se denomina permeado, y la corriente donde se encuentran los componentes incapaces de atravesarla, es llamada retenido (Pabby *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Camarillo, 2005). La Figura 2 representa estas corrientes.

Figura 2. Ilustración de la filtración membranaria.



Fuente: Autor

Las membranas ofrecen ventajas como la separación selectiva de compuestos, el funcionamiento continuo, económico, a temperatura ambiente, y una integración sencilla de los procesos convencionales existentes.

El transporte a través de una membrana puede llevarse a cabo por convección o por difusión de moléculas individuales, puede ser inducido por un campo eléctrico, gradientes de concentración, presión y temperatura (Pabby *et al.*, 2009).

Este trabajo se interesa en los procesos cuya fuerza impulsora es la presión. En este tipo de procesos la separación se realiza por exclusión de tamaño, inducido por el peso nominal molecular de corte (MWCO) y la presión transmembranaria (PTM) (diferencia de presión entre la entrada del alimento y la salida en el retenido) requerida. Estos procesos se pueden clasificar en microfiltración (MF) (100-5000 nm, 1-10 bar), ultrafiltración (UF) (1-100 nm, 1-10 bar), nanofiltración (NF) (0,5-10 nm, 10-30 bar) y ósmosis inversa (OI) (<0,5 nm, 35-100 bar). Especialmente la UF se está utilizando cada vez más como un proceso rápido para la concentración y purificación de las especies macromoleculares en

soluciones acuosas (Yeh y Chen, 2000). Entre las aplicaciones más mencionadas se encuentran la concentración de proteínas, la eliminación de virus (Shah *et al.*, 2007), en industrias de biotecnología, papel, láctea, y otras (Reddy *et al.*, 2003).

Una de las características más importantes de los procesos con membranas es la selectividad; es decir, la capacidad de separar los componentes según el tamaño de las partículas o el peso molecular de estos a partir de una mezcla compleja (Cherkasov *et al.*, 1995).

Los jarabes filtrados con membranas son superiores en términos de turbidez, color y limpieza microbiológica (casi esterilidad) en comparación con el proceso de filtración convencional (Slominska y Niedbach, 2009). Esto excluye la adquisición, manipulación y eliminación de los residuos coadyuvantes (Slominska y Grzeskowiak-Przywecka, 2004), trayendo más eficacia y un funcionamiento más económico (Hinkova *et al.*, 2004).

La tecnología de separación por membrana tiene un impacto significativo en las operaciones unitarias que continúan luego de la clarificación, como el intercambio iónico, la decoloración y las reacciones enzimáticas (Singh y Cheryan, 1997).

La Tabla 1 muestra el desarrollo que ha tenido la implementación de las técnicas de membrana, en especial la UF, para la obtención de jarabes malto-glucosados a partir de hidrolizados de almidón.

De la tabla se observa el uso de hidrolizados de almidón de yuca, trigo, papa y mezclas de estos. Las membranas utilizadas en su mayoría son de tipo cerámico, pero con módulos de baja superficie membranaria y temperaturas de filtración superiores al ambiente; mostrando valores interesantes de la permeabilidad, pero operando con altas presiones en su mayoría.

Tabla 1. Implementación de las técnicas de membrana aplicadas a la obtención de jarabes malto-glucosados.

<i>Referencia bibliográfica</i>	<i>Tipo de membrana</i>	<i>Tipo de hidrolizado</i>	<i>Condiciones de operación</i>	<i>Permeabilidad</i>
Lopéz-Ulibarri y Hall, 1997	Cartucho de fibra hueca DIAFLOW® de 10 kDa (área: 0,03 m ²)	Hidrolizado enzimático de almidón de yuca a C= 40 g/l	T= 55 °C PTM= 0,07 MPa t= 2 h	J= 8,32 l/m ² .h
Gaouar et al., 1998	CARBOSEP® de 50 kDa (área: 0,07 m ²)	Hidrolizado enzimático de almidón de yuca con SS= 30%	T= 60 °C PTM= 0,2 MPa t= 6 h	J= 20 l/m ² .h
Hinkova et al., 2004	MEMBRALOX® de 20 y 100 nm (área: 0,2 m ²) y TAMI® de 50 y 300 kDa (área: 0,076 m ²)	Hidrolizados ácido y enzimático de almidón de trigo con SS= 40%	T= 40 °C PTM= 0,1 MPa t= 1-7 h	J= 12-86 l/m ² .h
Slominska y Grzeskowiak-Przywecka, 2004	TAMI® de 300 kDa, 0,14 µm y 0,2 µm (área: 0,01 m ²)	Hidrolizado enzimático de una mezcla de almidón de papa (70% v/v) y yuca (30% v/v) a 32 °Brix	T= 40-70 °C PTM= 0,4 MPa t= 1 h	J= 38-82,5 l/m ² .h
Grzeskowiak-Przywecka y Slominska, 2007	TAMI® de 15 kDa (área: 0,01 m ²)	Hidrolizado enzimático de almidón de papa con ED= 7-9	T= 55 °C PTM= 0,45 MPa t= 5 h	J= 23 l/m ² .h

Fuente: Autor

Estos autores demuestran que el uso de la tecnología membranaria en la clarificación de hidrolizados de almidón ofrece beneficios relacionados a la calidad de los jarabes. Los resultados de estas investigaciones muestran retención total de las enzimas (López-Ulibarri y Hall, 1997), alta pureza de los jarabes al retirar las sustancias macromoleculares como grasas, proteínas y compuestos de color, sin influenciar en absoluto la composición y concentración de los azúcares (Hinkova *et al.*, 2004). Los rendimientos comparados con resultados de filtraciones convencionales demuestran que los parámetros de calidad de los hidrolizados (color, turbidez y composición de azúcares) mejoran con el uso de la filtración por membrana (Slominska y Grzeskowiak-Przywecka, 2004).

Al momento de diseñar procesos con aplicación de membranas, es muy importante tener en cuenta la polarización de la concentración (PC) y los fenómenos de adsorción que se presentan en la separación (Cherkasov *et al.*, 1995).

La PC es la acumulación reversible de soluto rechazado en la superficie de la membrana o dentro de ella (Cui y Muralidhara, 2010). Esta acumulación forma una capa de gel que produce un efecto llamado colmatación, e impide el paso de partículas a través de la membrana disminuyendo el flujo de permeado, cuando la presión, la temperatura, el flujo de alimentación y la concentración del alimento son constantes (Becerra, 2011; Baker, 2004). La colmatación está influenciada por la naturaleza del alimento, las características del material y de la superficie de la membrana; relacionada con fenómenos de adsorción e interacciones químicas (Cui y Muralidhara, 2010). Las técnicas de control incluyen la limpieza regular de la membrana, la inversión del flujo, o el uso de membranas con características de superficie que reduzcan al mínimo la adhesión (Baker, 2004).

El presente trabajo hace parte del proyecto Colciencias cód. 1102-5022-7720 titulado “Aumento de la productividad de concentrados de jarabe de glucosa

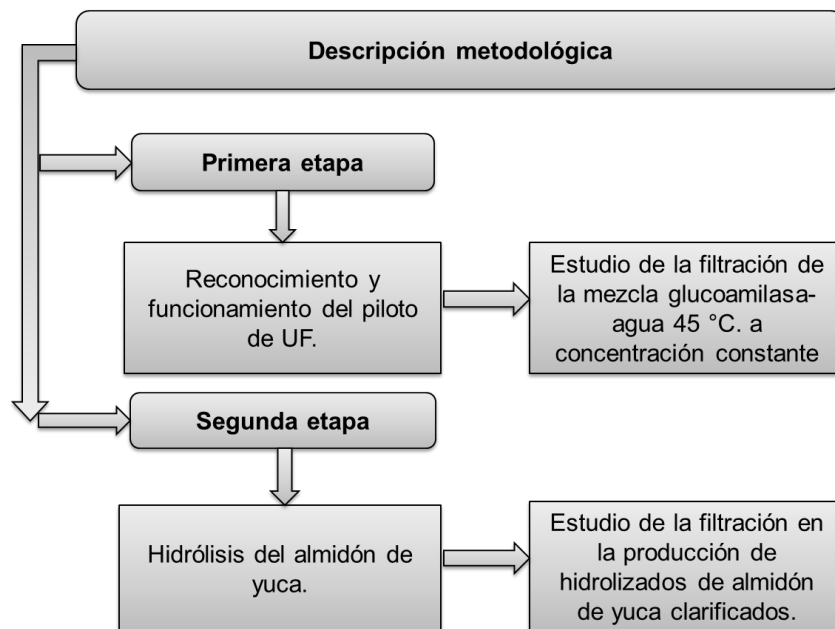
obtenidos a partir de hidrolizados de almidón de yuca”. En este trabajo se utilizó un piloto de laboratorio de UF con una membrana Millipore® de polietersulfona de 10 kDa. Este módulo permite una gran superficie membranaria en un espacio reducido. Los experimentos se enfocaron en determinar la aplicabilidad de la técnica de UF (membrana Millipore® de polietersulfona 10 kDa) en el proceso de producción de hidrolizados de almidón de yuca clarificados, considerando la influencia del caudal de alimentación, de la temperatura, de la PTM y los tiempos de hidrólisis sobre el proceso.

1.DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

1.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO GENERAL.

La Figura 3 muestra el esquema empleado para el desarrollo experimental de este proyecto. Se trabajó con mezclas de glucoamilasa-agua en la primera etapa, y se utilizó hidrolizado de almidón de yuca a distintos tiempos de hidrólisis en la segunda. En ambas etapas se realizaron filtraciones con el piloto de UF.

Figura 3. Diagrama metodológico general



Fuente: Autor

1.2 ESTUDIO DE LA FILTRACIÓN DE LA MEZCLA GLUCOAMILASA-AGUA A 45°C A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.

En esta primera etapa del proceso se hizo el reconocimiento del piloto membranario de UF, utilizado para la separación de hidrolizados de almidón de yuca. Este piloto fue diseñado y puesto en funcionamiento por Becerra (2011).

En este primer estudio se analizó el comportamiento de la enzima glucoamilasa a través de la membrana, a una temperatura mayor a la del ambiente. Se optó por la temperatura de 45 °C (temperatura máxima de operación del módulo membranario 50 °C). Los caudales de alimentación, la PTM y la concentración de enzima (0,0623% p/p relación enzima/almidón (Ruíz, 2009)) fueron tomadas siguiendo un estudio previo (Becerra, 2011) (Tabla 2). Las pruebas se realizaron con recirculación del permeado y del retenido al tanque de alimentación. En todas las pruebas se tomaron muestras de permeado y de retenido, y se midieron los caudales respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 2. Condiciones de realización de las pruebas glucoamilasa-agua.

<i>Prueba</i>	<i>PTM (psi)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Caudal de Alimentación (l/min)</i>
1	7,5	45	6
2	7,5	45	3
3	15	45	6
4	15	45	3

Fuente: Autor

1.3 ESTUDIO DE LA FILTRACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA CLARIFICADOS.

En la segunda etapa de esta investigación se trabajó con las mejores condiciones de operación; aquellas que aseguran mejor comportamiento de la actividad enzimática y minimizan la colmatación de la membrana en el tiempo. Estas condiciones fueron flujo de 6 l/min y una PTM de 15 psi. Cada experimento se desarrolló durante 3 h.

Los hidrolizados de almidón utilizados en esta etapa, se prepararon de acuerdo a un protocolo que fue elaborado paralelamente dentro del marco de este trabajo (el protocolo detallado se encuentra en el Anexo). Las condiciones de hidrólisis para cada experimento se diferencian solamente en los tiempos de reacción de licuefacción y sacarificación; las temperaturas y los pH de reacción se mantuvieron constantes para cada etapa de hidrólisis. En la Tabla 3 se muestra las condiciones de hidrólisis que se tuvieron en cuenta para cada experimento.

Tabla 3. Condiciones para la hidrólisis de cada experimento.

<i>Experimento</i>	<i>Tiempo de Reacción (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>
1	Licuefacción: 15	80	5
	Sacarificación: 45	70	4,5
2	Licuefacción: 15	80	5
	Sacarificación: 20	70	4,5
3	Licuefacción: 7	80	5
	Sacarificación: 45	70	4,5
4	Licuefacción: 7	80	5
	Sacarificación: 20	70	4,5
5	Licuefacción: 3	80	5
	Sacarificación: 45	70	4,5
6	Licuefacción: 3	80	5
	Sacarificación: 20	70	4,5

Fuente: Autor

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.

Insumos.

Los insumos utilizados para el desarrollo del trabajo fueron:

- Almidón de yuca ALMIYUCA de Industrias del Maíz S.A.
- Enzimas α -amilasa Liquozyme® SC DS y glucoamilasa Spirizyme® Fuel de Novozymes.
- Agua destilada.
- Soluciones de NaOH y HCl a concentración 2M para control del pH.
- Solución de Acetato de Sodio a concentración 0,016M como buffer de la solución de almidón de yuca.

Piloto de Ultrafiltración.

La Figura 4 muestra el piloto de UF utilizado. Para la puesta en marcha de este piloto se utilizó un protocolo que fue elaborado paralelamente al diseño y montaje de éste (Becerra, 2011).

Figura 4. Piloto membranario de UF



Fuente: Becerra, 2011

La Tabla 4 muestra las especificaciones de los equipos y elementos que componen el sistema filtración.

Tabla 4. Equipos y elementos del sistema de UF (Figura 4).

EQUIPO	ESPECIFICACIONES	UTILIDAD
Tanque de alimentación	Acero inoxidable enchaquetado capacidad: 10 l.	Almacenamiento del alimento.
Motor-reductor	Zew-Eurodrive, 1/2 HP, 439 rpm, 60 Hz, 220 V.	Torque y velocidad para la bomba.
Variador de frecuencia	CFW-08 WEG®	Ajuste de los rpm del motor
Bomba	Alfa Laval lobular de desplazamiento positivo tipo SRU en acero inoxidable de 1000 rpm y 0,128 l/Rev.	Impulsa el alimento a través del módulo membranario.
Soporte del cartucho membranario y accesorios	Millipore® en acero inoxidable con manómetros, válvulas de diafragma 3/4 " TC 316SS en teflón, acoples y empaques de silicona.	Soporte, hermeticidad y conexión del cartucho membranario con el sistema.
Mangueras	Polietileno resistente a T de 60 °C.	Conexión del sistema y transporte del alimento a través de éste.
Cartucho membranario de uf	Filtro cartucho Pellicon 2 Biomax® de polietersulfona de 10 kDa, área de 0,5 m ² , resistente a T de 50 °C.	Realiza la filtración y separación del alimento.
Baño termostato	MLW, 220 V, capacidad: 12 l.	Mantiene la temperatura del alimento.

Fuente: Autor

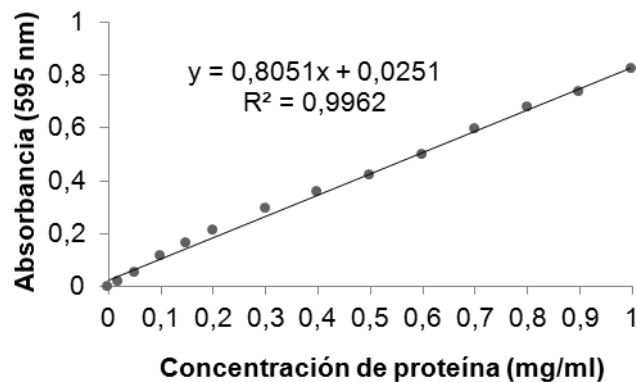
Cuantificación de proteína por Bradford.

La cantidad de proteína que hay en los extractos enzimáticos de retenido y permeado se determinó por el método de Bradford (Walker, 2002), llevando a cabo el siguiente procedimiento:

Se tomó 60 µl de extracto enzimático (muestra) y se adicionó 3 ml de reactivo Bradford. Se dejó reaccionar unos minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro UV-2401 PC SHIMADZU® necesaria en la determinación de la concentración de enzima (Becerra, 2011).

La curva de calibración mostrada en la Figura 5 fue elaborada a partir de una solución concentrada de albúmina de suero bovino (ABS) (1 mg/ml), preparando diluciones entre 0,02 y 1 mg/ml, y se realizaron lecturas de absorbancia a 595 nm.

Figura 5. Curva de calibración de reactivo Bradford.



Fuente: Autor

Determinación de la actividad enzimática por glucosa-oxidasa.

La actividad enzimática de la glucoamilasa se realizó solo en las muestras de retenido, siguiendo el procedimiento mostrado a continuación (Becerra, 2011).

Se preparó una solución de 50 ml al 10% (p/v) de maltosa, y se hizo reaccionar 1 ml de esta solución con 0,5 ml de muestra durante 10 min, a condiciones de 300 rpm y 60 °C. Al terminar la reacción se inactivó la enzima con 1,5 ml de ácido perclórico al 4% (v/v). Se tomó 10 µl del producto de la reacción anterior y se adicionó 1 ml de reactivo glucosa-oxidasa, se dejó reaccionar unos minutos y se leyó la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro UV-2401 PC SHIMADZU® necesaria en la determinación de la concentración de enzima.

La actividad es definida como la cantidad de µmoles de glucosa por minuto a partir de una concentración conocida de maltosa. La concentración de glucosa, se determinó por el método de la glucosa oxidasa, utilizando el kit enzimático de Biosystems®.

Grados Brix.

Se determinó con un refractómetro ATAGO® Pocket PAL-RI cada 10 min durante la primera hora y cada 20 min en la segunda y tercera hora la medición de sólidos solubles totales (azúcares y oligosacáridos).

Perfiles de azúcar.

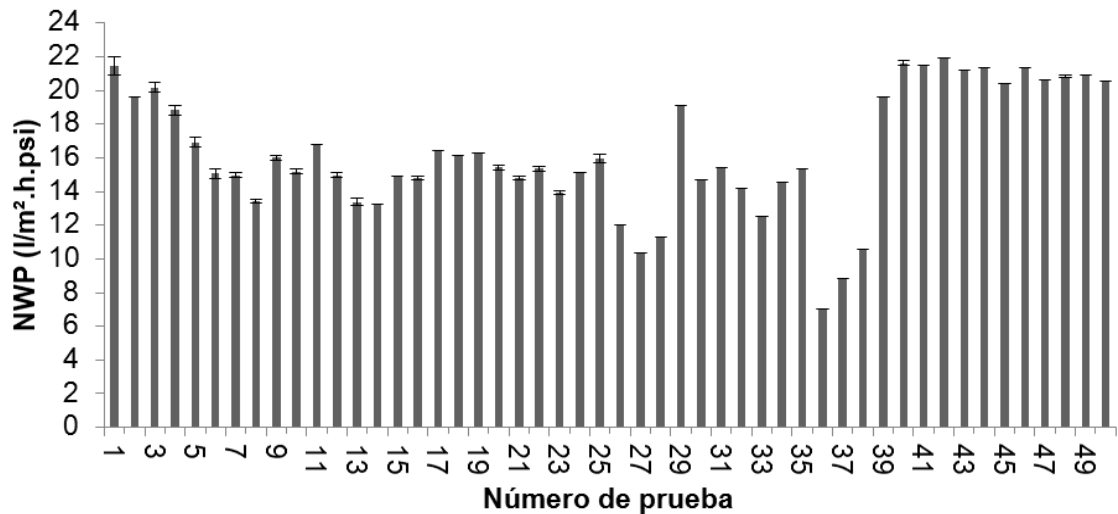
Se determinó con un sistema HPLC SHIMADZU® de inyector automático con una columna Altech 700CH de intercambio iónico enlazada con calcio, con un caudal de 0,5 ml/min a 80 °C y una fase móvil de agua grado HPLC con un volumen de inyección de 25 µl por muestra.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 HISTOGRAMA DE PERMEABILIDAD NORMALIZADA AL AGUA (NWP).

El histograma de flujos de permeado es muy importante para controlar la limpieza de la membrana y de esta manera asegurar la capacidad de filtración del sistema en el tiempo (Becerra, 2011).

Figura 6. Pruebas de permeabilidad normalizada al agua (NWP) realizadas a una PTM de 7,5 psi, caudal de 6 l/min y a temperatura de 25 °C.



Fuente: Autor

La Figura 6 muestra las permeabilidades obtenidas después de realizados los protocolos de limpieza del sistema de UF. El flujo de permeado presentó un comportamiento inestable debido a que a través del tiempo se utilizaron diferentes tipos de fluidos (que incidían sobre la eficiencia de la limpieza de la membrana). Hasta la prueba 25 se utilizó la mezcla glucoamilasa-agua presentando una reducción inicialmente, que es normal para todo sistema membranario nuevo

(Becerra, 2011); pero en el tiempo tiende a estabilizarse alrededor de un NWP de $15 \text{ l/m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{psi}$. A partir de la prueba 26 se filtraron hidrolizados de almidón de yuca observándose colmatación progresiva de la membrana. Este hecho obligó a modificar el protocolo de limpieza de la membrana, adicionando NaOCl a la solución de lavado. De la figura se observa una recuperación de la permeabilidad a partir de la prueba 29. Nuevamente a partir de la prueba 36 hubo una pérdida amplia de la permeabilidad debido a un taponamiento del puerto de alimentación (entrada al módulo membranario); se realizó un lavado varias veces mostrando una recuperación mínima. De nuevo se modificó la limpieza y se implementó un lavado dejando la misma solución, pero invirtiendo el flujo de alimentación en la sección del retenido antes de normalizar. Esta estrategia permitió una alta recuperación de la permeabilidad del sistema membranario estableciéndose un NWP alrededor de $21 \text{ l/m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{psi}$.

2.2 FILTRACIONES GLUCOAMILASA-AGUA A 45 °C A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.

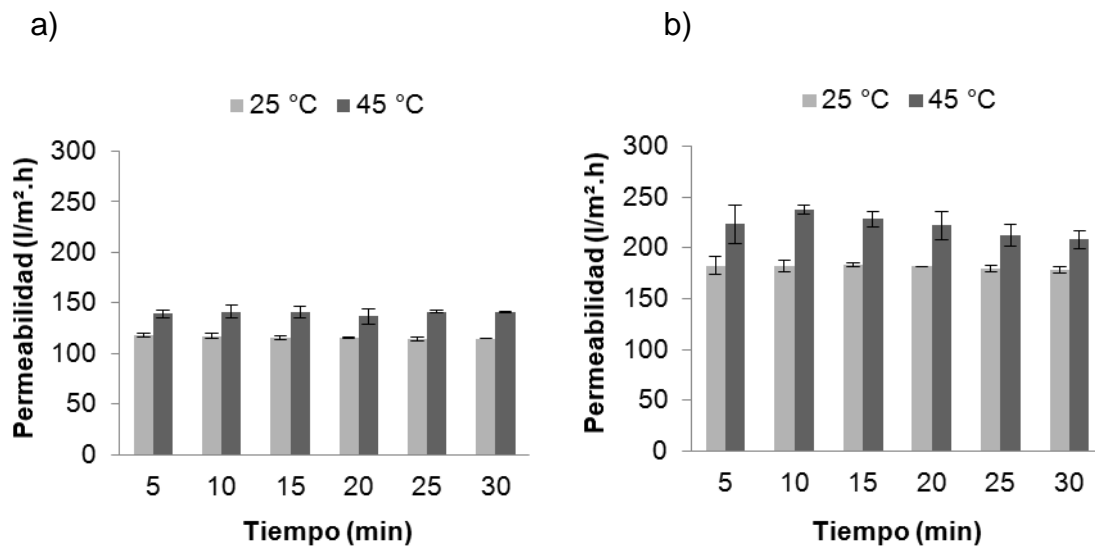
Permeabilidad de glucoamilasa-agua.

Se determinó el comportamiento del flux de permeado de la mezcla glucoamilasa-agua a distintos caudales de alimentación y PTM (Tabla 2), amentando la temperatura de la solución a filtrar en 45 °C. Estas pruebas fueron comparadas con filtraciones realizadas en un estudio previo, a una temperatura de 25 °C (Becerra, 2011). Los resultados se muestran en la Figura 7 para caudales de alimentación de 6 l/min a diferentes presiones (para 3 l/min el comportamiento fue similar).

De la Figura 7 se observa que para las temperaturas estudiadas no hay disminución de la permeabilidad en el tiempo; indicando ausencia de colmatación

de la membrana a esa concentración de enzima durante el tiempo de filtración. Igualmente se observa que al aumentar la temperatura y la PTM de filtración, la permeabilidad aumenta en promedio un 21,7 +/- 2,8% y un 57,3 +/- 2,8% respectivamente. Esto se presenta porque un aumento de la temperatura permite disminuir la resistencia a la transferencia de masa en la membrana (disminución de la viscosidad). Adicionalmente la PTM es la fuerza motriz de este proceso y un aumento de ella induce directamente un aumento de la permeabilidad del sistema membranario (Sims y Cheryan, 1992; Almandoz *et al.*, 2010).

Figura 7. Permeabilidad mezcla glucoamilasa-agua con variación de temperatura; a) caudal de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, y b) caudal de 6 l/min y PTM de 15 psi.



Fuente: Autor

Cuantificación de la enzima glucoamilasa.

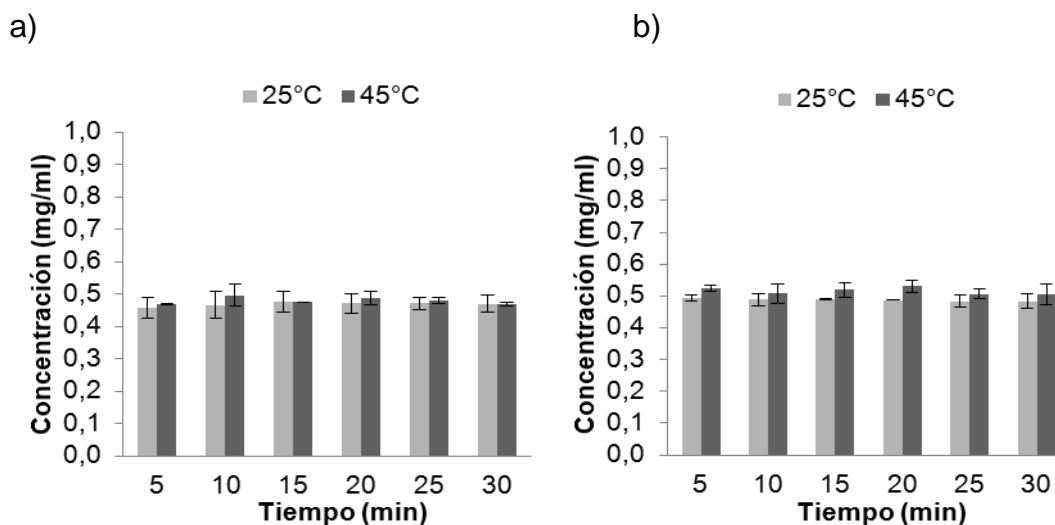
En todas las pruebas llevadas a cabo se tomaron muestras de permeado y de retenido, y se cuantificó la concentración de proteína en éstas. La Figura 8 muestra la concentración de proteína en el retenido durante la filtración a 25 y 45 °C, a PTM de 7,5 y 15 psi respectivamente, y utilizando un caudal de alimentación

de 6 l/min (Tabla 2). Resultados similares se obtuvieron con el caudal de alimentación de 3 l/min.

De la Figura 8 se observa que indistintamente de las condiciones de PTM y temperatura, la concentración de enzima en el retenido es constante en el tiempo. Esto refleja que, a la concentración de enzima utilizada, no hay adsorción de ésta sobre la superficie de la membrana.

La concentración de proteína en el permeado en todos los experimentos dio como resultado valores cercanos a cero (0,006 +/- 0,005 mg/ml en promedio). Lo anterior permite deducir que la temperatura y la PTM no tienen influencia en la selectividad de la membrana, manteniendo porcentajes de retención superiores a 98,5% (Becerra, 2011); alcanzando nuevamente el propósito de retener la glucoamilasa.

Figura 8. Concentración de glucoamilasa en el retenido a través del tiempo; a) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, b) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 15 psi.



Fuente: Autor

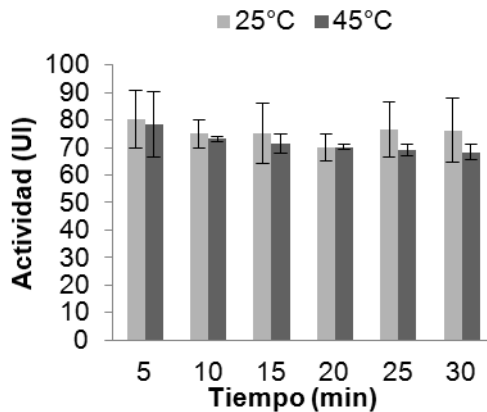
Actividad enzimática.

La determinación de la actividad de la enzima se realizó con el objetivo de observar la influencia del piloto (más específicamente la bomba) y de las condiciones de operación sobre la actividad enzimática. Para ello se analizaron muestras de retenido, para todos los experimentos. La Figura 9 presenta los resultados obtenidos; resultados similares se obtuvieron con un caudal de alimentación de 3 l/min.

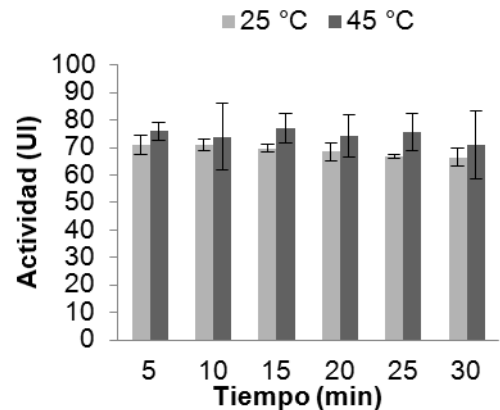
De esta figura se observa que las PTM y las temperaturas utilizadas no inciden en la actividad enzimática de la glucoamilasa. Resultado interesante si se proyecta el uso de esta tecnología en la separación de hidrolizados en continuo.

Figura 9. Actividad enzimática de la glucoamilasa a distintas temperaturas, a) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 7,5 psi, b) caudal de alimentación de 6 l/min y PTM de 15 psi.

a)



b)



Fuente: Autor

2.3 FILTRACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA.

Permeabilidad de hidrolizados.

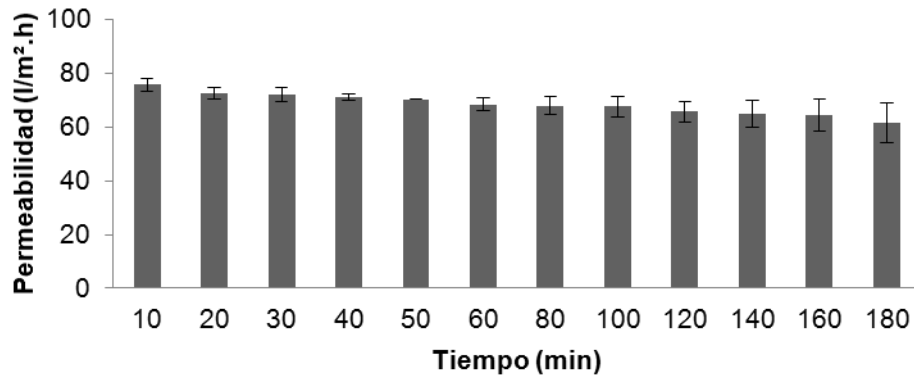
Se determinó el comportamiento del flux de permeado en el tiempo para los hidrolizados de almidón de yuca a distintos tiempos de reacción de licuefacción y sacarificación (Tabla 3). La Figura 10 muestra los resultados para la prueba 1 con tiempos de reacción de licuefacción de 15 min y de sacarificación de 45 min, y la prueba 6 con tiempos de reacción de 3 y 20 min respectivamente (pruebas con los mayores y menores tiempos de reacción de licuefacción y sacarificación). Los tiempos intermedios de reacción no se presentan ya que se observó un comportamiento similar a los presentados en la figura.

En la Figura 10 se puede observar una pérdida de la permeabilidad (18,4 +/- 2,3%) al comenzar la filtración, pero al cabo de 60 min de operación, el flujo de permeado tiende a estabilizarse en 58 l/m².h para ambos casos. Hinkova *et al.* (2004), aseguran que esta disminución se debe a que hay una leve colmatación de la membrana y por tanto hay una pérdida de la eficiencia total del proceso. Es a resaltar, que en este estudio se realizaron filtraciones de hidrolizados de almidón de trigo utilizando distintas unidades de filtración y membranas, hallando una estabilización de flujo alrededor de los 60 min de operación. Igualmente Almandoz *et al.* (2010), durante una serie de filtraciones de hidrolizados de almidón de maíz, observaron un descenso de la permeabilidad en la primera hora de filtración, comportándose posteriormente de manera estable.

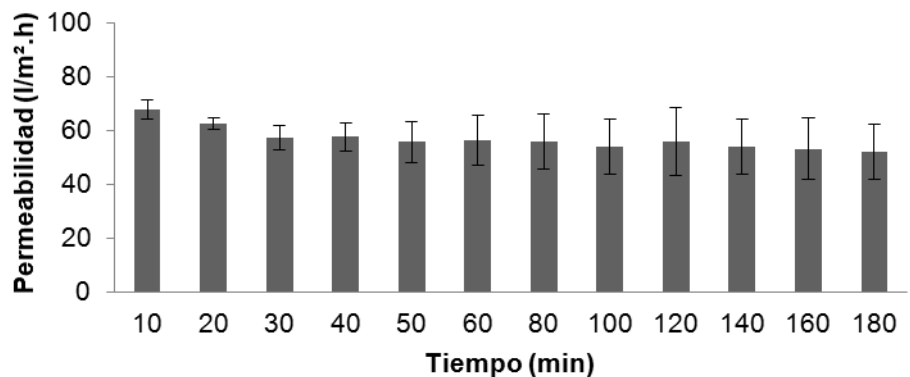
De los anteriores estudios se puede concluir la existencia de una disminución natural en la permeabilidad del proceso hasta estabilización al cabo de 1h de operación; sin importar el origen del almidón utilizado para la hidrólisis.

Figura 10. Permeabilidad de hidrolizados de almidón de yuca con caudal de alimentación de 6 l/min, PTM de 15 psi, temperatura de 25 °C y diferentes tiempos de reacción. a) licuefacción: 15 min, sacarificación: 45 min y b) licuefacción: 3 min, sacarificación: 20 min.

a)



b)



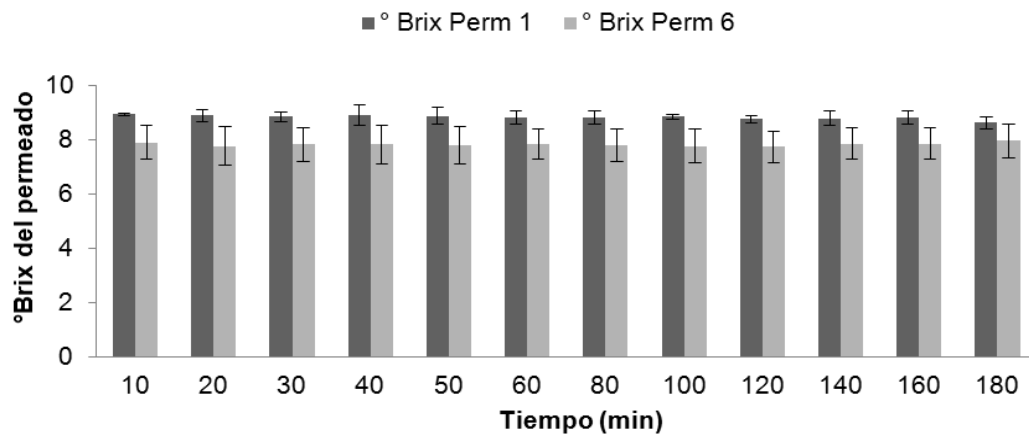
Fuente: Autor

De la Figura 10 también se observa que no hay diferencias significativas en la permeabilidad entre los tiempos de reacción utilizados en las dos etapas de hidrólisis. Esto permitiría trabajar con hidrolizados obtenidos con diferentes tiempos de reacción (para las etapas de licuefacción y sacarificación) sin que esto conlleve a cambios significativos en la productividad (permeabilidad) del proceso de clarificación con membranas.

Caracterización de las muestras de permeado.

Se determinaron las concentraciones de azúcares en el permeado para todas las pruebas, a distintos tiempos de reacción para las dos etapas que conforman la hidrólisis enzimática. La Figura 11 muestra los resultados obtenidos para las pruebas con los mayores y los menores tiempos de reacción de licuefacción y sacarificación respectivamente (pruebas 1 y 6). Resultados similares se obtuvieron para los demás tiempos de reacción estudiados.

Figura 11. ° Brix en el tiempo comparado entre la prueba 1 (licuefacción 15 min, sacarificación 45 min) y la prueba 6 (licuefacción 3 min, sacarificación 20 min) (Tabla 3).



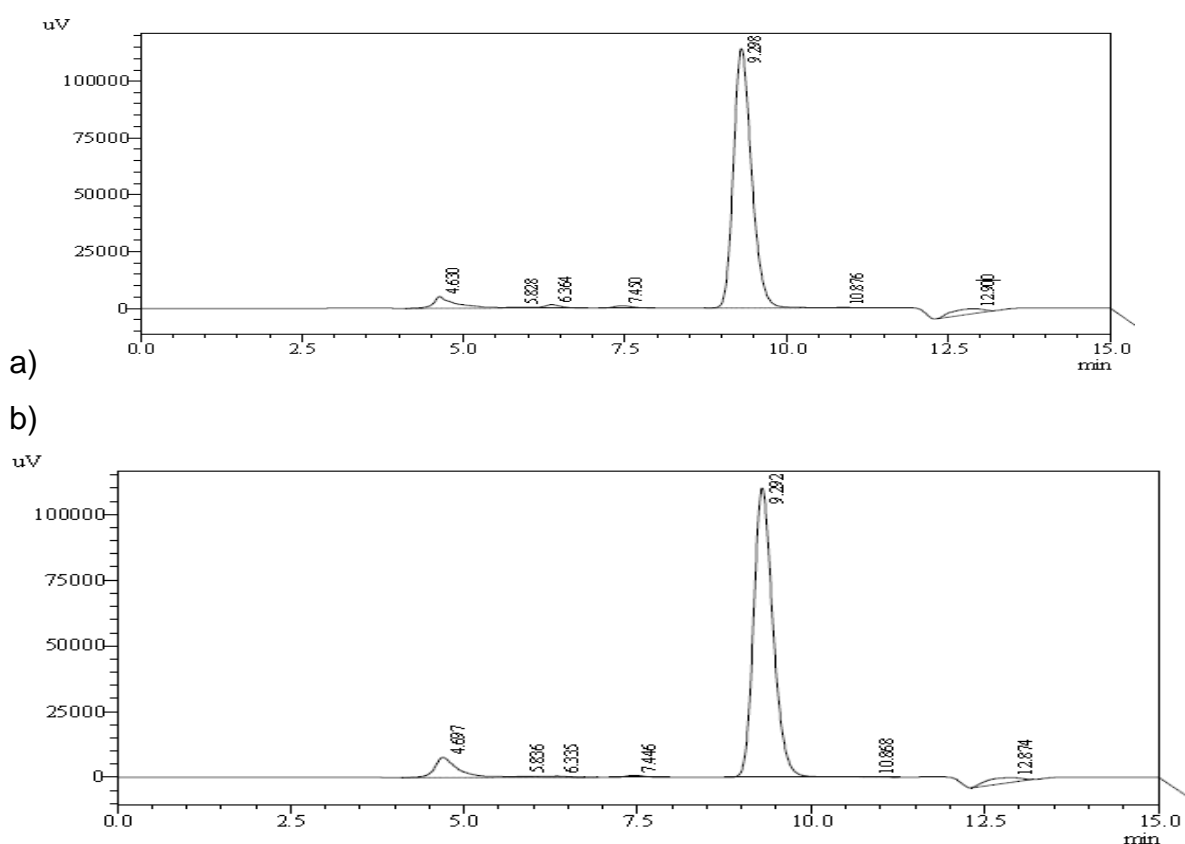
Fuente: Autor

En la Figura 11 no se observa variación de los °Brix en el tiempo. Esto es positivo debido a que se pueden reducir los tiempos de reacción de la hidrólisis enzimática sin afectar la cantidad de sólidos totales disueltos (azúcares simples y oligosacáridos). La diferencia entre los °Brix de la prueba 1 y 6 es debida a diferencias en la concentración inicial de la solución de almidón utilizada para la hidrólisis (difícil a mantener constante entre cada una de las pruebas).

La Figura 12 muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC para el análisis de contenido de glucosa en el permeado de las pruebas 1 y 6.

De esta figura se observa un pico en 9,3 min que fue identificado como glucosa; mostrando así que el contenido de este compuesto en el jarabe es muy alto. Otros picos más pequeños se observan, que corresponden esencialmente a otros carbohidratos. Para todos los tiempos de hidrólisis evaluados se encontró presencia significativa de glucosa en los hidrolizados; lo que permite reducir el tiempo de hidrólisis sin afectar el rendimiento de la reacción.

Figura 12. Cromatogramas HPLC de los permeados obtenidos en la, a) prueba 1 (licuefacción 15 min, sacarificación 45 min) y b) prueba 6 (licuefacción 3 min, sacarificación 20 min) (Tabla 3).



Fuente: Autor

3. CONCLUSIONES

El piloto de UF con membrana Millipore® de polietersulfona de 10 kDa presenta características interesantes para la filtración de soluciones glucoamilasa-agua a concentración constante. Presenta permeabilidades del orden de 208 l/m².h con una retención de enzima superior al 98,5%. Dichas permeabilidades pueden mejorarse al aumentar la temperatura y la PTM (incrementos del 21,7 +/- 2,8% y 57,3 +/- 2,8% respectivamente) sin que esto afecte su selectividad.

El piloto de UF con membrana Millipore® de polietersulfona de 10 kDa no afecta la actividad enzimática en el curso de la filtración al trabajar con temperaturas hasta 45 °C y PTM de 15 psi. Esto permitiría la reutilización de la enzima en un futuro sistema de filtración en continuo. El principal inconveniente se encuentra en la temperatura máxima de trabajo de este módulo membranario (50 °C) que es inferior a las temperaturas de hidrólisis (70 °C – 80 °C).

La membrana Millipore® de polietersulfona de 10 kDa presenta una disminución de la permeabilidad de 18,4 +/- 2,3% utilizando hidrolizados de almidón de yuca. Sin importar los tiempos de reacción aplicados en las etapas de hidrólisis enzimática, el ensuciamiento de la membrana no es significativo y no hay efecto de colmatación en ella. Las permeabilidades se estabilizan cerca de 58 l/m².h alrededor de 1 h de operación en todos los experimentos.

4. RECOMENDACIONES

Se sugiere estudiar otro tipo de membranas como las cerámicas que permitan trabajar a las temperaturas de hidrólisis (pensando en una filtración en continuo).

Se recomienda trabajar con soluciones a mayores concentraciones para determinar su comportamiento frente al sistema y así aumentar posiblemente la productividad del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

ALMANDOZ C., PAGLIERO C., OCHOA A., MARCHESE J., Corn syrup clarification by microfiltration with ceramic membranes, *Journal of Membrane Science* 363, 2010, 87–95.

BAKER R., *Membrane technology and applications*. 2 Ed. Menlo Park: John Wiley & Sons. 2004. 538p. ISBN: 0-470-85445-6.

BAKS T., KAPPENB F., JANSSENA A., BOOM R., Towards an optimal process for gelatinization and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*, *Journal of Cereal Science* 47, 2008, 214–225.

BECERRA J., *Diseño y montaje de un piloto de laboratorio para el estudio de la separación de hidrolizados de almidón de yuca utilizando tecnología membranaria*. Bucaramanga, 2011, 41p. Trabajo de grado Ing. Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ing. Físico-químicas.

CAMARILLO R., *Separación selectiva de metales pesados en efluentes industriales mediante tecnología PSU*, Ed. UCLM. 2007. 305p. ISBN: 978-84-8427-506-0.

CHERKASOV A.N., TSAREVA S.V., POLOTSKY A.E., Selective properties of ultrafiltration membranes from the standpoint of concentration polarization and adsorption phenomena, *Journal of Membrane science* 104 , 1995, 157-164.

CORRADINI E., Lotti C., DE MEDEIROS E., Comparative studies of corn thermoplastic starches with different amylose content. *Polímeros*, vol.15, n°4, 268-273.

CUI Z.F., MURALIDHARA H.S., *Membrane technology*. 1 ed. Oxford U.K: B.H. 2010. 289. ISBN. 978-1-85617-632-3.

GAOUAR O., ZAKHIA N., AYMARD C., RIOS G.M., Production of maltose syrup by bioconversion of cassava starch in an ultrafiltration reactor, *Industrial Crops and Products* 7, 1998, 159–167.

GRZESKOWIAK-PRZYWECKA A., SLOMINSKA L., Saccharification of potato starch in an ultrafiltration reactor, *Journal of Food Engineering* 79, 2007, 539–545.

HINKOVA A., BOHACENKO I., BUBNIK Z., HRSTKOVA M., JANKOVSKA P., Mineral membrane filtration in refinement of starch hydrolysates, *Journal of Food Engineering* 61, 2004, 521-526.

JOHNSON R., PADMAJA G., MOORTHY S.N., Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 2009, 616-620.

LÓPEZ-ULIBARRI R., HALL G.M., Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor, *Enzyme and Microbial Technology* 21, 1997, 398-404.

MIRONESCU M., MIRONESCU I.D., Design of a knowledge and management system for starch bioconversion, *Procedia Food Science* 1, 2011, 667-670.

MORALES S., ÁLVAREZ H., SÁNCHEZ C., Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch, *Food and Bioproducts Processing*. 86, 2008, 25-30.

PABBY A., RIZVI S.H., SASTRE A.M., *Membrane Handbook Separation*, Miami: Pearson Education, 2009. 1187p. ISBN: 978-0-8493-9549-9.

REDDY A., MOHAN D.J., BHATTACHARYA A., SHAH V.J., GHOSH P.K., Surface modification of ultrafiltration membranes by preadsorption of a negatively charged polymer I. Permeation of water soluble polymers and inorganic salt solutions and fouling resistance properties. *Journal of Membrane science* 214, 2003, 211-221.

RUIZ M., Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca por medio de hidrólisis enzimática, para ser usados como sustrato en la producción de bioetanol. Bucaramanga, 2009, 81p. Trabajo de grado Química. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.

SHAH T.N., FOLEY H.C., ZYDNEY A.L., Development and characterization of nanopores carbon membranes for protein ultrafiltration, *Journal of Membrane Science* 295, 2007, 40-49.

SING N., CHERYAN M., Fouling of a ceramic microfiltration membrane by corn starch hydrolysate, *Journal of Membrane Science* 135, 1997, 195-202.

SIMS K.A., CHERYAN M., Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 39, 1992, 960–967.

SLOMINSKA L., NIEDBACH J., Study on the influence of the so-called filtration enzyme action on the membrane filtration process of wheat starch hydrolysates, *Desalination* 241, 2009, 296-301.

Slominska L., PRZYWECKA A., Study on the membrane filtration of starch hydrolysates, *Desalination* 162, 2004, 255-261.

UTHUMPORN U., ZAIDUL I.S., KARIM A.A., Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes, *Food and Bioproducts Processing* 88, 2010, 47-54.

WALKER J.M., *The protein protocols handbook*. 2 Ed. New Jersey: 2002. 1172p. ISBN 0-89603-940-4.

WANG L., CHEN J.P., HUNG Y., SHAMMAS N., *Membrane and desalination technologies*. New york: Humana Press. 2011. 716p. ISBN: 978-1-58829-940-6.

YEH H.M., CHEN K.T., Improvement of filtration performance in tubular membranes using a twisted wire-rod assembly, *Journal of Membrane Science* 178, 2000, 43-53.

ANEXO A. PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN DE YUCA.

Se prepara una solución de 4 l de almidón de yuca en buffer acetato 0,016M al 10% (p/p). Las enzimas utilizadas para este proceso son la α -amilasa (Liquozyme[®] SC DS) y la glucoamilasa (Spirizyme[®] Fuel) de Novozymes; y almidón de yuca (ALMIYUCA) de Industrias del Maíz S.A.

A continuación se presenta los siguientes pasos para la hidrólisis:

1. Preparar el hidrolizado mezclando 3594,75 g de agua destilada con 5,25 g de acetato de sodio previamente, y luego 400 g de almidón de yuca, para un peso total de 4000 g de mezcla (10% p/p), y ajustar pH a 5 con HCl a 2 M o NaOH a 2 M.
2. Se adiciona la mezcla al tanque de alimentación del piloto membranario y se coloca bajo agitación en nivel 4, y calentar hasta temperatura de 80 °C.
3. Cuando la mezcla gelifique y se encuentre a 75 °C aproximadamente, adicionar 1,12 ml de α -amilasa (Liquozyme) al tanque de alimentación para empezar la primera reacción y dejamos reaccionar durante el tiempo necesario; manteniendo la temperatura a 80 °C.
4. Transcurrido el tiempo de reacción adicionar 15 ml de solución de HCl 2 M para bajar rápidamente el pH a 3 (de pronto habrá que adicionar un poco más) y desactivar la enzima α -amilasa frenando la primera reacción (licuefacción). Dejar el sistema reaccionar durante al menos 10 min.

5. Al mismo tiempo que se realiza la etapa 4, bajar la temperatura del hidrolizado a 70 °C (temperatura segunda reacción, sacarificación) y ajustar pH a 4,5 adicionando de NaOH 2 M (20 ml aproximadamente).
6. Adicionar 3,37 ml de glucoamilasa (Spirizyme) al sistema para dar inicio a la segunda reacción. Mantener la agitación en nivel 4, la temperatura de 70 °C durante el tiempo de reacción.
7. Pasado el tiempo de reacción bajar el pH a 3 agregando aproximadamente 10 ml de HCl 2 M para desactivar la glucoamilasa y detener la segunda reacción.
8. Se disminuye la temperatura a 25 °C y nuevamente se ajusta el pH a 7 agregando aproximadamente 35 ml de NaOH 2 M a la solución. Con ello el hidrolizado de almidón de yuca está preparado.