

**DISEÑO Y MONTAJE DE UN PILOTO DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO
DE LA SEPARACIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA
UTILIZANDO TECNOLOGÍA MEBRANARIA**

JOSÉ JAVIER BECERRA RIAÑO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**DISEÑO Y MONTAJE DE UN PILOTO DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO
DE LA SEPARACIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA
UTILIZANDO TECNOLOGÍA MEBRANARIA**

JOSÉ JAVIER BECERRA RIAÑO

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
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

DEDICATORIA

A Dios Padre quien me organiza los días, las noches y me acompaña en cada paso que doy.

A mis padres por el amor, comprensión y apoyo incondicional que me han brindado.

A mis hermanos por celebrar mis triunfos y acompañarme en las dificultades.

AGRADECIMIENTOS

Al ministerio de agricultura por la financiación de este trabajo que hace parte del proyecto del ministerio de agricultura código 026-2007D3321-639-07 titulado, “Aumento de la productividad del cultivo de la yuca en Santander, su utilización como materia prima para la obtención de bio-etanol y bio-butanol y estudio del proceso de transformación catalítica de bio-etanol a butanol”.

Al Doctor Carlos Jesús Muvdi Nova, por su valiosa colaboración intelectual y personal en el desarrollo de este proyecto.

Al profesor Andrés Rueda, por su disposición al compartir el conocimiento.

A los señores Eduardo Carreño y Wilson Carreño del laboratorio de procesos, por su aporte técnico en la solución de problemas.

Al señor Pedro Caldas del departamento de mantenimiento tecnológico, por su contribución en la parte eléctrica y electrónica del montaje.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	16
1.1. FILTRACIÓN MEMBRANARIA	16
1.1.1 Generalidades de las membranas.	16
1.1.2. Clasificación de membranas.	18
1.1.3. Modos de operación del sistema membranario.	20
1.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA	21
1.2.1 Generalidades.	21
1.2.2 Visión del proceso.	23
2. METODOLOGÍA	25
2.1 DISEÑO Y MONTAJE DEL SISTEMA MEMBRANARIO	25
2.2 IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MEMBRANARIO	27
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN	28
2.3.1. Cuantificación de proteína del extracto enzimático de glucoamilasa.	28
2.3.2. Determinación de la actividad enzimática.	29
2.4 ESTUDIO DE FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA.	30
2.5 PRUEBA DE CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DILUIDO.	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 HISTOGRAMA DE PERMEABILIDAD NORMALIZADA AL AGUA	33
3.2 FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.	34

3.3 FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA A CONCENTRACIÓN VARIABLE.	39
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación filtración membranaria	16
Figura 2. Principios de separación por a) tamaño (MF, UF, NF), b) diferencia de presión (ósmosis inversa), c) interacciones electrostáticas (electrodiálisis).	17
Figura 3. Diagrama de clasificación de las membranas sintéticas.	19
Figura 4. Modos de operación sistema membranario a) Modo concentración, b) Modo diafiltración, c) Modo reciclado total, d) Modo lavado.	21
Figura 5. Estructura química de a) Amilosa b) Amilopectina.	22
Figura 6. Proceso para la obtención de hidrolizados de glucosa	23
Figura 7. Montaje del sistema membranario. Fuente. El autor	25
Figura 8. Método colorimétrico de Bradford para cuantificar proteína	28
Figura 9. Curva de calibración de Bradford para cuantificación de proteína	29
Figura 10. Procedimiento para determinar la actividad enzimática de la glucoamilasa.	30
Figura 11. Procedimiento utilizado en la prueba de concentración	32
Figura 12. Pruebas de permeabilidad normalizada al agua (NWP), realizadas a una presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C.	34
Figura 13. Concentración de proteína presente en retenido Vs tiempo. a) Prueba 1, presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C, b) Prueba 3, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C, c) Prueba 2, presión transmembranaria de 7,5 psi, caudal de 3L/min y 25°C, d) prueba 4, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 3L/min y 25°C.	36
Figura 14. Actividad enzimática de la glucoamilasa presente en el retenido Vs tiempo a) Prueba 1, 30 minutos, presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C, b) Prueba 3, 30 minutos, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C, c) Prueba 2, 60 minutos, presión transmembranaria de	

7,5 psi, caudal de 3L/min y 25°C, d) Prueba 4, 60 minutos, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 3L/min y 25°C.	37
Figura 15. Caudales de permeado vs Tiempo, a)prueba 1 presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min, 25°C, b) prueba 3 presión transmembranaria de 15 psi, caudal de 6L/min y 25°C.	38
Figura 16. Concentración de proteína en retenido Vs Tiempo, Prueba de concentración de extracto enzimático diluido realizada a presión transmembranaria de 15psi, 6L/min y 25°C.	39
Figura 17. Concentración de proteína en permeado Vs tiempo, Prueba de concentración de extracto enzimático diluido realizada a presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C.	40
Figura 18. Caudal de permeado Vs Tiempo (prueba de concentración), prueba realizada a una presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C.	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los procesos membranarios.	19
Tabla 2. Condiciones a las que se realizaron las pruebas de separación	31

RESUMEN

Título: DISEÑO Y MONTAJE DE UN PILOTO DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN DE HIDROLIZADOS DE ALMIDÓN DE YUCA UTILIZANDO TECNOLOGÍA MEMBRANARIA^{*}.

Autor: José Javier Becerra Riaño^{**}

Palabras claves: hidrólisis, enzimas, almidón, membrana, ultrafiltración, yuca

Se realizó el diseño, montaje e implementación de un sistema membranario que permitirá la separación de hidrolizados de almidón de yuca. Se redactaron los protocolos de ensamble, puesta en marcha, apagado y mantenimiento del sistema membranario. Se instaló una membrana de ultrafiltración polimérica de polietersulfona (Pellicon 10 Biomax®) con un tamaño de poro de 10 kDa y una superficie membranaria de 0,5m².

Fue desarrollado un primer estudio para separar la glucoamilasa de una mezcla glucoamilasa-agua a una temperatura de 25°C, presiones transmembranarias de 7,5 y 15psi, caudales de alimentación de 3 y 6L/min. Se cuantificó la concentración de proteína en el tiempo para las muestras tomadas de los puertos de retenido y permeado, con el fin de observar el grado de separación logrado por la membrana y la retención de la glucoamilasa en la superficie membranaria (colmatación). Se determinó la actividad enzimática de la glucoamilasa durante las pruebas para observar su comportamiento a las condiciones de trabajo.

Se obtuvo un porcentaje de retención de glucoamilasa superior al 98,5% en todas las pruebas realizadas con la membrana de ultrafiltración. Se determinó que no hay colmatación en la membrana, ni tampoco pérdida de actividad de la glucoamilasa a las condiciones a las que se realizaron las pruebas. Sin embargo en la prueba de concentración donde la cantidad de proteína aumenta en el tiempo se observa una disminución en el flujo permeado debido a la colmatación; a analizar en estudios posteriores.

Los resultados mostrados evidencian que sin importar los caudales de alimentación y las presiones transmembranarias a una temperatura de 25°C, no se presentan variaciones en los niveles de actividad enzimática, permeabilidad y selectividad; esto a tiempos inferiores a 60min. Resultados que validan en una primera instancia la posibilidad de encaminar el proceso a una configuración en continuo.

^{*}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: DESIGN AND INSTALLATION OF A PILOT LABORATORY FOR THE STUDY OF THE SEPARATION OF HYDROLYZED STARCH CASSAVA USING MEMBRANE TECHNOLOGY^{*}

AUTHOR: José Javier Becerra Riaño^{**}

KEY WORDS: Hydrolysis, enzymes, starch, membrane, ultrafiltration, cassava

DESCRIPTION:

We performed the design, installation and implementation of a membrane system that will allow the separation of cassava starch hydrolysates. Protocols were drafted assembly, startup, shutdown and maintenance of the membrane. They installed a polymeric ultrafiltration membrane polyethersulfone (Biomax® Pellicon 10) with a pore size of 10 kDa and a membrane surface of 0,5m².

A first study was developed to separate the glucoamylase glucoamylase-water mixture at a temperature of 25°C, transmembrane pressures of 7,5 and 15 psi, feed rates of 3 and 6 L/min. We quantified the protein concentration in time for the samples taken from the ports of retentate and permeate, in order to observe the degree of separation achieved by the membrane and the retention of glucoamylase on the surface membrane (fouling). We determined the enzymatic activity of glucoamylase during testing to observe their behavior to the conditions of work.

The retention rate of glucoamylase obtained from the ultrafiltration membrane was upper to 98,5%. It was determined that there is no fouling in the membrane, not loss of activity of glucoamylase to the conditions that were tested. However in the test concentration where the amount of protein increases over time is a decrease in permeate flow due to fouling, to analyze in future studies.

The results shown demonstrate that regardless of the rates and transmembrane pressure at a temperature of 25°C, there are variations in the levels of enzyme activity, permeability and selectivity, this time to less than 60min. Validating results in the first instance the possibility of directing the process to a continuous configuration.

^{*}Degree work

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

INTRODUCCIÓN

Los jarabes de glucosa son producidos mediante hidrólisis controlada del almidón por vía ácida o enzimática^[23]. Actualmente se prefiere el uso de la hidrólisis enzimática debido a que es posible obtener mayores equivalentes de dextrosa (superior a 95%) comparados con los producidos por hidrólisis ácida (30-55%)^[13]. Los hidrolizados de almidón son una parte esencial en la producción de alimentos donde son usados como aditivos y como sustrato para la obtención de biocombustibles^[12].

Los hidrolizados de almidón son filtrados con el fin de remover sólidos suspendidos, proteínas e impurezas grasas. Convencionalmente, la clarificación de estos se realiza mediante flujo frontal utilizando filtros prensa o filtros rotatorios de vacío con tierras diatomeas como auxiliar filtrante^[24]. La tecnología membranaria es una alternativa que reemplazaría la filtración convencional. La separación por membranas utiliza flujo cruzado (o tangencial) que permite disminuir los problemas de colmatación, además, se logra la concentración, fraccionamiento y purificación de los hidrolizados de forma simultánea, obteniendo productos con una calidad superior en términos de turbidez, color y limpieza microbiológica comparada con la filtración tradicional^[24].

A nivel industrial en la producción de hidrolizados de almidón, las enzimas que llevan a cabo la hidrólisis enzimática (α -amilasa y glucoamilasa) no son reutilizadas^[19]. Por esta razón este proyecto busca estudiar la viabilidad de integrar el proceso de separación membranaria a un proceso continuo que permita recircular la enzima. Este trabajo hace parte del proyecto del Ministerio de Agricultura código 026-2007D3321-639-07 titulado, “Aumento de la productividad del cultivo de la yuca en Santander, su utilización como materia prima para la

obtención de bio-etanol y bio-butanol y estudio del proceso de transformación catalítica de bio-etanol a butanol”.

Para llevar a cabo este estudio se realizó el montaje y la implementación de un piloto de laboratorio de ultrafiltración que permita la separación de hidrolizados de almidón de yuca. Con este piloto se separó la glucoamilasa de una mezcla glucoamilasa-agua a una temperatura de 25°C. Se buscó analizar la influencia que tienen la presión transmembranaria, el caudal de alimentación y el número de ciclos que la enzima recircula por el sistema sobre la actividad enzimática de la glucoamilasa y la colmatación de la membrana. También se definió el porcentaje de retención de la membrana de ultrafiltración en la separación de la enzima.

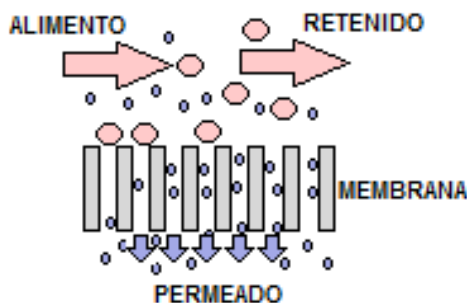
En el primer capítulo se mencionan algunos aspectos teóricos básicos relacionados con el estudio de membranas que permitirán entender el desarrollo del tema. El segundo capítulo habla de la metodología desarrollada durante el proyecto y por último en el tercero se desarrollan los resultados y su discusión.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. FILTRACIÓN MEMBRANARIA

1.1.1 Generalidades de las membranas. Una membrana es una barrera física que permite, en forma selectiva, el paso de ciertos componentes del fluido alimentado. El fluido que pasa a través de la membrana se denomina permeado (o filtrado) y el que no la atraviesa es el retenido (o concentrado) donde se encuentran los constituyentes rechazados^{[1][5]} (Ver fig.1).

Figura 1. Representación filtración membranaria



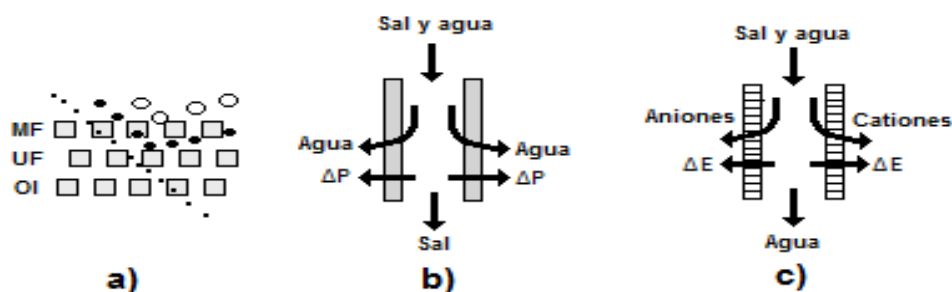
Fuente: Autor del Proyecto

Las cualidades más importantes que se buscan en una membrana son alta selectividad, alta permeabilidad, estabilidad mecánica, estabilidad térmica, resistencia química y bajo costo.^{[4][5][1]}

El transporte a través de la membrana puede tener lugar por convección o por difusión de las moléculas individuales, también puede ser inducido por un campo eléctrico o por gradientes de concentración, presión y temperatura^[2]. El mecanismo de separación en microfiltración (MF), ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF) es principalmente la exclusión por tamaño señalada por la clasificación nominal de

las membranas (MWCO). Los otros mecanismos de separación incluyen las interacciones electrostáticas entre el soluto y la membrana que dependen de las propiedades fisicoquímicas y de superficie.^[7] En la figura 2, se muestran ejemplos de principios de separación por tamaño de partícula (fig.2a), por diferencia de presión (fig.2b) e interacciones electrostáticas (fig.2c).

Figura 2. Principios de separación por a) tamaño (MF, UF, NF), b) diferencia de presión (ósmosis inversa), c) interacciones electrostáticas (electrodialisis).^[3]



Es necesario mencionar algunos conceptos importantes relacionados con el estudio de las membranas con el objetivo de contextualizar el presente trabajo.

- **Peso molecular de corte o “cut-off” (MWCO):** Es el peso molecular o tamaño molecular nominal (en Dalton Da) más pequeño de las especies para las cuales se espera un coeficiente de retención de al menos 90%^[7].
- **Presión transmembranaria:** Es la diferencia de presión a cada lado de la membrana. Ella es la fuerza impulsora que obliga el paso de las moléculas a través de la membrana.
- **Colmatación:** Es la acumulación reversible y/o irreversible de material sobre o dentro de la estructura de la membrana. Este proceso tiene como efecto la pérdida del rendimiento de una membrana, debida a la disminución en el flujo de permeado cuando la presión, el flujo alimentado, la temperatura y la concentración en el alimento se mantienen constantes. La colmatación puede disminuir la vida útil de la membrana además de causar un incremento en el

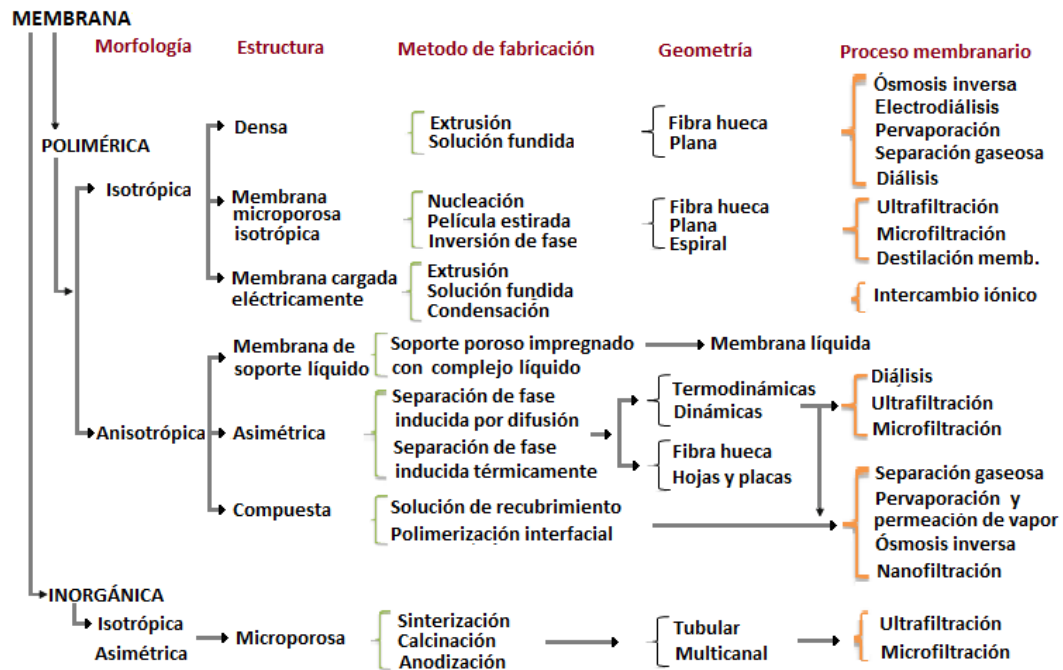
consumo de energía debido a la necesidad de aumentar la presión transmembranaria. Existen varios parámetros que influyen la velocidad de colmatación entre los cuales están incluidos la naturaleza y concentración de solutos y solventes, tipo de membrana, distribución del tamaño de poro, material de la membrana, superficie característica y la hidrodinámica de los módulos membranarios^{[5][7]}.

Algunos aspectos importantes para tener en cuenta en el momento de diseñar un proceso de separación por membranas son los siguientes ^[3].

- Objetivo de la separación
- Naturaleza de las especies retenidas (tamaño de las especies)
- Naturaleza de las especies transportadas a través de la membrana.
- Fuerza motriz y mecanismo de transporte/selectividad
- Fase de las corrientes de alimento y permeado

1.1.2. Clasificación de membranas. La figura 3, muestra una clasificación de las membranas. La clasificación puede obedecer distintos criterios, entre los cuales se pueden encontrar el material de fabricación, la morfología, la geometría, el método de preparación, el principio de separación, el tamaño de poro y el tipo de proceso membranario^{[5][6]}.

Figura 3. Diagrama de clasificación de las membranas sintéticas. [5]



Procesos membranarios.

La microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI) son los procesos membranarios más importantes a nivel industrial, ellos utilizan, como fuerza motriz la presión. Estos procesos pueden dividirse de acuerdo al tamaño de poro de las membranas y la presión transmembranaria requerida^{[6] [7]}(V. tabla 1).

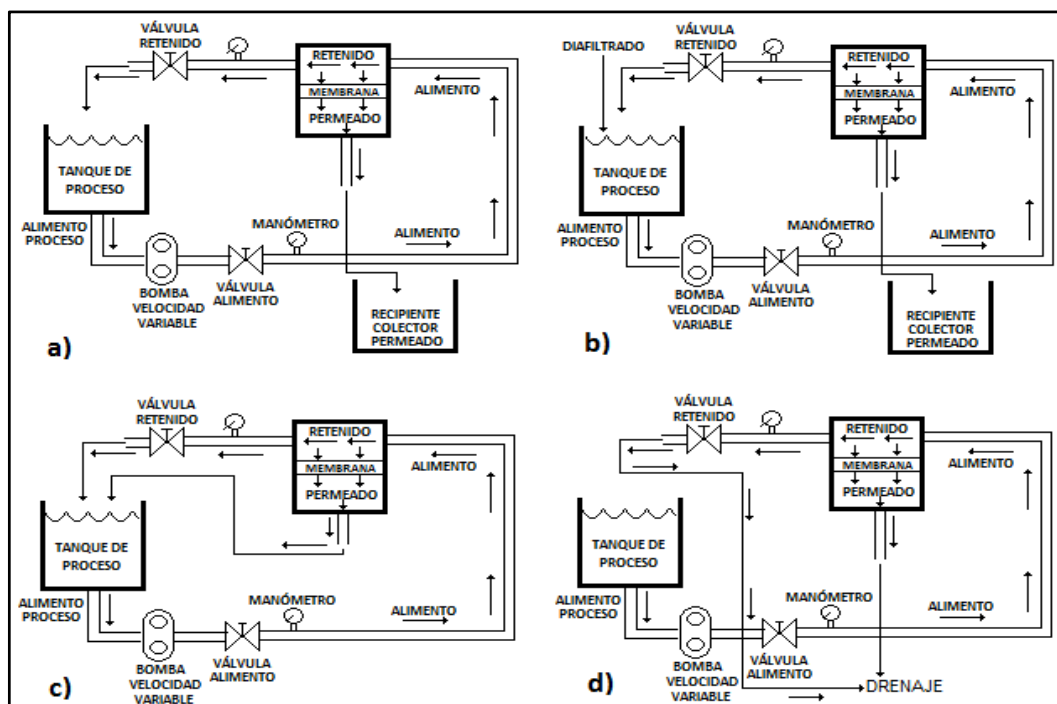
Tabla 1. Clasificación de los procesos membranarios. [5][7]

Proceso membranario	Tamaño de poro	Presión transmembranaria intervalo (bar)
Ósmosis inversa (OI)	< 0,5 nm o < 200 Da (Membranas densas)	35 - 100
Nanofiltración (NF)	0,5 - 10 nm o 100 - 500 Da	10 - 30
Ultrafiltración (UF)	1 - 100 nm o 500 - 100.000Da (membranas porosas)	1 - 10
Microfiltración (MF)	100 - 10.000nm o >100.000 Da (membranas porosas)	1 - 10

La MF es usada para la separación de suspensiones coloidales o finas partículas^{[3][6]}. La UF es utilizada ampliamente en la concentración de proteínas,^[11] en las industrias de biotecnología, alimenticias, papeleras y lácteos entre otras.^[8] La mayoría de membranas comerciales de UF están compuestas de polímeros hidrofóbicos como la polietersulfona, polisulfona, polietileno, polipropileno debido a sus excelentes propiedades químicas, térmicas y mecánicas.^[8] Una de las principales características de las membranas de UF es la selectividad.^{[9][10]}

1.1.3. Modos de operación del sistema membranario. En la figura 4, se muestran cuatro configuraciones comúnmente usadas en el sistema membranario. 1) Modo concentración (fig.4a), la línea de retenido regresa al tanque de alimentación mientras el permeado es recolectado en un recipiente. Esta configuración se usa en la concentración de proteínas, células, virus etc. 2) Modo diafiltración a volumen constante (fig.4b), es utilizado para lavar productos que son retenidos por la membrana. 3) Modo reciclo total (fig. 4c), permite medir velocidades de filtración y colmatación de la membrana en función del tiempo, presión y flujo tangencial pero independiente de la concentración. 4) modo lavado (fig.4d), se usa en la limpieza de la membrana.

Figura 4. Modos de operación sistema membranario a) Modo concentración, b) Modo diafiltración, c) Modo reciclo total, d) Modo lavado.



Fuente: Tomado del manual de operación Pellicon

Actualmente los procesos membranarios donde la presión es la fuerza motriz operan en flujo cruzado (o tangencial), disminuyendo los efectos de la colmatación en la membrana debido al efecto de cizalla generado en la superficie de la membrana. En el flujo cruzado una corriente de alimento fluye tangencialmente a la superficie de la membrana y dos corrientes dejan el módulo membranario, siendo una de permeado y otra de retenido (Ver fig.1 pag.3)^[7]

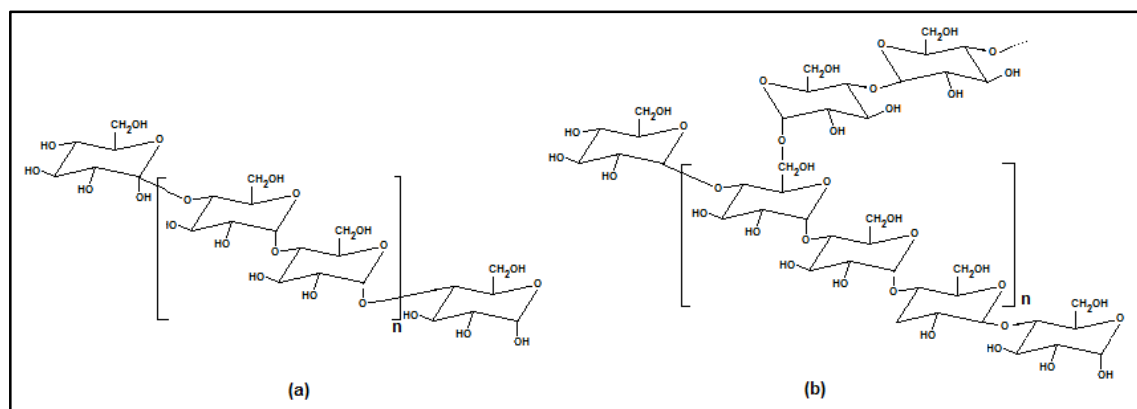
1.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA

1.2.1 Generalidades. Los jarabes de glucosa es un producto comercial que se utiliza ampliamente en las industrias farmacéuticas, de alimentos y como materia prima en la producción de biocombustibles ^[12]. Los jarabes de glucosa pueden ser

obtenidos por dos vías, hidrólisis ácida en donde los productos están en un intervalo de 30-55 ED o por hidrólisis enzimática que logra hidrolizados de 95 ED o superiores^[13] (El equivalente dextrosa ED es el término con que se mide el grado de conversión del almidón a glucosa). La fuente utilizada para la producción de jarabes de glucosa y fructosa es el almidón que es la forma más abundante de almacenar polisacáridos en plantas superiores como yuca, maíz, papa, arroz, sorgo y trigo.^{[14][15]}

El almidón es una mezcla de dos polisacáridos (amilosa y amilopectina) que están densamente empaquetados en un estado semicristalino con enlaces inter e intramoleculares. La molécula de amilosa es lineal y la amilopectina es una molécula altamente ramificada ambas constituidas por unidades de glucosa (Ver fig.5). La susceptibilidad del almidón al ataque de enzimas está influenciada por varios factores tales como el contenido de amilosa y amilopectina, tamaño de partícula, estructura cristalina y la presencia de inhibidores.^{[16][17][15]}

Figura 5. Estructura química de a) Amilosa b) Amilopectina.^[27]



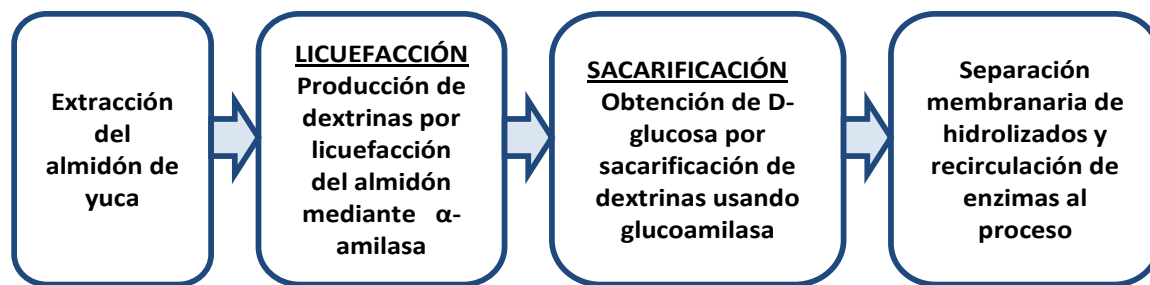
Entre los almidones no cereales, el almidón de yuca es el más susceptible al ataque enzimático, más que en otros almidones donde se presenta una fuerte resistencia al ataque de la α -amilasa y la glucoamilasa^[18]. Otras ventajas del uso del almidón de yuca es su contenido más bajo en minerales y proteínas

comparado con el almidón de maíz y papa, su temperatura de gelatinización es más baja y la solubilidad de la amilosa es más alta comparada con el maíz.^[19]

Independientemente de la fuente y tipo de almidón usado, el proceso de conversión completa de almidón a azúcares por medio de hidrólisis enzimática se lleva a cabo en dos etapas e involucra dos enzimas, α -amilasa y glucoamilasa. En la primera etapa la α -amilasa que es una enzima extracelular, fragmenta el almidón en cadenas de tamaño regular que resultan en dextrinas, maltosa, malttriosa y maltopentosa (etapa de licuefacción). En la segunda (etapa de sacarificación) la glucoamilasa separa las unidades de glucosa de los extremos no reductores obteniendo los hidrolizados de almidón.^{[20][14][21]}

1.2.2 Visión del proceso. El proceso global tiene como objetivo la separación de hidrolizados provenientes de un reactor donde sucede la hidrólisis enzimática del almidón de yuca. Ver figura 6.

Figura 6. Proceso para la obtención de hidrolizados de glucosa



Fuente: Autor del Proyecto

La refinación convencional de hidrolizados de almidón se realiza mediante el uso de filtros prensa o de filtros rotatorios de vacío con tierras diatomeas como auxiliar filtrante^{[23][24]}. La separación membranaria ofrece una alternativa interesante respecto a las técnicas de separación tradicionales. Esta permite de manera simultánea la concentración, fraccionamiento y purificación de los hidrolizados de almidón. Los hidrolizados obtenidos con membranas son superiores en términos

de turbidez, color y limpieza microbiológica comparada con los procesos de filtración convencional ^{[22][23][24]}.

La primera parte del proceso de la cual se encarga este proyecto es la de analizar la retención de la glucoamilasa presente en una mezcla enzima-agua por medio de una membrana de ultrafiltración. Para este fin se montó un piloto de laboratorio con el que se separó la glucoamilasa, se observó la colmatación producida por la enzima, se analizó la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de separación y se realizó una prueba para concentrar un extracto enzimático diluido.

2. METODOLOGÍA

2.1 DISEÑO Y MONTAJE DEL SISTEMA MEMBRANARIO

Se realizó el diseño y montaje de un sistema membranario configurado para un proceso batch, que va a ser utilizado en la separación de hidrolizados de almidón de yuca provenientes de un reactor enzimático. En la figura 7, se muestra el montaje del sistema membranario.

Figura 7. Montaje del sistema membranario.



Fuente: Autor del Proyecto

Es importante recordar que este sistema es un sistema UF, luego el principio de separación se fundamenta en la exclusión por tamaño y utiliza como fuerza motriz la presión. Esta presión transmembranaria se ajusta mediante la manipulación de una válvula ubicada a la salida del retenido (ver figura 7); la presión es indicada por medio de manómetros. La membrana de ultrafiltración (10kDa) fue

seleccionada para permitir el paso de los jarabes glucosados y retener los demás componentes de la mezcla entre los que están las enzimas del proceso.

Los elementos que componen este sistema son los siguientes:

- Tanque de alimentación en acero inoxidable enchaquetado, con capacidad para 10 litros. Aquí se almacena la mezcla para separar.
- Motor reductor (Zew Eurodrive) de medio caballo de fuerza, 439 r.p.m. a 60Hz, funciona a 220V de tensión. Proporciona el torque y la velocidad necesarios para el funcionamiento de la bomba.
- Convertidor de frecuencia CFW-08 (WEG®). Utilizado para variar de forma manual la frecuencia de la fuente a la que se conecta el motor, permitiendo ajustar la velocidad (r.p.m.) requerida. El ajuste del caudal de alimentación del módulo membranario se hace mediante este convertidor.
- Bomba lobular de desplazamiento positivo tipo SRU (Alfa Laval) en acero inoxidable resistente a las sustancias corrosivas utilizadas en la limpieza de la membrana. Fue escogida para evitar la pérdida de actividad de la enzima debida al estrés mecánico. Funciona a un máximo de 1000 r.p.m. y maneja un volumen de 0,128L/rev. Su función en conjunto con el motor-reductor es la de impulsar el fluido de trabajo a través del sistema membranario.
- Soporte del cartucho membranario (Millipore®) en acero inoxidable con sus accesorios (manómetros, válvulas de diafragma ¾" TC 316SS en teflón, acoples, empaques de silicona). El soporte lo componen el plato colector inferior en donde se encuentran los puertos de alimentación, retenido y permeado y el plato superior que sirve de ajuste hermético para la membrana mediante pernos roscados.
- Mangueras reforzadas flexibles de polietileno. Funcionan como conexiones para el tanque de alimentación, bomba y módulo membranario. Resistentes a temperaturas máximas de 60°C.
- Cartucho membranario orgánico de ultrafiltración compuesto de polietersulfona (filtro cartucho pellicon 2 biomax®), con un tamaño de poro de 10kDa y una

superficie de 0.5m^2 . Encargado de realizar la filtración mediante el mecanismo de exclusión por tamaño de poro. Resiste una temperatura máxima de 50°C

- Baño termostato para mantener temperatura constante de 60°C como máximo. Es usado en el proceso de limpieza en caliente del cartucho.

El ensamble del módulo membranario se realizó según el manual del usuario y para la parte eléctrica se contó con la asesoría del personal de mantenimiento tecnológico de la Universidad Industrial de Santander.

2.2 IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA MEMBRANARIO

Se desarrollaron los protocolos para el ensamble, puesta en marcha, apagado y mantenimiento del módulo membranario, con el fin de proporcionarle al usuario del sistema una herramienta complementaria de fácil comprensión y con pasos detallados que le permitan realizar de forma apropiada los procedimientos mencionados. Los protocolos no estarán disponibles en este documento pero su consulta será de fácil acceso ya que una copia se encontrará junto al piloto.

En el protocolo para el ensamble del sistema membranario se desarrolla una guía que incluye el procedimiento y las recomendaciones que se tienen en cuenta en el montaje de los accesorios del módulo membranario (soporte y membrana) y las conexiones que se realizan. Se menciona además la instalación del cartucho membranario y el método para ajustar el plato superior del soporte.

En el protocolo de puesta en marcha y apagado del piloto membranario se enumeran los pasos y las recomendaciones que se deben tener en cuenta cuando se enciende y se apaga el sistema y los ajustes que se deben realizar.

El protocolo para el mantenimiento de la membrana trata aspectos relacionados con el lavado, almacenamiento y enjuague de la membrana cuyo objetivo es mantener su permeabilidad y durabilidad. En esta sección se habla de las condiciones a las que se llevan a cabo estos procedimientos, los tiempos de duración y las sustancias utilizadas.

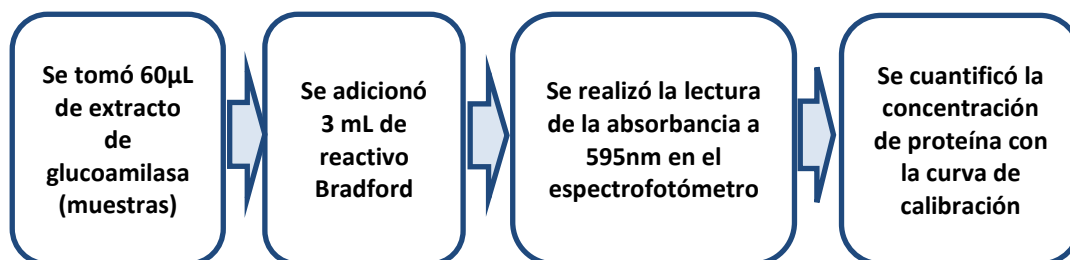
Adicional a estos protocolos se describe como realizar la prueba de normalización de la membrana al agua. El objetivo de esta prueba es llevar un registro de la permeabilidad de la membrana en el tiempo para compararla con los datos registrados antes de realizar la primera filtración.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS DE CUANTIFICACIÓN

2.3.1. Cuantificación de proteína del extracto enzimático de glucoamilasa.

Para determinar la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático de glucoamilasa tomado de los puertos de retenido y permeado, se utilizó el método colorimétrico de Bradford^[25] y se siguió el procedimiento mostrado en la figura 8.

Figura 8. Método colorimétrico de Bradford para cuantificar proteína

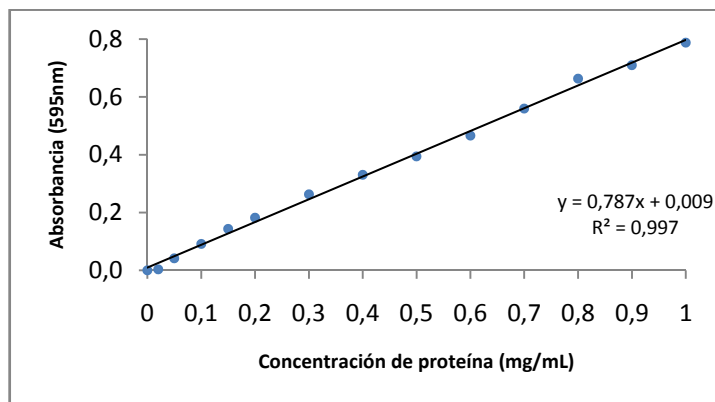


Fuente: Autor del Proyecto

La concentración de proteína se cuantificó mediante la interpolación de datos de la curva de calibración mostrada en la figura 9, hecha a partir de una solución concentrada de albúmina de suero bovino (1mg/mL); preparando diluciones que

van desde 0,02 hasta 1 mg/mL. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 595nm utilizando un espectrofotómetro UV-2401 PC (SHIMADZU).

Figura 9. Curva de calibración de Bradford para cuantificación de proteína

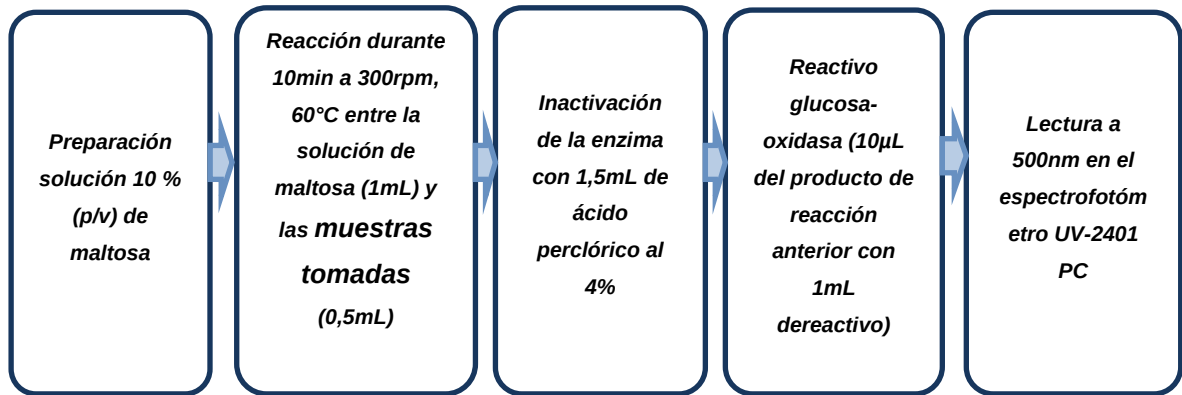


Fuente: Autor del Proyecto

2.3.2. Determinación de la actividad enzimática. La cuantificación de actividad enzimática de la glucoamilasa presente en las muestras tomadas del puerto de retenido, se realizó mediante el procedimiento descrito en la figura 10, definiendo la actividad como la cantidad de μ moles 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.

Figura10. Procedimiento para determinar la actividad enzimática de la glucoamilasa.



Fuente: Autor del Proyecto

2.4 ESTUDIO DE FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA.

La primera parte del proceso de separación de hidrolizados de almidón, analizará la capacidad de la membrana seleccionada (ver sección 2.1 pág. 18) para separar y mantener la enzima glucoamilasa dentro del sistema, sin que se altere su actividad enzimática. Para este fin se configuró un proceso batch, en modo reciclo total, que permite observar la posible colmatación de la membrana causada por la enzima. También se desea monitorear el comportamiento en el tiempo de la actividad enzimática de la glucoamilasa a medida que recircula por el sistema.

Este primer estudio se realizó con el fin de determinar la viabilidad de incorporar el sistema a un proceso continuo que permita, no solo la separación de hidrolizados, sino la posibilidad de recircular la enzima y el sustrato que no fue hidrolizado mejorando el rendimiento del proceso.

Para desarrollar este estudio se decidió trabajar a 25°C. El caudal máximo de alimentación utilizado durante las pruebas fue de 6L/min de acuerdo a lo recomendado por el proveedor. También se trabajó a un caudal intermedio de

3L/min con el fin de observar el comportamiento en el proceso de separación a este flujo.

Para preparar la solución de glucoamilasa-agua, se tuvo como criterio principal la concentración de enzima (0,0623 %p/p relación enzima/almidón) utilizada en estudios previos^[26].

Para el proceso de separación se ajustó el sistema a la máxima presión transmembranaria, 15 psi, lograda por el motor-reductor (relación rpm/torque) sin forzarlo. Se tomó también una presión intermedia de 7,5psi y se analizó el comportamiento.

Se realizaron cuatro pruebas por duplicado, las condiciones de operación se encuentran definidas en la tabla 2. Se tomaron muestras de permeado y retenido y se midieron sus respectivos caudales.

Tabla 2. Condiciones a las que se realizaron las pruebas de separación

CAUDAL DE ALIMENTACIÓN (L/min)	TEMPERATURA PRUEBA (°C)	PRESIÓN TRANSMEMBRANARIA (psi)
6	25	1ra prueba 7,5psi
		3ra prueba 15 psi
3	25	2da prueba 7,5 psi
		4ta prueba 15 psi

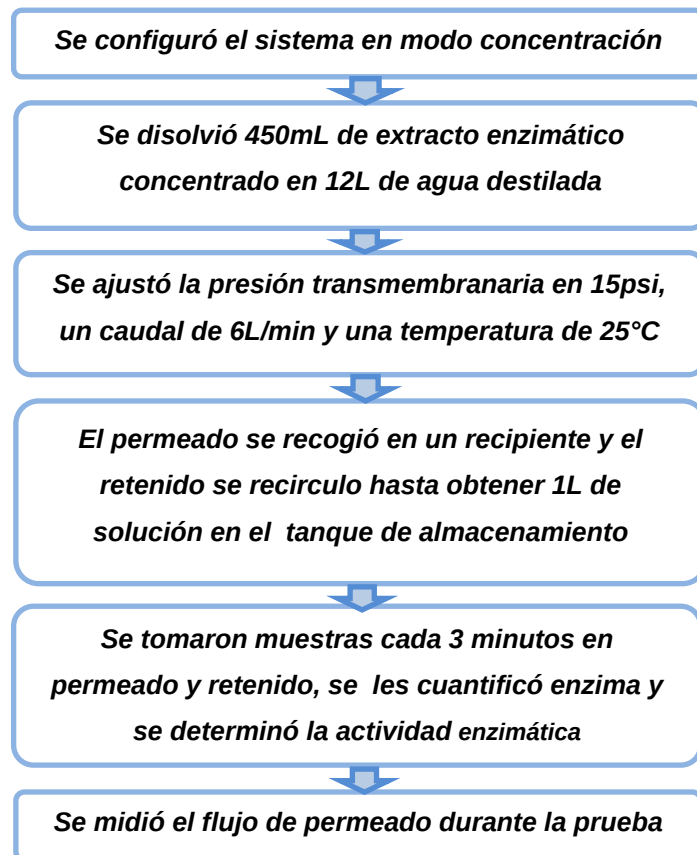
Fuente: Autor del Proyecto

2.5 PRUEBA DE CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DILUIDO.

Se realizó una prueba que tiene como objetivo, observar el comportamiento filtrante de la membrana de ultrafiltración durante la concentración de un extracto enzimático de glucoamilasa diluido. Para realizar esta prueba, el sistema

membranario se configuró en el modo concentración. La metodología empleada se representa en la figura 11.

Figura 11. Procedimiento utilizado en la prueba de concentración



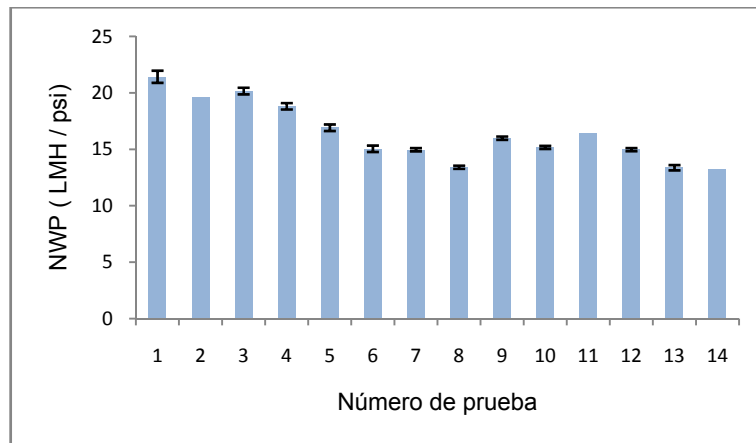
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 HISTOGRAMA DE PERMEABILIDAD NORMALIZADA AL AGUA

El establecimiento de un histograma de flujos de permeado es esencial para el seguimiento y aseguramiento de la capacidad filtrante e integridad del sistema. Permite hacer una comparación entre las permeabilidades de la membrana en el tiempo.

La figura 12 presenta el histograma de permeabilidades obtenido por el sistema de ultrafiltración utilizado. El flujo de permeado muestra una disminución gradual a medida que se realizan las pruebas, sin embargo, presenta una tendencia a estabilizarse alrededor de un NWP de $15 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{psi}$. En la figura se observa que a partir de la prueba 9, hay una recuperación de la permeabilidad de la membrana debida a la implementación de un lavado más prolongado y condiciones de temperatura más altas. El valor más bajo de permeabilidad de la membrana se obtuvo cuando se realizó la prueba de concentración del extracto enzimático diluido, donde la alta concentración de proteína colmató ligeramente la membrana.

Figura 12. Pruebas de permeabilidad normalizada al agua (NWP), realizadas a una presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C.



Fuente: Autor del Proyecto

La disminución de permeabilidad evidenciada en los primeros ciclos de utilización es un comportamiento normal para todo sistema membranario nuevo.

3.2 FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA A CONCENTRACIÓN CONSTANTE.

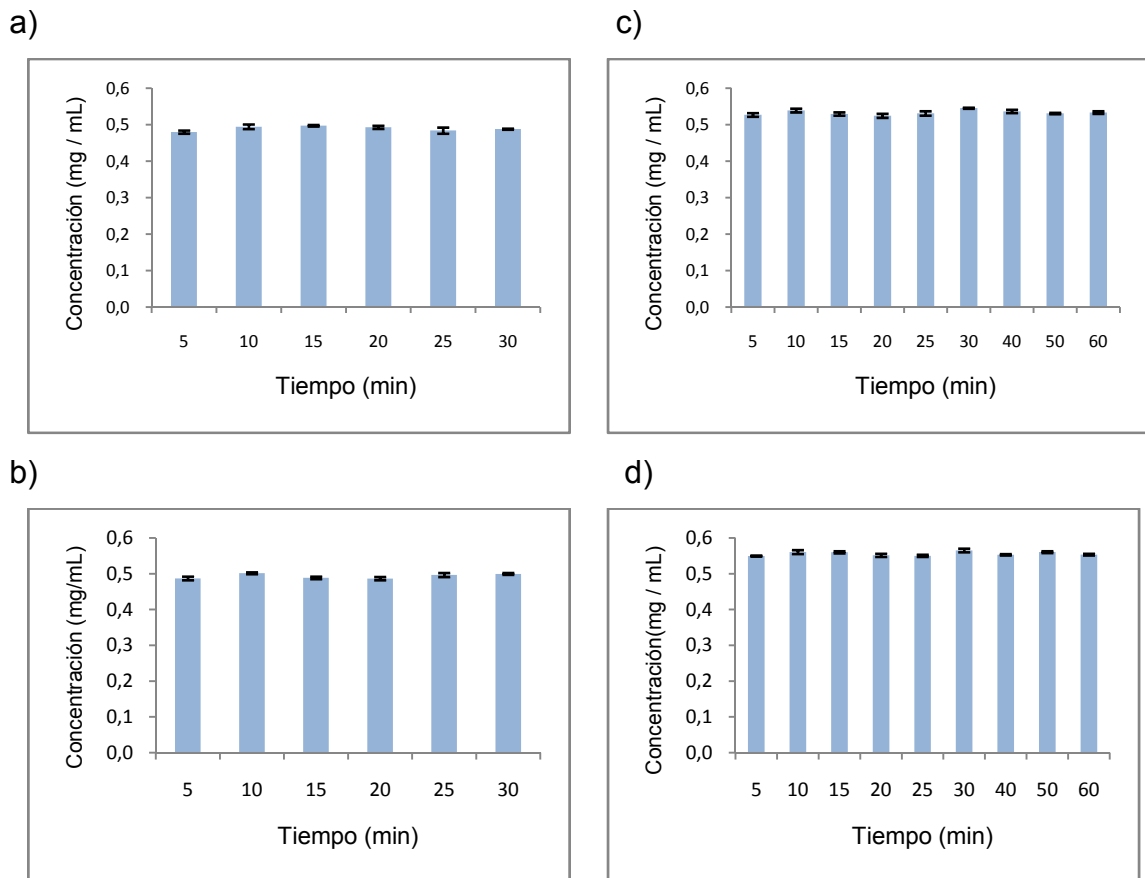
Se determinó la concentración de proteína presente en las muestras tomadas de los puertos de permeado y retenido de las cuatro pruebas realizadas. En la figura 13 se muestra gráficas de concentración de proteína en el retenido en función tiempo transcurrido.

La duración de las pruebas uno y tres (13a Y 13b respectivamente) fue de media hora y se realizaron a un caudal de alimentación de 6L/min. Las pruebas dos y cuatro (13c y 13d respectivamente) se llevaron a cabo durante 60 minutos a un caudal de 3L/min; esto con el fin de garantizar una frecuencia de pasaje a través del sistema equivalente a 6L/min para un mismo volumen de alimentación.

En las figuras 13a, 13b, 13c y 13d se percibe un comportamiento similar. Se observa que la concentración proteica en el retenido permanece constante en el tiempo en cada una de las pruebas, independientemente de las condiciones de caudal de alimentación y presión a las que se llevaron a cabo. Esto indica que la glucoamilasa no se está depositando en la superficie de la membrana a ese nivel de concentración.

Se determinó la concentración proteica del extracto enzimático en las muestras de permeado. Los resultados obtenidos en las cuatro pruebas realizadas son similares y muestran un valor para la concentración de proteína en el permeado, inferior al límite de detección del método (promedio de 0,004 +/- 0,003 mg/mL). Este resultado permite afirmar que el porcentaje de retención logrado por la membrana de ultrafiltración de 10kDa tiene un valor superior a 98,5% en todas las pruebas realizadas, el cual es un factor de retención elevado que asegura el objetivo de separación de la glucoamilasa.

Figura 13. Concentración de proteína presente en retenido Vs tiempo. a) Prueba 1, presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C, b) Prueba 3, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C, c) Prueba 2, presión transmembranaria de 7,5 psi, caudal de 3L/min y 25°C, d) prueba 4, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 3L/min y 25°C.



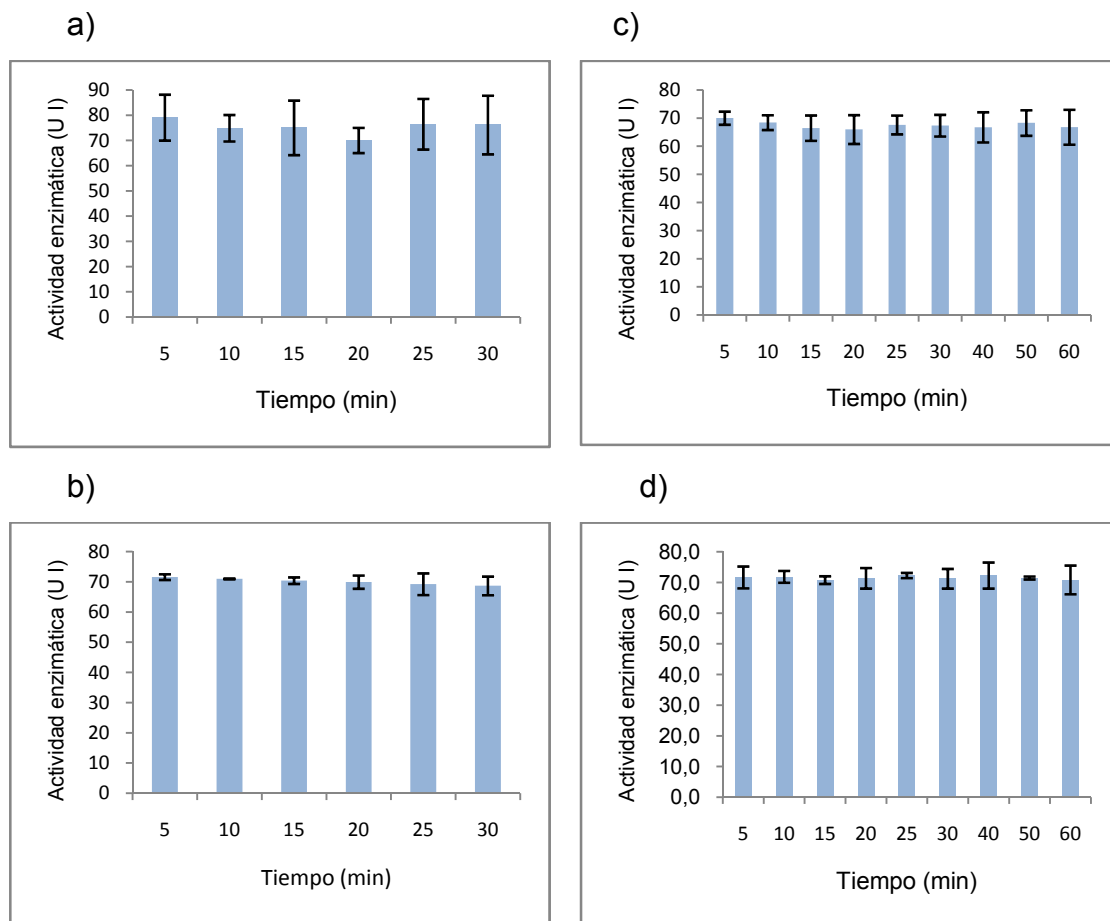
Fuente: Autor del Proyecto

Igualmente se cuantificó la actividad de la enzima presente en las muestras de retenido. La figura 14, registra el comportamiento en la actividad enzimática de la glucoamilasa en el tiempo para las cuatro pruebas realizadas.

Los resultados mostrados en la figura 14, permiten evidenciar que la actividad enzimática de la glucoamilasa se mantiene constante en el tiempo,

independientemente de la presión transmembranaria y caudal de alimentación utilizados en las pruebas.

Figura 14. Actividad enzimática de la glucoamilasa presente en el retenido Vs tiempo a) Prueba 1, 30 minutos, presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min y 25°C, b) Prueba 3, 30 minutos, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C, c) Prueba 2, 60 minutos, presión transmembranaria de 7,5 psi, caudal de 3L/min y 25°C, d) Prueba 4, 60 minutos, presión transmembranaria de 15psi, caudal de 3L/min y 25°C.

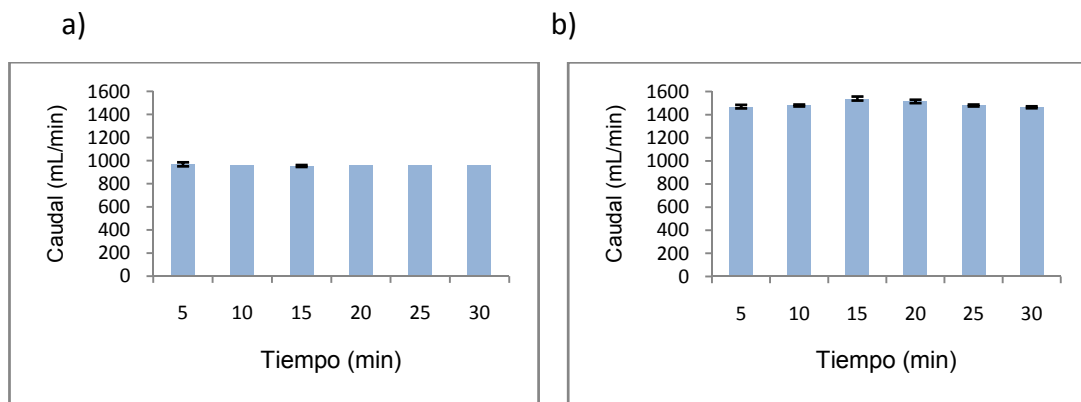


Fuente: Autor del Proyecto

Durante las pruebas de filtración de mezclas glucoamilasa-agua a concentración constante, se hizo un seguimiento del caudal de permeado, con el fin de

establecer una posible pérdida de permeabilidad debida a una probable colmatación de la membrana a causa de la enzima. Los resultados se resumen en la figura 15; como aclaración, solo se muestran los resultados para las pruebas realizadas a 6L/min y presiones transmembranarias de 7,5 (fig. 15a) y 15 psi (fig. 15b); las realizadas a 3L/min arrojaron resultados similares.

Figura 15. Caudales de permeado vs Tiempo, a) prueba 1 presión transmembranaria de 7,5psi, caudal de 6L/min, 25°C, b) prueba 3 presión transmembranaria de 15 psi, caudal de 6L/min y 25°C.



Fuente: Autor del Proyecto

En la figura 15, se observa que no hay una reducción en el flujo de permeado en el tiempo, lo cual indica que a la concentración a la que se realizaron las pruebas la membrana no presenta colmatación.

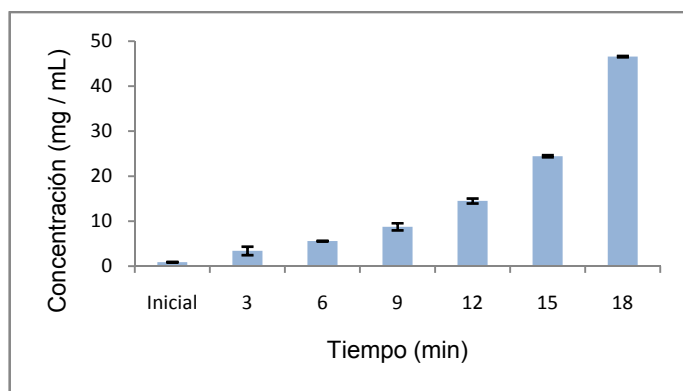
Los resultados mostrados hasta el momento (figuras 13, 14 y 15) evidencian que sin importar los caudales de alimentación (entre 3 y 6 L/min) y las presiones transmembranarias (entre 7,5 y 15 psi) a una temperatura de 25°C, no se presentan variaciones en los niveles de actividad enzimática, permeabilidad y selectividad (a tiempos de operación inferiores a 60 minutos); resultados que validan en una primera instancia la posibilidad de encaminar el proceso a una configuración en continuo.

3.3 FILTRACIÓN DE MEZCLAS GLUCOAMILASA-AGUA A CONCENTRACIÓN VARIABLE.

La prueba realizada para concentrar el extracto enzimático diluido de glucoamilasa se inició con 12.450mL de extracto diluido, cuya concentración de proteína en el retenido fue de 0,89 +/- 0,08 mg/mL. Al finalizar la prueba, se obtuvo 1L de extracto enzimático concentrado en el tanque de alimentación con una concentración de proteína de 46,6 +/-0,11 mg/mL (Ver figura 16).

En la figura 16, se observa el comportamiento exponencial descrito durante el proceso, donde se logró un factor de concentración volumétrico de 12,5 para el extracto enzimático diluido de glucoamilasa.

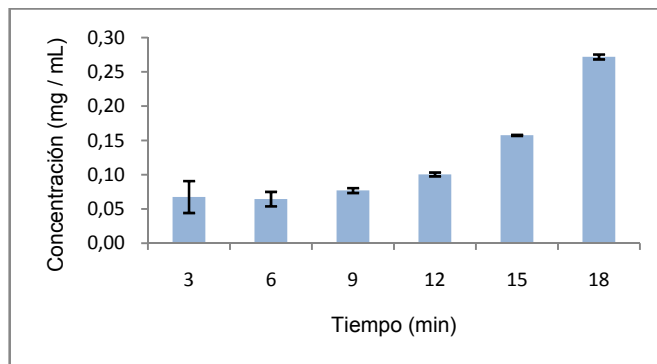
Figura 16. Concentración de proteína en retenido Vs Tiempo, Prueba de concentración de extracto enzimático diluido realizada a presión transmembranaria de 15psi, 6L/min y 25°C.



Fuente: Autor del Proyecto

Al cuantificar la proteína presente en las muestras de permeado tomadas durante la prueba, se observó una tendencia hacia el aumento de la concentración de proteína en el tiempo llegando a un valor de 0,27 +/- 0,003mg/mL a los 18 minutos de la prueba. Ver figura 17.

Figura 17. Concentración de proteína en permeado Vs tiempo, Prueba de concentración de extracto enzimático diluido realizada a presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C.



Fuente: Autor del Proyecto

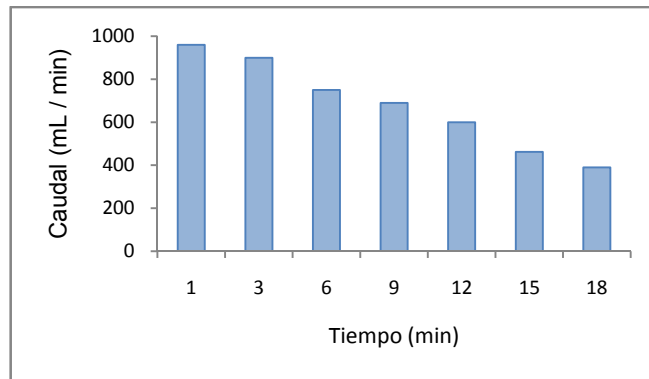
Al observar los resultados obtenidos, es evidente que un aumento en la concentración de proteína de la mezcla filtrada, genera algún tipo de pérdida en la selectividad de la membrana permitiendo el paso de glucoamilasa. Es importante mencionar que el principio de exclusión por tamaño de poro considera partículas esféricas y poros ideales homogéneos y cilíndricos, que en realidad no se presentan^[28]. Esto permite considerar el posible paso de partículas que teóricamente por criterios de tamaño, no deberían pasar (incluso al cambiar la concentración de la solución). Sin embargo, la cantidad de proteína presente en el retenido es 170 veces la proteína del permeado al final de la prueba.

Otro factor importante analizado en la prueba de concentración fue la medición del flujo de permeado en el tiempo. Esto nos da información acerca del grado de colmatación que sufre la membrana a medida que la mezcla se concentra.

La figura 18, muestra los caudales de permeado medidos durante la prueba de concentración del extracto enzimático diluido. La gráfica muestra una disminución en el flujo de permeado causada por la colmatación de la membrana a medida que aumenta la concentración de glucoamilasa en el retenido. Durante la prueba se

evidenció una pérdida del 60% en el caudal de permeado. Esta se considera normal debido a que la pérdida de permeabilidad no se presenta de forma abrupta.

Figura 18. Caudal de permeado Vs Tiempo (prueba de concentración), prueba realizada a una presión transmembranaria de 15psi, caudal de 6L/min y 25°C.



Fuente: Autor del Proyecto

CONCLUSIONES

Se pudo realizar el montaje y la implementación de un piloto de laboratorio de ultrafiltración que va a ser usado en la separación de hidrolizados de almidón de yuca. Se redactaron los protocolos de encendido, puesta en marcha, apagado y mantenimiento del piloto, con las recomendaciones para el uso adecuado de este.

Se logró estudiar el comportamiento del proceso de separación membranario (sistema UF pellicon 10 Biomax®) de una mezcla glucoamilasa-agua bajo condiciones de concentración constante, a 25°C, a presiones transmembranarias de 7,5 y 15 psi y caudales de alimentación de 3 y 6L/min. Se obtuvo un porcentaje de retención superior al 98,5% en todas las pruebas realizadas; independientemente de las condiciones de presión transmembranaria y caudal de alimentación utilizadas. Igualmente se evidenció ausencia de adsorción de glucoamilasa sobre la superficie de la membrana durante el tiempo de realización de la prueba (30 y 60 min), al nivel de concentración del extracto enzimático utilizado en la separación (0,0623 % p/p relación enzima/almidón).

Las condiciones a las que fue sometida la glucoamilasa como son, temperatura, presión transmembranaria, caudal de alimentación y estrés mecánico (sistema bombeo), no tienen un efecto adverso sobre la actividad enzimática ya que no se evidencia pérdida en ninguna de las pruebas realizadas, lo que permitiría un potencial uso en una configuración en continuo.

En la filtración de mezclas glucoamilasa-agua a concentración variable, se observó un aumento exponencial en la concentración de proteína del extracto enzimático y se logró un factor de concentración volumétrico de 12,5. Igualmente

se evidenció una disminución en el flujo, debido a la colmatación progresiva de la membrana; colmatación en parte irreversible.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo los estudios de separación de mezclas glucoamilasa-agua a temperaturas mayores de 25°C, con el objetivo de analizar el comportamiento de la actividad enzimática de la glucoamilasa y colmatación de la membrana con la temperatura.

Es necesario continuar con el estudio de la separación de hidrolizados de almidón de yuca realizando la filtración de la mezcla compleja (a distintos grados de hidrólisis) proveniente del reactor enzimático. Esto se debe hacer con el fin de analizar el porcentaje de retención de la membrana de ultrafiltración y el grado de colmatación que sufre la membrana sometida a las condiciones del proceso real de filtración.

Se recomienda realizar un análisis de la calidad de jarabes de glucosa obtenidos con el sistema de ultrafiltración, con el fin de garantizar la funcionalidad de la membrana de 10 kDa y garantizar la calidad de los jarabes que van a ser utilizados como sustrato en la obtención de biocombustibles.

Acoplar el sistema de ultrafiltración al proceso en continuo para la recirculación y reutilización de las enzimas y de la materia prima que no se transformó. Igualmente estudiar la actividad enzimática en el proceso de hidrólisis en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wankat, P. Ingeniería de procesos de separación. 2 ed. México: C.R.C Press, 2008. 768p. ISBN: 978-970-26-1281-0.
- [2] Pabby,A,Rizvi,S, Sastre,A. Membrane Handbook Separation, Miami:PearsonEducación, 2009. 1187p. ISBN: 978-0-8493-9549-9.
- [3] Winston,W.S,Sirkar,K, Membrane Handbook. New York: Chapman & Hall. 1991. 954p. ISBN: 0 – 412 – 98871-2.
- [4] Rautenbach,R,Albrecht,R. Membrane processes, RWTH Aachen: John Wiley & Sons, 1989. 459p. ISBN: 0 – 471 – 91110-0.
- [5] Wang,L, Chen,J.P, Hung,Y, Shammash,N. Membrane and desalination technologies. New york: Humana Press. 2011. 716p. ISBN:978-1-58829-940-6.
- [6] R. Baker, Membrane technology and applications. 2 ed. Menlo Park: John Wiley & Sons. 2004. 538p. ISBN: 0-470-85445-6.
- [7] Cui,Z.F, Muralidhara,H.S, Membrane technology. 1 ed. Oxford U.K: B.H. 2010. 289. ISBN. 978-1-85617-632-3.
- [8] Reddy, A, Mohan, D.J, Bhattacharya, A, Shah, V.J, GhoshP.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.

- [9] A.N. Cherkasov, S.V. Tsareva, A.E. Polotsky, Selective properties of ultrafiltration membranes from the standpoint of concentration polarization and adsorption phenomena, *Journal of Membrane science* 104 , 2005, 157-164.
- [10] H.M. Yeh, K.T. Chen, Improvement of filtration performance in tubular membranes using a twisted wire-rod assembly, *Journal of Membrane Science* 178, 2000, 43-53.
- [11] T.N. Shah, H.C. Foley, Andrew, L. Zydney, Development and characterization of nanopores carbon membranes for protein ultrafiltration, *Journal of Membrane Science* 295, 2007, 40-49.
- [12] H. Susanto, N. Widiasta, Ultrafiltration fouling of amylose solution: Behavior, characterization and mechanism, *Journal of Food Engineering* 95, 2009, 423-431.
- [13] N. Singh, M. Cheryant, Properties and composition of concentrates and syrup obtained by microfiltration of saccharified corn starch hydrolysate, *Journal of Cereal Science* 22, 1998, 315-320.
- [14] R. Johnson, G. Padmaja, S.N. Moorthy, 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.
- [15] U. Uthumporn, I.S. Zaidul, A.A. Karim, Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes, *Food and Bioproducts Processing* 88, 2010, 47-54.
- [16] Y. Chen, S. Huang, Z. Tang, X. Chen, Z. Zhang, Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α -amylase and glucoamylase, *Carbohydrate Polymers* 85, 2011, 272-275.

- [17] S. O'Brien, Y. Wang, Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase, *Carbohydrate Polymers* 72, 2008, 597-607
- [18] Y.N. Shariffa, A.A. Karim, A. Fazilah, I.S. Zaidul, Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature, *Food Hydrocolloids* 23, 2009, 434-440.
- [19] R. López, G.M. Hall, Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor, *Enzyme and Microbial Technology* 21, 1997, 398-404.
- [20] S. Morales, H. Álvarez, C. Sánchez, Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch, *Food and Bioproducts Processing* 86, 2008, 25-30.
- [21] G.D. Najafpour, C.P. Shan, Enzymatic hydrolysis of molasses, *Bioresource Technology* 86, 2003, 91-94.
- [22] A. Hinkova, I. Bohacenko, Z. Bubnik, M. Hrstkova, P. Jankovska, Mineral membrane filtration in refinement of starch hydrolysates, *Journal of Food Engineering* 61, 2004, 521-526.
- [23] L. Slominska, A. Przywecka, study on the membrane filtration of starch hydrolysates, *desalination* 162, 2004, 255-261.
- [24] L. Slominska, J. Niedbach, Study on the influence of the so-called filtration enzyme action on the membrane filtration process of wheat starch hydrolysates, *desalination* 241, 2007, 296-301.
- [25] J.M. Walker. *The protein protocols handbook*. 2 ed. New Jersey: 2002. 1172p. ISBN 0-89603-940-4.

[26] Ruiz, Mónica. 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.

[27] Corradini, E, Lotti, C, de Medeiros, E. Comparative studies of corn thermoplastic starches with different amylose content. *Polímeros*, vol.15, n.4, 268-273.

[28] Zeman, L, Zydney, A. Microfiltration and ultrafiltration principles and applications. Newark, Delaware: Marcel Dekker, Inc. 1996. 618p. ISBN: 0-8247-9735-3.