

# EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UNA MEMBRANA DE ULTRAFILTRACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE JARABE CONCENTRADO DE GLUCOSA A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF AN ULTRAFILTRATION MEMBRANE ON THE PRODUCTION OF GLUCOSE SYRUP FROM THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF THE CASSAVA STARCH

Diego F. ROJAS V.<sup>1</sup>, Carlos E. MEJIA G.<sup>2</sup> Carlos FIGUEROA M.<sup>2\*</sup>

## RESUMEN

En este trabajo se evalúa la eficiencia de una membrana de ultrafiltración utilizada en el proceso de concentración de jarabe glucosado, el cual es producido a partir de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca, por medio de las enzimas Termamyl<sup>®</sup> (α-amilasa) y AMG<sup>®</sup> (amiloglucosidasa). Los parámetros evaluados son: presión, temperatura, viscosidad (concentración de glucosa) y velocidad de rotación en revoluciones por minuto (rpm), demostrándose que las mejores condiciones de trabajo son 250 rpm, 5 psi, y 50°C (temperatura de proceso). El seguimiento del proceso se realiza evaluando la concentración de glucosa por medio del método de la glucosa oxidasa, la concentración de azúcares reductores con el método del DNS, y la determinación de proteínas por el método de Hartree-Lowry.

**Palabras clave:** Ultrafiltración, Termamyl<sup>®</sup>, AMG<sup>®</sup>, hidrólisis enzimática, jarabe glucosado, Almidón de yuca.

## ABSTRACT

This work presents the evaluation of the efficiency of an ultrafiltration membrane on the concentration of glucose syrup, which is produced by the enzymatic hydrolysis of the cassava starch, with the enzymes Termamyl<sup>®</sup> (α-amylase) and AMG<sup>®</sup> (amyloglucosydase). The evaluated parameters are: pressure, temperature, viscosity (concentration of glucose) and rotation speed in revolutions per minute (rpm). The best working conditions are 250 rpm, 5 psi, and 50°C (process temperature). The evaluation of the process is carried out by determining the concentration of glucose, reducing sugars and proteins by the glucose oxidase, the DNS and the Hartree-Lowry methods respectively.

**Key Words:** Ultrafiltration, Termamyl<sup>®</sup>, AMG<sup>®</sup>, enzymatic hydrolysis, glucose syrup, cassava starch.

---

1 Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A 1226, Medellín, Colombia.

2 Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia. A.A 1226, Medellín, Colombia.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cafima@carios.udea.edu.co

## INTRODUCCIÓN

La ultrafiltración es un proceso basado en membranas microporosas que actúan como barreras capaces de separar los componentes de una mezcla cualquiera de acuerdo a su tamaño y forma; estas membranas soportan flujos tangenciales que minimizan la saturación [1]. El proceso de ultrafiltración depende básicamente de factores como la temperatura, la presión, el flujo tangencial y la viscosidad. Es importante resaltar que el comportamiento de las membranas, durante el proceso de ultrafiltración depende de propiedades como el tamaño del poro, porosidad y área de la membrana; además de la importancia de las interacciones que pueden presentarse entre la membrana y el soluto que va ser ultrafiltrado [2].

El proceso de ultrafiltración ha venido siendo utilizado con múltiples fines en el área de la biotecnología. En este caso el objetivo de la ultrafiltración es obtener un jarabe glucosado purificado, y aumentar la concentración y la recuperación de enzimas para ser reutilizadas.

La industria de producción de edulcorantes calóricos y no calóricos a nivel mundial está en auge, ya que la industria de alimentos trata de innovar día a día utilizando procesos que garanticen la calidad y la disminución de los costos. En nuestro país la producción de jarabes glucosados y fructosados a partir del almidón de yuca se ha venido desarrollando a nivel de laboratorio; aun no se tiene resultados a mayor escala. Este proyecto evalúa la eficiencia de la membrana de ultrafiltración en la producción de jarabe glucosado a partir del almidón de yuca, con el fin de observar el descenso en la eficiencia del ultrafiltro cuando se aumentan las concentraciones de jarabe, además de evaluar la diferencia que existe entre la ultrafiltración de éste y la del agua como parámetros iniciales de escalamiento industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los equipos y reactivos utilizados en este trabajo son:

- Equipo de ultrafiltración Millipore<sup>®</sup> de membrana de polietersulfona de 50 kDa de 1 ft<sup>2</sup>.
- Bomba peristáltica: Heidolph<sup>®</sup> PD5106.
- Espectrofotómetro de U.V. Spectronic Genesis<sup>®</sup> 2PC.
- Biorreactor BioStat<sup>®</sup> 5 L, con sistema de control.
- Biorreactor EPL<sup>®</sup> con agitación y temperatura controlada.
- pHmetro: pH2000 CII.
- Almidón de yuca: Almiyuca<sup>®</sup>.
- Enzimas  $\alpha$ -amilasa (Termamyl<sup>®</sup>) y enzima amiloglucosidasa (AMG<sup>®</sup>).
- Kit para determinación de glucosa, Glucose Liquicolor<sup>®</sup>.
- Agua destilada.
- Ácido cítrico, JT Baker<sup>®</sup>.
- CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, JT Baker<sup>®</sup>.
- Glucosa anhidra, JT Baker<sup>®</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Producción de jarabe glucosado

La producción de jarabe glucosado se realiza en dos etapas: la licuefacción y la sacarificación. Para la licuefacción se utiliza un sistema Batch de 8 L, el cual se realiza con una solución de almidón de yuca (400 g/L), pH 5.5. Para activar la enzima se requiere una concentración de Ca<sup>+2</sup> de 10 ppm además de adicionar 0.5 mL/L de

Termamyl® ( $\alpha$ -amilasa). El proceso se realiza bajo unas condiciones temperatura de 85 °C, 700 rpm, manteniendo estas condiciones durante 2.5 h.

En la sacarificación se utiliza un sistema Batch de 5 L el cual es alimentado con el producto de la licuefacción (maltodextrinas); este sistema es ajustado a un pH de 4.5 (con ácido cítrico). Después se le adiciona 1 mL/L de AMG®. El proceso se realiza a 700 rpm, y 55°C, manteniendo estas condiciones durante 16 h, en biorreactor BioStat®. El producto de esta etapa de sacarificación es el jarabe glucosado (la hidrólisis enzimática del almidón de yuca a glucosa es del 95% de eficiencia).

### Determinación de glucosa

Por medio del método Glucosa Oxidasa (Liquicolor de Human®), se cuantifica la cantidad de glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática del almidón de yuca, tanto en el proceso de licuefacción como en el de sacarificación. El método (recomendado por el fabricante del - Kit para determinación de glucosa, Glucose Liquicolor®) utiliza la enzima glucosa oxidasa y un patrón de glucosa de 1 g/L. Para esto, se realiza diluciones de la muestra a analizar (1/1000 para el licuado y 1/2000 para el sacarificado). Posteriormente, se deja reaccionar un mL de glucosa oxidasa con 10  $\mu$ L de muestra, agua como blanco y patrón de glucosa. La reacción se lleva a cabo por 10 min. a temperatura ambiente. Luego, se determina la absorbancia (A) en el Spectronic Genesis® a  $\lambda=500$  nm. La concentración de la muestra se determina por la relación:  $A_{\text{muestra}}/A_{\text{patrón}} = (C_{\text{muestra}}/C_{\text{patrón}}) \times \text{dilución}$ .

### Determinación de azúcares reductores

La determinación de los azúcares reductores se realiza por el método ácido-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Gail Lorenz Miller [3]. Éste se realiza a las muestras del proceso de licuado y sacarificado. Se utiliza para cuantificar maltodextrinas y verificar el desarrollo del proceso enzimático en cada fase del proceso.

### Ultrafiltración

Un diagrama del proceso se observa en la figura 1. Se evalúa la capacidad del ultrafiltro utilizando agua destilada (como sustancia a ultrafiltrar), variando en el proceso la presión y las rpm de la bomba peristáltica, dejando el sistema a temperatura ambiente. Se evaluó la capacidad a 100 rpm y 0, 2.5, 5, 7.5, y 10 psi. A 150 rpm y 0, 2.5, 5, 7.5, y 10 psi. Y así sucesivamente con 200, 250, 300, 400 y 500 psi. El cambio en la velocidad de flujo de permeado (a 3 diferentes rpm) se observan en la figura 2.

### Determinación del N.W.P.

También es necesario evaluar el NWP, el cual es un parámetro recomendado por el fabricante, para verificar que la eficiencia de la membrana de ultrafiltración no haya variado más del 10% respecto al valor inicial dado por el fabricante de 28; Este valor se determina por medio de la fórmula:

$$NWP = \frac{R \times K}{A \times P}$$

K= Constante 1 a 25°C.

A= Área de la membrana (1 ft<sup>2</sup>).

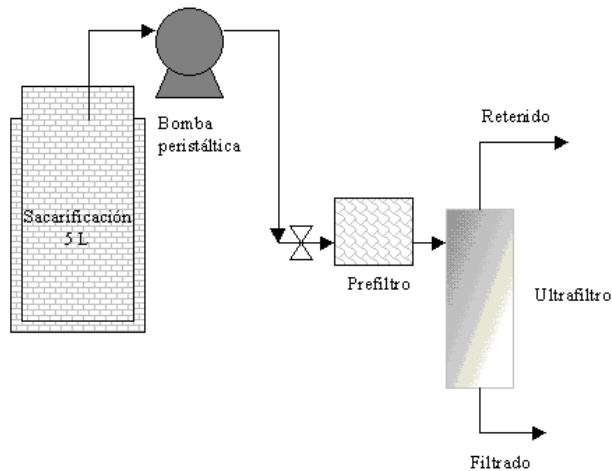
P= Presión de trabajo (psi).

R= Velocidad de permeado (mL/min).

Estos valores se toman a 10 psi de presión para cada valor de rpm. La variación de NWP a diferentes rpm se observa en la figura 3.

Al final del proceso de sacarificación el jarabe obtenido, el cual contiene enzimas, maltodextrinas y glucosa, se ultrafiltra en el equipo de ultrafiltración Millipore®. El jarabe viene del biorreactor a 50 °C a la velocidad de flujo del permeado y del retenido a 250 rpm, 5 y 15 psi.

La membrana de polietersulfona de 50kDa, del equipo de ultrafiltración Millipore®, ayuda a obtener un jarabe glucosado libre de enzimas (Termamyl® y AMG®) y maltodextrinas, residuos que pueden ser reutilizados.



**Figura 1.** Proceso de ultrafiltración.

### Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realiza por el método de HARTREE-LOWRY [4], para la curva de calibración se utiliza como patrón albúmina de suero bovino (BSA).

La cuantificación de proteínas se realiza a las muestras provenientes del permeado y del retenido, a los 0, 5, 10, 15 y 30 minutos del proceso de ultrafiltración.

### Protocolo de desinfección

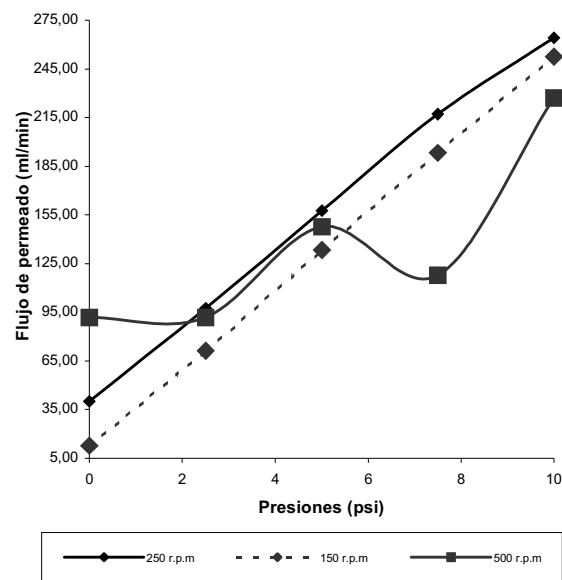
Se utiliza una solución de NaOH 0.1N a 45 +/- 5 °C, la cual es pasada a través del prefiltro y del ultrafiltro y se deja en contacto durante 60 +/- 5 min, para sanitizar, desinfectar y remover material particulado de la membrana de polietersulfona, luego una solución de 300 ppm de hipoclorito de sodio a 25°C es también ultrafiltrada durante 30 min. Este procedimiento se realiza después de cada cambio de solución ultrafiltrada.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

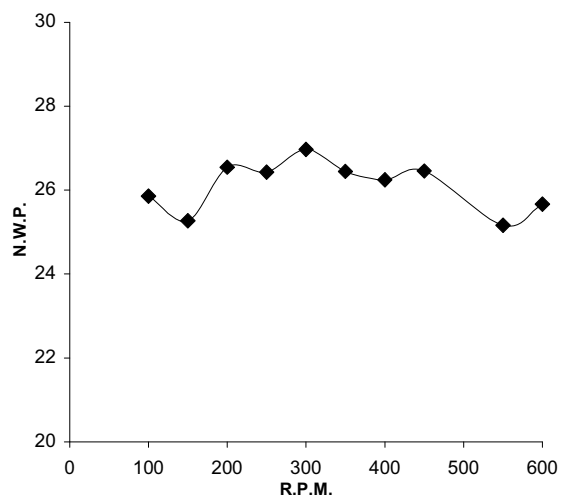
### Evaluación inicial del ultrafiltro con agua destilada

Analizando el proceso de ultrafiltración con agua destilada, se realiza una gráfica para

visualizar y facilitar el análisis de cuales son las condiciones óptimas de trabajo (véase figura 2). Las condiciones óptimas de trabajo son: 250 rpm y 5 psi, puesto que bajo estas condiciones se obtiene la mayor velocidad de filtración, mientras que con jarabe glucosado la velocidad de filtración es cercana a 40 mL/min, la cantidad de flujo ideal para realizar el proceso de obtención de jarabe glucosado en continuo, en un posterior estudio.



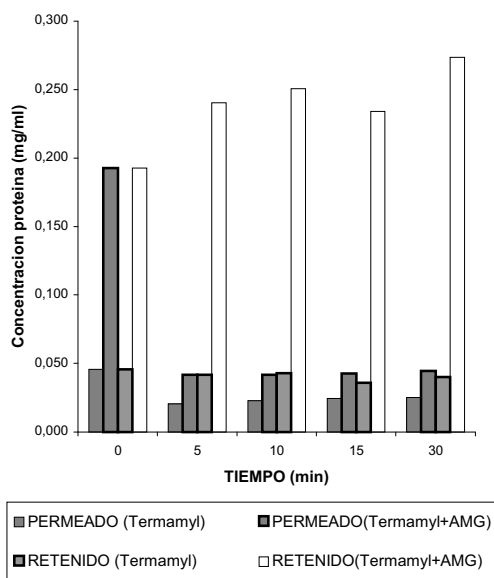
**Figura 2:** Cambio en la velocidad de flujo del permeado en función de la presión.



**Figura 3:** Variación de NWP a diferentes rpm, utilizando agua como sustancia a ultrafiltrar, a 10 psi.

### Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se considera como cero (0), por debajo de 0.05 mg/mL, por esto se observa que en el permeado (tanto con termamyl® como con termamyl® + AMG®) no se encuentra proteína, mientras que en el retenido puede verse que la concentración va aumentando con el tiempo (Véase figura 4).



**Figura 4:** Determinación de proteínas (enzimas termamyl® y AMG®) en el permeado y en el retenido a 0, 5, 10, 15 y 30 min.

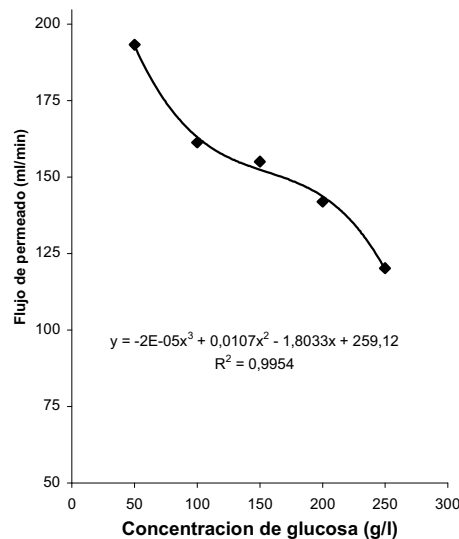
### Matriz ideal

Para verificar el funcionamiento del ultrafiltro a condiciones ideales, se evalúa la velocidad del permeado a diferentes concentraciones de glucosa (matriz ideal: agua + glucosa anhidra). Los resultados obtenidos pueden verse en la figura 5 la cual muestra el comportamiento del flujo a diferentes concentraciones de glucosa; dicho comportamiento mostró ser polinómico de tercer grado.

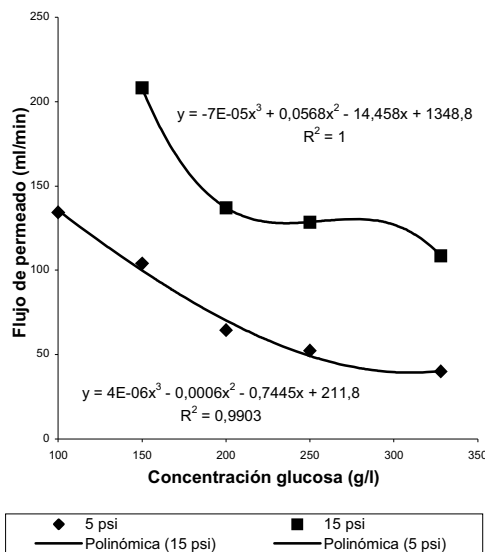
### Matriz real

Se evalúa el comportamiento del ultrafiltro bajo condiciones reales (Matriz real: producto de la sacarificación, jarabe glucosado [5]), obtenido a partir de la hidrólisis enzimática del al-

midón de yuca. A éste se le practican diferentes diluciones a partir de una concentración de glucosa de 328 g/L, el proceso de ultrafiltración se mantiene bajo las siguientes condiciones 5 y 15 psi, 50 °C y 250 rpm. Los resultados se presentan en la figura 6. De estos se observa que el comportamiento también es polinómico de tercer grado, siendo esto un resultado esperado con base en lo encontrado en la matriz ideal.



**Figura 5:** Evaluación del flujo del permeado con una matriz ideal a diferentes concentraciones de glucosa. Condiciones de operación: 50°C, 250 rpm y 5 psi.



**Figura 6:** Evaluación del flujo del permeado con una matriz real a diferentes concentraciones de jarabe glucosado a 50 °C, 250 rpm, 5 y 15 psi.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este proyecto muestran que las condiciones ideales de operación del ultrafiltro son 250 rpm y 5 psi. Con estas condiciones se obtiene una velocidad de flujo del permeado de aproximadamente 40 mL/min, en el proceso de ultrafiltración del producto de sacarificado (jarabe glucosado). Esto es importante de analizar porque en el momento de escalar el proceso a nivel industrial, la velocidad esperada de producción de jarabe glucosado es de 30 a 50 mL/min; por lo tanto esta velocidad de flujo satisface las necesidades del proceso.

El valor encontrado de N.W.P. (el cual es un valor que debe ser constante, aproximadamente de 28 +/- 10%, aun con cambios de revoluciones), no muestra una variación significativa respecto con el valor suministrado por el fabricante, por lo tanto se considera que el ultrafiltro se encuentra bajo condiciones óptimas de trabajo.

La concentración de proteínas en el permeado y el retenido demuestra que el siste-

ma de ultrafiltración es muy eficiente, por que no permite el paso de proteínas al permeado, lo cual es muy importante para el proceso, teniendo en cuenta que cuando este proyecto se realice en continuo se estará en la capacidad de reutilizar las enzimas [6, 7].

Para escalar este proceso a un nivel industrial (montaje del sistema en continuo), es necesario tener en cuenta que la variación del flujo del permeado en función de la concentración ha mostrado ser polinómico de tercer grado y no lineal como se había estudiado [8], por lo tanto se requiere de un estudio matemático adecuado para poder lograr el escalamiento del proceso. El comportamiento es debidamente validado mediante condiciones ideales de solución de glucosa (libre de enzimas y maltodextrinas). Luego, se encuentra el mismo comportamiento cuando se ultrafiltra la matriz real (jarabe glucosado) a diferentes presiones y a diferentes concentraciones. De esto se concluye que la velocidad del permeado no depende de la presión, ni de la viscosidad, sino de la concentración de glucosa).

## AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de biotecnología microbiana y biología molecular de la escuela de bacteriología de la Universidad de Antioquia y a la estudiante de pregrado de Química farmacéutica Paola Andrea Zapata Ocampo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vega, V., Pino, A. L., Saavedra, F. A. (1996) Ultrafiltración y osmosis inversa en el procesamiento de alimentos I y II. Principios, equipamiento y aplicaciones. Contribuciones científicas y tecnológicos. 24 (112) :1 – 28.
2. Torres, M.R., Ramos, G. A., Soriano, E. (1996) Factores que determinan el comportamiento de las membranas de ultrafiltración. Alimentación, equipos y tecnología. 15 (03): 119 – 123.
3. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31 : 426.
4. Caprett, D. R. Hartree-Lowry and Modified Lowry Protein Assays. Rice University 1995, Updated 27 Jun 2000. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/lowry.html>
5. Torres, M.R., Ramos, G., A. Soriano, E. (1996) Ultrafiltración de disoluciones proteicas: causas del descenso del flujo. Alimentación, equipos y tecnología. 15 (10) : 97–103.
6. Gaouar, O., Aymard, C., Zakhia, N., Rios, G.M. (1997) Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch into Maltose Syrup in a Continuous Membrane Reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 69 : 367–375.
7. Prazeres, D.M. Cabral, J. M. (1994.) Enzymatic membrane biorreactor and their applications. Enzyme Microb. Technol. 16 : 738-750.
8. Florez, F.A., Uribe R., O.E., Dabeiba, N. (2001) Sacarificación enzimática para la producción de jarabe glucosado. Revista Facultad de Ingeniería (Medellín). 22 : 81–90.

*Fecha de Recibo: Noviembre 12 de 2002  
Fecha de Aceptación; Marzo 4 de 2003*