

**CRISTALIZACIÓN DE FRUCTOSA A PARTIR DE PREPARADOS DE ALMIDÓN
DE YUCA**

WILSON GERMAN OYOLA NARANJO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006

**CRISTALIZACIÓN DE FRUCTOSA A PARTIR DE PREPARADOS DE ALMIDÓN
DE YUCA**

WILSON GERMAN OYOLA NARANJO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico.

Director

Dr. Qco. JOSE ANTONIO HENAO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA

2006

*A mi hija que es la luz de mis ojos,
a mi esposa, mi madre, mi padre
y mis hermanas, a mis maestros
gracias por sus conocimientos,
y definitivamente a Dios
por darme sabiduría.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor Daniel Ricardo Molina quien dirigió inicialmente este proyecto y por sus aportes en la realización del mismo, así como al profesor William Larrota.

Al director del proyecto profesor José Antonio Henao.

A mi familia por su apoyo constante.

A mis compañeros de laboratorio Sandra Pinto, Alejandra Duarte, Alberto Sánchez, Fernando Anaya por su apoyo y sus aportes en el proyecto.

A mis maestros Dr. Vladimiro Kouznetsov, Dr. Fernando Aya, Dr. Jairo Martínez, Dr. Antonio Henao, Dr. Alirio Palma, Dr. Fernando Martínez, MSc. Daniel Molina, MSc. Helena Arenas, MSc. José Carlos Gutiérrez, MSc. Jairo Camargo, MSc. Leonor Yamile Vargas por sus conocimientos y consejos que fueron muy bien recibidos, GRACIAS.

A mis compañeros y amigos de la carrera.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	20
1. MARCO TEORICO	22
1.1 LA YUCA	22
1.2 EL ALMIDÓN	25
1.2.1 Estructura química	27
1.2.2 Hidrólisis	27
1.2.2.1 Hidrólisis ácida.	27
1.2.2.2 Hidrólisis enzimática.	27
1.2.3 Enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis del almidón.	28
1.2.3.1 α -Amilasa. (α -1,4-glucan- glucanohidrolasa).	28
1.2.3.2 Glucoamilasa. (amilo-glucosidasa, δ -amilasa, α -(1 \rightarrow 4)glucan- glucohidrolasa, exo-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosidasa).	29

1.3	JARABES DE D-GLUCOSA	30
1.3.1	Licuefacción con α -amilasa	31
1.3.2	Sacarificación con glucoamilasa	31
1.4	ISOMERIZACIÓN DE LA GLUCOSA A FRUCTOSA	32
1.5	PURIFICACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA	34
1.5.1	DOWEX MARATHON A2	34
1.5.1.1	Remoción de oxígeno	35
1.5.2	DOWEX MARATÓN C	35
1.6	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA MEZCLA GLUCOSA-FRUCTOSA	36
1.6.1	Mecanismo de la separación	37
1.7	EVAPORACIÓN	39
1.7.1	Factores del proceso	39
1.8	DECOLORACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO	40
1.8.1	Tamaño de poro	41
1.8.2	Temperatura y pH	42

1.9	CRISTALIZACIÓN DE FRUCTOSA	42
1.9.1	Limitaciones	42
1.10	DIFERENCIA ENTRE GLUCOSA Y FRUCTOSA	46
1.11	ISOMEROS DE FRUCTOSA	46
1.12	DIFERENCIA ENTRE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA Y LA FRUCTOSA CRISTALINA	47
1.13	PROPIEDADES ENDULZANTES	47
1.13.1	Sinergia	49
1.13.2	Dulzor percibido	50
1.14	DENSIDAD DE LA FRUCTOSA CRISTALINA	50
1.15	PROPIEDADES VISCOSAS	51
2.	MARCO DE ANTECEDENTES	53
3.	METODOLOGÍA	59
3.1	EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA	59
3.2	HUMEDAD	59
3.3	SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN	

DE JARABES DE GLUCOSA Y FRUCTOSA.	60
3.3.1 Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de maltosa.	60
3.3.1.1 Preparación del reactivo DNS.	60
3.3.1.2 Preparación de las soluciones de maltosa.	61
3.3.1.3 Procedimiento para obtener los datos de la curva de calibración.	61
3.3.2 Curva de calibración de absorbancia en función de Concentración de glucosa.	61
3.3.3 Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa.	62
3.3.4 Determinación de la actividad enzimática de glucoamilasa.	63
3.3.5 Determinación de la actividad enzimática de la glucosa isomerasa.	64
3.4 SEGUIMIENTO ANALÍTICO DE LOS JARABES DE FRUCTOSA, SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y EVAPORACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA.	65
3.4.1 Curvas de calibración de glucosa y fructosa.	66
3.5 GELIFICACIÓN, LICUEFACCIÓN, SACARIFICACIÓN DEL ALMIDÓN E ISOMERIZACIÓN.	66
3.5.1 Gelificación	66

3.5.2	Licuefacción con α -amilasa	66
3.5.3	Sacarificación con AMG	67
3.5.4	Isomerización con la enzima glucosa isomerasa	67
3.6	UNIDAD DE INTERCAMBIO IONICO	68
3.7	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FRUCTOSA-GLUCOSA	68
3.8	UNIDAD DE EVAPORACIÓN	68
3.9	DECOLORACIÓN CON CARBON ACTIVADO	69
3.10	CONCENTRACIÓN AL VACÍO	69
3.11	ETAPAS DE CRISTALIZACIÓN	69
4.	ANÁLISIS Y RESULTADOS	71
4.1	EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA	71
4.2	HUMEDAD	72
4.3	SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA Y FRUCTOSA.	72
4.3.1	Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de maltosa.	72

4.3.2	Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de glucosa.	73
4.3.3	Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa.	74
4.3.4	Determinación de la actividad enzimática de glucoamilasa.	74
4.3.5	Determinación de la actividad enzimática de la glucosa isomerasa.	75
4.4	SEGUIMIENTO ANALÍTICO DE LOS JARABES DE FRUCTOSA, SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y EVAPORACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA.	76
4.4.1	Curvas de calibración de glucosa y fructosa.	76
4.5	JARABE DE GLUCOSA	78
4.5.1	Condiciones de Gelificación	78
4.5.2	Licuefacción con α -amilasa.	78
4.5.3	Sacarificación con glucoamilasa.	80
4.6	ISOMERIZACIÓN DE GLUCOSA A FRUCTOSA	81
4.7	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FRUCTOSA-GLUCOSA	82
4.8	EVAPORACIÓN	87
4.9	DECOLORACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO	88

4.10	CONCENTRACIÓN AL VACÍO	89
4.11	ETAPAS DE CRISTALIZACIÓN	89
4.12	ANÁLISIS DE FRUCTOSA	92
5.	CONCLUSIONES	94
6.	RECOMENDACIONES	96

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Propiedades generales del almidón de yuca.	26
Tabla 2. Propiedades de edulcorantes comunes	48
Tabla 3. Viscosidad de soluciones acuosas de fructosa a 30 °C	41
Tabla 4. Condiciones estándar para la determinación de la actividad de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada (sweetzyme-t)	64
Tabla 5. Extracción de almidón de yuca	71
Tabla 6. Determinación de la humedad de yuca (10 g de muestra)	72
Tabla 7. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de maltosa	73
Tabla 8. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de glucosa	73
Tabla 9. Actividad de la enzima α -amilasa	74
Tabla 10. Actividad de la enzima glucoamilasa	75
Tabla 11. Actividad de la enzima glucosa isomerasa.	75

Tabla 12. Concentración de soluciones de fructosa y su ángulo de rotación específica.	76
Tabla 13. Concentración de soluciones de glucosa y su ángulo de rotación específica.	76
Tabla 14. Condiciones de gelificación.	78
Tabla 15. Condiciones de trabajo de la enzima fungamyl 2500 BG	79
Tabla 16. Condiciones de trabajo de la enzima glucoamilasa AMG 1000 BG y resultados del jarabe de glucosa	80
Tabla 17. Composición jarabe de fructosa	81
Tabla 18. Datos para la determinación de las mejores condiciones para la separación cromatográfica.	83
Tabla 19. Condiciones de trabajo para la resina Monosphere 99 empleada en la separación cromatográfica de fructosa.	84
Tabla 20. Datos obtenidos de la separación cromatográfica.	86
Tabla 21. Resultados de la separación cromatográfica de fructosa	86
Tabla 22. Condiciones para la decoloración del jarabe de alta fructosa.	88
Tabla 23. Condiciones para la cristalización de fructosa	91
Tabla 24. Resultados de la cristalización de fructosa	91

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Corte transversal de la raíz de yuca.	24
Figura 2. Reacción enzimática de la glucosa isomerasa	33
Figura 3. Columnas de intercambio iónico para purificación de jarabes de fructosa	36
Figura 4. Esquema de producción de jarabes de alta fructosa de 55%	37
Figura 5. Diagrama de separación cromatográfica en continuo con salidas de productos.	38
Figura 6. Regiones involucradas en la supersaturación	45
Figura 7. Isómeros estructurales de glucosa y fructosa	46
Figura 8. Tautómeros de fructosa	46
Figura 9. Sinergia con sacarosa, dulzor relativo de la mezcla fructosa /glucosa.	50
Figura 10. Intensidad endulzante percibida	50

Figura 11. Reactor para Gelificación, Licuefacción y Sacarificación de almidón.	97
Figura 12. Columna de isomerización de glucosa a fructosa	82
Figura 13. Columnas de separación cromatográfica	85
Figura 14. Separación cromatográfica de fructosa	87
Figura 15. Columna de decoloración del jarabe de fructosa	88
Figura 16. Sistema de cristalización de fructosa y cristales de fructosa	90

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
1. ANEXO .1 Curva de calibración de maltosa	102
2. ANEXO 2. Curva de calibración de glucosa	103
3. ANEXO 3. Curva de polarimetría de fructosa y glucosa	104
4. ANEXO 4. Ecuaciones empleadas para la relación fructosa-ángulo de polarimetría y concentración de sólidos totales	105
5. ANEXO 5. Perfil de difracción de rayos X	106
6. ANEXO 6. Espectro de absorción IR	109

RESUMEN

TÍTULO*:

CRISTALIZACIÓN DE FRUCTOSA APARTIR DE PREPARADOS DE ALMIDÓN DE YUCA

Wilson Germán Oyola[†], Jose Antonio Henao[‡], Daniel Ricardo Molina

Palabras claves: yuca, almidón, jarabe, isomerización, cristalización.

La yuca es una especie de raíz que presenta un porcentaje de almidón del 30% (varía según la especie). Gracias a la cantidad de almidón que presenta la yuca, para darle un valor agregado, se orientó al almidón por la ruta de edulcorantes obteniéndose como productos los jarabes de glucosa y jarabes de fructosa del 55%.

La fructosa es un carbohidrato, que presenta características importantes en la industria de los edulcorantes tales como alto poder endulzante. Comparado con un patrón de medida (sacarosa, valor de dulzor 100), la fructosa presenta un valor de 180 por tanto más dulce que la sacarosa. Además, la fructosa se usa como endulzante para dietas especiales en pacientes con problemas de azúcar, es bajo en calorías, y presenta otras propiedades importantes en la industria.

Este trabajo se propuso la cristalización de fructosa a partir de jarabes de fructosa del 42%, para lo cual fue necesario: extracción de almidón de la región interna de la yuca, hidratación del almidón con tratamiento térmico a 70° C (gelificación), tratamiento enzimático para la hidrólisis del almidón a glucosa con α -amilasa (Fungamil 2500 BG) y amiloglicosidasa (AMG 1000BG) enzimas proveídas por NOVO NORDISK, tratamiento con la enzima soportada glucosa isomerasa (SWEETZIME T) que conduce a la isomerización de glucosa en fructosa hasta un 45% en peso de sólidos totales, eliminación de sales por intercambio iónico, separación cromatográfica con una resina de intercambio catiónico en la forma de sal de Ca (DOWEX MONOSPHERE 99) que permite la obtención de jarabes de fructosa del 94,6% en base sólida; para terminar con la cristalización de la fructosa por medio de un control riguroso de la temperatura y adición de núcleos de cristalización. La fructosa obtenida fue caracterizada por análisis IR y análisis de Difracción de Rayos X.

* Trabajo de grado

[†] [‡] Grupo de Investigación en Química Estructural, Centro de Investigación en Biomoléculas "CIBIMOL", Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, apartado aéreo 678, fax: (7) 6347166. Bucaramanga. Colombia. wilson_oyola@yahoo.es, jahenao@uis.edu.co.

SUMMARY

TITLE ^{*}:

CRYSTALLIZATION OF FRUCTOSE STARTING FROM PREPARED OF STARCH OF YUCCA

Wilson Germán Oyola[†], José Antonio Henao[‡], Daniel Ricardo Molina

Key words: yucca, starch, syrup, isomerization, crystallization.

The yucca is a kind of root that presents a percentage of starch of 30% (it varies according to the species). Thanks to the quantity of starch that presents the yucca, to give him an added valued, it was guided to the starch by the sweetener route obtaining as products the syrups of glucose and syrups of fructose of 55%.

The fructose is a carbohydrate that presents characteristic important in the industry of the sweeteners such as high capacity to sweeten. Compared with to measure pattern (sucrose, valued of sweetness 100), the fructose presents to it valued of 180 therefore sweeter than the sucrose. Also, the fructose is used as sweetener for special diets in patient with problems of sugar, it is low in calories, and it presents other important properties in the industry.

This work intended the fructose crystallization starting from syrups of fructose of 42%, for that which was necessary: extraction of starch of the internal region of the yucca, hydrate of the starch with thermal treatment to 70° C (gelatinization, enzymatic treatment for the hydrolysis of the starch to glucose with α -amylase (Fungamil 2500 BG) and amiloglucosidase (AMG 1000BG) enzymes obtained for NOVO NORDISK, treatment with the supported enzyme glucose isomerase (SWEETZIME T) that drives to the isomerization of glucose in fructose until 45% in weight of total solids, elimination of salts for ionic exchange, separation chromatographic with to resin cationic exchange in the form of salt of Ca (DOWEX MONOSPHERE 99) that allows the obtaining of syrups of fructose of 94,6% dry base solids; to finish with the crystallization of the fructose by means of to rigorous control of the temperature and addition of crystallization nuclei. The obtained fructose was characterized by analysis to IR and analysis of diffraction of rays X.

^{*} Project degree

^{† ‡} Group of Investigation in Structural Chemistry, Center of Investigation in Biomolecules " CIBIMOL ", School of Chemistry, School of Sciences, Industrial University of Santander, Post air 678, fax: (7) 6347166. Bucaramanga. Colombia. wilson_oyola@yahoo.es, jahenao@uis.edu.co.

INTRODUCCIÓN

La yuca es una de las principales plantas útiles tropicales difundidas en todos los continentes. La diversidad más amplia del género *Manihot* se encuentra en el Brasil, sur occidente de México y Guatemala. La distribución de la yuca en otros continentes se inició después del descubrimiento de América. La yuca actualmente se ha constituido en un cultivo de gran importancia en todas las regiones tropicales del mundo, tanto por el consumo de raíces frescas, es decir como cultivo de subsistencia, como por su uso agroindustrial. La utilización de productos procesados de yuca, se podría extender desde el uso de la harina para reemplazar importaciones de cereales para la elaboración de pan, hasta la producción de edulcorantes de alto poder endulzante y bajos niveles caloríficos.

Los estudios realizados a partir del almidón de tres variedades de yuca, Armenia, Chile y Amarga, han permitido al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Industrial de Santander desarrollar productos de competencia en el área de los edulcorantes, ya que éstos provienen del tratamiento de almidones de maíz principalmente. Además, estos estudios indican que los procesos para los diversos almidones (de las tres variedades) no presentan variabilidad significativa, por lo cual se pueden emplear cualquier tipo de yuca para su desarrollo.

El tratamiento que se ha realizado al almidón de yuca en esta área consiste en la extracción del almidón a partir de la yuca; la gelificación, licuefacción (enzimática), sacarificación (enzimática), purificación y evaporación para los jarabes de glucosa, e, isomerización de los anteriores (enzimática) y la evaporación en la producción de jarabes de alta fructosa (55% fructosa). Debido a que en el ámbito mundial

estos productos y, además, la purificación de los jarabes de alta fructosa HFSC (High Fructose Syrup Corn) de 90% fructosa y la cristalización de fructosa, se han desarrollado e implementado en el ámbito industrial, se quieren obtener estos productos de igual manera a partir de la yuca, y seguir la ruta de los edulcorantes con el fin de estudiar la competitividad de los productos del maíz con los de la yuca, siendo este último uno de los más difundidos por los cultivadores gracia a su adaptabilidad en los diversos suelos colombianos.

Los procesos a desarrollar en la presente investigación, involucran la separación cromatográfica de la glucosa-fructosa, purificación de los jarabes de alta fructosa, evaporación hasta 90% fructosa, evaporación al vacío hasta 97% en peso de sólidos, saturación de fructosa con etanol, nucleación y crecimiento de los cristales, separación física por centrifugación y secado de los cristales. En el proceso se controlan los diversos factores que inhiben la cristalización del único tautómero de fructosa de los cinco que logra dicha cristalización (β -D-fructopiranososa); estos factores son: formación de la molécula de difructosa, la solubilidad en agua, la viscosidad de la solución supersaturada, la presencia de glucosa y el pH.

1. MARCO TEORICO

1.1 LA YUCA

La yuca es una especie de raíces amiláceas que se cultiva en los trópicos y subtropicos. Originaria de América tropical remonta su origen a la época precolombina. Fue encontrada por los conquistadores en la hoya amazónica, en territorio que hoy pertenece a Brasil y Colombia. Actualmente existen más de 5000 variedades de yuca y cada una tiene características peculiares. Cada variedad de yuca tiene un comportamiento diferente y su tiempo óptimo de cosecha no es igual al de otras variedades. Aunque estas características dependen de dos condiciones inherentes al sitio en que se cultiva la yuca, clima, y altitud; también depende de los caracteres genéticos de la variedad y del manejo que ésta reciba. Cuando pasa el tiempo óptimo de cosecha de la yuca, el contenido de agua y de fibra aumenta y el porcentaje de almidón disminuye notablemente. Por consiguiente, en el proceso de obtención del almidón se produce gran cantidad de mancha (subproducto que contiene almidón de mala calidad) (Alarcón.1998).

La planta de yuca esta compuesta por flores, tallos y raíz. Las flores (masculina y femenina) son pequeñas y la polinización cruzada es frecuente. El fruto es dehiscente y las semillas pequeñas y ovaladas. La raíz es cónica y tiene una corteza externa y otra interna (de color blanco o rosado). En condiciones experimentales y en monocultivo, la yuca rinde hasta 90 Ton/ha de raíces; sin embargo, el rendimiento promedio, en condiciones reales (suelos marginales, climas severos y asociación con otros cultivos) es de 9.8Ton/ha en el mundo (12.4Ton/ha en América Latina). Con una tonelada de yuca fresca se pueden

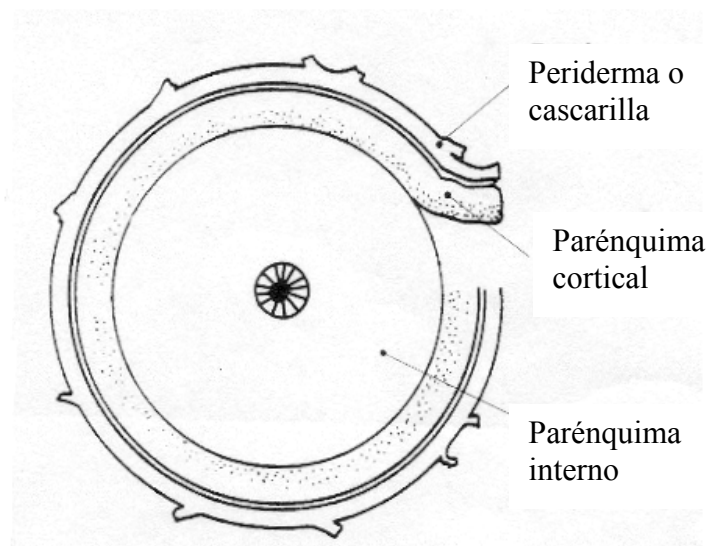
obtener 280Kg de harina o 230Kg de almidón ó 350Kg de trozos secos o 170 litros de alcohol (Alarcón.1998). Actualmente en Colombia, se están implementando cultivos industriales con clones de yuca, donde se han alcanzado rendimientos de 84Ton/ha (Domínguez C. 1985).

La yuca tolera la sequía sin reducir la producción porque posee tres características; las estomas se cierran cuando el aire está seco, las raíces extraen agua del suelo profundo (hasta 2.5m) y su sistema fotosintético fija el carbono atmosférico aun disponiendo de poca agua (en estrés hídrico). Este cultivo sobrevive en suelos escasos de fósforo porque establece asociaciones con hongos que suministran ese nutriente; también se desarrolla en suelos ácidos (con aluminio). La yuca no tolera un suelo inundado. La yuca extrae de los suelos una cantidad de nutrientes similar a la que extraen otros cultivos; pero con un manejo adecuado de los cultivos, su producción podría ser sostenible. Una de las grandes ventajas de la yuca es que tiene la habilidad para crecer en suelos ya desgastados, ventaja extraordinaria que, unida a su gran potencial de producción, augura a este cultivo una perspectiva de consideración como fuente básica de energía para las regiones marginales. (Alarcón.1998).

La raíz de la yuca se compone de tres tejidos (ver figura 1): el periderma (cascarilla), el parénquima cortical (corteza) y el parénquima interior. Una vez cosechadas se deterioran en 3 ó 4 días: por tanto, deben consumirse o procesarse sin demora. La yuca no debe considerarse solamente un cultivo de consumo humano, puesto que un alto porcentaje de ella es destinado a la producción de almidón, harina de yuca, pelets, etc. (Alarcón.1998).

Difundida en los cinco continentes la yuca ha contribuido significativamente en la alimentación humana y animal. El continente africano produce el 50% del total de yuca en el mundo, sobresaliendo en producción los países Zaire, Nigeria, Indonesia y en el continente americano Brasil. (Domínguez C. 1985), (Montaldo A. 1996).

Figura 1. Corte transversal de la raíz de yuca.



La yuca por ser una fuente rápida de almidón, materia prima para la fabricación de alimentos balanceados para animales y de productos nuevos para el consumo humano, ha despertado en el sector privado un interés directo que ha llevado el desarrollo de investigaciones sobre este cultivo. Para alcanzar su inmenso potencial industrial, este cultivo debe hacerse más competitivo mediante una mayor productividad a menores costos de producción y un procesamiento más eficaz por medio de adelantos tecnológicos. (Alarcón.1998, Domínguez C. 1985, Montaldo A. 1996).

1.2 EL ALMIDÓN

Después de la celulosa, el almidón es el carbohidrato de mayor abundancia en la naturaleza. El almidón es una de las principales reservas de energía en las plantas y se encuentra en diversas fuentes como los cereales (maíz, trigo, cebada, arroz), la papa, la yuca y muchos otros cultivos. (Domínguez C. 1985, Montaldo A. 1996, Morrison R. 1996).

El almidón es el carbohidrato más importante en la actividad humana por su función alimenticia y por sus múltiples aplicaciones en la industria y el comercio. A diferencia de los almidones de cereales, que requieren procesos industriales muy tecnificados, los almidones de raíces y tubérculos (papa, batata, achira y yuca) son más fáciles de obtener en el medio rural: su obtención sólo requiere de molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado. (Alarcón.1998, Montaldo A. 1996).

El almidón se halla en forma de gránulos y tiene el tamaño y forma característicos de la planta de la cual se obtiene, por esta razón resulta muy útil realizar un análisis con microscopio, ya que este nos permite confirmar el origen del almidón y nos ayuda a observar rápidamente si hay presencia de materiales extraños, afrecho, insectos o residuos de estos. (Bernal I. 1994, Domínguez C. 1985).

Cuando los gránulos están intactos, son insolubles en agua fría; si se rompe su membrana externa al ser molidos, estos gránulos se hinchan en agua fría y si se calienta por encima de 55°C, forman un gel. Cuando se tratan los gránulos enteros con agua tibia, ésta se difunde a través de sus membranas y extrae parte del

almidón. En agua caliente se hinchan tanto que el granulo revienta. Algunas propiedades se pueden apreciar en la Tabla 1. (Bernal I. 1994, Montaldo A. 1996).

El almidón de origen vegetal, de gran importancia en la bioindustria, es un polisacárido formado por un único monómero, la glucosa. El almidón esta compuesto por amilosa y amilopectina. Generalmente la composición es de 20% de amilosa y el 80% de amilopectina. (Bernal I. 1994, Morrison R. 1996).

La despolimerización del almidón, o hidrólisis, puede lograrse por medios químicos o a través de enzimas. Entre los productos que se obtienen en la hidrólisis del almidón se encuentran los jarabes de D-glucosa. La D-glucosa: es comúnmente denominada Dextrosa. (Bernal I. 1994).

Tabla 1. Propiedades generales del almidón de yuca. (BERNAL I. 1994).

Propiedad	Especificación
Tamaño de Gránulo (eje mayor, μm)	4 – 35
Amilosa (%)	17 – 20
Amilopectina (%)	80 – 83
Temperatura de Gelatinización ($^{\circ}\text{C}$) ^a	52 – 65
Viscosidad Relativa	Alta
Aspecto de la Pasta	Clara
Tendencia a Gelificar / Retrogradar	Media
Sabor	Insípido
Calor de Combustión (KJ/g)	17.6
^a Desde la temperatura inicial de gelatinización hasta completar la formación de la pasta.	

1.2.1 Estructura química.

El almidón es un polímero cuyos monómeros son moléculas de D-glucosa unidas entre sí por enlaces α -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 4) glucosídicos. Los gránulos de este glucano, están compuestos de una mezcla de dos polisacáridos, de los cuales uno es un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y el otro es muy ramificado llamado amilopectina. Las cadenas de amilosa y de amilopectina se asocian por enlaces de hidrógeno entre los grupos alcohólicos directamente o por medio de moléculas de agua. (Domínguez C. 1985, Montaldo A. 1996).

1.2.2 Hidrólisis

La hidrólisis del almidón se puede realizar por varias rutas ampliamente estudiadas.

1.2.2.1 Hidrólisis ácida. La acción de un ácido sobre el almidón induce la ruptura de los enlaces α (1-4) y α (1-6) de las cadenas de amilosa y amilopectina, introduciendo a los terminales 1 y 4 ó 6 una molécula de agua dejando así las moléculas de glucosa libres.(Morrison R. 1996).

1.2.2.2 Hidrólisis enzimática. Los productos obtenidos de cultivos de hongos bajo un ambiente de almidón denominados enzimas amilasas catalizan la ruptura de enlaces α (1-4) y α (1-6). En el ámbito industrial existen variedades de enzimas en el mercado empleadas para la hidrólisis de las cadenas de amilosa y amilopectina dependiendo de los tipos de fuentes obtenidas; NOVO NORDISK

distribuye una serie de enzimas específicas para este fin. Los pasos o etapas para la hidrólisis de almidón son la licuefacción y sacarificación. Para cada etapa es necesario usar una enzima específica que se encarga de las rupturas parciales y totales de los enlaces involucrados en la cadena de almidón. (Fungamil. 1999, AMG. 1999, Morrison R. 1996).

1.2.3 Enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis del almidón.

La producción de jarabes de glucosa desde almidón se realiza en dos pasos, primero la licuefacción del almidón y segundo la sacarificación, es decir, la formación de moléculas de D-glucosa. La licuefacción se realiza utilizando como catalizador las enzimas β -amilasa ó la enzima α -amilasa, y la sacarificación se realiza utilizando como catalizador la glucoamilasa, pullulanasa ó también se pueden utilizar mezclas de enzimas, las cuales son comercializadas por industrias NOVO Nordisk en el ámbito mundial. (Sánchez L. 2002).

1.2.3.1 α -Amilasa. (α -1,4-glucan- glucanohidrolasa). La α -amilasa es una enzima extracelular que actúa como catalizador en la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 4) glucosídicos de las moléculas de amilosa y de amilopectina, dando lugar a la formación de oligosacáridos, que pueden ser de cadenas lineales ó de cadenas ramificadas. La α -amilasa no actúa como catalizador en la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 6) glucosídicos, tampoco en los segmentos del polímero que forman dobles hélices. A través de ésta enzima se hidrolizan los enlaces α -(1 \rightarrow 4) glucosídicos al azar, es decir actúa sobre cualquier punto interno de la molécula liberando dextrinas. Las condiciones de pH y temperatura en que ésta enzima tiene su mayor actividad, así como la composición específica y el peso molecular, tienen ciertas variaciones que dependen de la fuente de donde se haya extraído

dicha enzima. (Fungamil. 1999, Morrison R. 1996, Sánchez L. 2002).

La estabilidad y la actividad que los iones calcio le generan a la α -amilasa, es un fenómeno estudiado ampliamente. Estos iones pueden provenir de sales como acetato de calcio, sulfato de calcio y cloruro de calcio, siendo esta última sal la más comúnmente utilizada. (Domínguez C. 1985, Sánchez L. 2002).

La estabilidad como la actividad de la enzima se afecta rápidamente cuando el pH es igual o menor a 3.0, y sufre una desactivación irreversible por tratamientos a pH igual a 2.5. Los máximos niveles de actividad de este enzima se realizan a un pH entre 4.5 y 6.9. (Domínguez C. 1985, Fungamil. 1999, Ulibarri R. 1997).

1.2.3.2 Glucoamilasa. (amilo-glucosidasa, δ -amilasa, α -(1 \rightarrow 4)glucan-glucohidrolasa, exo-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosidasa). Ésta enzima actúa como catalizador en la hidrólisis de enlaces α -(1 \rightarrow 4)-glucosídicos de las cadenas poliméricas del almidón.

Esta enzima actuando como una exo-enzima, libera de forma secuencial unidades sencillas de D-glucosa a partir de los extremos no reductores de las moléculas de amilosa y de amilopectina. Debido al bajo grado de especificidad de ésta enzima puede ser usada para catalizar la hidrólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 3)-glucosídicos y α -(1 \rightarrow 6)glucosídicos. La velocidad de hidrólisis del almidón, catalizada por ésta enzima, se incrementa en proporción directa con el peso molecular del sustrato. (AMG. 1999).

Las fuentes más comunes, para extraer ésta enzima, son de órganos de animales, bacterias y de origen fúngico. La enzima presenta rangos de trabajo a pH que pueden variar entre 2.94 y 6.98, y a temperaturas que varían entre 15°C a 70°C. (AMG. 1999).

Esta enzima requiere de la acción anticipada de α -amilasa para poder catalizar, con mayor eficiencia, la hidrólisis de los enlaces α -(1→4) y α -(1→6)glucosídicos y producir jarabes de D-glucosa a gran escala. (AMG. 1999).

La actividad de esta enzima se ve inhibida por la presencia de eritritol, turanosa y tris(hidroximetil)-metilamina, en la mezcla. Cuando se hidroliza el almidón con glucoamilasa como catalizador, los polímeros que contienen enlaces α -(1→4)-glucosídicos se hidrolizan más rápidamente que los polímeros que contienen enlaces α -(1→6)-glucosídicos. (Fungamil. 1999, Sánchez L. 2002).

1.3 JARABES DE D-GLUCOSA.

Los jarabes de D-glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D-glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas. Los jarabes de D-glucosa e hidrolizados vienen comúnmente caracterizados por su “equivalente de dextrosa” (ED), que esta definido como: el porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de los sólidos totales de oligosacáridos. Ver ecuación 1.

$$\mathbf{ED} = \frac{W_{gr}}{W_{st}} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

W_{gr} : peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe

W_{st} : peso de los sólidos totales presentes en el jarabe

La producción se realiza en dos pasos: el primero, la licuefacción, consiste en hacer reaccionar el almidón con α -amilasa obteniendo como producto un hidrolizado de almidón. El segundo, la sacarificación, en la cual el hidrolizado reacciona con la enzima glucoamilasa, obteniéndose el jarabe de glucosa.

1.3.1 Licuefacción con α -amilasa.

El almidón previamente gelatinizado se somete al proceso de licuefacción con la enzima α -amilasa. Para obtener un hidrolizado con ED entre 20 y 30 es necesario determinar tanto las condiciones de trabajo de la enzima α -amilasa como los valores de las variables independientes (temperatura, pH, concentración de enzima y tiempo de reacción entre enzima y sustrato). La α -amilasa se desactiva bajando el pH hasta 2,5 con HCl (5N), durante 1 min, y luego se sube hasta pH 4,5 con NaOH (5N). (Fungamil. 1999, Ulibarri R. 1997).

1.3.2 Sacarificación con glucoamilasa.

El hidrolizado de almidón es sacarificado con la enzima glucoamilasa. Las variables independientes seleccionadas fueron concentración de sustrato ([S]), relación unidades enzimáticas de AMG 1000BG por gramo de sustrato (UI/S) y

tiempo de reacción (t) y la variable dependiente fue porcentaje de conversión de almidón a glucosa (%conversión). (AMG. 1999).

La concentración de glucosa fue determinada por el método colorimétrico de la glucosa oxidasa. El porcentaje de conversión de almidón a glucosa (%conversión) es determinado por la ecuación 2. (Ulibarri R. 1997).

$$\%conversión = \frac{[Glucosa]}{[S] \times 1.11} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

%conversión = es el porcentaje de conversión de almidón a glucosa.

[Glucosa] = concentración de glucosa, en gramos por litro de solución producida en la hidrólisis.

[S] = concentración de almidón en gramos por litro de solución.

1.11 = es el factor de corrección requerido para cuantificar el incremento de sólidos totales durante la hidrólisis. (Sims K. 1992).

Alrededor de los 30 minutos está el mejor tiempo para lograr la mayor conversión de almidón a glucosa cuando la [S] es de 40 g/L y el UI/S es 300, usando la enzima glucoamilasa AMG 1000BG.

1.4 ISOMERIZACIÓN DE LA GLUCOSA A FRUCTOSA

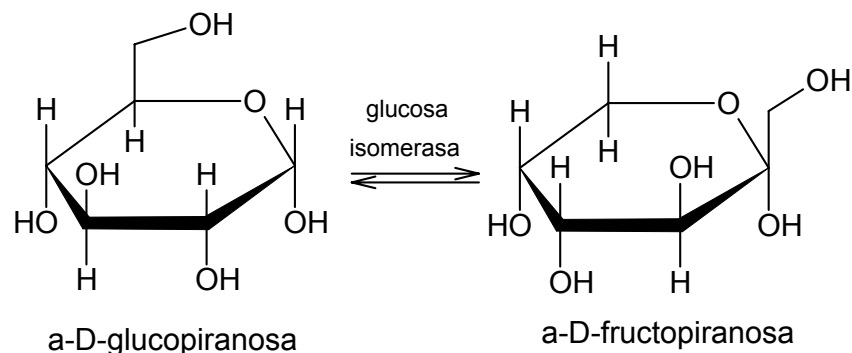
La isomerización de la glucosa es la parte importante del proceso ya que la fructosa tiene un alto poder endulzante y a su vez tiene bajos niveles calóricos lo que le permite al organismo degradarla muy fácilmente.

La enzima glucosa isomerasa (D- Glucosa cetoisomerasa) es la encargada de la isomerización de glucosa hasta fructosa. Esta reacción es reversible y se produce una mezcla de glucosa y fructosa, la velocidad de conversión depende de la enzima usada y de las condiciones de la reacción, como la temperatura, pH y tiempo de reacción. (Blanco V. 2002, Bernal. 1990, Sánchez L. 2002).

En el ámbito mundial las investigaciones más recientes están dedicadas a la inmovilización de la enzima glucosa isomerasa y a su utilización en la conversión de glucosa a fructosa (ver figura 1). En materia de producción mundial se preparan $5 \cdot 10^3$ Toneladas de jarabes de fructosa. En el ámbito nacional la demanda de jarabes de fructosa para la industria alimenticia empieza alrededor de 1986. Actualmente es producido por Maizena en forma de jarabes y es importada en forma de cristal desde España y México. (Corn R. 2003)

La inmovilización de enzimas y otros componentes celulares es un concepto fundamental, y las ventajas o restricciones del movimiento de una molécula de enzima a una región definida de la célula son las que deciden la forma de ataque o inmovilización. (Kuo-Chen. 1987, Rojas H. 2002).

Figura 2. Reacción enzimática de la glucosa isomerasa



En 1978 aparecieron en el mercado los jarabes de 55% de fructosa. Son estos los que presentan un poder edulcorante equivalente al de la sacarosa y son obtenidos a partir de una mezcla de jarabes con 42% de fructosa, producto normal de isomerización enzimática, y 90% de fructosa, con respecto a la concentración de sólidos, obtenidos a través de un proceso de intercambio iónico en resina catiónica fuertemente ácida en forma de sal de calcio, que permite la separación de una mezcla de glucosa y fructosa en solución hasta dicha concentración. El proceso es bastante complejo pues opera en continuo con varias alimentaciones y salidas, por lo cual ocasiona que las zonas de proceso se muevan constantemente en la columna. De la mezcla de jarabes de primera y tercera generación se obtienen los de 55% de fructosa, empleados por la industria de bebidas gaseosas en lugar de la sacarosa y cuya producción correspondió en 1986 al 58% del total de los jarabes con alto contenido de fructosa. (Blanco V. 2002, Rojas H. 2002).

1.5 PURIFICACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA

1.5.1 DOWEX MARATHON A2 (Tipo 2 Resina de intercambio aniónico base fuerte)

DOWEX MARATÓN A2 es una resina de alta capacidad de intercambio, tipo gel 2, de forma esférica. Se basa en una matriz copolimérica de estireno-divinilbenceno con grupos funcionales de dimetiletanol amonio. Las pequeñas esferas de tamaño uniforme de la resina permiten un rápido intercambio cinético durante la operación, regeneración más completa y rápida de la resina, mayor contacto en el enjuague seguido de la regeneración. Su alta fuerza mecánica y fuerza osmótica le dan una buena resistencia a la rotura. La basicidad del grupo funcional tipo 2, siendo ligeramente más baja que la de la resina aniónica de base fuerte de trimetilamonio

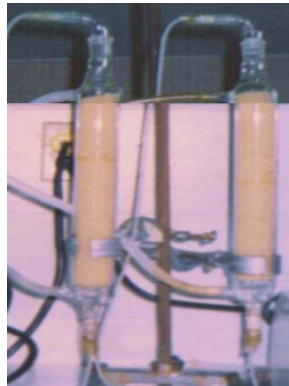
tipo 1y hidrofobicidad siendo mejoradas por el grupo polar etanol, ambos contribuyen a estas buenas características operacionales. Las aplicaciones donde la resina DOWEX MARATÓN A2 más recomendables incluyen desmineralización, alcalinización remoción de oxígeno y remoción de nitratos.

1.5.1.1 Remoción de oxígeno. La resina DOWEX MARATÓN A2 en la forma de sulfito es usada para remover oxígeno de aguas desionizadas. El oxígeno en el agua convierte el sulfito en sulfato. La resina es regenerada usando sulfito de sodio. (DOW LIQUID. Ficha Técnica 2003)

1.5.2 DOWEX MARATÓN C (resina de intercambio catiónico ácido fuerte)

DOWEX MARATÓN C es una resina de intercambio catiónico tipo ácido fuerte con una distribución de tamaño de partícula uniforme empleada para desmineralización de aguas. Se basa en una matriz copolimérica de estireno-divinilbenceno con grupos funcionales de ácido sulfónico. Las pequeñas esferas uniformes exhiben cinéticas de intercambio más rápidas que otras resinas clasificadas por tamaño. El mejoramiento de la cinética permite una eficiente regeneración, alta capacidad operacional, reducción de agente regenerador y menos agua de lavado. Además esta resina también presenta una excelente estabilidad a la compresión y la tensión osmótica. Estas resinas conforman el sistema de purificación iónica de los jarabes de alta fructosa antes de ser expuestos a la resina de separación de las moléculas de fructosa y glucosa. (DOW LIQUID. Ficha Técnica 2003)

Figura 3. Columnas de intercambio iónico para purificación de jarabes de fructosa



1.6 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA MEZCLA GLUCOSA-FRUCTOSA

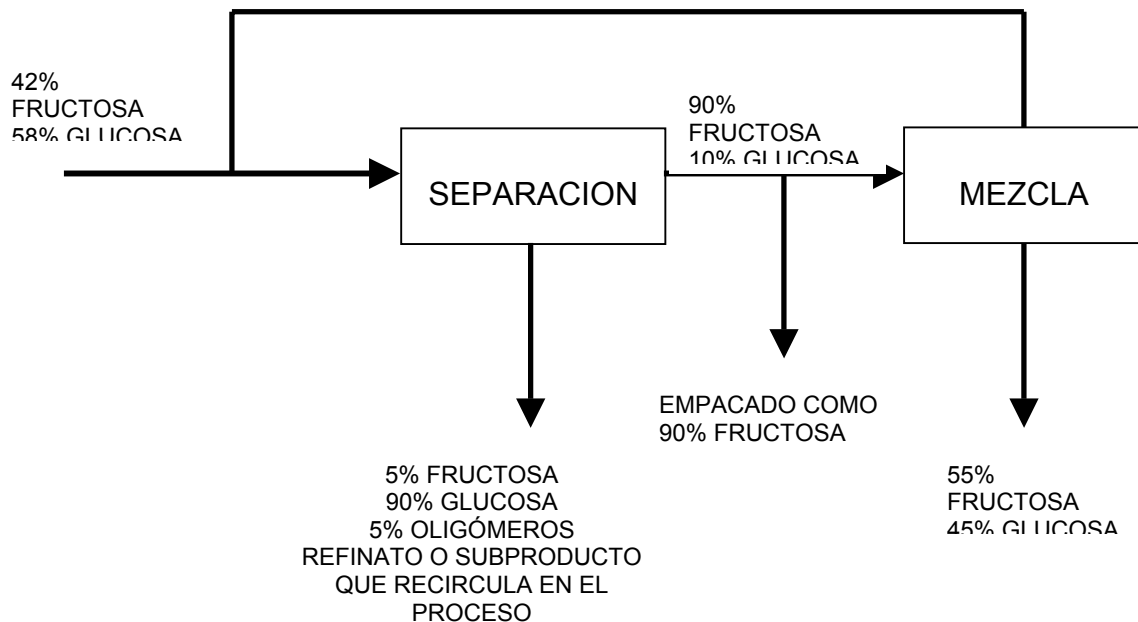
Con la actual tecnología en isomerización enzimática, la conversión de glucosa a fructosa está económicamente limitada a conversiones entre 42 y 46% de fructosa sobre una base seca. Para preparar un jarabe de alta fructosa del 55%, un jarabe del 42% es separado en una corriente de fructosa de alta pureza y una corriente de glucosa de alta pureza. Luego una mezcla de las corrientes del 42% y la separada se emplea para obtener el jarabe de 55%. Usando separación cromatográfica, la concentración de fructosa puede fácilmente ser incrementada por encima del 90%. Para esta operación se usa la resina DOWEX MONOSPHERE 99 una resina de tamaño de partícula uniforme. La resina DOWEX MONOSPHERE 99 Ca (en la forma de calcio) se ha estabilizado como la resina estándar en la industria por su eficiencia y economía en el enriquecimiento de fructosa. Hay tres tamaños de partícula estándar, la selección de cada una depende de la caída de presión debida a la separación. Los tamaños nominales (diámetro medio) son 320, 350 y 390 micras. Aunque esta resina es de intercambio catiónico, no intercambia iones como lo hacen las demás, debido a

que su función es adsorber y liberar suavemente la fructosa mientras ésta desciende por la columna. El jarabe no intercambia iones en el proceso.

1.6.1 Mecanismo de la separación

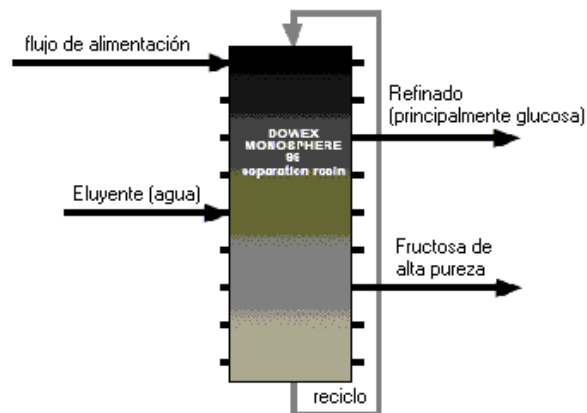
Las resinas de separación cromatográfica contienen macro poros y grandes cantidades de agua. El azúcar a separar se disuelve en el agua contenida en el interior de las esferas. Allí el azúcar interactúa con los iones calcio que contiene la resina. La fructosa, la glucosa y el agua forman un complejo de ligandos débiles con el ión calcio. Una interacción más fuerte en el complejo que forma la fructosa con el ión calcio comparado con la que forma la glucosa es la base del mecanismo de separación de fructosa y glucosa. Este mecanismo de separación es llamado cromatografía de intercambio de ligando. La resina usada está en la forma de calcio, sin embargo, otras resinas similares son usadas en las formas de hidrógeno, potasio y sodio. DOWEX MONOSPHERE. 2003.

Figura 4. Esquema de producción de jarabes de alta fructosa de 55%



Si una mezcla de glucosa y fructosa disueltas en agua se bombean a través de un lecho fijo empacado con una resina gel en la forma de calcio, la fructosa siendo más fuertemente atraída al calcio sobre las esferas de la resina, permanecerán más tiempo inmovilizadas en el interior de ella. La glucosa es menos atraída y por consiguiente permanece más tiempo fuera de las cuentas, en la corriente del líquido que permanece entra las cuantas de la resina de separación. El resultado neto es que la glucosa se mueve más rápidamente hacia abajo del lecho que la fructosa. Si una corriente de líquido se retira de la columna más temprano que la cresta de los sólidos totales disueltos o más debajo de la columna de la cresta de los sólidos disueltos, ese flujo se enriquecerá en glucosa comparado con el alimento (figura 9). Una corriente removida después de o más alto en la columna que el pico de los sólidos disueltos se enriquecerá en fructosa. Un solo lecho empacado de resina puede ser usado de esta manera para purificar o enriquecer corrientes de fructosa de 42%. Más comúnmente este proceso es llevado a cabo en un equipo de operación continua bajo el principio de lecho en pseudo-movimiento (PMB) o lecho en movimiento simulado (SMB). Ver figura 10. (DOWEX MONOSPHERE. 2003).

Figura 5. Diagrama de separación cromatográfica en continuo con salidas de productos.



1.7 EVAPORACIÓN

La evaporación es un proceso en el cual el vapor de una solución líquida en ebullición es removido y, como resultado, obtenida una solución concentrada. Usualmente, la unidad de evaporación se refiere a la sustracción de agua de una solución acuosa. Para este proyecto se empleará evaporador para concentrar una solución de fructosa hasta 90%. En algunos casos, el propósito principal de la evaporación es concentrar la solución para que al enfriarla, se formen cristales que puedan ser separados. (DIAS M. y otros. 2003)

1.7.1 Factores del proceso

El tipo de evaporador usado está influenciado por las propiedades físico-químicas de la solución que será concentrada. La presión y la temperatura del proceso también afectan el tipo de evaporador. Las principales propiedades a considerar son:

1. Concentración en un líquido: Cuando el fluido entra en el evaporador, la solución es relativamente diluida, con una baja viscosidad y un alto coeficiente de transferencia de calor. Cuando el proceso de evaporación beneficia a la solución, ésta se vuelve más concentrada, viscosa y con un bajo coeficiente de transferencia de calor.
2. Sensibilidad del material con la temperatura: Muchos productos, especialmente los jarabes de almidones son sensibles a la temperatura y pueden presentar degradación. La cantidad de degradación es una función de la temperatura y el tiempo.

3. Presión y temperatura: El punto de ebullición de la solución está relacionado con la presión del sistema. Si la presión de operación del evaporador es alta, la temperatura del punto de ebullición también será alta. La temperatura del punto de ebullición puede subir cuando la concentración de la solución se incremente por la evaporación. Este fenómeno es llamado elevación del punto de ebullición. En materiales sensibles a la temperatura, ésta se mantiene usualmente baja en el evaporador y la presión de operación por debajo de 1 atm. (bajo vacío). (DIAS M. y otros. 2003).

1.8 DECOLORACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

El carbón activado es usado como una forma de purificación para aguas, y tratamiento de aguas en la industria. El carbón usado es muy versátil y es un efectivo método para remover compuestos orgánicos tóxicos. El carbón también juega un papel importante en la refinación del azúcar para decolorar el producto en una corriente que lo contiene. Aproximadamente un 60-80% del color es removido por este método durante un proceso de purificación de jugo de azúcar.

El tipo de carbón usado es llamado carbón bituminoso el cual no es una fuente renovable pero puede ser regenerado. El carbón activado se opera en un lecho fijo y normalmente a presión atmosférica. No hay requerimientos de energía para esta unidad de operación excepto en la energía para el bombeo y la chaqueta calorífica requerida para sistemas líquidos.

Algunas separaciones se logran a través de la capacidad de los fluidos de adherirse a las superficies de los sólidos. Este proceso es llamado adsorción. Los

adsorbentes de carbón activado contienen innumerables poros donde las paredes del carbón tienen un área superficial en el rango de 400-1800 m²/g. La adsorción es selectiva y ciertas especies de moléculas deben ser adsorbidas en preferencia a otras.

La adecuada purificación mantiene las moléculas de una sustancia a ser removida sin perturbar el sistema. Hay dos tipos de carbón activado, granular y polvo. El carbón activado en forma de polvo es generalmente usado en sistemas estáticos (batch) y el carbón activado granular se usa en procesos semi y continuos. El carbón granular requiere largos tiempos de residencia para alcanzar el equilibrio y se analizan experimentalmente por pulverización hasta la forma de polvo. (DIAS M. y otros. 2003).

1.8.1 Tamaño de poro

Hay tres propiedades importantes del carbón activado, las cuales contribuyen a la adsorción del color. Las propiedades son tamaño de volumen de poro, distribución del área superficial entre los micro poros y la superficie externa y la reactividad química de la superficie del carbón.

El tamaño del volumen de poro puede estar en un rango de 0-20 Å diámetro del poro (micro), 20-500 Å (meso) y más grandes que 500 Å (macro poros). Los carbones con un alto volumen de poro y una combinación de grandes y pequeños poros tienen el mejor potencial de despolarización debido a que hay presencia de volumen de poro favorable y distribución del área superficial al mismo tiempo. El volumen del poro usualmente es del 80-90% del área superficial externa total. Los

micro poros serían problemáticos en la decoloración del azúcar debido a que el gran tamaño de la molécula de fructosa tendría problemas al entrar en tamaños de poro pequeños. (DIAS M. y otros. 2003)

1.8.2 Temperatura y pH

La temperatura de un sistema de carbón empacado no tiene un efecto real sobre la decoloración del jugo de fructosa. La temperatura es usualmente fija a 25 °C. Como con el proceso de purificación de fructosa si la temperatura se eleva por encima de los 80 °C el producto se descompondrá y se oxidará.

La adsorción de calor puede ser influenciada por cambios en el pH. Sin embargo, los cambios de pH en un sistema ocurren sin producir alteraciones malignas sobre el producto. Algunos carbones contienen suficiente acidez o alcalinidad para alterar el pH de una solución buffer. (DIAS M. y otros. 2003).

1.9 CRISTALIZACIÓN DE FRUCTOSA

1.9.1 Limitaciones

1. La fructosa está presente en cinco formas tautoméricas, de las cuales solo la forma β -D fructopiranososa cristalizará. Este tautómero típicamente se presenta del 40% en una solución de etanol-agua fructosa. El α -D fructopiranososa determinará la cristalización puesto que es muy similar a la

β -D fructopiranosas, cubriendo los sitios de crecimiento superficial del cristal. Así el cristal no crece pero el α -D fructopiranosas no forma un enlace muy fuerte con el cristal.

Las razones por las cuales la fructosa cristalina es más dulce que el jarabe de fructosa son:

- a. La fructosa cristalina contiene solamente el tautómero más dulce que es el β -D-fructopiranosas.
 - b. La fructosa cristalina está empacada a 98% de sólidos seco mientras el jarabe de alta fructosa de 90% está empacado al 80% de sólidos secos.
2. La fructosa forma una molécula de difructosa dianhídrido en una reacción de deshidratación, ésta molécula inhibirá la formación de los cristales igual que la α -D fructopiranosas. Esta molécula se forma si el jarabe es expuesto al HCl, el cual es usado para mantener el pH en la columna de carbón activado.
 3. La fructosa es altamente soluble (alrededor de 4g/ 1g de agua a temperatura ambiente) mientras la adición de etanol hace a la fructosa insoluble.
 4. Los jarabes de alta fructosa de 90% tienen alta viscosidad y son fluidos no Newtonianos. La mayoría de los cristalizadores operan usando un lecho fluidizado por la región de contacto de los núcleos y la solución supersaturada. La alta viscosidad de los jarabes de 90% hacen un lecho fluidizado impráctico. La agitación mecánica debe usarse en lugar de la agitación por un flujo ascendente del jarabe.

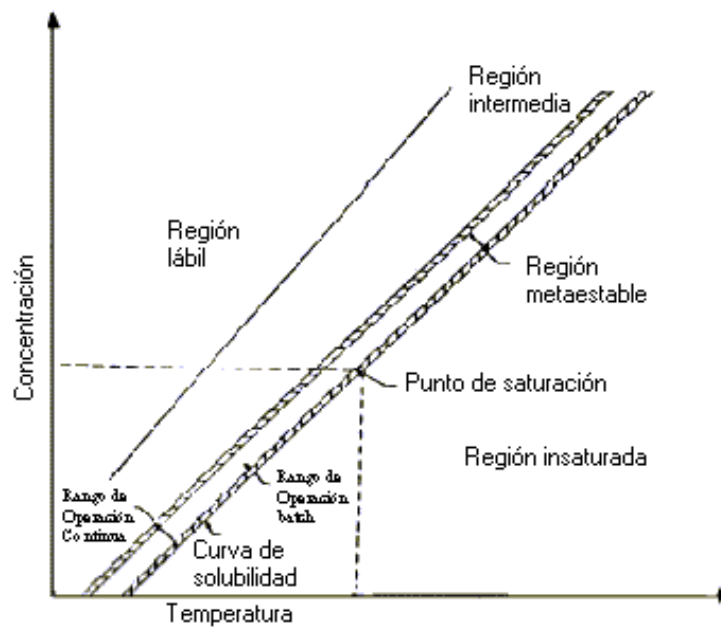
5. La presencia de glucosa reduce la velocidad de crecimiento del cristal en la cristalización de fructosa.
6. El proceso de cristalización es sensible al pH con un pH óptimo a 5. más bajo que 5 resultará en mutarrotación hacia los tautómeros no cristalizables. Más alto que 8 resulta en caramelización y el cristal será decolorado. El pH debe ser controlado con la adición de jugo de limón o ácido clorhídrico. (DIAS M. y otros. 2003).

Para la cristalización se debe preparar una solución sobresaturada del compuesto que se quiere cristalizar y se debe tener en cuenta tres diferentes regiones formadas: ver figura 6.

1. Región meta-estable: el soluto se encuentra en exceso, en presencia de núcleos se dará su crecimiento, pero no se formarán nuevos núcleos. Esta región es deseada por la formación de cristales uniformes, ya que todos los núcleos crecerán a la misma velocidad y al mismo tiempo.
2. Región intermedia: el soluto se encuentra en exceso de equilibrio, se formarán nuevos núcleos y se depositará el material sobre ellos.
3. Región lábil: los núcleos se formarán espontáneamente en una solución sin presencia de núcleos.

Para una cristalización continua, la región intermedia requiere de la presencia de núcleos y del cambio por núcleos nuevos. (DIAS M. y otros. 2003).

Figura 6. Regiones involucradas en la supersaturación



La velocidad de crecimiento de cristalización para fructosa en una solución agua-etanol sigue la siguiente ley cinética. Ecuación 3.

$$G = k_G \sigma^n \quad \text{Ecuación 3.}$$

donde

G = velocidad de crecimiento

k_G = constante de velocidad, encontrada experimentalmente para fructosa ($3.0 \cdot 10^8$ m/s)

σ = solubilidad (0.5 g de fructosa por 1 g de etanol + agua)

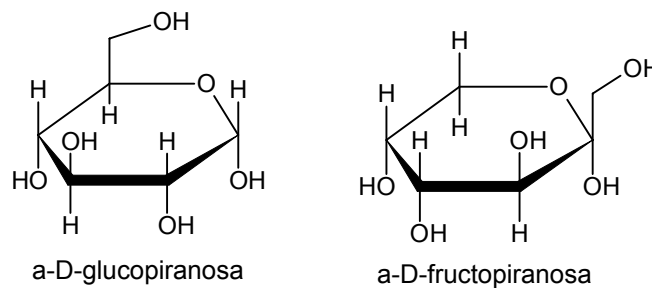
n = poder de ley de velocidad de crecimiento, encontrada experimentalmente (rango para fructosa de 1-1.2).

La solubilidad de la fructosa en agua es de 4 g/ 1 g de agua, y la solubilidad en etanol es de 0.045g/1g etanol. (DIAS M. y otros. 2003).

1.10 DIFERENCIA ENTRE GLUCOSA Y FRUCTOSA

La única diferencia estructural entre las moléculas de glucosa y la fructosa es que ellas son isómeros uno del otro como se observa en la figura 3.

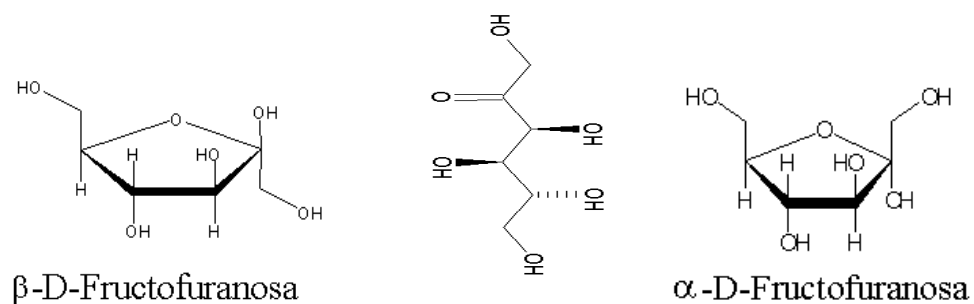
Figura 7. Isómeros estructurales de glucosa y fructosa

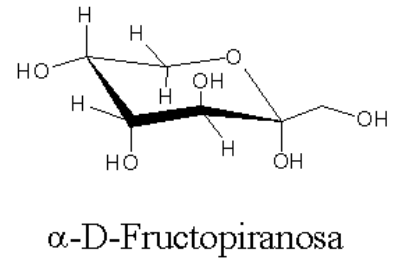
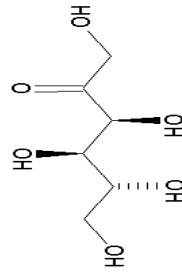
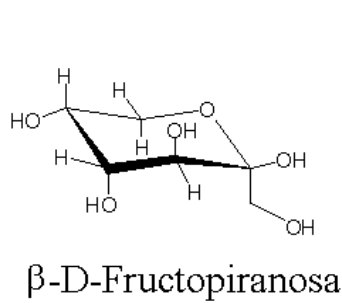


Sin embargo, el dulzor en relación con la sacarosa es muy diferente entre los dos isómeros. La glucosa es 85% tan dulce como la sacarosa y la fructosa es 180% más dulce que la sacarosa. (Días M. y otros. 2003).

1.11 ISOMEROS DE FRUCTOSA

Figura 8. Tautómeros de fructosa





1.12 DIFERENCIA ENTRE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA Y LA FRUCTOSA CRISTALINA

La fructosa cristalina es deseada por:

1. Productos de confitería que requieren endulzantes con bajo nivel de calorías y humedad baja.
2. Facilidad de transporte
3. Mezclado en seco en alimentos
4. Mejoramiento de las propiedades de gelificación al estar combinado con almidón.
5. Dulzor intenso que dura más que otros edulcorantes.

Hay también un beneficio adicional que es el elevado valor endulzante superior a los jarabes. El dulzor de los HFCS-90 es alrededor de 1.6 veces más dulce que la

sacarosa cristalina. La fructosa cristalina es 1.8 veces más dulce que la sacarosa cristalina. La propiedad dulce de ambos edulcorantes hace de ellos los mejores endulzantes para las dietas bajas en carbohidratos y bajas calorías. (Días M. y otros. 2003)

1.13 PROPIEDADES ENDULZANTES

Los tres endulzantes usados en la industria son la glucosa, sacarosa y fructosa. Cada endulzante tiene sus beneficios y limitaciones dependiendo de las condiciones de uso. Para determinar el dulzor, la industria usa una escala de comparación empleando para ello la sacarosa. La sacarosa da un valor 100.

La tendencia de consumo de endulzantes del maíz para el año 2000 se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de edulcorantes comunes

Endulzante	Fructosa	Glucosa	Oligómeros	Dulzor relativo	Exportación Kg	U.S.\$/Kg
Sacarosa	ND	ND	ND	100	ND	ND
Glucosa	0	96	4	80	111.453.993	0.34
HFCS-42	42	52	6	100	43.345.929	0.24
FHCS-55	55	40	5	120	235.642.047	0.25
HFCS-90	90	9	1	160	39.426.634	0.82
Fructosa cristalina	98	0	0	180	48.690.939	0.66

ND no determinado.

2001 Corn Annual, Corn Refiners Association, p.24 (2000)

Como muestra la tabla, los HFCS-90 tienen una dulzura relativa a la sacarosa de 106 – 160, dependiendo de la pureza de los jarabes. La fructosa cristalina tiene

una dulzura relativa de 180, esto es debido a la presencia de tautómeros¹ en la mezcla en equilibrio de la fructosa. (Días M. y otros. 2003, Morrison R. 1996).

Las propiedades de dulzura son expresadas en dos formas descriptivas diferentes:

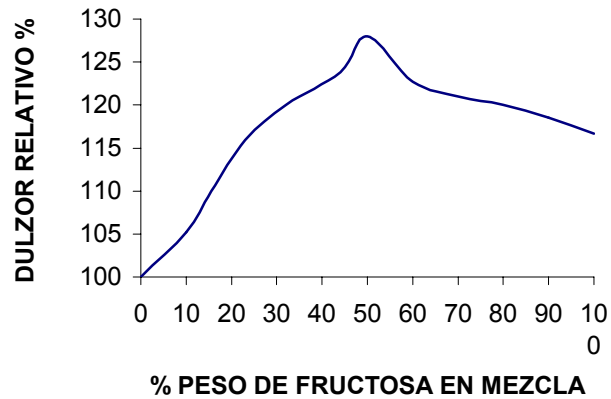
1. Sinergia de fructosa con sacarosa
2. La dulzura percibida y la intensidad del dulzor comparando glucosa, fructosa, y sacarosa.

1.13.1 Sinergia

La alta intensidad endulzante de la fructosa es sólo una de las propiedades atractivas para la industria de confitería. Otra propiedad es el efecto sinérgico sobre el dulzor que ocurre cuando la sacarosa y la fructosa son mezcladas. El dulzor relativo del HFCS-90 es de 106 – 160 dependiendo del porcentaje de mezcla. Un valor arbitrario para HFCS-90 es 115, sin embargo este mismo jarabe puede tener un dulzor relativo de 130 cuando está mezclado en una proporción 50:50 con sacarosa. Este concepto se ilustra en la Figura 4. (Días M. y otros. 2003)

¹ Un tautómero es un estereoisómero que se encuentra en equilibrio con otro estereoisómero. El cambio de estructura mutuamente se denomina mutarrotación

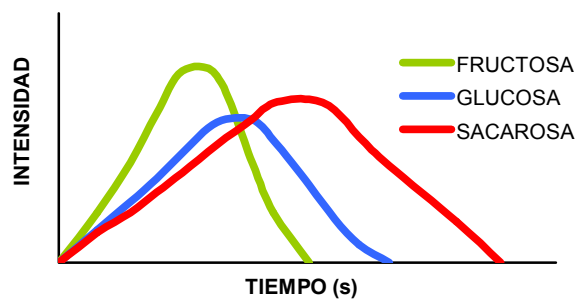
Figura 9. Sinergia con sacarosa, dulzor relativo de la mezcla fructosa /glucosa.



1.13.2 Dulzor percibido

La fructosa provee una intensa dulzura como se muestra en la figura 5. El dulzor es una propiedad cualitativa la cual varía de persona a persona. El dulzor también varía con el tiempo. De los tres endulzantes mostrados en la figura 5 la fructosa tiene la mayor intensidad de sabor dulce y más rápido después de ser saboreado. Esta cualidad es ideal para limpiar completamente el dulce en el paladar ocurrido en los sorbetes.

Figura 10. Intensidad endulzante percibida



1.14 DENSIDAD DE LA FRUCTOSA CRISTALINA

La densidad de la fructosa cristalina fue encontrada a partir de las propiedades cristalinas publicadas por la American Crystallographic Association²

Densidad de la fructosa cristalina = 1.598 g/cc

1.15 PROPIEDADES VISCOSAS

La viscosidad de la fructosa es una ventaja en muchos procesos de horneado. Los valores de viscosidad para las diferentes soluciones de fructosa se publican en muchos artículos de investigación. La viscosidad varía grandemente con el porcentaje en peso de fructosa en la solución y con la temperatura. Se proporcionan valores de viscosidad en la Tabla 3.

Tabla 3. Viscosidad de soluciones acuosas de fructosa a 30 °c

Viscosidad (cP)	p/p% (d.s.b) Solución Fructosa
1.1	30
2.8	50
5.2	60
18	70
92	80
2100	90

² Donnay G. Crystal Data. 2. ed. American Crystallographic Association. Washington D.C. 1963.

Debido a que la viscosidad depende de la temperatura, se publicó una correlación empírica (ver ecuación 4), para que pueda ser usada en jarabes de alta fructosa a otras temperaturas. (Días M. y otros. 2003)

$$\mu = 14.44 \cdot 10^{-3} \exp(-0.04 (T-273)) + 0.9 \cdot 10^{-3} \text{ Pas} \quad \text{Ecuación 4.}$$

2. MARCO DE ANTECEDENTES

En Colombia no se han desarrollado estudios a cerca de la cristalización de fructosa. En el ámbito internacional, los estudios realizados se encaminan a la purificación de soluciones acuosas del carbohidrato fructosa cuando está mezclado con glucosa, ya sea por hidrólisis ácida del disacárido sacarosa o azúcar de mesa o simplemente técnicas en purificación de fructosa por diferentes métodos de cristalización. Los encontrados fueron:

U.S Pat .No. 5,656,094; Process for the production of crystalline fructose of high purity utilizing fructose syrup having a low content of fructose made from sucrose and product obtained.

La invención describe un proceso para la producción de fructosa cristalina anhidra de alta pureza química a través de la cristalización, el cual es llevado a cabo por un enfriamiento controlado de una solución acuosa-alcohólica de fructosa, la cual ha sido obtenida de la sacarosa de la caña de azúcar.

La fructosa obtenida por el método descrito, se compone de cristales bien definidos típicos del sistema ortorrómbico y se constituyen de partículas las cuales exhiben una reducida distribución de tamaño con un diámetro promedio comprendido entre alrededor de 250 micrones hasta 350 micrones.

La fructosa es el mejor edulcorante de todos los carbohidratos, por lo cual se emplean en diferentes productos de confitería y bebidas, además de reducir los valores calóricos de estos productos y ser empleado en productos dietéticos.

Al menos todos los procesos para la producción de fructosa que han sido patentados desde los comienzos de los 60's, usan almidón de maíz como materia prima. En general estos procesos industriales se basan principalmente en: un proceso enzimático típico que produce un jarabe de glucosa de 94% en peso seco y 6% de oligosacáridos. En segundo lugar la isomerización de la glucosa usando un proceso enzimático catalítico que produce un jarabe del 42% en fructosa, 52% de glucosa y 6% oligosacáridos. (PROCESS FOR, 2003)

No. 5,656,094; Patente EP 0613954A1. Normalmente, el enriquecimiento de la fructosa se lleva a cabo en una columna empacada con un lecho de una resina de intercambio catiónico, la cual separa la fructosa de la glucosa y otros indeseables productos de la isomerización.³ Al final de este paso se ha obtenido un jarabe enriquecido, denominado como Very Enriched Fructose Corn Syrup (VEFCS), el cual contiene aproximadamente 90% de fructosa en base sólida. Esta fracción VEFCS, la cual también contiene glucosa y algunos oligosacáridos, es usada como alimento para una separación final y un paso de purificación el cual consiste en la cristalización de la fructosa de la solución acuosa o de una solución acuoso-alcohólica. Luego, la centrifugación, el lavado y secado de los cristales para obtener finalmente la fructosa cristalina anhidra. (U.S. Pat. No.3, 513,023; U.S. Pat. No. 3,607,392; U.S Pat .No. 3,883,365; U.S Pat .No.4,199,373; U.S Pat .No.4,199.374; U.S Pat .No. 4,724, 006; U.S Pat .No. 5,047,088; U.S Pat .No.5,350,456; U.S Pat .No.5,656,094).

³ T. Hirota. Continuous Chromatographic Separation of Fructose/Glucose. Sugar Azúcar, 245-247, 1980, K. Venkatasubramanian. Integration of Large Scale Production and purification of Biomolecules. Enzyme engineering, 6 : 37-43. 1982.

Debe notarse que la producción de fructosa cristalina por cristalización de fructosa de jarabes de alta fructosa es generalmente llevado a cabo por uno de los tres métodos siguientes: cristalización de una solución acuosa, cristalización de una solución acuoso-alcohólica, y secado de un jarabe enriquecido de fructosa. U.S Pat .No. 5,047,088; U.S Pat .No.5,350,456; U.S Pat .No.5,656, 094; Patent EP 0613954 A1.

El primero de estos procesos de manufactura consiste en la cristalización de la fructosa de su solución acuosa concentrada o del jarabe enriquecido de fructosa empleando una combinación adecuada de las variables del proceso tales como: concentración, temperatura, presión y pH, y por la adición a la solución de pequeños cristales de fructosa pura la cual actúa como semillas de cristalización, seguido por un enfriamiento controlado de la solución hasta aproximadamente 25°C con el fin de permitir el crecimiento del cristal. Este enfriamiento debe ser culminado cuidadosamente para evitar niveles de alta supersaturación que pueden ocasionar que ocurran fenómenos de nucleación espontánea. Dichos fenómenos de nucleación espontánea consisten en una formación espumosa e intensa de cristales diminutos los cuales pueden actuar como núcleos indeseables para el crecimiento de cristales que llevan a un producto final de baja calidad.

Debido a la extremadamente alta viscosidad de la solución saturada de fructosa, la cual llega a ser incluso más alta cuando la temperatura se reduce, los periodos de tiempo requeridos para terminar el proceso llegan a ser muy largos; frecuentemente, estos tiempos de cristalización alcanzan valores mucho más largos que 50 horas, y pueden alcanzar las 70 horas o en ocasiones más. Otro problema inherente en la cristalización de la fructosa de una solución acuosa se representa en los bajos rendimientos de fructosa cristalina, que usualmente son más bajos que el 40%, debido a la alta solubilidad de la fructosa en agua, incluso

a la más baja temperatura alcanzada en la etapa final del proceso de cristalización que está alrededor de los 25°C (a esta temperatura la solubilidad de la fructosa en agua es 4gramos de fructosa/ gramo de agua)(U.S Pat .No. 3,513,023; U.S Pat .No.3,883,365, U.S Pat .No.3,928,062; U.S Pat .No. 4,199,373; U.S Pat .No. 5,047,088; U.S Pat .No. 5,350,456; U.S Pat .No. 5,656,094; Patent EP0613954 A1)

El segundo proceso para la cristalización de fructosa comprende: introducir rápidamente a una solución acuosa de fructosa, normalmente un solvente orgánico, un alcohol seleccionado de el grupo constituido por metanol, etanol e isopropanol; adicionar a la solución acuoso-alcohólica resultante semillas compuestas de cristales de fructosa anhidra pura; y, empleando una agitación vigorosa, llevar a cabo un enfriamiento controlado de la solución, de este modo se forman los cristales de fructosa. El proceso patentado emplea, típicamente, jarabes acuosos que tienen un contenido de sólidos secos alrededor de 95% por peso, y un contenido de fructosa más alto del 90 % en base sólida, preferiblemente comprendido entre 93% y 96% de fructosa (U.S Pat .No.4,190,374)

El alcohol adicionado al jarabe enriquecido de fructosa, está usualmente en una relación de peso de la fructosa a el alcohol preferiblemente comprendida entre 0.5 y 3, es usada para disociar efectivamente la fructosa del agua, de manera que el metanol, etanol, e isopropanol tienen el más alto grado de afinidad por el agua que el de la fructosa, facilitando de esta manera la cristalización de la fructosa.

El otro propósito de utilizar alcoholes es la reducción considerable de la viscosidad efectiva del jarabe enriquecido de fructosa después de la formación de la solución

acuoso-alcohólica, la cual contribuye al mejoramiento de la agitación y el mezclado del sistema y al incremento de la velocidad de crecimiento de cristales. La reducción de ambos y la habilidad de la fructosa para permanecer en la solución acuosa y la efectiva viscosidad del líquido madre, causada por la adición del alcohol, disminuye los tiempos de cristalización en un rango de 12 a 24 horas así como también aumenta el rendimiento de fructosa cristalina, cuando se compara con los valores típicos respectivos obtenidos en el proceso de cristalización de fructosa de soluciones acuosas. Sin embargo, grandes cantidades de alcohol son requeridos, así que los costos involucran la utilización de este tipo de solventes deben ser tomados en cuenta.

Además de esta desventaja de carácter económico, el método de cristalización de fructosa de soluciones acuoso-alcohólicas, como se establece en trabajos anteriores, tiene una fuerte tendencia a experimentar los indeseables fenómenos de nucleación espontánea, debido a la muy rápida adición de una gran cantidad de alcohol, antes de la adición de los núcleos o semillas de cristalización.

El tercer método para la preparación de fructosa cristalina consiste en secar un jarabe muy enriquecido de fructosa en un secador rotatorio, produciendo así un sólido de fructosa granular la cual contiene una porción de fructosa cristalina y una porción de fructosa amorfa. Debido a que la fructosa amorfa es extremadamente higroscópica, la manipulación de este producto semi-cristalino en ambientes húmedos llega a ser difícil. (U.S. Pat. No. 4,517,021).

Todos los procesos patentados para la producción de fructosa cristalina combinan varios etapas de procesamiento complejas, las cuales elevan el número de dificultades técnicas que usualmente llevan a la disminución de la eficiencia y la

productividad del proceso, contribuyendo así a un costo de manufactura de la fructosa cristalina, la cual, a su vez, presenta un rendimiento por debajo de los niveles óptimos en aplicaciones específicas en la industria de alimentos y en el último consumidor como un poderoso endulzante, así como también en la manipulación, empaçado y almacenamiento. (L. M. Hanover and J. S. White, Manufacturing, Composition, and Applications of Fructose. Am. J. Clin. Nutr. ,58 (suppl.), 724S-732S, 1993; U.S. Pat. No. 3,883,365; U.S. Pat. No. 4,199,373; U.S. Pat. No. 4,724,006; U.S. Pat. No. 5,047,088; U.S. Pat. No. 5,350,456; U.S. Pat. No. 5,656,094; Patent EP 0 613 954 A1)

3. METODOLOGÍA

3.1 EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

Las condiciones usadas para la extracción de almidón de yuca, teniendo en cuenta los análisis preliminares, fueron:

- 1 kg de yuca se lavó y peló hasta obtener el parénquima interno.
- El parénquima se ralló en un rallador convencional de tamaño de poro 0.1 cm.
- Se pasó por un tamiz 100 y se lavó con 10 L de agua.
- Se separó la fibra y se dejó decantar el almidón por 2 h. Se separó el almidón decantado y se permitió decantar el resto del almidón por 4h.
- El almidón decantado se esparció en una superficie plana (vidrio) y se dejó secar al aire y sol.
- Se pesó el almidón y la fibra y se obtuvieron los porcentajes.

3.2 HUMEDAD

Se determinó la humedad de la yuca mediante los siguientes pasos:

- Se pesó tres piezas de 10.0 g de yuca.
- Se introdujeron en un horno (mufla) previamente calentada hasta 105° C.
- Se mantuvo las muestras en el horno a 105° C por 6 horas.

- Se llevaron las muestras a un desecador por 2 horas.
- Se pesaron las muestras libres de humedad
- Se reportaron los porcentajes de humedad y promedio de la determinación.

3.3 SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA Y FRUCTOSA.

3.3.1 Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de maltosa.

Ésta curva se realizó utilizando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que consiste en incubar el sustrato y el reactivo (DNS) seguidos por la medición de absorbancia (540 nm) de la solución y así determinar la concentración de azúcares reductores. Estos azúcares reaccionan con el DNS dando como producto el compuesto 3-amino-5-nitrosalicilato. La absorbancia guarda una relación directamente proporcional a la concentración molar de los azúcares reductores. (Sánchez L. 2002).

3.3.1.1 Preparación del reactivo DNS. Se mezclan y se disuelven en 250 mL de agua destilada, 8 g de NaOH y 15 g de tartrato de sodio y potasio. Posteriormente se agrega 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico bajo calentamiento. Se afora a 500 mL con agua destilada y se almacena a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.

3.3.1.2 Preparación de las soluciones de maltosa. Se preparó una solución de maltosa (Merck, Darmstadt) de concentración 1000 ppm. Por dilución de ésta se prepararon seis soluciones, de concentraciones 100, 200, 300, 500, 800, 900 Y 1000 ppm, respectivamente.

3.3.1.3 Procedimiento para obtener los datos de la curva de calibración. En un tubo de ensayo con tapa se mezclaron 2 mL de solución de maltosa con 2 mL de DNS. Se dejó reaccionar en un baño con agua en ebullición por 5 min. La reacción se detiene introduciendo el tubo de ensayo en baño de hielo por 5 min. Posteriormente se agregaron 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 10 minutos. Finalmente se leyó su absorbancia a 540 nm. Como blanco se utilizó una solución preparada con el procedimiento anterior pero agregando agua desionizada en lugar de solución de maltosa. Los resultados se muestran en la tabla 7. El anexo 1 muestra la gráfica de absorbancia (540 nm) contra concentración de maltosa

3.3.2 Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de glucosa.

Se procedió como en la solución de maltosa pero se cambió por una solución de glucosa (Merck, Darmstadt) de concentración 1000 ppm. Los resultados se muestran en la tabla 8. El anexo 2 muestra la gráfica de absorbancia (540 nm) contra concentración de glucosa.

3.3.3 Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa.

La actividad enzimática de α -amilasa de origen fúngico, Fungamyl 2500BG, (Novo Nordisk), se determinó por el método propuesto por Whelan³. Se preparó una solución de S (sustrato) en buffer de acetato de sodio (0.016 M, pH 4.7), cuya concentración final es de 10 mg de S/mL, seguidamente el almidón fue gelatinizado y se tomó 1 mL el cual se mezcló con 1 mL de solución de enzima, preparada de la siguiente manera: Se disolvió α -amilasa en buffer de acetato de sodio (0.016 M, pH 4.7) y cloruro de calcio 1 % p/v de tal forma que la concentración final fuera 0.3 % g de enzima/ g de S. Ésta mezcla se incubó en un baño con agua a 55 °C durante 3 min. Seguidamente se agregaron 2 mL de reactivo DNS y se dejó en baño con agua en ebullición por 5 min. La reacción se detiene dejándola en un baño de hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 10 min. La absorbancia se leyó a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior pero agregando agua destilada en lugar de solución enzimática. La cuantificación de la actividad enzimática se logró determinando la concentración de grupos reductores, expresados como maltosa, por interpolación en la curva de calibración de la misma. Para el cálculo de la actividad de la enzima alfa-amilasa se utilizó la ecuación 5. Los resultados de la actividad enzimática se reportan en la tabla 9. (Fungamil. 1999)

$$\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa (UI / mg)} = \frac{m \times V_T \times 10^6}{W_E \times PM \times t} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde:

m = Concentración de maltosa (g/ L)

³ WHISTLER, Roy L., SMITH, Robert J., BEMILLER, James N. y Wolfrom, M. L. Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. IV, Starch. Academic press, New York 1964. 335p.

VT = Volumen total de reacción (L).
WE = Peso de enzima alfa-amilasa (mg).
PM = Peso molecular de maltosa (g/ mol).
t = Tiempo de reacción (min.).

3.3.4 Determinación de la actividad enzimática de glucoamilasa.

La actividad de la enzima glucoamilasa de origen fúngico, AMG 1000BG 7, (Novo Nordisk), se determinó como la actividad de la α -amilasa pero modificado de la siguiente forma: no se agregó cloruro de calcio a la solución enzimática, la concentración enzimática fue de 2 % g de Enzima/g de Sustrato y el tiempo de incubación 10 min. La cuantificación de la actividad enzimática se logró determinando la concentración de grupos reductores, expresados como glucosa, por interpolación en la curva de calibración de la glucosa. Para el cálculo de la actividad de la enzima glucoamilasa se utilizó la ecuación 6. Los resultados de la actividad enzimática se reportan en la tabla 10. (AMG. 1999).

$$\text{Actividad de glucomilasa (UI / mg)} = \frac{m \times V_T \times 10^6}{W_E \times PM \times t} \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde:

m = Concentración de glucosa (g/L)
VT = Volumen total de reacción (L).
WE = Peso de enzima amiloglucosidasa (g).
PM = Peso molecular de glucosa (g/mol).
t = Tiempo de reacción (min.).

3.3.5 Determinación de la actividad enzimática de la glucosa isomerasa.

A la enzima glucosa isomerasa inmovilizada (SWEETZYME – T) se le determinó la actividad bajo las condiciones mostradas en la tabla 4. El fabricante reporta una actividad de 350 IGIU/g, y una densidad de 0.33 g/mL

Tabla 4. Condiciones estándar para la determinación de la actividad de la enzima glucosa isomerasa inmovilizada (sweetzyme-t)

VARIABLE	VALOR
Glucosa	50% p/p
PH	7.5
Temperatura	60° C
Mg ⁺²	99 mg/L (MgCl ₂ .6H ₂ O)
Ca ⁺²	< 2 ppm
SO ₂	100 ppm (Na ₂ S ₂ O ₅)
Na ₂ CO ₃	2 mM
Flujo	2.98 g enzima*mL*min ⁻¹
Conversión %	45 sbs

15 gramos de enzima fueron adicionados a una columna (ver figura x). El sustrato fue administrado usando una bomba peristáltica MASTER-FLEX L/S® Economic Driver a una velocidad de flujo de 2 mL/ min. A las 24 y 48 horas se les determinó el contenido de glucosa usando las ecuaciones por polarimetría. Los resultados se reportan en la tabla 11.

La actividad fue calculada con la ecuación 7.

$$\frac{IGIU}{g} = 0.926 * \frac{F}{W} * X_e * DS * Ln \frac{X_e}{X_e - X} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde

0.926 = factor de conversión de unidades (g/h ► $\mu\text{mol}/\text{min}$)

F = Flujo del jarabe

W = Peso de la Enzima (g)

Xe = Equilibrio de conversión (0.507 a 60° C)

DS = Concentración del jarabe (% p/p)

X = Conversión a la salida del reactor

3.4 SEGUIMIENTO ANALÍTICO DE LOS JARABES DE FRUCTOSA, SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y EVAPORACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA.

La medición de fructosa y concentración de sólidos totales se efectúan por medio de polarimetría usando el polarímetro STEEG & REUTER modelo SR6-FC serie 8203 y el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

3.4.1 Curvas de calibración de glucosa y fructosa.

Se prepararon seis soluciones de fructosa anhidra marca MERCK de concentraciones 0, 1.2, 4.8, 9.6, 14.4 y 30 % p/v y seis soluciones de glucosa anhidra marca MERCK de concentración 0, 2, 10, 15, 33, 50 % p/v, y se midieron los ángulos de rotación con el polarímetro. Los resultados se reportan en la tabla 12, 13 y 14. El anexo 3 muestra las dos curvas de calibración para glucosa y fructosa. El anexo 4 muestra las ecuaciones y factor de correlación de las ecuaciones necesarias para obtener la relación de fructosa con respecto del ángulo de rotación y la concentración de sólidos reductores.

3.5 GELIFICACIÓN, LICUEFACCIÓN, SACARIFICACIÓN DEL ALMIDÓN E ISOMERIZACIÓN.

3.5.1 Gelificación

Se realizó el proceso de gelificación para permitir el ataque enzimático, se ajustó el pH para la etapa siguiente. La gelificación se realizó en las siguientes etapas:

1. Se preparó una suspensión de almidón del 6 % p/p en buffer de acetato 0.016M y pH 4.7.
2. Se efectuó un calentamiento progresivo hasta los 70° C con agitación constante de 150 rpm para proporcionar la homogenización del gel.

3.5.2 Licuefacción con α -amilasa

1. Se preparó una solución enzimática al 0.1% p/v y del 1% p/v de CaCl₂ en buffer de acetato 0.016 M y pH 4.7
2. Se incubó la enzima a 55° C por cinco minutos y se adicionó al gel de manera que la relación g enzima/ g sustrato fuera del 0.03%, manteniendo la temperatura con baño termostático en 55° C y una agitación de 150 rpm durante 30 minutos. Se tomó una muestra de 0.1 mL y se diluyó a 2 mL, con una absorbancia de 0.414 se determinó la concentración de grupos reductores usando el método colorimétrico del DNS y la curva de calibración de maltosa, para determinar el equivalente de dextrosa.

3.5.3 Sacarificación con AMG:

1. Se incubó la enzima AMG (amiloglucosidasa) en una solución del 0.1% p/v en buffer de acetato 0.016 M y pH 4.7 por cinco minutos.
2. Se adicionó la enzima sobre la solución resultante de la licuefacción a una temperatura mantenida en los 55° C y agitación de 150 rpm durante 30 minutos. Se tomó una muestra de 0.020 mL y se diluyó a 2 mL, con una absorbancia de 0.529 se determinó la concentración de grupos reductores expresado como glucosa usando el método colorimétrico del DNS y la curva de calibración de glucosa. A partir de los datos anteriores se determinó la conversión de almidón en glucosa empleando la ecuación 2.

La solución resultante se pasó a través de una membrana de ultrafiltración para eliminar los oligosacáridos que no se hidrolizaron hasta glucosa y se llevó a un proceso de intercambio iónico y evaporación hasta obtener jarabes de glucosa del 55% p/p.

3.5.4 Isomerización con la enzima glucosa isomerasa:

1. Se ajustó el pH de los jarabes de glucosa a 7.5 usando buffer de fostato, y las condiciones iniciales del jarabe.
2. Se incubó la enzima SWEETZYME -T soportada por 30 minutos a una temperatura de 82° C y se hizo pasar por la columna una relación carga enzimática flujo de 2.98 g enzima*mL*min⁻¹.

3.6 UNIDAD DE INTERCAMBIO IONICO

Los jarabes de fructosa obtenidos por isomerización tienen una concentración de sólidos del 55 % en peso con una concentración de 45 % de fructosa y 55 % de glucosa, contienen además una serie de iones que afectan el funcionamiento de la resina empleada en la etapa siguiente.

1. El jarabe de fructosa proveniente de la isomerización de la glucosa se hizo pasar a través de dos columnas conectadas en serie empacadas con una resina de intercambio aniónico y una de intercambio catiónico simultáneamente con una altura de lecho de 14 cm cada una, con un flujo de 5 mL/min a temperatura ambiente.

3.7 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FRUCTOSA-GLUCOSA

1. Una cantidad de 25 mL de jarabe de fructosa se adicionó a dos columnas conectadas en serie, las cuales contenían 350 g de resina con una altura total de 120 cm, a una temperatura de 28° C y un flujo de jarabe empleado para la separación de 1.18 mL/min y se usaron 596 mL de agua desionizada para la elusión de esta fracción.

3.8 UNIDAD DE EVAPORACIÓN

La solución de fructosa obtenida de la etapa de separación cromatográfica fue luego evaporada bajo vacío hasta una concentración de 50% en peso a una temperatura de 60° C. La evaporación se realiza en un sistema de destilación

simple hasta esta concentración debido a que ésta es la adecuada para el tratamiento con carbón activado ya que a una concentración mayor aumentará su viscosidad y el paso por la columna de carbón será difícil.(PROCESS FOR. 2003)

3.9 DECOLORACIÓN CON CARBON ACTIVADO

A una temperatura de 28° C se hizo pasar el jarabe enriquecido de fructosa con una concentración de 50% en peso de sólidos por una columna de carbón activado para retirar el color. El carbón activado es previamente tratado para mejorar la superficie de contacto y adsorción superficial con HCl 2N y calentado en mufla a 500° C. (PROCESS FOR. 2003).

3.10 CONCENTRACIÓN AL VACÍO

Una vez retirado el color del jarabe de fructosa la etapa siguiente es la evaporación al vacío a una temperatura de 60° C hasta por encima de 90 % en peso de sólidos. (PROCESS FOR. 2003).

3.11 ETAPAS DE CRISTALIZACIÓN

Con el jarabe de fructosa listo a una concentración mayor de 90% de sólidos y una concentración superior a 88% de fructosa, está dispuesta la siguiente etapa que corresponde a la cristalización de fructosa.

1. Se redujo rápidamente la temperatura de 60 a 55° C con el fin de obtener una supersaturación del jarabe y evitar la descomposición térmica que usualmente ocurre cuando el jarabe está sujeto a temperaturas más altas de 65 ° C por largos periodos de tiempo.
2. Se adicionaron núcleos de cristalización (fructosa pura anhidra marca MERCK) de tamaño relativo entre 40 y 80 micras por 3 horas en relación de 7% en peso de fructosa pura por gramo de fructosa en el jarabe.
3. Se permitió un enfriamiento continuo y lento de la mezcla a una velocidad de 0.8°C/h hasta una estabilización de la temperatura en 51° C.
4. Se adicionó etanol absoluto a una temperatura de 51° C lentamente por un periodo de 7 horas hasta una relación de peso de 1.8 g etanol/g de agua en el jarabe, para la disolver la glucosa y el agua disponible en el jarabe de fructosa y permitir la formación de un estado de supersaturación que permite la cristalización de fructosa.
5. Se permitió un enfriamiento suave de la mezcla hasta 27° C a una velocidad de enfriamiento de 0.4 a 0.8° C/hora lo que corresponde a una cristalización en un periodo de 40 a 50 horas después de esto se separan los cristales.

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

Los resultados de la extracción del almidón se relacionan en la tabla 4.

Tabla 5. Extracción de almidón de yuca

Peso yuca (g)	Peso almidón (g)	Peso fibra (g)	% porc almidón	%porc fibra
1000	301,3	81,2	30,13	8,12
1020	302,4	80,3	29,65	7,87
980	298,2	78,2	30,43	7,98

El porcentaje de almidón promedio recuperado fue de 30.07 ± 0.32 y de fibra 7.99 ± 0.1 .

El almidón de color blanco durante la extracción no presenta cantidades considerables de mancha y en algunos casos ninguna. Esto es debido al tiempo de sedimentación, ya que se permite en una primera recuperación del almidón la mayor parte de éste sin que sea atacado por microorganismos en forma aparente. En la segunda parte, después de cuatro horas, la cantidad de almidón que se recupera es poca y es en esta etapa donde se observa la mancha. El almidón extraído es almacenado en un frasco de vidrio para todas las determinaciones de la investigación.

4.2 HUMEDAD

Tabla 6. Determinación de la humedad de yuca (10 g de muestra)

Yuca inicial (g)	Yuca final (g)	Humedad	Desviación estándar
10,02	6,12	61,08	0,1233
9,97	6,07	60,88	0,1152
11,3	6,89	60,97	0,1122
9,84	5,98	60,77	0,1334
10,5	6,41	61,05	0,1186

La Humedad promedio es 60.95 ± 0.12 de una yuca fresca cortada en varios tramos. Los datos registrados corresponden a los más precisos encontrados.

4.3 SEGUIMIENTO ANALÍTICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JARABES DE GLUCOSA Y FRUCTOSA.

4.3.1 Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de maltosa.

La tabla 7 muestra los valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de maltosa empleados para la curva de calibración necesaria para la determinación de la actividad de la enzima α -amilasa. El factor de correlación ($r = 0.9995$) indica el cumplimiento de la ley de Beer en el rango de concentraciones empleado. El anexo 1 muestra la curva de calibración.

Tabla 7. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de maltosa

Concentración de maltosa (ppm)	Absorbancia
100	0,013
200	0,08
300	0,138
500	0,266
800	0,443
900	0,493
1000	0,564

4.3.2 Curva de calibración de absorbancia en función de concentración de glucosa.

La tabla 8 muestra los valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de glucosa empleados para la curva de calibración necesaria para la determinación de la actividad de la enzima AMG. El factor de correlación ($r = 0.9987$) indica el cumplimiento de la ley de Beer en el rango de concentraciones empleado. El anexo 2 muestra la curva de calibración.

Tabla 8. Valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de glucosa

Concentración de glucosa (ppm)	Absorbancia
100	0,035
200	0,132
300	0,194
500	0,362
800	0,518
900	0,729
1000	0,801

4.3.3 Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa.

La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (UI). Una UI se define como la cantidad de enzima (α -amilasa) necesaria para liberar 1 micro-mol de grupos reductores por minuto calculados como maltosa. El resultado de la actividad de la enzima α -amilasa se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Actividad de la enzima α -amilasa

Sustrato	Actividad (UI/mg)
Almidón de yuca	234.78

El valor obtenido está acorde al comparado por los valores registrados en la tesis de grado “Obtención de jarabes de D-glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile) cultivadas en la región Guanentá (Santander)” donde se reportan tres valores de actividad para almidones de yuca (230, 235, 232).

4.3.4 Determinación de la actividad enzimática de glucoamilasa.

El valor de la actividad enzimática se reporta con la misma unidad que la de la enzima α -amilasa calculando los grupos reductores como glucosa. El resultado de la actividad de la enzima AMG se presenta en la tabla 10.

Tabla 10. Actividad de la enzima glucoamilasa

Sustrato	Actividad (UI/mg)
Almidón de yuca	25023

El valor obtenido igualmente está acorde al comparado por los valores registrados en la tesis de grado “Obtención de jarabes de D-glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile) cultivadas en la región Guantán (Santander)” donde se reportan tres valores de actividad para almidones de yuca (24972, 24828, 24788).

4.3.5 Determinación de la actividad enzimática de la glucosa isomerasa.

La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (UIIG). Una UIIG se define como la cantidad de enzima (SWEETZYME-T) necesaria para isomerizar 1 micro-mol de moléculas de glucosa por minuto. El resultado de la actividad de la enzima glucosa isomerasa se presenta en la tabla 11.

Tabla 11. Actividad de la enzima glucosa isomerasa.

Tiempo (h)	Conc. Inicial de glucosa (%p/p)	conversión	Actividad (IGIU/g)
12	50	0,468	342,49
48	50	0,459	314,76

El fabricante reporta una actividad de 350 IGIU/g, lo que muestra una buena actividad de la enzima empleada para la isomerización. La actividad decae por el tiempo de reacción en la columna y la temperatura.

4.4 SEGUIMIENTO ANALÍTICO DE LOS JARABES DE FRUCTOSA, SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y EVAPORACIÓN DE LOS JARABES DE ALTA FRUCTOSA.

4.4.1 Curvas de calibración de glucosa y fructosa. La tabla 12 muestra los valores de concentración de las soluciones de fructosa y glucosa.

Tabla 12. Concentración de soluciones de fructosa y su ángulo de rotación específica

Conc. Fructosa % p/v	Rotación específica
1,2	-0,4
4,8	-8
9,6	-16
14,4	-24,8
30	-52

El valor del ángulo de rotación específica de fructosa es negativo (levógiro), el factor de correlación ($r = 0.9995$) indica el cumplimiento de la linealidad en el rango de concentraciones empleado. El anexo 3 muestra la curva de calibración de fructosa.

Tabla 13. Concentración de soluciones de glucosa y su ángulo de rotación específica

Conc. Glucosa % p/v	Rotación específica
2	1,3
10	10,2
15	16,3
33	35,3
50	53,7

El valor del ángulo de rotación específica de glucosa es positivo (dextrógiro), el factor de correlación ($r = 0.9995$) indica el cumplimiento de la linealidad en el rango de concentraciones empleado. El anexo 3 muestra la curva de calibración de glucosa.

El anexo 4 muestra las ecuaciones empleadas para la obtención de las ecuaciones 8 y 9.

Relacionando éstas y otras curvas correspondientes a mezclas producidas de glucosa y fructosa de concentraciones conocidas se obtuvo una relación que permite determinar la concentración de fructosa en una mezcla cualquiera de glucosa-fructosa conociendo la cantidad de sólidos disueltos y el ángulo de rotación óptica de la mezcla:

$$[F] = -0,35123 \cdot \alpha_o + 0,1867 + 0,37974 \cdot [S] \quad \text{Ecuación 8.}$$

$$[G] = 0,35123 \cdot \alpha_o - 0,16949 + 0,62026 \cdot [S] \quad \text{Ecuación 9.}$$

donde

[F] es la concentración de fructosa en %p/v

[S] es la concentración de sólidos (glucosa-fructosa) en %p/v

[G] es la concentración de glucosa en %p/v

α_o es el ángulo de rotación de la mezcla.

Las ecuaciones 7 y 8 permitieron determinar las proporciones de glucosa y fructosa que se obtienen durante la separación cromatográfica de la mezcla así como en la evaporación de los jarabes

4.5 JARABE DE GLUCOSA

El jarabe de glucosa preparado en tres etapas presentó las características indicadas en las tablas 14, 15 y 16.

4.5.1 Condiciones de gelificación

Se tomaron 99 g de almidón extraído y se preparó 1650 g de una solución de almidón ajustada a pH 4.7 con buffer de acetato y se trataron usando las condiciones de la tabla 14 en el dispositivo que muestra la figura 11. Se obtuvo un gel uniforme con una hidratación total del almidón que fue observado por medio de un microscopio. La tabla 14 muestra las condiciones de Gelificación del almidón.

Tabla 14. Condiciones de gelificación.

VARIABLE	VALOR
PH	4,7 (buffer acetato 0,016 M)
Temperatura	70° C
Concentración almidón	6% p/p
Agitación	150 rpm
Tiempo	30 min

4.5.2 Licuefacción con α -amilasa.

En el mismo dispositivo pero a una temperatura de 55° C, se introdujo 0.0297 g de enzima α -amilasa previamente preparada con CaCl_2 en buffer de acetato, durante 30 minutos. Se tomó una muestra y se leyó la concentración de azúcares

reductores usando la curva de calibración de maltosa, se calculó el equivalente de dextrosa empleando la ecuación 1. En la tabla 15 se resumen las condiciones empleadas para la licuefacción del almidón, y el equivalente de dextrosa obtenido.

Tabla 15. Condiciones de trabajo de la enzima fungamyl 2500 BG

VARIABLE	VALOR
Temperatura(°C)	55
pH	4,7
Conc.Enzima (%g de E/g de S)	0,003
Tiempo de Reacción (min)	30
Equiv. Dextrosa (ED)	25.02

Figura 11. Reactor para Gelificación, Licuefacción y Sacarificación de almidón.



4.5.3 Sacarificación con glucoamilasa.

En el mismo sistema se adicionó 1.98 g de la enzima glucoamilasa en una proporción de 2% g de enzima / g de sustrato.

Como resultado un jarabe de glucosa con una conversión del 96.09 % calculada a partir de la ecuación 2. Las características de la sacarificación y las condiciones empleadas se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de trabajo de la enzima glucoamilasa AMG 1000 BG y resultados del jarabe de glucosa

VARIABLE	VALOR
Temperatura(°C)	55
PH	4,7
UI/S	300
Tiempo de Reacción (min)	30
Conc. Glucosa (% p/p)	6.46
Oligosacáridos y dextrinas	0.26

El valor de la concentración de glucosa aumenta a 6.46% p/p debido a que con la hidrólisis se adiciona una molécula de agua por cada enlace roto, ganando en una proporción de 1.11 en peso la concentración de azúcares reductores y perdiendo 10.6 mL de agua. Además se presentan pérdidas de agua debido a que el sistema no es totalmente cerrado. La concentración de oligosacáridos y dextrinas corresponde a la cantidad de almidón que sufre ruptura de enlaces y no se convierte totalmente en glucosa.

El jarabe fue pasado a través de una membrana de ultrafiltración en espiral y flujo tangencial (Prep/Scale-TFF, Millipore) con un área de filtración de 0.09 m² y tamaño de poro para filtrar moléculas de peso molecular hasta de 10.000 Dalton. Se dejó recircular los jarabes a través de la membrana de ultrafiltración hasta que se eliminó los sólidos suspendidos más notables. Se alimentó con una bomba peristáltica con un flujo de 7 mL/min y una presión de entrada de entre 0 y 20 psi.

4.6 ISOMERIZACIÓN DE GLUCOSA A FRUCTOSA

El jarabe obtenido fue concentrado en un sistema de destilación al vacío (30" Hg) a 60° C con el fin de no degradar la molécula de glucosa, hasta una concentración de 54.89 % p/p de sólidos totales. El jarabe fue pasado a través de dos columnas que contenían resinas de intercambio iónico, aniónica y catiónica respectivamente, con el fin de eliminar los iones Ca⁺⁺ que afectan el funcionamiento de la resina, se ajustaron las condiciones de la enzima glucosa isomerasa como se indica en la tabla 4.

La conversión de sólidos en base seca (sbs) corresponde a la conversión de la glucosa en fructosa. La conversión obtenida fue de 45 % lo que implica una solución de azúcares con la composición que muestra la tabla 17. La figura 12 muestra el dispositivo empleado para la isomerización de glucosa a fructosa. El jarabe presenta una coloración amarilla debido a la liberación del soporte.

Tabla 17. Composición jarabe de fructosa

COMPONENTE	PORCENTAJE
Sólidos totales	54,89
Glucosa	30.19
Fructosa	24,70

El jarabe de fructosa obtenido es pasado nuevamente por las columnas de intercambio iónico.

Figura 12. Columna de isomerización de glucosa a fructosa



4.7 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FRUCTOSA-GLUCOSA

Esta etapa consistió en una separación parcial de fructosa de la mezcla glucosa-fructosa y la posterior preparación de un jarabe enriquecido de la misma la cual contiene también pequeñas cantidades de glucosa. Para la determinación de las condiciones de trabajo se realizaron separaciones parciales manteniendo fija una de las variables y teniendo en cuenta las propuestas por el método de separación de lecho móvil que se realiza en continuo para la separación cromatográfica.

La tabla 18 muestra la determinación de las mejores condiciones para la separación cromatográfica.

Tabla 18. Datos para la determinación de las mejores condiciones para la separación cromatográfica.

Flujo (mL/min)	Concentración (%p/p)	Temperatura °C	Volumen (mL)	% Fructosa Recuperado	Máxima % Fructosa
19.35	50.33	28	30	25.97	79.67
13.65	52.12	28	40	7.39	84.75
3.41	51.36	28	50	7.79	66.28
1.23	54.35	28	25	13.37	95.08
1.18	55.23	28	25	62.22	98.85
1.22	55.23	28	40	51.95	83.63
5.16	55.16	28	40	38.90	86.68
1.2	52.64	40	25	62.47	96.52
1.3	50.42	43	50	49.39	69.05

Las variables fueron determinadas teniendo en cuenta el porcentaje de fructosa recuperado y el máximo porcentaje de separación de fructosa. El flujo elevado produce una baja separación de los componentes de la solución; flujos más pequeños (6 mL/min – 1mL/min) producen mejores separaciones, sin embargo el porcentaje de recuperación es mucho mayor para el flujo de 1.18 mL/min. El volumen de jarabe adicionado a las columnas de separación se estableció en 25 mL debido a que cantidades superiores de jarabe no se separan de manera apreciable y sólo se recupera una pequeña proporción de fructosa. La temperatura se fijó en 28 °C ya que a 40 ° se tienen problemas de fluidización de la resina y además el porcentaje de recuperación es ligeramente mayor. Por otro lado, el mantenimiento de la temperatura del sistema por el tiempo de la separación (9 horas aproximadamente) implica gastos. La concentración del jarabe varía entre 50 y 55 % p/p y teniendo en cuenta la recuperación de fructosa se estableció en 55%.

El jarabe de glucosa-fructosa que tiene una concentración de 54.89 % de sólidos disueltos obtenidos de la etapa anterior y a una temperatura de 28° C se adicionó a una columna cromatográfica que contiene un lecho empacado formado por una resina en la forma de intercambio catiónico cargada con calcio (Ca) que adsorbe fructosa en mayor grado que la glucosa. Como consecuencia de esta retención selectiva de fructosa por la resina se obtiene una fracción parcial de los dos isómeros. Posteriormente, la elusión se realizó con agua la cual previamente se ha desionizado y desoxigenado en una unidad de intercambio iónico y por temperatura respectivamente. Esta se adicionó a la columna cromatográfica para efectuar la desorción de fructosa. Con respecto al procedimiento propuesto por las patentes, aquí se realizó la separación de los isómeros no en continuo sino por lotes; una cantidad de 25 mL se adicionó a dos columnas conectadas en serie, las cuales contenían 350 g de resina con una altura de 90 cm, el flujo empleado para la separación fue de 1.18 mL/min y se usaron 596 mL para la elusión de esta fracción. La tabla 18 resume las condiciones para la separación cromatográfica.

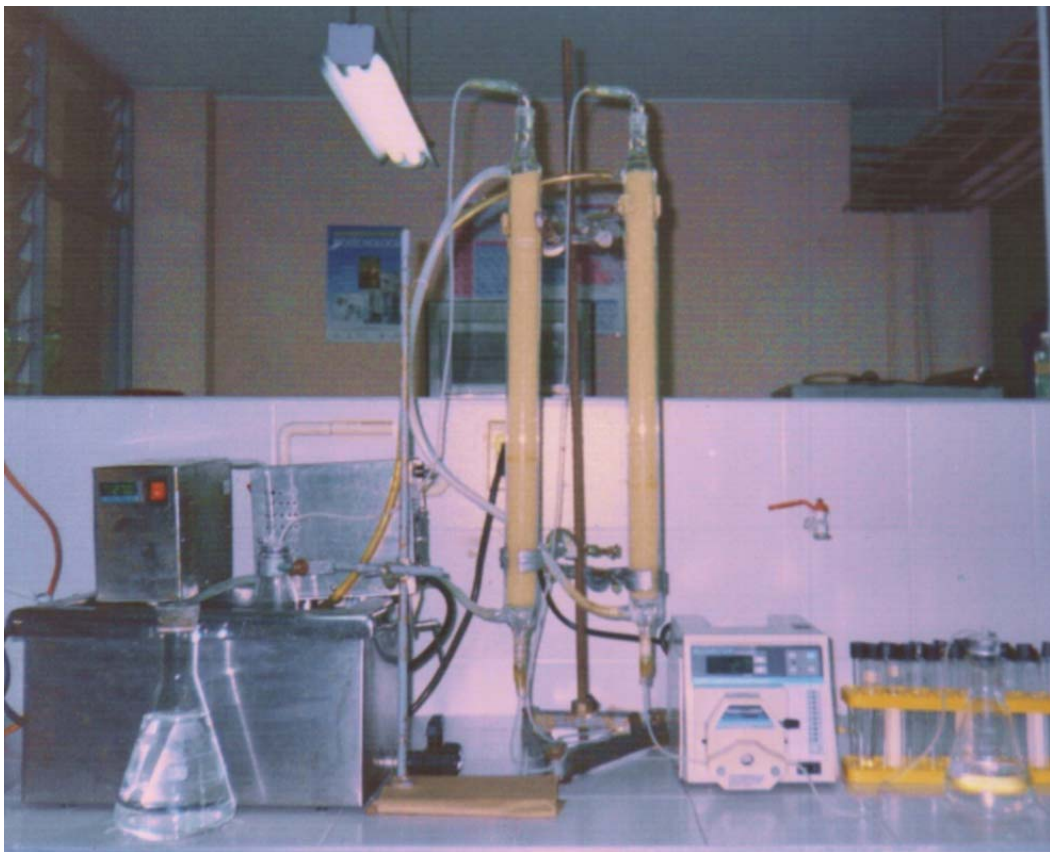
Tabla 19. Condiciones de trabajo para la resina Monosphere 99 empleada en la separación cromatográfica de fructosa.

CONDICIÓN	VALOR
Concentración Jarabe% p/p	54.89
temperatura °C	28
Oxígeno disuelto (ppm)	<0.1
Flujo	1.18

La figura 13 muestra el sistema empleado para la separación cromatográfica de glucosa y fructosa.

En la figura se observan el baño termostataado con una temperatura de 28 °C y en su interior el jarabe de glucosa, la bomba peristáltica con un flujo de 2.3 mL/min en el indicador y flujo real de 1.18 mL/min, los tubos de ensayo 15 mL para la recolección de las muestras de la separación y las dos columnas conectadas en serie.

Figura 13. Columnas de separación cromatográfica



25 mL de solución de glucosa-fructosa del 54.89 % p/v de sólidos y conversión del 45 % fue adicionada a dos columnas empacadas con 350 g de resina MONOSPHERE 99 de separación cromatográfica y altura total de 180 cm, a una temperatura de 28 °C, por medio de una bomba peristáltica que permitía un flujo a

través de la columna de 1.18 mL/s; se adicionaron 569 mL de agua desionizada y desoxigenada por 8 horas como eluyente. La tabla 20 muestra los datos obtenidos en la separación. Después de 4 h y 44 min (284 min) de iniciada la separación se recogió la primera muestra de 13 mL de solución de azúcares para ser analizada por polarimetría y espectroscopia de absorción a 450 nm usando el método colorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Durante 1 hora y 40 min se recogieron las muestras que contienen la mayor proporción de glucosa y a partir de ese momento se obtienen las muestras adecuadas para la cristalización de fructosa (concentración mínima de fructosa 89% de sólidos).

La separación tarda 8 horas hasta que la última muestra no presenta cantidades considerables de fructosa

Tabla 20. Datos obtenidos de la separación cromatográfica

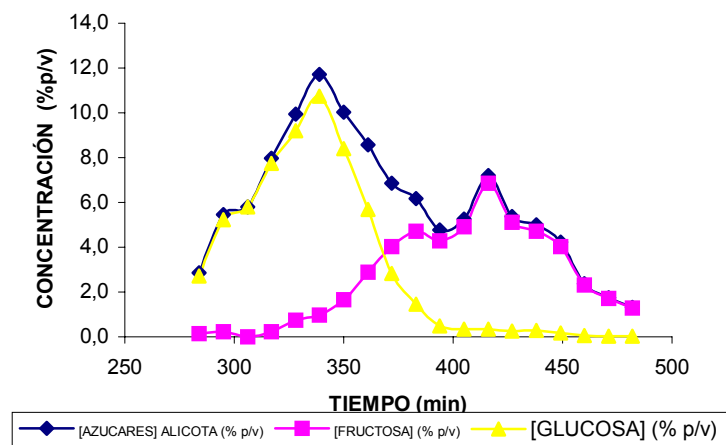
Se obtuvieron 234 mL aproximadamente de solución de fructosa que contenía 4.83 g de fructosa y 0.28 g de glucosa como muestra la tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la separación cromatográfica de fructosa

COMPONENTE	PESO (g)	CONCENTRACIÓN % p/p	% SÓLIDOS	% RECUPERACIÓN
FRUCTOSA	4.83	2,06	94,63	62.80
GLUCOSA	0.28	0,12	5,37	2.97

La figura 14 muestra la gráfica de separación cromatográfica de fructosa en un sistema de dos columnas conectadas en serie.

Figura 14. Separación cromatográfica de fructosa



4.8 EVAPORACIÓN

El jarabe anterior se llevó a un sistema de destilación simple con vacío a 60 °C hasta obtener un volumen de solución de 7 mL y una concentración de sólidos de 50 % p/p. El jarabe resultante fue almacenado en una botella ámbar de vidrio en una nevera a una temperatura de 8° C para evitar el ataque de microorganismos en el jarabe. El procedimiento anterior se repitió con los 152 mL más de la solución a separar (seis separaciones en total) obteniendo una solución al 2.18 % de sólidos y 94.63% sbs de fructosa, hasta separar la solución total obtenida en la etapa de isomerización.

Se obtuvo una solución de azúcares reductores del 50% en peso y se introdujeron en una columna de carbón activado para remover el color.

4.9 DECOLORACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

Para la decoloración del jarabe de fructosa se empleó carbón activado granular ya que el carbón activado tipo polvo no es el recomendado para procesos estáticos (batch) debido a los problemas de eliminación de residuos de carbón. El carbón fue tratado previamente con ácido clorhídrico HCl 2N durante 1 h y luego lavado con agua desionizada y secado en una mufla a 500° C para mejorar sus propiedades adsorbentes. La figura 15 muestra le dispositivo empleado para la decoloración del carbón activado. La tabla 22 muestra las condiciones para la decoloración del jarabe de fructosa. La figura 15 muestra el sistema empleado para la decoloración y purificación del jarabe de fructosa.

Tabla 22. Condiciones para la decoloración del jarabe de alta fructosa.

VARIABLE	VALOR
Sólidos	50 %p/p
Temperatura (°C)	28
Flujo (mL/min)	0,6
PH	5,5

Figura 15. Columna de decoloración del jarabe de fructosa



4.10 CONCENTRACIÓN AL VACÍO

En un biorreactor, que se empleó como cristizador, acoplado a una bomba de vacío, se concentró el jarabe de fructosa a una temperatura de 60° C para evitar la caramelización del azúcar y a 30 pulgadas de Hg hasta una concentración de 91% de sólidos medidos por dilución por polarimetría. En esta etapa se obtiene un jarabe purificado de alta fructosa del 94.63 % sbs.

4.11 ETAPAS DE CRISTALIZACIÓN

El jarabe de fructosa de concentración 91.15 % de sólidos ubicado en un bioreactor con una bomba de vacío y trampa de cloruro de calcio, agitación para permitir la dispersión de los cristales y la cristalización del isómero β -D-fructopiranososa a una temperatura de 60° C, se le redujo la temperatura hasta 55° C usando hielo en el baño termostatado. Se adicionaron 0.34 g de fructosa cristalina pura marca Merck cada 30 min durante 3 h como semillas o núcleos de cristalización hasta una relación de 7% en peso de fructosa pura por gramo de fructosa en el jarabe. Después de esto, se redujo la temperatura del baño termostatado 0.4° C cada 30 min por 5 h hasta reducir la temperatura a 51° C. Posteriormente se adicionaron 8.5 mL de alcohol etílico anhidro durante 7 horas mientras se mantenía la agitación hasta una relación de 1.8g de alcohol / g de agua en el jarabe. En esta etapa se reduce la solubilidad de la fructosa en el líquido madre e inicia el proceso de crecimiento de los núcleos de cristalización. Luego, un enfriamiento suave de la mezcla hasta 27° C a una velocidad de enfriamiento de 0.6 °C/h se efectuó sobre el sistema en un periodo de 40 h; después de esto se separaron los cristales por centrifugación y en un embudo buchner. Los cristales se lavaron con etanol enfriado a 4° C en la centrífuga para

remover la glucosa adherida a la superficie de los cristales aumentando la pureza de la fructosa cristalina y el líquido madre (alcohol con fructosa y glucosa) fue mantenido en un frasco ámbar. Los cristales lavados fueron luego secados con aire caliente a una temperatura menor a 80° C, se pesaron y se midió el rendimiento. La tabla 23 muestra las condiciones de la cristalización. La figura 16 muestra el sistema empleado para la cristalización de fructosa.

Figura 16. Sistema de cristalización de fructosa y cristales de fructosa

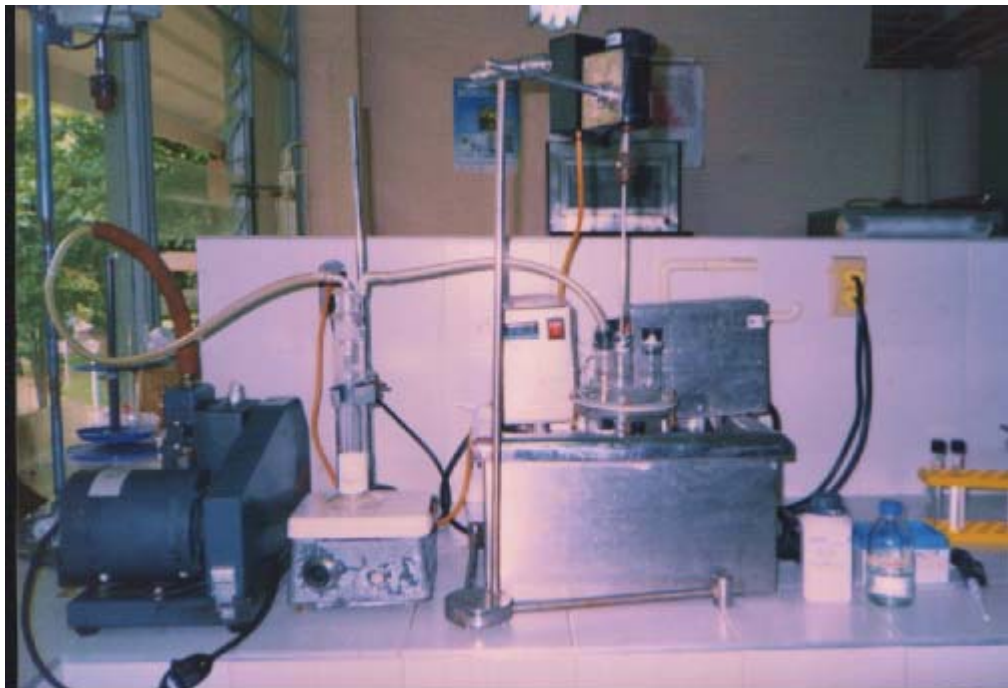


Tabla 23. Condiciones para la cristalización de fructosa

ETAPA	CONDICIÓN	VALOR	ACCIÓN
1	Temperatura (°C)	60	Disminución rápida de la temperatura hasta 55°C
	Agitación (rpm)	150	
	Concentración (%p/p)	91,15	
2	Temperatura (°C)	55	Adición de núcleos de cristalización
	Agitación (rpm)	150	
	Concentración (%p/p)	91,15	
	g fructosa/g núcleos	7	
	Adición de núcleos (g fructosa/30 min)	0,34	
	tiempo (h)	3	
3	Temperatura (°C)	55	Disminución de la temperatura hasta 51°C y crecimiento de los cristales
	Agitación (rpm)	150	
	Reducción de temperatura (°C/30min)	0,4	
	tiempo (h)	5	
4	Temperatura (°C)	51	Adición de alcohol anhidro al jarabe
	Agitación (rpm)	150	
	g alcohol/g agua en el jarabe	1,8	
	tiempo (h)	7	
5	Temperatura (°C)	51	Reducción de la temperatura hasta 27 °C
	Agitación (rpm)	150	
	Reducción de temperatura (°C/h)	0,6	
	tiempo (h)	40	

Los resultados de la cristalización de fructosa se relacionan en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados de la cristalización de fructosa

Fructosa (g)	Recuperación % (g cristales/g fructosa sln)	Recuperación total cristalizabile (g cristales/g fructosa β-D-fructopiranososa)	cristalización de fructosa % (g cristales/g fructosa teórica)
8.95	30.47	76.19	19.02

El porcentaje de recuperación corresponde a la cantidad de cristales obtenidos por gramo de fructosa presente en la solución a cristalizar. El resultado es muy bueno teniendo en cuenta que el objetivo del proyecto era la cristalización de fructosa a

partir de almidón de yuca. Teniendo en cuenta que el tautómero β -D-fructopiranososa se encuentra en una proporción cercana al 40% de la fructosa en solución alcohólica y acuosa, la cristalización real será lo correspondiente a éste único cristizable, para el que se obtuvo una recuperación del 76.19 %. El porcentaje de cristalización de fructosa corresponde al proceso total calculado con respecto a la fructosa teórica que resultaría en 100 % de efectividad del proceso.

4.12 ANÁLISIS DE FRUCTOSA

La fructosa obtenida se analizó por difracción de rayos X y por IR. El anexo 5 muestra el espectro de difracción y su comparativo con los datos encontrados en bases de datos. El anexo 6 muestra el espectro IR de la fructosa y su comparativo obtenido de bases de datos.

5. CONCLUSIONES

1. El almidón de yuca puede emplearse como materia prima para la obtención de derivados edulcorantes como jarabes de glucosa, jarabes de fructosa y fructosa cristalina, esta última, siguiendo la metodología propuesta en este trabajo.
2. En la extracción del almidón, el tiempo de sedimentación se redujo y se dividió en dos partes para evitar la formación de mancha que afecta la calidad del almidón de yuca.
3. Se obtuvo un jarabe de glucosa con una conversión del 96.09% de almidón de yuca en glucosa en la etapa de licuefacción y sacarificación, 6.46 % p/p de glucosa en solución y una cantidad de oligosacáridos de 0.26 % p/p
4. Se obtuvo un jarabe de fructosa con una conversión del 45% que se encuentra en el margen de isomerización de la enzima glucosa isomerasa como producto para preparación de jarabes de alta fructosa del 94 % siguiendo la etapa de separación cromatográfica.
5. La aplicación de polarimetría en la determinación de las concentraciones de glucosa y fructosa de mezclas de éstos disminuyó los costos de operación del proyecto así como el tiempo de análisis con métodos enzimáticos.

6. Se obtuvo dos ecuaciones que relacionan las concentraciones de fructosa y glucosa con el ángulo de rotación polarimétrica y la concentración de sólidos totales.
7. En la etapa de separación de carbohidratos se alcanzó una separación de fructosa del 62.80% y glucosa del 2.97% y una concentración de fructosa del 94.63 % sbs.
8. Las variables de la separación se determinaron teniendo en cuenta la concentración final de sólidos en base seca de fructosa, ya que ésta es determinante en la cristalización final del carbohidrato.
9. La evaporación al vacío empleando un sistema de destilación simple fue adecuada para proteger la molécula de la descomposición térmica.
10. Seguir cuidadosamente las etapas de cristalización lleva a una mejor obtención de fructosa sólida y con mejores rendimientos. Es esencial el control de la temperatura y la agitación para lograr la cristalización de fructosa.
11. Los cristales obtenidos fueron separados con un embudo buchner, lavados con alcohol para remover los residuos de glucosa que pudieran cristalizar en la superficie de los cristales de fructosa y secados con aire a 80° C para evitar que se disuelvan nuevamente por la humedad.

12. El porcentaje de recuperación de fructosa fue del 30.47% de la cantidad de fructosa en solución, un buen porcentaje ya que los datos que se encuentran resultan de procesos que cuentan con equipos especializados para la cristalización así como de un sistema de separación de los carbohidratos que funciona en continuo y permite recuperaciones de hasta el 90% de fructosa empleando almidón de maíz como materia prima para la elaboración de los edulcorantes.

RECOMENDACIONES

1. En la etapa de separación cromatográfica realizar un estudio del proceso en continuo con el fin de mejorar el porcentaje de separación que es uno de los pasos más importantes en la cristalización de fructosa.
2. Realizar pruebas a escala de planta piloto para la separación cromatográfica y la cristalización con el fin de llevar el proceso total a escala industrial.
3. Continuar estudiando la cristalización de fructosa empleando los otros alcoholes con el fin de comparar los porcentajes de recuperación.
4. Realizar un estudio de factibilidad para el proceso de cristalización de fructosa propuesto por la compañía DOW empleando las resinas para la purificación de los jarabes producidos durante la operación de cristalización a partir de almidón de yuca.
5. Realizar un estudio sobre cómo mejorar la presencia de una mayor proporción de β -D-fructopiranososa en la mezcla agua-alcohol-fructosa-glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN, Freddy y DOMINIQUE, Dufour. Almidón agrio de yuca en Colombia: Producción y recolección. Palmira: CIAT. 1998. p.3-6, 9-16, 20.

BLANCO, V. Juan. Producción de jarabes especiales de alta fructosa (HFSS) a partir de jarabes de fructosa obtenidos de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile) cultivadas en la región Guanentá (Santander). Universidad Industrial de Santander. 2002. pag. 41-61.

BERNAL, Ines. Análisis de alimentos. Santa fe de Bogotá: Guadalupe. 1994. p.10, 44. (Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, Colección Julio Carrizosa Valenzuela: No2).

BUSTAMANTE, R., RINCÓN, R. Estudios de las Variables que Afectan la Producción por Medios Enzimáticos de Jarabes de Alta Fructosa a Partir de Jarabes de Glucosa. Universidad Industrial de Santander. 1990. p. 102

CORN REFINERS Association. U.S. Department of Commerce 1997 Census of Manufactures data. On-line. 19-09-2003. Available from internet <http://www.census.gov/prod/ec97/97m3112d.pdf>

DIAS, Martha; KAUR, Paramjeet & STORRAR, Megan. Production of refined high fructose corn syrup and crystalline fructose from unrefined high fructose corn syrup. On-line. 13-05-2003. Available from internet. www.google.com search "crystallization of fructose". p. 29-51.

DOMÍNGUEZ, c. YUCA: Investigación, producción y utilización. Santa fe de Bogotá: OSPREY. 1985. P. 185-196, 539-554.

DOW LIQUID Separations. Dowex Marathon A2. Ion Exchange Resin. On-line. 08-09-2003. Available from internet. <http://www.dowex.com>

DOWEX MARATHON C. A Uniform Particle Size, High Capacity Cation Exchange Resin for Softening and Demineralization Applications. On-line. 08-09-2003. Available from internet. <http://www.dowex.com>.

DOWEX MONOSPHERE. Ion Exchange Resins Chromatographic Separation of fructose and glucose with DOWEX MONOSPHERE resins. On-line. 08-09-2003. Available from internet. <http://www.dowex.com>

FICHA TÉCNICA, Enzime Business. Fungamyl® BG. Novo Nordisk. Folleto B 697e-E. Pág. 1 – 3.

FICHA TÉCNICA, Enzime Business. AMG para Panificación. Novo Nordisk. Folleto B 848c-E. Pág. 1 – 3.

FICHA TÉCNICA, NOVO INDUSTRI A/S. Novo method for activity determination of the immobilized glucoseisomerasa-SWEETZYME -T, 1987.

KPATENTS PROSSES Instruments. Starch Sweeteners Process. APN10301. On-line. 13-05-2003. Available from internet. <http://www.kpatents.com>

KUO-CHENG, C., JUAN-YIH, W. "Substrate protection of immobilized glucose isomerase". Biotechnol. Bioeng., 1987, 30, 817-824.

LUNA, Tatiana & CABANZO, Andrea. Estudio del proceso de extracción de almidón de yuca de tres variedades (amarga, armenia y chile) y evaluación de la remoción del cianuro en el residuo líquido obtenido en la sedimentación del almidón. Universidad Industrial de Santander. 2002. p. 50-60

MONTALDO, A. La yuca frente al hambre del mundo tropical. Maracay: Anauco. 1996 p.351-362.

MORRISÓN, ROBERT T., Boyd Robert N., Química orgánica. 5^{ta} ed. Addison-Wesley Iberoamericana. USA, 1996. P. 1258 – 1259, 1284, 1309, 1357

PROCESS FOR the Production of Crystalline Fructose of High Purity Utilizing Fructose Syrup Having a Low Content of Fructose Made from Sucrose and Product Obtained. On-line. 15-06-2003. Available from internet.

<http://ep.espacenet.com/espacenet/viewer> PN=US5656094. Search “crystallization AND fructose”.

ROJAS, H. Luisa & MAZO, R. Juan. Isomerización de glucosa a fructosa a nivel de laboratorio, a partir de glucosa isomerasa inmovilizada. Universidad de Antioquia. 2002. p. 44 –56.

SÁNCHEZ, L. Alberto. Obtención de jarabes de D-glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (Amarga, Armenia y Chile) cultivadas en la región Guanentá (Santander). Universidad Industrial de Santander. 2002. p.

SIMS, Kevin A. and CHERYAN, Munir. 1992. Hydrolysis of Liquefied Corn Starch in a Membrane Reactor. *Biotechnology and Bioengineer* 39: 960 – 967.

SOUMEN SOKERI Osakeyhtio. Method for Crystallization of Fructose from Water Solution. Mannerheimintie, Helsinki, Finlandia. On-line. 15-06-2003. Available from internet. <http://ep.espacenet.com>. Search “crystallization AND fructose”.

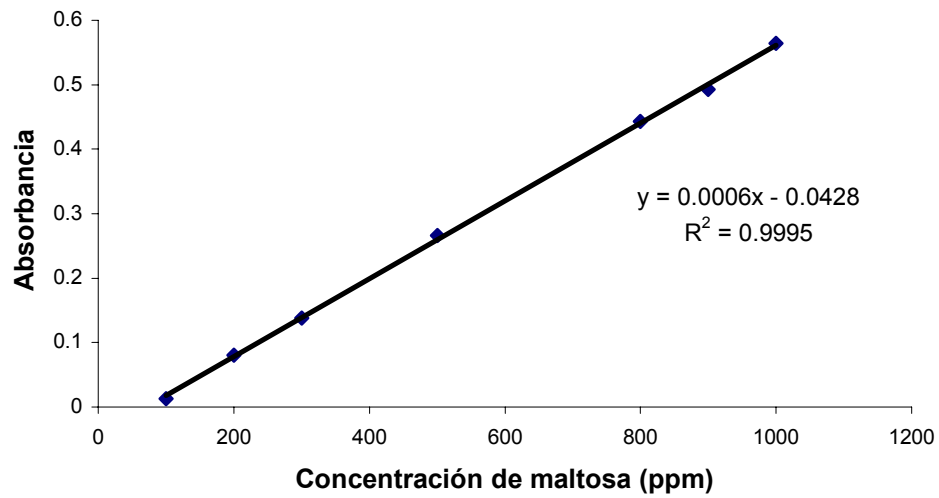
ULIBARRI, R. López and HALL, G. M. Saccharification of Cassava Flour Starch in a Hollow-Fibber Membrane Reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 1997 21:398 – 404.

WHISTLER, Roy L., SMITH, Robert J., BEMILLER, James N. y WOLFROM, M. L. *Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. IV, Starch.* Academic press, New York 1964. 335p.

ANEXOS

ANEXO 1.

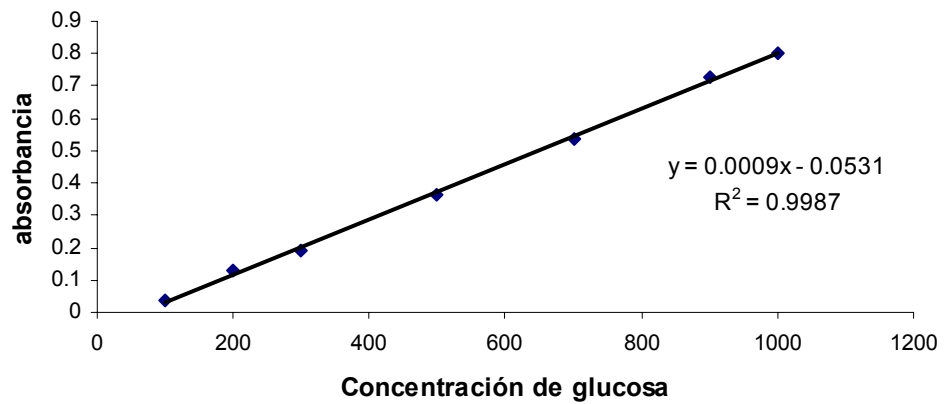
Curva de calibración de maltosa



Se preparó una solución de maltosa (Merck, Darmstadt) de concentración 1000 ppm, y empleando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se leyó la absorbancia a 540 nm para cada uno de los patrones preparados por dilución.

ANEXO 2.

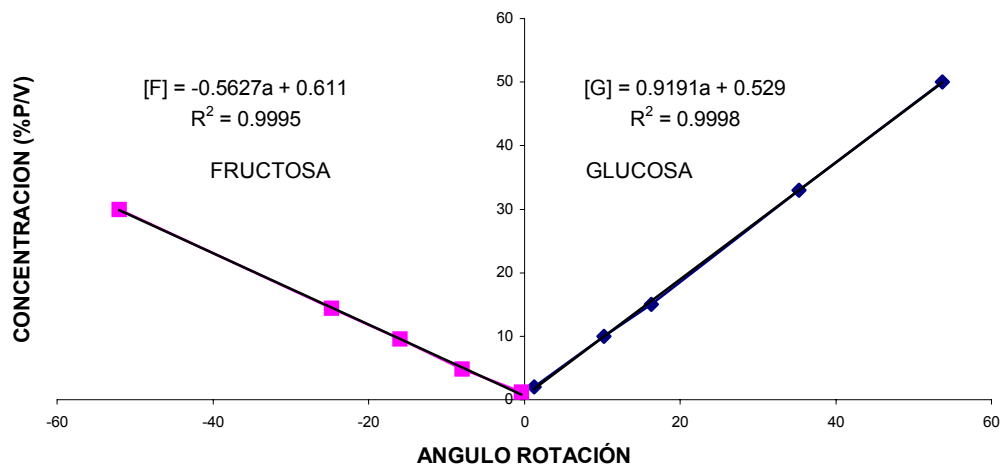
Curva de calibración de glucosa



Se preparó una solución de glucosa (Merck, Darmstadt) de concentración 1000 ppm, y empleando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico se leyó la absorbancia a 540 nm para cada uno de los patrones preparados por dilución.

ANEXO 3.

CURVAS GLUCOSA Y FRUCTOSA Vs. ROTACIÓN POLARIMETRICA



Se preparó una solución de glucosa y una de fructosa de 50% p/v, se prepararon los patrones por dilución y se leyó el ángulo de rotación polarimétrico usando un polarímetro STEEG & REUTER modelo SR6-FC serie 8203.

ANEXO 4.

Ecuaciones empleadas para obtener la relación de fructosa con respecto del ángulo de rotación polarimétrico y la concentración de sólidos totales.

$$[S] = [F] + [G]$$

$$\alpha_S = \alpha_F + \alpha_G$$

$$\alpha_O = 0.9937\alpha_S + 0.0245 \quad r^2 = 0.9988$$

$$\alpha_F = -1.7762[F] + 1.0743 \quad r^2 = 0.9995$$

$$\alpha_G = 1.0877[G] - 0.5698 \quad r^2 = 0.9998$$

$$[F] = -0.35123\alpha_O + 0.37974[S] + 0.1867$$

$$[G] = 0.35123\alpha_O + 0.62026[S] - 0.16949$$

donde

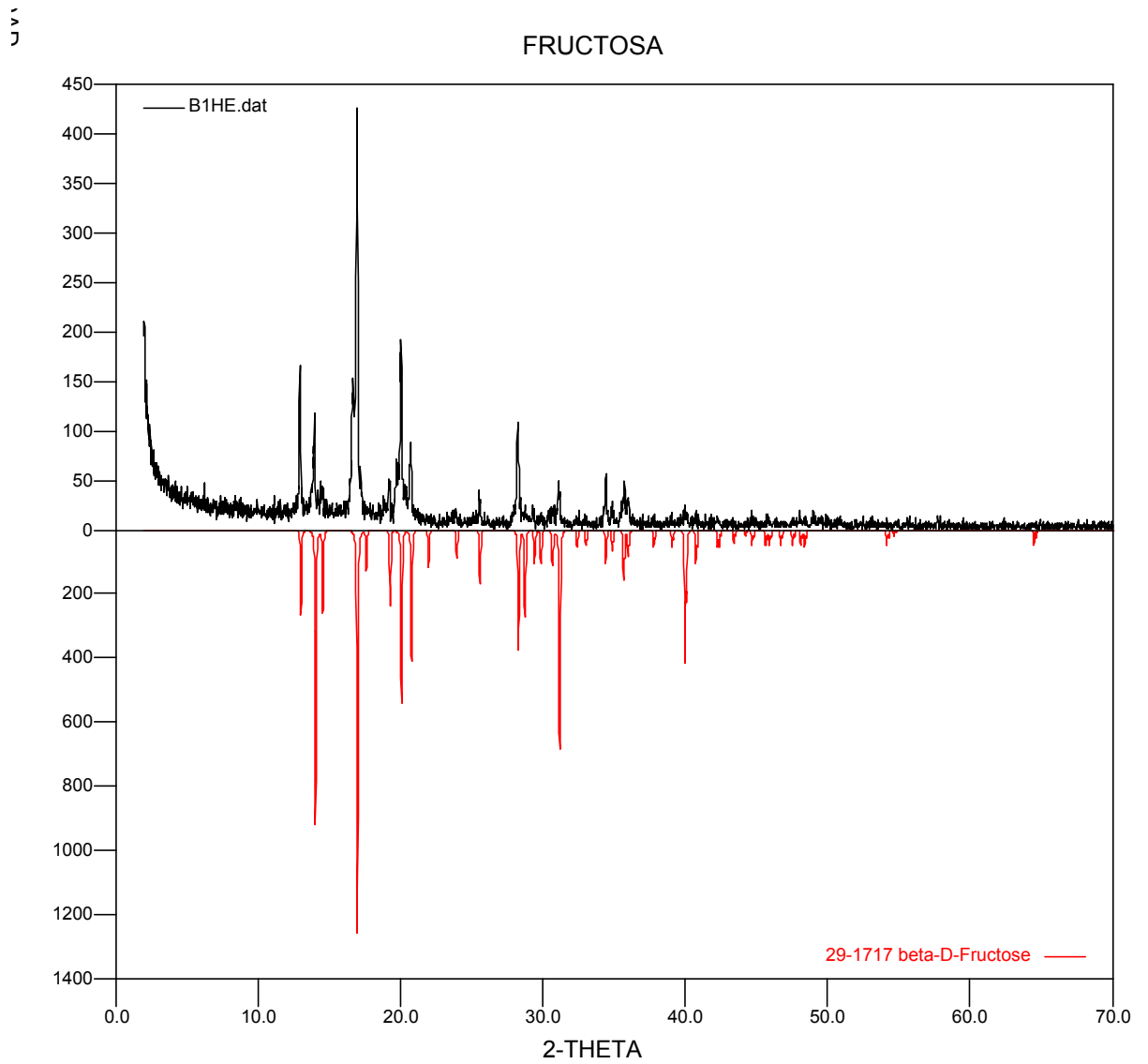
$[S], [F], [G]$ concentración de sólidos, fructosa y glucosa (%p/v)

$\alpha_O, \alpha_S, \alpha_F, \alpha_G$ ángulo observado, ángulo suma, ángulo de fructosa y ángulo de glucosa

Se comprobaron las ecuaciones para soluciones de glucosa y fructosa con el valor entregado por la ecuación obteniendo $r^2 = 0.9997$ y $r^2 = 0.9999$ respectivamente.

ANEXO 5.

PERFIL DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X



2Theta	d (A)	Height	Area	FWHM
3,676	2,401,530	2,9	20,5	0,1400
6,995	1,262,607	4,3	44,9	0,2400
7,674	1,151,169	2,5	16,9	0,1500
8,405	1,051,127	4,3	20,6	0,1600
9,138	966,959	2,8	28,9	0,2200
9,972	886,288	2,9	20,0	0,1400
11,115	795,414	3,1	15,2	0,1000
11,377	777,162	2,9	20,5	0,1400
12,961	682,511	77,9	622,9	0,1600
13,956	634,037	42,7	341,5	0,1300
14,470	611,642	14,6	116,5	0,1350
15,569	568,717	3,6	28,2	0,1400
16,949	522,697	226,1	2016,5	0,1800
18,059	490,808	4,0	24,1	0,1200
18,476	479,823	3,9	27,1	0,1400
19,204	461,797	21,8	174,3	0,1600
20,037	442,777	97,7	781,5	0,1600
20,351	436,021	20,8	165,9	0,1600
20,722	428,304	42,2	456,5	0,2200
21,192	418,914	5,1	25,5	0,1000
23,856	372,690	4,6	22,9	0,1100
25,552	348,336	10,8	53,7	0,1150
27,163	328,025	2,7	19,2	0,1400
28,223	315,944	55,7	389,2	0,1100
28,752	310,247	10,6	63,1	0,1200
29,353	304,032	9,8	58,8	0,1300
29,856	299,020	7,5	52,5	0,1400
30,380	293,980	7,9	55,1	0,2000
30,689	291,097	11,8	82,6	0,1800
31,098	287,359	24,1	192,9	0,1600
34,427	260,295	29,7	203,7	0,1400
34,844	257,272	12,7	101,2	0,1600
35,730	251,097	24,8	172,4	0,1400
35,984	249,382	18,3	127,8	0,1400
38,677	232,617	4,2	37,4	0,1800
39,019	230,653	6,4	51,6	0,1600
39,948	225,502	10,3	81,9	0,1600
40,736	221,319	8,0	74,9	0,2000
42,270	213,635	5,3	31,2	0,1200
44,673	202,687	7,7	76,2	0,2000
45,814	197,900	5,9	35,3	0,1200

47,574	190,981	4,7	33,0	0,1400
48,043	189,225	6,2	43,0	0,1400
48,327	188,178	4,3	29,6	0,1400
48,997	185,761	7,4	51,9	0,1400
49,440	184,200	5,4	31,4	0,1200
49,962	182,399	4,5	31,6	0,1400
50,517	180,525	2,9	25,1	0,1800
50,814	179,536	5,5	54,5	0,2000
51,997	175,727	3,7	29,3	0,1600
53,031	172,543	2,6	23,6	0,1800
54,758	167,502	2,7	29,7	0,2200
55,555	165,287	3,0	21,2	0,1400
55,763	164,718	2,5	17,7	0,1400
56,914	161,659	2,3	14,0	0,1200
57,719	159,594	6,6	45,9	0,1400
58,500	157,647	3,6	28,6	0,1600
59,172	156,017	1,5	11,8	0,1600
59,524	155,178	2,9	21,9	0,1600
61,524	150,605	1,5	11,0	0,1700
62,373	148,756	2,6	22,0	0,1800
62,373	148,756	2,6	21,4	0,1800
63,382	146,629	1,6	13,4	0,1600
64,396	144,564	2,8	19,7	0,1400
64,942	143,478	4,3	30,1	0,1400
66,434	140,614	2,6	21,0	0,1600
67,600	138,469	3,6	28,6	0,1600

Se encontró que la β -D-fructopiranososa cristaliza en un sistema ortorrómbico, grupo espacial $P2_12_12_1$ (No. 19), densidad 1.589 g/cc, $Z = 4$, constantes de celda
a: 8.06 **b:** 10.06 **c:** 9.12

Se hizo un refinamiento del perfil empleando el programa Powder-X y se compararon las señales con la del perfil 4-229 reportado por Dore, W., University of California, Berkeley, California, USA. *Private Communication*.

ANEXO 6.

ESPECTRO DE ABSORCIÓN IR

