

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



“OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y CLARIFICACIÓN DEL EXTRACTO  
ACUOSO DE YACÓN (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.)”

Presentado por:

MELISSA KINA NOBORIKAWA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

LIMA – PERÚ

2016

## TABLA DE CONTENIDO

### ÍNDICE DE CUADROS

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE ANEXOS

### RESUMEN

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1.	YACÓN .....	4
2.1.1.	ASPECTOS GENERALES .....	4
2.1.2.	TAXONOMÍA.....	5
2.1.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	5
2.1.4.	FORMAS DE CONSUMO Y PROCESAMIENTO .....	7
2.2.	FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	8
2.2.1.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS FOS.....	10
2.2.2.	APLICACIONES DE LOS FOS EN LA AGROINDUSTRIA.....	11
2.2.3.	BENEFICIOS DE LOS FOS EN LA SALUD HUMANA .....	13
2.2.4.	TOXICIDAD .....	14
2.3.	EXTRACCIÓN.....	14
2.3.1.	EQUILIBRIO SÓLIDO – LÍQUIDO .....	15
2.3.2.	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXTRACCIÓN.....	16
2.3.3.	MODELACIÓN MATEMÁTICA DE EXTRACCIÓN.....	17
2.4.	CLARIFICACIÓN.....	18
2.4.1.	ETAPAS DE LA CLARIFICACIÓN .....	18
a.	COAGULACIÓN .....	19
b.	FLOCULACIÓN .....	20
2.4.2.	FACTORES QUE CONDICIONAN LA EFICIENCIA DE LA CLARIFICACIÓN.....	21
2.5.	ADSORCIÓN .....	23
2.5.1.	ISOTERMAS DE ADSORCIÓN .....	24
a.	MODELOS MATEMÁTICOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN .....	25
2.5.2.	MATERIAL ADSORBENTE: CARBÓN ACTIVADO .....	26
a.	USOS DEL CARBÓN ACTIVADO .....	27

2.6.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	27
2.6.1.	ETAPAS DE LA OPTIMIZACIÓN .....	27
a.	ETAPA I: <i>SCREENING</i> O CRIBADO .....	28
b.	ETAPA II: ESCALAMIENTO .....	28
c.	ETAPA III: OPTIMIZACIÓN FINAL .....	29
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	33
3.2.	MATERIA PRIMA .....	33
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	33
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	35
3.4.1.	DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES .....	35
3.4.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES REDUCTORES... 35	
3.4.5.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	35
3.4.6.	DETERMINACIÓN DE GRANULOMETRÍA .....	37
3.4.7.	DETERMINACIÓN DE pH .....	37
3.4.8.	DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ .....	37
3.4.9.	DETERMINACIÓN DE COLOR .....	38
3.4.10.	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	38
3.4.11.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA .....	38
3.4.12.	DETERMINACIÓN DE CALCIO .....	39
3.4.13.	DETERMINACIÓN DE FOSFATO .....	39
3.5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	39
3.5.1.	EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE LA HARINA DE YACÓN .....	39
3.5.2.	CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO PROVENIENTE DE LA HARINA DE YACÓN.....	40
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	42
3.6.1.	EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE HARINA DE YACÓN.....	42
3.6.6.	CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE LA HARINA DE YACÓN.....	45
3.6.7.	ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE COMPUESTOS COLOREADOS .....	49
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE YACÓN .....	51
4.2.	EXTRACCIÓN DE FOS .....	53

4.2.1. <i>SCREENING</i> O CRIBADO .....	54
4.2.2. EFECTO DE LA RELACIÓN MATERIA PRIMA:SOLVENTE EN LA EXTRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	57
4.2.3. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	58
4.3. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO A PARTIR DE YACÓN .....	62
4.4. CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO PROVENIENTE DE HARINA DE YACÓN .....	65
4.4.1. <i>SCREENING</i> O CRIBADO .....	68
4.4.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN .....	71
4.4.3. CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO FINAL .....	78
4.5. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE COMPUESTOS COLOREADOS.....	82
4.6. PRESENTACIÓN DEL FLUJO DEFINITIVO CON LOS PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN LAS OPERACIONES ESTUDIADAS.....	86
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	90
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	91
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	104

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición química promedio de 10 accesiones de yacón en relación a un kilogramo de materia fresca .....	6
Cuadro 2: Contenido de carbohidratos en raíces de yacón.....	6
Cuadro 3: Valor calórico y poder edulcorante de los fructooligosacáridos en comparación con los azúcares más comunes y algunos edulcorantes sintéticos.....	11
Cuadro 4: Ventajas y desventajas de la cantidad apropiada de fosfatos .....	22
Cuadro 5: Factores y sus niveles considerados en el arreglo factorial $2^k$ aplicado en la etapa de screening para la extracción de FOS.....	44
Cuadro 6: Modelos cinéticos aplicados al proceso de extracción de fructooligosacáridos.	46
Cuadro 7: Factores y sus niveles considerados en el arreglo factorial $2^k$ aplicado en la etapa de screening para la clarificación y decoloración.....	47
Cuadro 8: Factores y sus niveles considerados en el diseño compuesto central aplicado en la etapa de optimización de la clarificación y decoloración.....	48
Cuadro 9: Expresión matemática de los modelos de isotermas de adsorción .....	50
Cuadro 10: Características de la harina de yacón (*) .....	51
Cuadro 11: Resultado del análisis de granulometría .....	53
Cuadro 12: Arreglo del diseño factorial $2^k$ y respuesta experimental en la etapa del screening en el proceso de extracción de fructooligosacáridos .....	55
Cuadro 13: Contenido de fructooligosacáridos en extractos obtenidos a diferentes relaciones MP:S manteniendo constante la temperatura y el tiempo (30 °C por 5 min) (*) .....	57
Cuadro 14: Parámetros de los modelos de cinética aplicados al proceso de a extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y 30 °C .....	60
Cuadro 15: Características del extracto concentrado a partir de harina de yacón (*) .....	63
Cuadro 16: Arreglo del diseño factorial $2^k$ y respuestas experimentales en la etapa de screening (*) .....	69
Cuadro 17: Diseño compuesto central, respuesta experimental y predicho en la etapa de optimización (*).....	73
Cuadro 18: Análisis de Varianza del modelo cuadrático para el porcentaje de remoción de turbidez en la etapa de optimización .....	74
Cuadro 19: Análisis de Varianza del modelo cuadrático para la $\Delta E$ en la etapa de optimización .....	74

Cuadro 20: Condiciones que maximizan los procesos de clarificación y decoloración.....	78
Cuadro 21: Valores predichos y experimentales de las variables respuestas bajo las condiciones que maximizan los procesos de decoloración y clarificación .....	78
Cuadro 22: Características del extracto clarificado y decolorado obtenido con los parámetros que maximizan las operaciones estudiadas(*).....	80
Cuadro 23: Valores L, a* y b* del extracto concentrado inicial, extracto clarificado con los parámetros que maximizan las operaciones estudiadas y agua destilada (*) .....	80
Cuadro 24: Parámetros de los modelos de las isothermas de adsorción de compuestos coloreados a diferentes porcentajes de carbón activado en la clarificación y decoloración del extracto de yacón (*) .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Raíz de yacón ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> Poepp & Endl.) entera y corte transversal .....	4
Figura 2: Productos a base de raíces de yacón comercializados en Lima .....	8
Figura 3: Estructura química de los FOS.....	9
Figura 4: Estructura química de los FOS más comunes en la naturaleza.....	9
Figura 5: Clasificación de los fructanos .....	10
Figura 6: Mecanismo de clarificación usando cal y calor .....	20
Figura 7: Esquema del fenómeno de adsorción.....	23
Figura 8: Etapas del fenómeno de adsorción.....	24
Figura 9: Representación esquemática de la estructura porosa del carbón activado.....	26
Figura 10: El carácter secuencial de la MSR.....	29
Figura 11: Superficie de respuesta cuadrática .....	30
Figura 12: Curvas de nivel de respuesta cuadrática .....	30
Figura 13: Diseños centrales compuestos para $k=2$ y $k=3$ .....	31
Figura 14: Flujo de operaciones para la obtención del extracto a partir de la harina de yacón .....	40
Figura 15: Flujo de operaciones de la clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón .....	43
Figura 16: Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño factorial $2^k$ .....	55
Figura 17: Contenido de fructooligosacáridos en extractos obtenidos a diferentes tiempos manteniendo constante la relación MP:S y temperatura (1:30 g/mL y 30 °C).....	59
Figura 18: Cinética de extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y a 30 °C. Modelo Ley de Fick modificado por Qu et al. (2010).....	61
Figura 19: Cinética de extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y a 30 °C. Modelo Ley de Fick modificado por Chan et al. (2014).....	61
Figura 20: Diagrama de Pareto estandarizado del diseño factorial $2^k$ (etapa screening): (a) Porcentaje de remoción de turbidez (b) Variación del color .....	70
Figura 21: Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada para el porcentaje de remoción de turbidez (a) y la $\Delta E$ (b) .....	76
Figura 22: Extracto concentrado a partir de harina de yacón (a), agua destilada (b) y extracto clarificado y decolorado (c).....	78

Figura 23: Linealización de los modelos de Langmuir (a) Freundlich (b) y Temkin (c) para la adsorción de compuestos coloreados del extracto concentrado a partir de harina de yacón en carbón activado en polvo .....	85
Figura 24: Flujo de operaciones con los parámetros que maximizan la clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón .....	87
Figura 25: Contribución de (a) la disminución de turbidez y (b) la variación de color ( $\Delta E$ ) en cada etapa del proceso de clarificación y decoloración de extracto concentrado a partir de harina de yacón.....	88



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959) .....	104
ANEXO 2: Determinación del contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y FOS por HPLC .....	106
ANEXO 3: Determinación de turbidez .....	108
ANEXO 4: Determinación del contenido de compuestos fenólicos (Singleton y Rossi, 1965) .....	109
ANEXO 5: Determinación del contenido de proteínas (Bradford, 1976) .....	110
ANEXO 6: Determinación del contenido de calcio (Chapman y Pratt, 1973).....	111
ANEXO 7: Especificaciones del hidróxido de calcio .....	112
ANEXO 8: Especificaciones del carbón activado .....	113
ANEXO 9: ANVA de la regresión para el rendimiento de extracción de FOS a partir de harina de yacón en la etapa de <i>screening</i> .....	114
ANEXO 10: ANVA para el contenido de FOS por relación materia prima:solvente .....	115
ANEXO 11: Pruebas de múltiple rangos para el contenido de FOS por relación materia prima:solvente .....	115
ANEXO 12: ANVA para el contenido de FOS por tiempo de extracción .....	115
ANEXO 13: Pruebas de múltiple rangos para el contenido de FOS por tiempo de extracción .....	116
ANEXO 14: ANVA de la regresión para el porcentaje de remoción de turbidez en los procesos de clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón en la etapa de <i>screening</i> .....	117
ANEXO 15: ANVA de la regresión para la $\Delta E$ en los procesos de clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón en la etapa de <i>screening</i> .....	118
ANEXO 16: Superficie de respuesta estimada para (a) el porcentaje de remoción de turbidez y (b) la $\Delta E$ en el extracto clarificado y decolorado .....	119

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos: optimizar la extracción acuosa de fructooligosacáridos (FOS) a partir de harina de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.), así como los factores que permitan clarificar y decolorar el extracto concentrado aplicando la metodología de superficie de respuesta. Para el estudio de la extracción de FOS, se aplicó un arreglo factorial  $2^k$ , de donde se determinó que, de los tres factores evaluados: temperatura, tiempo y relación materia prima:solvente (MP:S), solo esta última afectó significativamente el rendimiento de extracción de FOS, por lo que se procedió a determinar la relación que asegure el máximo contenido de estos, aplicando para su identificación un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de comparación de medias. Los parámetros óptimos fueron: temperatura de 30 °C, tiempo de 10 minutos y relación MP:S de 1:30 (g/mL), obteniendo un rendimiento de extracción máximo de 99,23 por ciento. Para el estudio de la clarificación y decoloración del extracto concentrado (20 °Brix), se aplicó un arreglo factorial  $2^k$ , determinándose que de los tres factores evaluados: pH en la clarificación, porcentaje de carbón activado y temperatura de decoloración, los dos primeros influyeron significativamente en el porcentaje de remoción de turbidez y variación de color ( $\Delta E$ ). Para la optimización se utilizó un diseño compuesto central con ocho puntos centrales. Los niveles que maximizaron el proceso fueron: pH de 11 y porcentaje de carbón activado de 0,81 por ciento. Con los valores que maximizan las operaciones, se propuso un flujo que permite la reducción del 99,8 por ciento de la turbidez inicial, una  $\Delta E$  de 28,19 respecto al extracto inicial, una  $\Delta E$  de 1,07 respecto al agua pura y una recuperación de FOS de 81,3 por ciento. Las isoterms de Freundlich y Temkin fueron las que mejor describieron el proceso de adsorción de los componentes coloreados presentes en el extracto de yacón en carbón activado.

Palabras clave: yacón, fructooligosacáridos, extracción, clarificación, decoloración.

## SUMMARY

This research had the following aims, optimize the aqueous extraction of fructooligosaccharides (FOS) from yacon flour (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) and the factors that allow the clarification and discoloration of the concentrated extract using the response surface methodology. For the research of the extraction of FOS, a  $2^k$  factorial design was used, and it was determined that, of the three evaluated factors (temperature, time and raw material: solvent relationship (RM:S)), only the last one affected the performance of the extraction of FOS significantly, so we proceeded to determine the relation that ensures the maximum content of these, applying, for its identification, an analysis of variance (ANOVA) and a comparison of means test. The optimal parameters were: temperature of 30 °C, time of 10 minutes and RM:S relation of 1:30 (w/v), obtaining a maximum performance of the extraction in 99,23 percent. In the clarification and discoloration process of the concentrated extract (20 °Brix) with the highest content of FOS, a screening was conducted to evaluate the effect of the factors, using a  $2^k$  factorial design, and it was determined that, of the three evaluated factors: clarification pH, activated charcoal percentage and discoloration temperature, the first two influenced on the rate of turbidity removal and color variation ( $\Delta E$ ) significantly. A central composite design with eight central points was used for optimization. The levels that optimized the process were pH of 11 and activated charcoal percentage of 0,81 percent. With the values that optimized the operations, a flow was proposed that allowed the reduction of 99,76 percent of the initial turbidity,  $\Delta E$  of 28,19 respect to the initial extract,  $\Delta E$  of 1,07 respect to pure water and FOS recovery of 81,3 percent. Freundlich and Temkin isotherms were the best that described the adsorption process in the colored compounds presented in the extract of yacon in activated charcoal.

Key words: yacon, fructooligosaccharides, extraction, clarification, decolorization

## I. INTRODUCCIÓN

El yacón es una raíz nativa de la región andina y una fuente importante de fructooligosacáridos (FOS) que ha sido evaluado en estudios *in vitro* e *in vivo* presentando características prebióticas, con importantes implicancias en la salud. Estos oligosacáridos no digeribles son polímeros de fructosa que contienen de 3 a 10 moléculas de fructosa y una molécula de glucosa terminal unidas por enlace glucosídico  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1). Estas moléculas no son degradadas por las enzimas digestivas humanas (Sabater, 2008), y por el contrario son aprovechadas para su metabolismo por los lactobacilos y bifidobacterias que constituyen bacterias benéficas de la microflora del colon.

Los FOS habiendo sido aceptados como alimentos funcionales por la legislación de varios países (EEUU, Japón y Unión Europea) se han incorporado a un mercado que se encuentra en rápida expansión como es el de los prebióticos. Hasta el momento los productos industrializados de este tipo provienen principalmente de procesos biotecnológicos como la transfructosilación enzimática a partir de sacarosa o por hidrólisis de inulina proveniente de raíces de achicoria. A pesar de que el yacón se presenta como una fuente natural de FOS a la fecha no ha podido ser industrializado con tecnologías que añadan un mayor valor agregado, debido principalmente a problemas en la pre y post cosecha, además de dificultades tecnológicas en las diversas etapas del proceso tecnológico que permita productos con alto grado de pureza y concentración. La extracción, una de las etapas del proceso de obtención de FOS, persigue la mayor recuperación del prebiótico pero a la vez puede propiciar la extracción de otros compuestos como: proteínas, fenoles, enzimas y azúcares reductores responsables de reacciones enzimáticas y no enzimáticas que aportan color y turbidez a los extractos, interfiriendo en las etapas siguientes y disminuyendo la calidad y la pureza de los mismos.

Se han realizado investigaciones sobre la extracción de FOS provenientes del yacón (Chirinos, 1999; Arce, 2011); sin embargo, no se ha concretado aún una metodología con

parámetros y condiciones que evidencien obtener la máxima cantidad del mencionado compuesto.

Por otro lado, durante las primeras etapas de industrialización (pelado, cortado, etc.), se presenta un oscurecimiento rápido, el cual está relacionado a su contenido fenólico (especialmente ácido clorogénico y ácido cafeico) y a la actividad endógena de la polifenoloxidasas (Lachman *et al.*, 2003), por lo que el extracto necesita ser clarificado y decolorado para evitar que el color oscuro sea transmitido al alimento en el que se va a incorporar.

El método más antiguo de clarificación, y de hecho uno de los más eficientes, empleado a nivel mundial, involucra de manera general cal (óxido de calcio) y calor. El proceso ha tenido modificaciones a lo largo de la historia con el propósito de mejorar la clarificación y darle un tratamiento especial a los jugos difíciles de tratar. Por otro lado, el carbón activado se ha usado ampliamente para eliminar contaminantes orgánicos, incluyendo fenoles, debido a la existencia de grupos funcionales tales como carboxilos, lactonas, aldehídos, cetonas, quinonas, hidroquinonas, anhídrido y estructuras etéreas (Jung *et al.*, 2001).

Por los motivos expuestos, en la presente investigación se busca optimizar los procesos de extracción de FOS, clarificación y decoloración del extracto obtenido a partir de harina de yacón, como etapas iniciales a procesos que promuevan un mayor aprovechamiento industrial de esta raíz, con propuesta de productos con mayor valor agregado que potencien su carácter prebiótico.

Por todo ello, los objetivos de la presente investigación fueron:

#### Objetivo principal

- Determinar los parámetros de las operaciones de extracción de FOS, clarificación y decoloración del extracto a partir de harina de yacón, que maximicen el contenido de FOS, aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta.

#### Objetivos específicos

- Determinar la temperatura, tiempo y relación materia prima:solvente que permitan obtener una recuperación máxima de FOS en el extracto a partir de harina de yacón.

- Determinar el pH, temperatura de decoloración y porcentaje de carbón activado que aseguren obtener la máxima eliminación de turbidez y  $\Delta E$  (diferencia total de color) del extracto.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. YACÓN

#### 2.1.1. ASPECTOS GENERALES

El yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) es una planta herbácea perenne, crece hasta una altura de 1 a 2,5 m; consta de un tallo principal ramificado desde la base; otras, a veces, solo con ramas pequeñas en la parte superior. Las raíces son fusiformes y ovaladas, de color blanco, crema o púrpura y tiene múltiples flores de color amarillo-naranja de 3 cm de tamaño (Lachman *et al.*, 2003; Seminario *et al.*, 2003; Grau y Rea, 1997).

El hábitat natural del yacón es la zona de los Andes comprendida entre los 800 y 2800 m.s.n.m. En el Perú, el yacón se puede sembrar durante todo el año, sobre todo en lugares con riego y sin ocurrencia de heladas (Manrique *et al.*, 2005). Crece en el área alto andina de 18 departamentos: Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, La Libertad, San Martín, Ancash, Huánuco, Lima, Pasco, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Pasco, Apurímac, Arequipa, Cusco y Puno (Seminario *et al.*, 2003).

En la Figura 1 se puede observar a la raíz de yacón entera, sin cáscara y corte transversal.



**Figura 1: Raíz de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) entera y corte transversal**

### 2.1.2. TAXONOMÍA

Taxonómicamente está clasificado dentro de las Asteraceae, una familia a la que pertenece también la achicoria (*Cichorium intybus*), el topinambur (*Helianthus tuberosus*) y la dalia (*Dahlia sp.*) (Manrique *et al.*, 2005).

Polanco (2011) clasifica taxonómicamente al yacón de la siguiente manera:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Género:	<i>Smallanthus</i>
Especie:	<i>sonchifolius</i>
Nombre científico:	<i>S. sonchifolius</i> (Poepp & Endl) H. Robinson

### 2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de las raíces de yacón se presenta en el Cuadro 1. El yacón es una de las raíces comestibles con mayor contenido de agua, representado entre el 83 y 90 por ciento del peso fresco de las raíces (Hermann *et al.*, 1999). El mineral más abundante es el potasio, en promedio 230 mg/100 g de materia fresca comestible. En mucho menor cantidad se encuentra el calcio, fósforo, magnesio, sodio y hierro. En cuanto al contenido de proteínas, lípidos y vitaminas es bastante bajo.

Los carbohidratos representan alrededor del 90 por ciento del peso seco de las raíces recién cosechadas, de los cuales entre el 50 y 70 por ciento son FOS. El resto de carbohidratos lo conforman la sacarosa, fructosa y glucosa (Ohyama *et al.*, 1990; Hermann *et al.*, 1999). El contenido de carbohidratos en las raíces de yacón se puede observar en el Cuadro 2; sin embargo, la composición varía significativamente dependiendo de factores tales como el cultivar, la temporada de cultivo y de cosecha y la temperatura en post-cosecha del yacón (Seminario *et al.*, 2003).



**Cuadro 1: Composición química promedio de 10 accesiones de yacón en relación a un kilogramo de materia fresca**

Componentes	Promedio	Rango
Materia seca (g)	115	98 - 136
Carbohidratos totales (g)	106	89 - 127
Fructanos (g)	62	31 - 89
Sacarosa libre (g)	14	10 - 19
Fructosa libre (g)	8,5	3,9 - 21,1
Glucosa libre (g)	3,5	2,3 - 5,9
Proteína (g)	3,7	2,7 - 4,9
Fibra (g)	3,6	3,1 - 4,1
Lípidos (mg)	244	112 - 464
Calcio (mg)	87	56 - 131
Fósforo (mg)	240	182 - 309
Potasio (mg)	2 282	1 843 - 2 946

FUENTE: Hermann *et al.* (1999)

**Cuadro 2: Contenido de carbohidratos en raíces de yacón**

Carbohidratos	Contenido (mg/g materia seca)
Fructosa	350,1 ± 42,0
Glucosa	158,3 ± 28,6
Sacarosa	74,5 ± 19,0
GF <sub>2</sub>	60,1 ± 12,6
GF <sub>3</sub>	47,4 ± 8,2
GF <sub>4</sub>	33,6 ± 9,3
GF <sub>5</sub>	20,6 ± 5,2
GF <sub>6</sub>	15,8 ± 4,0
GF <sub>7</sub>	12,7 ± 4,0
GF <sub>8</sub>	9,6 ± 7,2
GF <sub>9</sub>	6,6 ± 2,3
Inulina	13,5 ± 0,4

FUENTE: Ohyama *et al.* (1990)

Adicionalmente, Yan *et al.* (1999) reportaron una cantidad considerable de compuestos fenólicos en las raíces de yacón equivalente al 3,8 por ciento del peso seco de las mismas. Entre los principales antioxidantes presentes en las raíces de yacón se encuentran el ácido clorogénico, ferúlico, gálico, gentísico y cafeico (Valentová *et al.*, 2006).

#### **2.1.4. FORMAS DE CONSUMO Y PROCESAMIENTO**

El yacón tradicionalmente se consume como fruta fresca (Seminario *et al.*, 2003) pero, al ser perecible, los productos procesados (Figura 2) son una alternativa a la comercialización tradicional de raíces frescas, dando como resultado productos con mayor tiempo de vida.

Algunos productos que se pueden obtener son:

- Pasas, como resultado de un proceso de deshidratación de las raíces al medio ambiente (Seminario *et al.*, 2003).
- Hojuelas, deshidratadas en horno a temperatura controlada orientadas hacia el mercado de consumo de snacks (Seminario *et al.*, 2003).
- Jarabe, mediante el siguiente proceso: extracción mecánica del jugo de las raíces, tratamiento térmico (a temperaturas mayores a 60 °C) o adición de ácido cítrico o ácido ascórbico y, finalmente, concentración a 72 – 73 °Brix (Manrique *et al.*, 2005).
- Harina, a partir de las raíces previamente seleccionadas y deshidratadas, las cuales sufren un proceso de molienda, obteniendo partículas finas que conforman la harina (Hermann *et al.*, 1999).
- Infusión, como producto del secado de las hojas, el cual se puede realizar al medio ambiente, siempre y cuando la humedad relativa sea baja. Si esto no es posible, entonces se pueden usar hornos; posteriormente, se realiza la molienda, el tamizado y el envasado en papel filtro (Seminario *et al.*, 2003).
- Otros productos a partir de raíces de yacón son la mermelada, galletas, etc.

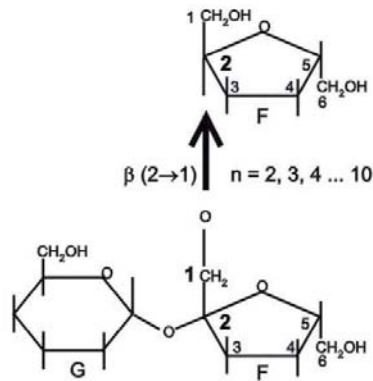


**Figura 2: Productos a base de raíces de yacón comercializados en Lima**

## 2.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Los FOS, conocidos como oligofruktanos u oligofruktosa, pertenecen a una clase particular de azúcares conocidos con el nombre de fruktanos (Niness, 1999). Son cadenas de unidades de fruktosa con una unidad de glukosa terminal unidas por enlace glukosídico  $\beta(2\rightarrow1)$  (Figura 3), característica que lo define como oligosacáridos no digestibles (OND). Como consecuencia, estos no pueden ser degradados por las enzimas digestivas humanas que son específicas para uniones  $\alpha$ -glukosídicas, de tal forma que todos los OND pueden actuar como sustratos para la fermentación por bacterias beneficiosas en el colon (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*), aportando energía para el crecimiento microbiano. Los FOS más comunes en la naturaleza son: 1-kestosa ( $GF_2$ ), nistosa ( $GF_3$ ) y 1- $\beta$ -Fruktofuranosil nistosa ( $GF_4$ ) (Figura 4) (Lachman *et al.*, 2003).

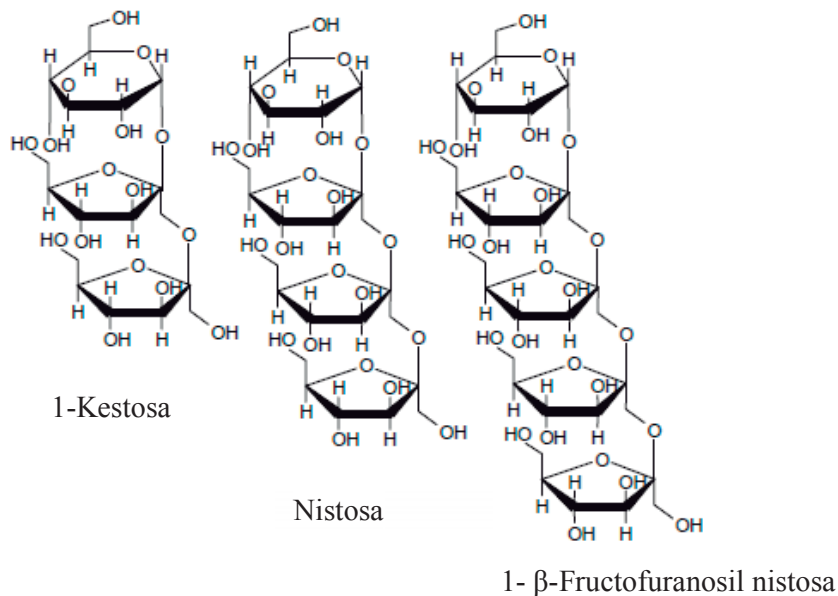
La National Research Council (1989) menciona que las raíces de yacón contienen inulina; sin embargo, Ohyama *et al.* (1990) demostraron que en realidad las raíces contienen FOS. A pesar de ello, muchos artículos científicos, revistas, entre otros, mencionan que las raíces de yacón contienen inulina como componente principal. Por ello, es importante distinguir la diferencia entre inulina y FOS ya que sus propiedades físicas y sus aplicaciones son distintas.



**Figura 3: Estructura química de los FOS**

G= glucosa, F= Fructosa, n= número de moléculas de fructosa.

FUENTE: Seminario *et al.* (2003)

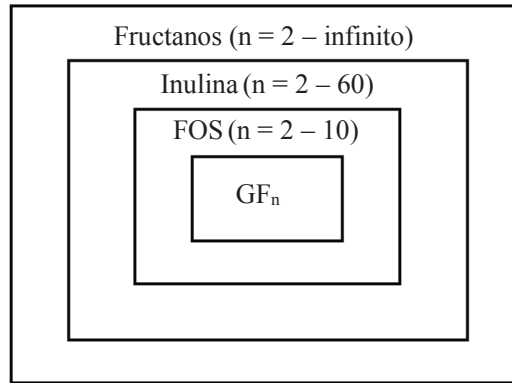


**Figura 4: Estructura química de los FOS más comunes en la naturaleza**

FUENTE: Lachman *et al.* (2003)

Esta diferencia radica en el número de moléculas de fructosa en la cadena; en la inulina, este número varía entre 2 y 60, mientras que en los FOS, entre 2 y 10 (Figura 5). Por otro lado, la inulina casi no tiene sabor dulce, su consistencia y su baja solubilidad relativa en agua la convierten en un sustituto excelente de la grasa para la elaboración de varios tipos de alimentos, como helados y postres. Los FOS, en cambio, son muy solubles en agua, tienen un ligero sabor dulce y eventualmente pueden ser utilizados como sustitutos hipocalóricos del azúcar (Niness, 1999).

## Carbohidratos



**Figura 5: Clasificación de los fructanos**

n=número de moléculas de fructosa

FUENTE: Seminario *et al.* (2003)

### 2.2.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS FOS

Los FOS son totalmente solubles en agua y son muy estables en un rango de pH de 4,0 – 7,0, así como estables a temperaturas de refrigeración. Estas propiedades hacen que los oligosacáridos puedan usarse para alterar la temperatura de congelación de los alimentos y controlar la intensidad de caramelización en las comidas preparadas debido a reacciones de Maillard (Chacón, 2006; Mussato y Mancilha, 2007).

En el Cuadro 3 se muestra el valor calórico y poder edulcorante de los FOS en comparación con los azúcares más comunes y algunos edulcorantes sintéticos. El poder edulcorante de los FOS oscila de 0,3 - 0,6 veces al de la sacarosa, dependiendo de la estructura química y el grado de polimerización de los oligosacáridos. El poder edulcorante disminuye con la longitud de la cadena de oligosacáridos; esta propiedad hace que los FOS sean muy usados en comidas donde el uso de la sacarosa está restringido por su alta capacidad edulcorante. Además proporcionan solo la cuarta parte del valor calórico de los carbohidratos comunes (Seminario *et al.*, 2003).

Los FOS son altamente higroscópicos y su capacidad de retención de agua es mayor que la de la sacarosa e igual a la del sorbitol (Bornet, 1994). Además, la viscosidad de una solución de FOS es relativamente mayor que una de sacarosa a la misma concentración debido al

mayor peso molecular de estos compuestos, lo que hace que aumente su viscosidad, mejorando el cuerpo y la textura (Sabater, 2008).

**Cuadro 3: Valor calórico y poder edulcorante de los fructooligosacáricos en comparación con los azúcares más comunes y algunos edulcorantes sintéticos**

	<b>Origen</b>	<b>Calorías (kcal/g)</b>	<b>Poder edulcorante (*)</b>
FOS	Natural	1-1,5	0,3
Glucosa	Natural	4	0,7
Fructosa	Natural	4	1,7
Sacarosa	Natural	4	1
Esteviosidos	Natural	0	30 - 320
Aspartame	Sintético	0	200
Sacarina	Sintético	0	300 - 500
Sucralosa	Sintético	0	600

(\*) Con la finalidad de comparación, se asigna el valor de uno al poder edulcorante de la sacarosa o azúcar de mesa.

FUENTE: Seminario *et al.* (2003)

### **2.2.2. APLICACIONES DE LOS FOS EN LA AGROINDUSTRIA**

Los FOS se pueden aplicar en la agroindustria como:

#### **a. SUSTITUTOS DE AZÚCARES**

Los FOS son utilizados como sustitutos hipocalóricos de azúcares edulcorantes como la sacarosa. Generalmente esto genera productos de confitería, chocolatería y bebidas de aceptación sensorial en general admisible en comparación con los productos edulcorados de forma convencional (Chacón, 2006).

#### **b. SUSTITUTOS DE GRASAS**

En alimentos de contenido de humedad muy elevado, especialmente en helados y otros derivados lácteos, así como en embutidos, los fructanos hidrolizados en concentraciones de

40 – 45 por ciento adoptan una textura y palatabilidad muy similar a la de la grasa, por lo cual se les puede emplear como sustitutos de esta (Cherbut, 2002 citado por Hernández y Jiménez, 2010).

**c. FIBRA**

Los FOS, al ser compuestos incoloros que no dejan sabores residuales, pueden agregarse a la fibra convencional sin que esto involucre un incremento en la viscosidad de la matriz, por lo cual su uso permite aumentar el contenido de fibra sin que este sea muy evidente. Estas características pueden ser aprovechadas en el campo de los alimentos, pues su incorporación en una formulación no debe desvirtuar las características organolépticas propias del producto alimenticio (Niness, 1999; Rodríguez *et al.*, 2012).

**d. PREBIÓTICOS**

Administrar una combinación de prebióticos, como galacto-oligosacáridos de cadena corta y fructooligosacáridos de cadena larga a las fórmulas infantiles, produce un efecto muy beneficioso ya que promueve específicamente el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, reduciendo a su vez el crecimiento de patógenos hasta niveles similares a los de niños alimentados con lactancia materna. (Fanaro *et al.*, 2005).

**e. OTRAS APLICACIONES**

También se ha reportado su uso como ingrediente de mayonesas ligeras, quesos bajos en calorías, productos de pastelería y panificación, contribuyendo a la reducción del contenido calórico y a la retención de agua de estos productos; su adición a las formulaciones de helado para evitar la formación de cristales de hielo, su empleo como emulgentes en la fabricación de margarinas; y en general, para modificar la textura o cremosidad de algunos alimentos son algunas de sus aplicaciones en la industria de alimentos (Olesten y Gudmond-Hoyer, 2000 citados por Hernández y Jiménez, 2010).

### **2.2.3. BENEFICIOS DE LOS FOS EN LA SALUD HUMANA**

#### **a. BAJO APORTE CALÓRICO**

Los FOS, por tener uniones beta que unen los monómeros de fructosa, son resistentes a la hidrólisis realizada por las enzimas digestivas humanas, por lo cual pasan al intestino delgado sin ser metabolizados (Chambilla, 2010 y McCrea *et al.*, 2009 citados por Urango, 2012), Por esta razón, los FOS no tienen incidencia en la elevación de los niveles de glucosa en la sangre. Debido a esto y a su reducido contenido calórico, su consumo es recomendado como sustituto del azúcar común o sacarosa (Seminario *et al.*, 2003), pudiendo ser incluido en los regímenes dietéticos para bajar de peso (Manrique y Hermann, 2004).

#### **b. REGULARIZACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO**

Estudios realizados utilizando inulina y oligofructosa han dado como resultado la reducción de los niveles de lípidos sanguíneos en animales, aunque son necesarias altas dosis de estos compuestos para producir los efectos deseados. Estudios en ratones muestran que la inulina y los FOS pueden inhibir la acumulación de triglicéridos en el hígado y tienen efectos favorables sobre la esteatosis hepática (retención anormal de lípidos en células hepáticas) (Beylot, 2005; Delzenne *et al.*, 2002)

#### **c. EFECTO PREBIÓTICO**

Una dieta rica en FOS promueve el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, resultando en altos niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el material fecal, la mejora de la densidad celular y la formación de criptas en el tejido ciego, siendo indicativos de beneficios para la salud del colon (Campos *et al.*, 2012). La proliferación de estas bacterias genera una serie de efectos benéficos en la salud, pero además inhibe el crecimiento de otro grupo de bacterias de la microflora que habitualmente produce toxinas o propicia el desarrollo de enfermedades en el tracto gastrointestinal; esta propiedad es conocida como efecto prebiótico (Manrique y Hermmann, 2004).



#### **d. MEJORA DE LA ABSORCIÓN DE MINERALES**

Otro de los beneficios es la mejora de la absorción de minerales como el calcio y el magnesio. El intestino delgado es la zona donde normalmente estos minerales se absorben pero gracias a los ácidos grasos de cadena corta generados como productos de la flora intestinal tras la ingesta de prebióticos, el colon también es capaz de absorberlos de manera eficiente (Bornet *et al.*, 2002; Tokunaga, 2004).

#### **e. REGULARIZACIÓN DE HÁBITOS INTESTINALES**

Los FOS y la inulina incrementan la biomasa fecal y el contenido en agua de las heces, de modo que se estimula el peristaltismo intestinal y se consigue una mejora en los hábitos intestinales (Roberfroid, 2005).

#### **2.2.4. TOXICIDAD**

No existe evidencia experimental alguna que indique que los FOS presentan algún grado de toxicidad, sin importar la cantidad ingerida como parte de la dieta; aunque en algunas personas se ha detectado que ingestas por encima de los 10 gramos diarios pueden llegar a producir un ligero malestar. Ingestas inusualmente altas pueden causar diarrea debido a una retención osmótica de fluidos tanto en el intestino grueso como en el intestino delgado. La máxima dosis que no causa diarrea en humanos es 0,3 y 0,4 g/kg de peso corporal en hombres y mujeres, respectivamente (Hernández y Jiménez, 2010).

#### **2.3. EXTRACCIÓN**

La extracción sólido-líquido, también llamada extracción por disolvente, es una operación de transferencia de materia destinada a separar los principios solubles de un sustrato sólido, mediante su “difusión” en un solvente (Mafart y Béliard, 1994). Por ejemplo, la extracción de solubles de café a partir de café tostado y molido en la producción de “café soluble”, la extracción de los aceites comestibles de semillas oleaginosas con disolventes orgánicos, extracción de proteína de la soja en la producción de aislado de proteína de soja, etc. El objetivo es extraer tanto como sea posible el soluto, utilizando una cantidad limitada de disolvente, a fin de obtener un extracto concentrado (Berk, 2013).

### **2.3.1. EQUILIBRIO SÓLIDO – LÍQUIDO**

El mecanismo de la extracción de un soluto contenido en una partícula sólida mediante un líquido se considera que ocurre en tres etapas sucesivas hasta que se alcanza el equilibrio. Estas etapas, según Ibarz y Barbosa-Cánovas (2005), son las siguientes:

#### **a. CAMBIO DE FASE DEL SOLUTO**

Es el paso del soluto desde la fase sólida al líquido. La disolución del soluto se realiza a través de una interfase sólido-líquido. Suele considerarse que este fenómeno de disolución es instantáneo, por lo que no influye en la velocidad global de extracción.

#### **b. DIFUSIÓN DEL SOLUTO EN EL DISOLVENTE CONTENIDO EN LOS POROS DEL SÓLIDO**

En la mayoría de los casos, el soluto se encuentra en el interior de las partículas sólidas, siendo necesario que el disolvente se ponga en contacto con él, por lo que se debe llenar los poros del sólido inerte. La transferencia del soluto desde el interior de la partícula sólida hasta la superficie, se realiza debido a la gradiente de concentración existente entre la interfase sólido-líquido y la superficie exterior del sólido.

En muchos procesos de extracción la velocidad de transferencia de materia se incrementa con la temperatura, debido a la relación directa de este factor con difusividad. Además, si las partículas desintegran a través de la operación de molienda se logra que la longitud de los poros disminuya, lo que trae consigo el que la velocidad de transferencia también aumente. En otros casos, como en la extracción de azúcar de remolacha, la disolución tiene lugar a través de paredes celulares, que permiten el paso del azúcar pero no dejan pasar componentes indeseables; sin embargo, si la trituración fuese lo suficientemente grande como para romper la estructura celular, estos componentes se disolverían llegando a contaminar la solución azucarada.

**c. TRANSFERENCIA DEL SOLUTO DESDE LA SUPERFICIE DE LAS PARTÍCULAS HASTA EL SENO DE LA DISOLUCIÓN**

Una vez que el soluto ha alcanzado la superficie de la partícula, se transfiere desde este punto hasta el seno de la disolución gracias a una gradiente de concentración, realizándose esta transferencia de materia por transporte molecular y turbulento, de forma simultánea.

Cada una de las etapas descritas posee su propia velocidad de transferencia. Tal como se menciona anteriormente, en la primera etapa la disolución del sólido se considera instantánea, por lo que no va a influir en el proceso. De las otras dos etapas, es la segunda la que suele controlar la velocidad del proceso, ya que normalmente se desarrolla lentamente.

**2.3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXTRACCIÓN**

Las condiciones que afectan la velocidad y el rendimiento de la extracción, así como la calidad del producto extraído, son los siguientes:

**a. TEMPERATURA**

El proceso de extracción se ve favorecido a medida que se incrementa la temperatura. Al respecto, Berk (2013) menciona que, a alta temperatura, la solubilidad del soluto extraíble en el disolvente es mayor y la viscosidad del disolvente es menor, lo que resulta en una mayor humectación y capacidad de penetración y coeficientes de difusión más altos. En ciertos casos, se pueden preferir temperaturas más bajas si la selectividad del disolvente mejora con la reducción de la temperatura.

**b. TAMAÑO DE PARTÍCULA**

El tamaño de las partículas afecta a la velocidad de extracción de diversas maneras. Cuanto más pequeño, mayor es el área de contacto entre el sólido y el líquido y, por tanto, más elevada es la velocidad de transferencia. Por otra parte, con un material muy fino y poca circulación de líquido, la superficie puede no ser utilizada de una forma totalmente eficaz, siendo difícil la separación de las partículas del líquido y el escurrido del residuo sólido. Generalmente es aconsejable que el rango de tamaños de partícula sea pequeña, de forma

que cada partícula requiera aproximadamente el mismo tiempo para la extracción (Coulson *et al.*, 2003).

### **c. AGITACIÓN**

La agitación del disolvente es importante ya que incrementa la transferencia de material desde la superficie de las partículas hacia la solución. Además, evita la sedimentación de las partículas y hace que se utilice de una forma más eficaz la superficie de contacto (Coulson *et al.*, 2003).

### **d. SOLVENTE**

El solvente debe ser selectivo, con una viscosidad suficientemente baja para que pueda circular con facilidad. Generalmente se usa solvente en estado puro y, conforme transcurre la extracción, la concentración del soluto incrementa y la velocidad de extracción disminuirá progresivamente; en primer lugar, debido a la disminución del gradiente de concentración, y, en segundo lugar, porque la solución aumentará su viscosidad (Coulson *et al.*, 2003). El solvente más adecuado y mayormente empleado en las industrias agroalimentarias es el agua (Mafart y Béliard, 1994).

### **e. TIEMPO**

Sharapin *et al.* (2000) menciona que el tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo.

## **2.3.3. MODELACIÓN MATEMÁTICA DE EXTRACCIÓN**

Muchos enfoques matemáticos se pueden utilizar para modelar el proceso de extracción. La ley de Fick de la difusión es ampliamente empleada para la mayoría de las curvas de extracción. La etapa de difusión en la extracción depende de dos mecanismos de extracción; difusión interna y la difusión externa. La difusión interna de compuestos activos, tal como se explica en la ley de Fick, es impulsado por la diferencia de concentración entre la matriz de la planta y el disolvente a granel de la siguiente manera (Chan *et al.*, 2014):

$$N = -D \frac{dc}{dx} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde  $N$  es el flujo de masa del soluto,  $C$  es la concentración del soluto en la partícula sólida,  $D$  es conocida como la difusividad o coeficiente de difusión para el soluto en el disolvente, y  $x$  es la distancia en la dirección de la transferencia. Para la difusión externa, los compuestos activos se difunden desde la superficie externa del sólido al líquido. Para asegurar una extracción eficaz, la resistencia de transferencia de masa externa tiene que ser minimizada de manera que la tasa de extracción solo depende de la difusión interna de los compuestos activos. La difusividad en la ley de Fick en la Ecuación (1) es una propiedad importante que indica la tasa de transferencia de masa y es útil para el diseño del equipo (Pérez *et al.*, 2011).

## **2.4. CLARIFICACIÓN**

La clarificación es el proceso por el cual son eliminadas las impurezas (sean solubles, coloidales en suspensión o insolubles) susceptibles a coagulación y floculación por medios mecánicos y químicos, que implican el asentamiento y remoción por decantación de las mismas, para producir un jugo claro (Marín, 2012).

Con el proceso de clarificación se pretende formar flóculos que se encarguen de atrapar todo el material suspendido, el cual debe ser sedimentado rápidamente produciendo un volumen mínimo de lodos y un jugo claro de alta calidad (valores bajos de turbidez y contenido de iones calcio disueltos, que tenga un pH adecuado que logre disminuir la inversión de la sacarosa en los procesos siguientes de extracción) (Marín, 2012).

### **2.4.1. ETAPAS DE LA CLARIFICACIÓN**

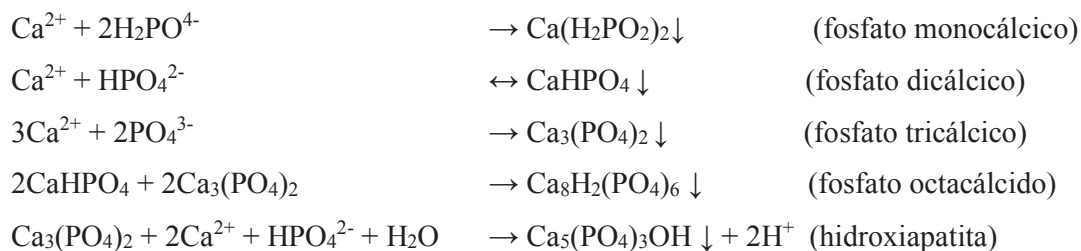
Fisicoquímicamente, la clarificación comprende dos procesos elementales: la coagulación y la floculación de las impurezas. El método más antiguo de clarificación de soluciones (en jugos de caña), y de hecho uno de los más eficientes y empleados a nivel mundial, involucra de manera general cal (óxido de calcio) y calor como agentes clarificantes y es conocido como proceso de defecación simple (Marín, 2012).

## a. COAGULACIÓN

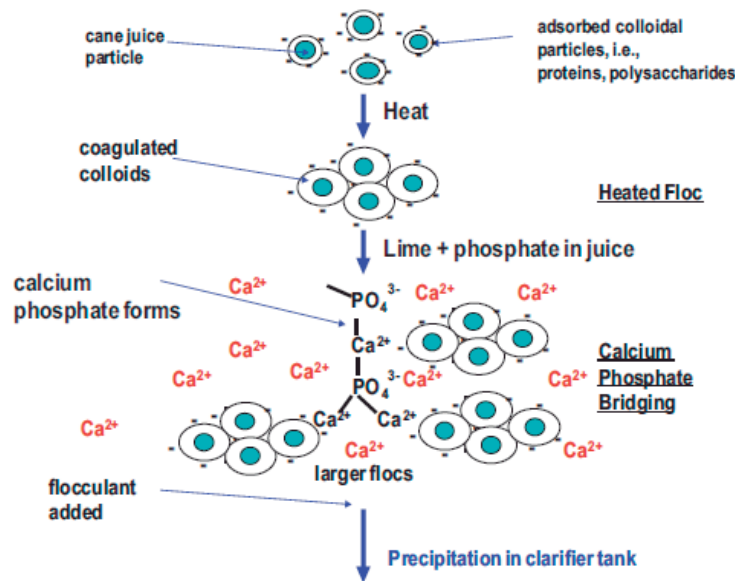
La coagulación es un fenómeno de desestabilización de las partículas coloidales (Marín, 2012), el cual se puede observar en la Figura 6 y se explica a continuación:

- **Calentamiento:** El calor es considerado como un agente coagulante. Su presencia estimula notoriamente la aglomeración de las impurezas (Marín, 2012); es decir, las partículas coloidales, particularmente proteínas, coagulan y forman flóculos naturales (Andrzejewski *et al.*, 2013). Con el aumento de temperatura, lo que ocurre es una leve disminución de la carga electrostática del coloide, provocando la semi-neutralización del mismo y, como consecuencia de esto, desfavorece la estabilidad del coloide y hace posible su colisión con otros coloides, permitiendo que la coagulación avance.
- **Encalado:** Después de calentar, se añade cal hidratada (hidróxido de calcio) a la solución para aumentar el pH, produciendo: (i) la neutralización de los ácidos, (ii) la reducción de la degradación indeseable de azúcares en ácidos, (iii) la formación de flóculos de fosfato de calcio (al reaccionar con los fosfatos inorgánicos solubles) y (iv) la introducción de las partículas cargadas positivamente en la solución (Chen y Chou, 1993). Adicionalmente, según Doherty y Rackemann (2009) ocurren también estas reacciones: la desnaturalización de las proteínas (y otros compuestos orgánicos, tales como gomas, pectinas y ceras), la inversión de la sacarosa debido a la acción combinada de pH y temperatura y la formación de cuerpos de color debido a la polimerización (ya sea enzimática o térmicamente) de flavonoides y compuestos fenólicos.

Doherty y Rackemann (2009) indican que después de la adición de cal, las reacciones que se producen para producir fosfatos de calcio son:



Como se observa, algunas reacciones son secuenciales; estas inician con la formación de fosfato monocálcico y dicálcico y, posteriormente, se producirán otras reacciones con el objeto de formar compuestos como el fosfato tricálcico, fosfato octacálcico e hidroxipatita (Doherty y Rackermann, 2009).



**Figura 6: Mecanismo de clarificación usando cal y calor**

FUENTE: Andrzejewski *et al.* (2013)

## b. FLOCULACIÓN

Una vez que las impurezas son coaguladas, es necesaria la introducción de un proceso que permita que estas sedimenten en el menor tiempo posible. Este proceso es la floculación, la cual es alcanzada tras la adición de una sustancia polimérica llamada floculante, cuya función es envolver los coágulos de impurezas formados para que estos obtengan mayor peso molecular y como consecuencia precipiten en un tiempo considerablemente corto (Marín, 2012). El calcio y el fósforo (en forma de  $P_2O_5$ ) presentes en la solución son necesarios en la formación de puentes de fosfato de calcio que ayudan en el proceso de floculación (Andrzejewski *et al.*, 2013).

Las partículas en suspensión son sujetas a diferentes fuerzas. Estos incluyen:

- Gravedad: la fuerza que separa partículas según su densidad, con las más densas dirigiéndose hacia el fondo del líquido en el cual está suspendido (Doherty y Rackermann, 2009).
- Fuerzas de Van der Waals: son fuerzas atractivas de corto alcance entre las partículas en suspensión. Estas fuerzas tienden a atraer partículas en suspensión hacia la otra (Doherty y Rackermann, 2009).
- Fuerza Browniana: imparte movimiento oscilatorio a los coloides dispersos en el medio líquido, ocasionando colisiones de partículas y moléculas del medio en suspensión para lograr la aglomeración (Doherty y Rackermann, 2009).
- Repulsión electrostática: fuerza que tiende a mantener las partículas separadas. Esta repulsión es causada por el “Potencial Zeta” (PZ), debido a la diferencia de potencial entre la partícula y la solución. La estabilidad de las partículas dispersas depende de la magnitud del PZ. Para que se presente la máxima aglomeración y precipitación de las impurezas, es necesario que el PZ de las partículas sea nulo (cero), denominándose “punto isoeléctrico” (Marín, 2012).

#### **2.4.2. FACTORES QUE CONDICIONAN LA EFICIENCIA DE LA CLARIFICACIÓN**

##### **a. pH**

Reece (2003) menciona que el pH en el proceso de clarificación es importante, lo que indica que un pH de aproximadamente 7 es necesario para neutralizar la carga en la partícula fina en suspensión en el jugo para facilitar la coagulación y sedimentación.

##### **b. CANTIDAD DE CAL**

La cantidad de cal que se adicione a la solución puede tener efectos negativos o positivos según el control que se le dé. Entre los efectos positivos, Honig (1969) menciona la completa precipitación de compuestos inorgánicos removibles (por ejemplo: fosfatos inorgánicos). Entre los efectos negativos que posee la adición incorrecta de cal se encuentran (Marín, 2012): (i) incremento de color como consecuencia de la descomposición de algunas sustancias como los azúcares reductores (exceso de cal), (ii) decantación deficiente



(deficiencia de cal), (iii) jugo turbio con posibles pérdidas por inversión (deficiencia de cal) y (iv) aumento de viscosidad del jugo claro por la no eliminación de sustancias viscosas (deficiencia de cal).

**c. CONTENIDO DE FOSFATOS**

Es importante que el contenido de fosfatos sea como mínimo 300 mg/L. Su importancia se atribuye a que son los fosfatos (presentes en la forma  $P_2O_5$ ) los que reaccionan en primera medida con los iones calcio que se adicionan en el proceso de clarificación y es el fosfato de calcio precipitado el que se obtiene en mayor proporción; por lo tanto, constituye casi toda la eliminación de las impurezas (Marín, 2012). La cantidad adecuada de fosfatos presenta las siguientes ventajas y desventajas (Cuadro 4):

**Cuadro 4: Ventajas y desventajas de la cantidad apropiada de fosfatos**

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Jugo de mayor claridad	Mayor cantidad de precipitado (impurezas)
Mayor velocidad de decantación	
Mejores características de filtración	Mayor consumo de cal
Mayor remoción de impurezas coloidales	

Fuente: Marín, (2012)

**d. TEMPERATURA**

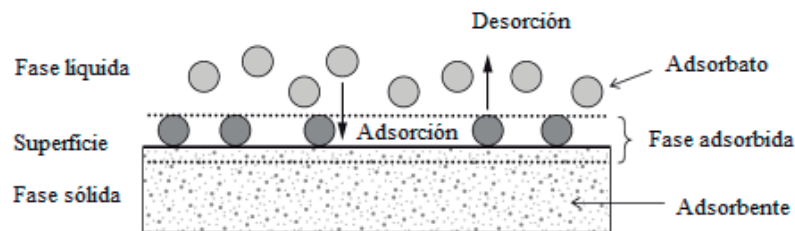
El calentamiento acelera las reacciones que ocurren durante el proceso de coagulación ocasionadas por el contacto entre la cal y las sustancias del jugo en el proceso de encalado (Marín, 2012). Además, la solubilidad de las sales de fosfato disminuye con el aumento de la temperatura, dando como resultado su precipitación. Estas ventajas se contrastan con el hecho de que, a temperaturas elevadas, puede ocurrir degradación de los azúcares a caramelos (furfurales) y, una vez formados, no se puede revertir este proceso. También se puede originar la formación de color ya que en medio alcalino los azúcares reductores se descomponen a altas temperaturas, aumentando así el color de los jugos (Cardona, 2009).

**e. TIEMPO**

Es importante que el tiempo de coagulación sea breve para prevenir la inversión de la sacarosa y la destrucción de los azúcares reductores, de manera que se evita la formación de color y/o ácidos orgánicos (Gil, 2008).

**2.5. ADSORCIÓN**

La adsorción es un fenómeno físico-químico que resulta de la atracción entre las moléculas de la superficie del sólido (adsorbente) y las del soluto retenido (adsorbato). Implica la separación de una sustancia de una fase, acompañado de su acumulación o concentración en la superficie de la fase de adsorción (Figura 7). Este proceso de transferencia se lleva a cabo hasta que se alcanzan las condiciones de equilibrio dinámico, que se da después de que la concentración de la solución se mantiene constante (Izquierdo *et al.*, 2004; Carabasa *et al.*, 1998).



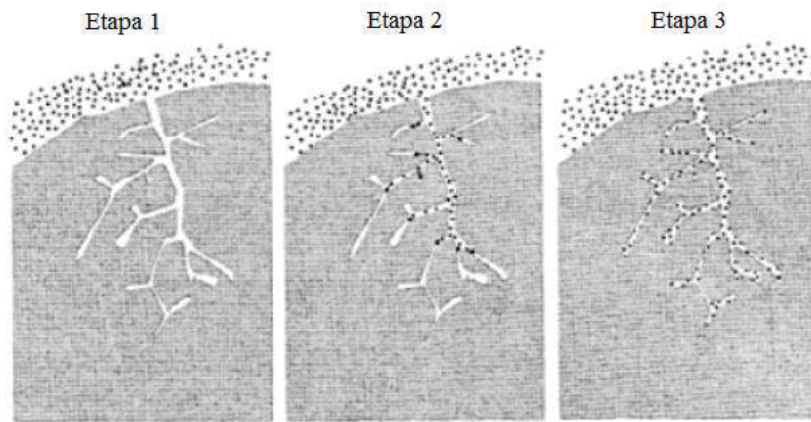
**Figura 7: Esquema del fenómeno de adsorción**

FUENTE: Worch (2012)

El mecanismo de adsorción (Figura 8) se compone de tres etapas: difusión a través de la capa límite alrededor de la partícula adsorbente (Etapa 1), transferencia de masa dentro de la superficie interna de la partícula adsorbente (Etapa 2) y adsorción en un sitio adecuado (Etapa 3) (Arslanoğlu *et al.*, 2005). Si la interacción entre el adsorbato y la superficie del adsorbente se debe solo a las fuerzas de Van der Waals, se trata de una adsorción física; pero si involucra un intercambio o una transferencia de electrones, dando como resultado una reacción química, se trata de una adsorción química (Izquierdo *et al.*, 2004).

Como adsorbentes se utilizan sólidos que presentan una gran superficie de contacto y, en general, suelen ser porosos (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005). Entre los más utilizados están

el carbón activado, zeolitas naturales y sintéticas, arcillas, resinas de intercambio iónico, gel de sílice y algunos polímeros sintéticos (Carabasa *et al.*, 1998).



**Figura 8: Etapas del fenómeno de adsorción**

FUENTE: Sepúlveda *et al.* (2008)

La adsorción se utiliza en muchos casos de purificación de fluidos, que contienen contaminantes que les confieren sabores y olores desagradables. Así, en los zumos de naranja, la limonina es un compuesto que le confiere un sabor amargo y puede ser eliminada por adsorción sobre polímeros. De igual modo, las melaninas y melanoidinas, formadas por los pardeamientos enzimáticos y no enzimáticos, pueden ser eliminadas por adsorción sobre carbón activado (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

### 2.5.1. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Una isoterma de adsorción es una representación gráfica que muestra la relación entre la cantidad adsorbida por unidad de peso de adsorbente (por ejemplo, carbón activado) y la cantidad de adsorbato en un medio de prueba en el equilibrio a una temperatura fija. Los principales factores que determinan la forma de una isoterma son: el número de compuestos en la solución, su capacidad de adsorción relativa, la concentración inicial en la solución, el grado de competencia entre los solutos por los sitios de adsorción y las características específicas del adsorbente (Carabasa *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2002).

## a. **MODELOS MATEMÁTICOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN**

Los datos de adsorción pueden ser representados por varios modelos de isothermas que se utilizan a menudo para describir el equilibrio de adsorción sobre una base cuantitativa (Arslanoğlu *et al.*, 2005). Los más utilizados son los de Langmuir, Freundlich y Temkin, los cuales han sido utilizados por Arslanoğlu *et al.* (2005) para describir el proceso de adsorción de los componentes de colores oscuros en pulpa de melocotón sobre carbón activado en polvo y por Angin (2014), para describir el proceso de adsorción del Amarillo 18 sobre carbón activado producido a partir de residuos sólidos de la industrias de zumo de fruta. Así mismo, Carabasa *et al.* (1998) indicaron que la adsorción de compuestos de color oscuro a partir de zumos de fruta por carbón activado sigue el modelo de las isothermas de Langmuir y Freundlich.

- **Isoterma de Langmuir**

Presenta las siguientes presunciones: (i) adsorción sobre una superficie con un número finito de sitios idénticos, los cuales se consideran que están homogéneamente distribuidos sobre la superficie del adsorbente y (ii) la interacción entre moléculas adsorbidas es insignificante (Nasehi *et al.*, 2012).

- **Isoterma de Freundlich**

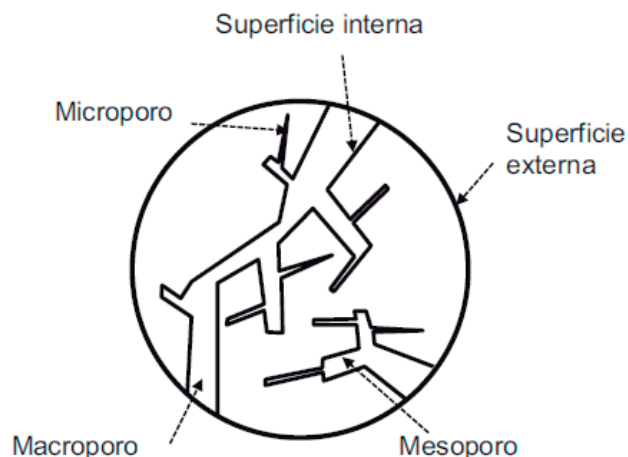
Está basado en la adsorción sobre una superficie energéticamente heterogénea; es decir, sitios de adsorción con la misma energía de interacción adsorbato-adsorbente se encuentran agrupados en pequeñas áreas. En esta perspectiva, la cantidad adsorbida es la suma de adsorción en todos los sitios (Foo y Hameed, 2010).

- **Isoterma de Temkin**

Es útil para representar un gran intervalo de concentraciones. Este modelo asume lo siguiente: (i) el calor de adsorción disminuye de manera lineal con la ocupación superficial y que (ii) la adsorción se caracteriza por una distribución uniforme de las energías de enlace, hasta en cierta energía de enlace máxima (Kim *et al.*, 2004 citados por Rubinos, 2007).

## 2.5.2. MATERIAL ADSORBENTE: CARBÓN ACTIVADO

El carbón activado es un mineral de origen orgánico constituido básicamente por carbono (Reinoso, 2005), con una estructura porosa desarrollada (Figura 9) y elevada área superficial que pueden adherir en su superficie una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos de fases líquidas o gaseosas, por medio del proceso de adsorción. Son producidos a partir de madera, semilla, cáscaras de frutas, etc. (Primera *et al.*, 2011).



**Figura 9: Representación esquemática de la estructura porosa del carbón activado**

FUENTE: Gómez *et al.* (2010)

La adsorción del carbón activado se debe a un desequilibrio de fuerzas que se genera en toda la superficie formada por átomos de carbono. El desequilibrio se debe a que el carbono tiende a formar sus cuatro enlaces perfectamente distribuidos en el espacio, lo que no ocurre en su superficie sólida, formándose enlaces del tipo Van der Waals con las moléculas del fluido adyacente (Manahan, 2007).

Las principales propiedades que debe tener un carbón activado son (Gómez *et al.*, 2010):

- Alta capacidad de adsorción
- Distribución adecuada de poros
- Alta resistencia mecánica

- Alta concentración de sitios activos (grupos químicos que contienen oxígeno u otro tipo de heteroátomos)
- Bajo contenido de material inorgánico o cenizas

#### **a. USOS DEL CARBÓN ACTIVADO**

La adsorción mediante carbón activado encuentra numerosas aplicaciones en varias industrias de procesamiento de alimentos para eliminar el color no deseado y para mejorar la calidad y la capacidad de consumo de la materia alimenticia. Se puede mencionar:

- En la refinación de azúcar, se utiliza para eliminar el color, originadas por las melanoidinas y los complejos fenólicos, olor y sustancias extrañas (Goyal, 2012).
- En aceites y grasas, es usado para la purificación del aceite de semilla de algodón ya que elimina los peróxidos (Calzada, 1981 citado por Zamora, 2010).
- En la preparación de bebidas alcohólicas, para eliminar compuestos no deseados para mejorar el sabor, color, y otras propiedades (Goyal, 2012).
- En frutas, como adsorbente de etileno para evitar la maduración prematura (Hovanec *et al.*, 1998 citados por Niño y Ortiz, 2008).

## **2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA**

La metodología de superficies de respuesta, o MSR, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta (Montgomery, 2002). Permite que el investigador inspeccione, de manera visual, la respuesta para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento (Kuehl, 2001).

### **2.6.1. ETAPAS DE LA OPTIMIZACIÓN**

Ayala y Pardo (1995) mencionan tres etapas fundamentales: *screening* o cribado, escalamiento y optimización final.

**a. ETAPA I: SCREENING O CRIBADO**

Al inicio de un proceso de optimización, cuando todavía no se tiene un buen conocimiento del comportamiento del proceso, generalmente la lista de factores o variables que puedan influir en el proceso son muchas, por lo que es necesario identificar las más relevantes. En esta etapa, los diseños de primer orden son los más recomendados, siendo el diseño factorial el más utilizado, especialmente los diseños factorial  $2^k$  y factorial fraccionado (Ayala y Pardo, 1995).

Montgomery (2002) menciona que, por lo general, se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden, representado en la Ecuación (2):

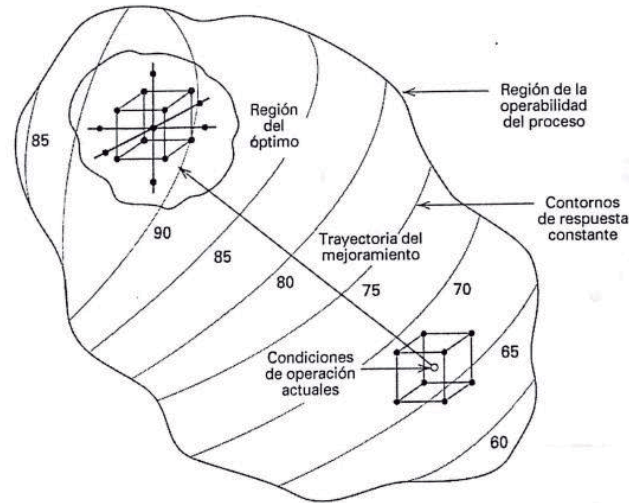
$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad \text{Ecuación (2)}$$

donde “ $\varepsilon$ ” representa el ruido o error observado en la respuesta “ $y$ ”.

**b. ETAPA II: ESCALAMIENTO**

Cuando la región óptima se encuentra lejos de los experimentos iniciales (Etapa I: *screening*), como en el caso de las condiciones de operación de la Figura 10, se inicia una segunda etapa de optimización denominada escalamiento (Ayala y Pardo, 1995).

Esta etapa consiste en escalar sucesivamente hacia la región óptima hasta llegar a ubicarla. Existen varios métodos entre los cuales destacan el método de pendientes ascendentes o descendentes y el método de búsqueda simple (*Simplex Search*). Estos métodos permitirán acercarse a la denominada “región experimental de respuestas estacionarias”, es decir, a una zona en la cual ya no es posible mejorar las respuestas por las técnicas mencionadas. En esta situación los efectos cuadráticos toman importancia y el uso de los modelos de segundo orden es necesario para describir dicha región (Ayala y Pardo, 1995).



**Figura 10: El carácter secuencial de la MSR**

FUENTE: Montgomery (2002)

**c. ETAPA III: OPTIMIZACIÓN FINAL**

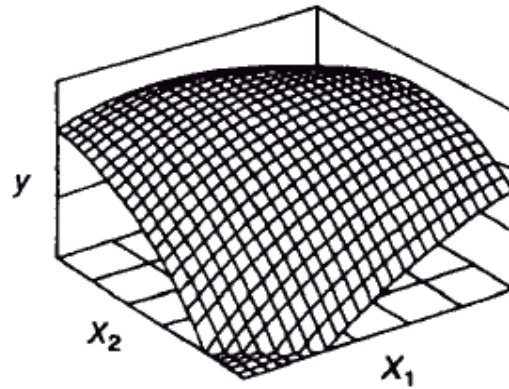
En la región experimental que encierra el óptimo, los efectos de segundo orden son mayores en valores absolutos a los efectos de primer orden, lo que indica que esta región puede ser descrita apropiadamente mediante modelos matemáticos de segundo orden de la forma:

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{u,j=1}^k b_{uj} X_u X_j + \sum_{j=1}^K b_{jj} X_j^2 \quad u \neq j \quad \text{Ecuación (3)}$$

Una vez definido el modelo matemático que represente satisfactoriamente la región óptima, se procede a optimizar dicho modelo, es decir, hallar los valores óptimos de las variables  $X_j$  que maximicen o minimicen el modelo matemático estimado (Ecuación (3)) (Ayala y Pardo, 1995).

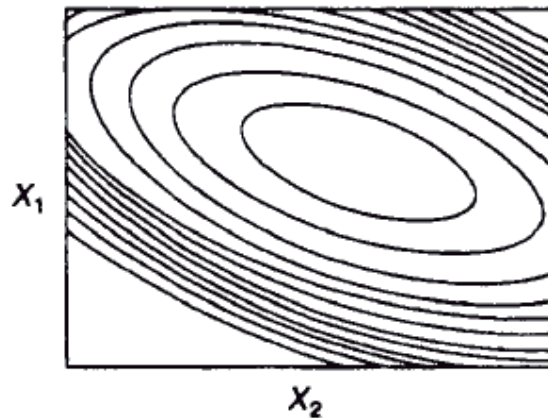
La ecuación de respuesta cuadrática se representa como una superficie sólida en tres dimensiones (Figura 11). En la Figura 12, la ecuación aparece como curvas de nivel o también llamado gráfica de contornos. Cada contorno corresponde a una altura particular de la superficie de respuesta (Kuehl, 2001; Montgomery, 2002).





**Figura 11: Superficie de respuesta cuadrática**

FUENTE: Kuehl (2001)



**Figura 12: Curvas de nivel de respuesta cuadrática**

FUENTE: Kuehl (2001)

Los diseños para ajustar modelos de segundo orden son:

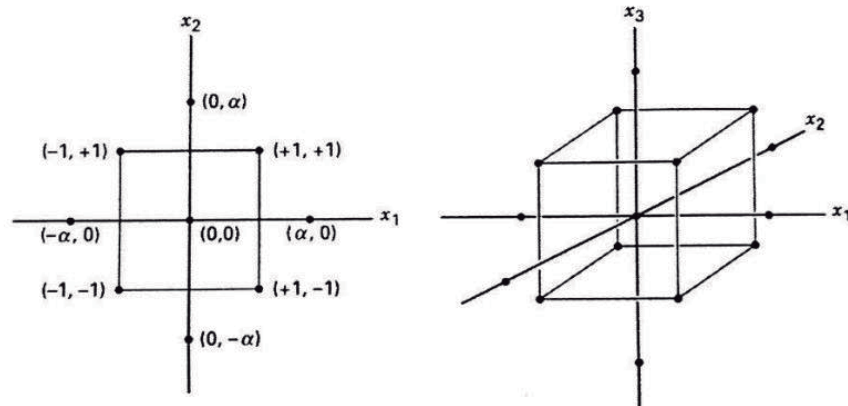
### c.1. Factorial $3^k$

Los factoriales  $3^k$  se pueden usar para estimar las ecuaciones polinomiales cuadráticas, pero el número de combinaciones de tratamientos que requieren produce un experimento poco práctico de gran tamaño; pues mientras los diseños  $3^k$  con dos factores requieren solo 9 combinaciones de tratamientos, un diseño con tres factores requiere 27, y uno con cuatro factores requiere 81 (Kuehl, 2001).

## c.2. Diseño compuesto central

El diseño compuesto central o DCC consiste, según Montgomery (2002) y Kuehl (2001), en un diseño factorial  $2^k$ , al cual se le añade puntos axiales ( $2k$ ) en los ejes de coordenadas, a una distancia  $\pm \alpha$  del punto central del diseño. El punto central es replicado cierto número de veces.

En el DCC, cada factor tiene cinco niveles, lo cual permite una buena predicción del modelo de segundo orden. Asimismo, el reducido número de puntos experimentales (correspondientes a la suma de los puntos factoriales, puntos axiales y repeticiones en el punto central:  $N = 2^k + 2k + n_c$ ) lo convierte en un diseño económico en cuanto al uso de recursos (Kuehl, 2001). En la Figura 13 se muestra el DCC para  $k=2$  y  $k=3$  factores.



**Figura 13: Diseños centrales compuestos para  $k=2$  y  $k=3$**

FUENTE: Montgomery (2002)

Hay dos parámetros en el diseño que deben especificarse:

- La distancia  $\alpha$  de las corridas axiales al centro del diseño. La elección de la distancia  $\alpha$  de las corridas axiales al centro del diseño es muy importante, pues determinará la rotabilidad del diseño. Un diseño es rotable cuando la varianza  $V[y(x)]$  es igual en todos los puntos  $x$  que equidistan del centro del mismo, siendo constante en esferas, lo cual se traduce en la obtención de un modelo de segundo orden que proporciona buenas predicciones en toda la región de investigación (Montgomery, 2002).
- El número de los puntos centrales  $n_c$ . Algunas razones por las que deben incluirse: produce un buen perfil de la función, minimiza el cuadrado medio del error, permite

hacer un análisis de falta de ajuste a un modelo de segundo orden e incrementa la robustez del diseño; de tres a cinco corridas centrales son suficientes para alcanzar dichos objetivos. Si se quiere introducir más puntos centrales, no hay ningún inconveniente, excepto por el costo adicional que significa ejecutar más lecturas (Box y Draper, 1987; Montgomery, 2002).

### **c.3. Diseños Box-Behnken**

Los diseños son rotatorios, o casi rotatorios, con menor número de unidades experimentales en comparación con los diseños  $3^k$ . Se forman con la combinación de diseños  $2^k$  y diseños de bloques incompletos. Estos diseños son esféricos más que cuboidales puesto que los puntos del diseño se encuentran en las orillas de un cubo en lugar de en las esquinas como los del diseño de cubo con cara centrada. El diseño de Box-Behnken solo debe usarse si no se tiene interés en predecir las respuestas en las esquinas de la región cuboidal. (Kuehl, 2001).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

Se utilizó harina de yacón producida a partir de raíces de yacón frescas adquiridas en el Mercado Mayorista N° 2 de Frutas de Lima, ubicado en el distrito de La Victoria. Las raíces frescas fueron transportadas al laboratorio y procesadas el mismo día de su recepción.

#### **3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **3.3.1. MATERIALES**

- Material de vidrio: baguetas, embudo Büchner, fiolas, matraces Erlenmeyer, matraces Kitasato, pipetas, placas Petri, probetas, termómetro, tubos de ensayo y vasos de precipitado.
- Micropipetas de 5-50  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 500-5000  $\mu\text{L}$  (Brand Transferpette<sup>®</sup>, Alemania).
- Tamices (W.S. Tyler<sup>®</sup>, ASTM Specification E-11, EE.UU.)
- Otros: ollas, cuchillos, tablas de picar, cucharas, pinzas, bolsas de polipropileno de alta densidad, magnetos, tubos Eppendorf, tubos Falcon, malla N° 20, papel filtro Whatman<sup>®</sup> N°1.

##### **3.3.2. EQUIPOS**

- Agitador magnético (CAT<sup>®</sup>, modelo M6, Alemania)

- Agitador vortex (VELP Scientifica<sup>®</sup>, modelo F202A0175, España)
- Balanza analítica (OHAUS<sup>®</sup>, modelo AR2140, EE.UU.)
- Balanza de precisión (OHAUS<sup>®</sup>, modelo Scout, China)
- Baño maría con agitación (GFL<sup>®</sup>, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand<sup>®</sup>, modelo ME2C, Alemania)
- Centrífuga (Hettich<sup>®</sup>, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa, Perú)
- Colorímetro (Konica Minolta<sup>®</sup>, modelo CR- 400/410, Japón)
- Congelador (Electrolux<sup>®</sup>, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo de fase líquida de alta performance (HPLC) (Waters Associates<sup>®</sup>, modelo 2695, EE.UU.)
- Espectrofotómetro (Biotek Instruments<sup>®</sup>, modelo EONC, EE.UU.)
- Espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Genesys 200)
- Estufa al vacío (Shellab<sup>®</sup>, modelo 1400 E-2, EE.UU.)
- Licuadora (Oster<sup>®</sup>, modelo 4655-053, México)
- Potenciómetro digital (Thermo Orion<sup>®</sup>, modelo 410, EE.UU.)
- Refractómetro de mano 0-32 °Brix (VWR<sup>®</sup>, BX Series, EE.UU.)
- Refrigerador (LG<sup>®</sup>, modelo GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph<sup>®</sup>, modelo Heizbad HB, Alemania)
- Selladora (Machintek<sup>®</sup>, modelo KF-300H, EE.UU.)
- Tamizadora vibratoria (Siemens Schuckert Werke<sup>®</sup>, BE 4835, Alemania)
- Turbidímetro (WTW, Turb<sup>®</sup> 550/Turb<sup>®</sup> 550 IR, Alemania)

### 3.3.3. REACTIVOS

- Acetato de sodio (p.a. Merck<sup>®</sup>, Alemania)
- Acetonitrilo (grado HPLC. J.T. Baker<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS) (p.a. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Ácido acético glacial (p.a. J.T. Baker<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Ácido fosfórico (p.a. J.T. Baker<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Agua destilada
- Agua Milli - Q
- Alcohol etílico desnaturalizado (p.a. J.T. Baker<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Bisulfito de sodio (Mallinckrodt<sup>®</sup>, México)

- Carbonato de sodio (p.a. J.T. Baker<sup>®</sup>, EE.UU)
- Carbón activado en polvo (Clarimex<sup>®</sup>, México)
- Coomassie azul brillante G250 (p.a. Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Fenol (p.a. Mallinckrodt<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Folin Ciocalteu 2 N (p.a. Merck<sup>®</sup>, Alemania)
- Fructosa (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Hidróxido de calcio (p.a. Merck<sup>®</sup>, Alemania)
- Hidróxido de sodio en perlas (p.a. J.T. Baker<sup>®</sup>, México)
- Inulinasa (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EE.UU.)
- Tartrato de sodio y potasio (Scharlau<sup>®</sup>, España)

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES**

Se determinó el contenido de sólidos solubles en el extracto concentrado y extracto clarificado y decolorado a partir de la harina de yacón usando un refractómetro de mano, previamente calibrado. Se empleó el método 932.14-C de la AOAC (1995), reportándose los resultados en grados Brix.

#### **3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES REDUCTORES**

Se usó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) expresándose el resultado en porcentaje de azúcares reductores (AR). El cual se basa en la reacción entre el ácido 3,5 dinitrosalicílico y el grupo reductor de la glucosa o fructosa en medio alcalino, formando un compuesto de color marrón cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares presentes. El procedimiento empleado para la determinación del contenido de AR se presenta en el ANEXO 1.

#### **3.4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

Para la determinación del contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructooligosacáridos (FOS), se realizó el procedimiento señalado por Jaime *et al.* (2001) con algunas

modificaciones. El procedimiento se encuentra descrito en el ANEXO 2. Se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) (Waters Associates<sup>®</sup>, modelo 2695), detector de índice de refracción Waters Associates (Modelo 2414), columna Shodex<sup>®</sup> Asahipak<sup>®</sup> NH2P-40 3E (4,6 mm ID x 250 mm) y pre-columna Shodex<sup>®</sup> NH2P-50G 3A (4,6 mm ID x 10 mm). El solvente de elución fue acetonitrilo: agua (80:20) a un flujo de 0,5 mL/min y 42 °C, durante 20 minutos. La cantidad de muestra inyectada fue 20 µL. La muestra, los estándares (glucosa, fructosa y sacarosa) y la fase móvil se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm PVDF Millipore<sup>®</sup> antes de la inyección en el HPLC.

La concentración total de fructanos se determinó de acuerdo al método de Hoebregs (1997), según las Ecuaciones (4) y (5).

$$G = G_T - (S/1,9) - G_F \quad \text{Ecuación (4)}$$

$$F = F_T - (S/1,9) - F_F \quad \text{Ecuación (5)}$$

donde:

$S$  = sacarosa,  $G$  = glucosa liberada de los fructanos,  $G_T$  = glucosa total,  $\frac{S}{1,9}$  = glucosa o fructosa proveniente de la sacarosa,  $G_F$  = glucosa libre,  $F$  = fructosa liberada de los fructanos,  $F_T$  = fructosa total,  $F_F$  = fructosa libre.

El contenido total de oligofructanos (Ecuación (6)) es la suma de  $G$  y  $F$ , corregida por la pérdida de agua durante la hidrólisis:

$$\text{FOS}_{\text{totales}}(\%) = k(G + F) \quad \text{Ecuación (6)}$$

donde:

$$k = 0,925 \text{ (para oligómeros)}$$

El rendimiento de extracción de FOS, se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{Cantidad de FOS extraída}}{\text{Cant. total de FOS en la harina}} \times 100 \quad \text{Ecuación (7)}$$

### 3.4.6. DETERMINACIÓN DE GRANULOMETRÍA

La granulometría se determinó usando tamices (W.S. Tyler®) N° 30, 40, 50, 60, 70, 100 y 200 que fueron ensamblados en una tamizadora vibratoria (Siemens Schuckert Werke®). En la parte superior, donde se encuentra el tamiz de mayor diámetro, se colocó la harina y posteriormente la columna de tamices se sometió a vibración y movimientos rotatorios intensos (150 RPM). Luego de aproximadamente 10 minutos, se retiraron los tamices, tomando por separado los pesos del material retenido en cada uno de ellos. Los resultados se expresaron en porcentaje, aplicando la Ecuación (8).

$$\text{Porcentaje retenido} = \frac{A}{W} \times 100 \quad \text{Ecuación (8)}$$

donde:

$A$  = Peso retenido en el tamiz y  $W$  = Peso inicial de la muestra

### 3.4.7. DETERMINACIÓN DE pH

El pH del extracto se determinó usando un potenciómetro, el cual fue previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. La medición se realizó directamente sobre los extractos a temperatura ambiente.

### 3.4.8. DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ

Se determinó la turbidez en el extracto bruto y extracto clarificado, mediante un turbidímetro microprocesador de sobremesa con medidas nefelométricas, que expresa los valores en unidades NTU (unidades nefelométricas de turbidez) y cubre un rango de 0 a 10000 NTU (WTW, Turb®). El procedimiento empleado para la determinación de turbidez se presenta en el ANEXO 3.

Los resultados se expresaron en porcentaje de remoción de turbidez y se obtuvo mediante la Ecuación (9).

$$\text{Porcentaje de remoción de turbidez (\%)} = \frac{\text{Turbidez}_{\text{Inicial}} - \text{Turbidez}_{\text{Final}}}{\text{Turbidez}_{\text{Inicial}}} \times 100 \quad \text{Ecuación (9)}$$



### 3.4.9. DETERMINACIÓN DE COLOR

El color de las muestras se determinó por el método CIELAB, utilizando un colorímetro de refracción (Konica Minolta®), el cual expresó el color en parámetros de L\* (luminosidad), a\* (verde a rojo) y b\* (azul a amarillo) de la escala de Hunter.

La diferencia de color se determinó según la regla:

$$\Delta E = [(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación (10)}$$

donde:

$$\Delta a = a_{\text{muestra}} - a_{\text{patrón}^*} \quad \text{Ecuación (11)}$$

$$\Delta b = b_{\text{muestra}} - b_{\text{patrón}^*} \quad \text{Ecuación (12)}$$

$$\Delta L = L_{\text{muestra}} - L_{\text{patrón}^*} \quad \text{Ecuación (13)}$$

patrón\* = valores del extracto concentrado inicial

Así,  $\Delta E$  representa la diferencia de color total entre el extracto concentrado y la muestra (extracto clarificado y decolorado).

### 3.4.10. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó con el reactivo Folin – Ciocalteu, siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965).

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 755 nm y los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g de muestra en base seca (en la harina) y mg de ácido gálico equivalente (AGE)/mL de muestra (en los extractos). El procedimiento empleado para la determinación de compuestos fenólicos se presenta ANEXO 4.

### 3.4.11. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Se determinó la proteína total del extracto óptimo utilizando el método de Bradford (1976) (ANEXO 5), el cual se basa en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie

Blue G-250 y las proteínas. El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína. La formación del complejo colorante - proteína toma aproximadamente dos minutos y permanece estable por una hora, por lo que el procedimiento es muy rápido y el tiempo para el ensayo no es limitante (García y Vázquez, 1998).

#### **3.4.12. DETERMINACIÓN DE CALCIO**

Mediante espectrofotometría de absorción atómica (Chapman y Pratt, 1973) (ANEXO 6), se determinó el contenido de calcio en la harina de yacón, en el extracto a partir de la harina y en el extracto concentrado de yacón, usando estándares de calcio. Se empleó el espectrofotómetro de absorción atómica Thermo Scientific® Genesys 200.

#### **3.4.13. DETERMINACIÓN DE FOSFATO**

Se determinó el contenido de fosfato mediante el método 970.39 de la AOAC (1995), reportándose los resultados en ppm de  $P_2O_5$ .

### **3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

#### **3.5.1. EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE LA HARINA DE YACÓN**

Para la extracción de los FOS, se utilizó harina de yacón, la cual se obtuvo según el siguiente procedimiento: las raíces de yacón fueron seleccionadas, lavadas, cortadas en rodajas de cinco milímetros de espesor, sometidas a un blanqueado en agua a ebullición por seis minutos y secadas a una temperatura de 65 °C hasta alcanzar un contenido de una humedad constante (3,5 por ciento); luego fueron molidas y la harina obtenida fue tamizada utilizando una malla N° 20 (833 micras), empacada en bolsa de polietileno y almacenada a -20 °C hasta su uso.

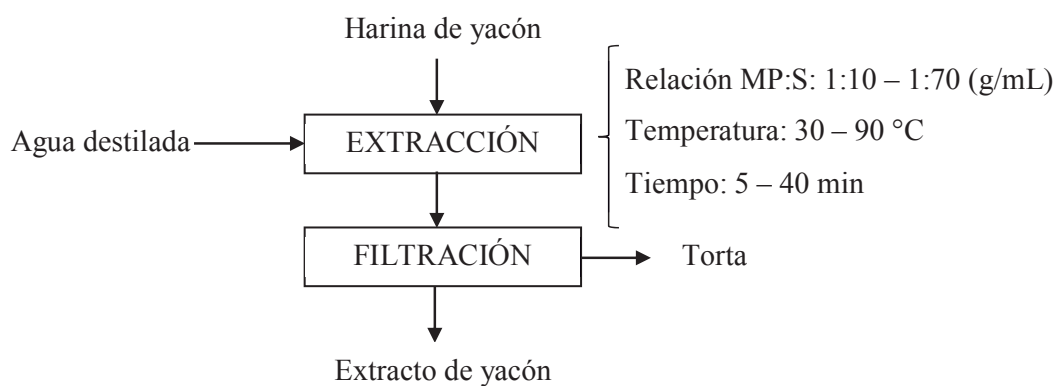
En la Figura 14 se presenta la secuencia de operaciones llevada a cabo para la obtención del extracto a partir de la harina de yacón. A continuación se describen dichas operaciones:

- a. **Extracción:** Se pesaron dos gramos de harina en un matraz y se adicionó agua destilada en una relación materia prima:solvente (MP:S) determinada (1:10 y 1:70

(g/mL)). Luego, se llevó a baño maría bajo agitación constante a una temperatura (30 – 90 °C) y tiempo de extracción (5 – 40 min) en concordancia con el diseño experimental.

- b. Filtración:** Se filtró el extracto empleando papel Whatman® N°1, con el fin de retener el sobrenadante y obtener un extracto bruto.

Al extracto bruto obtenido se le determinó el contenido de FOS, el cual fue expresado en rendimiento de extracción.



**Figura 14: Flujo de operaciones para la obtención del extracto a partir de la harina de yacón**

### 3.5.2. CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO PROVENIENTE DE LA HARINA DE YACÓN

Para la clarificación y decoloración, se utilizó el extracto obtenido con los parámetros óptimos determinados en la primera etapa de esta investigación, el cual fue concentrado a 60 °C, empleando el rotavapor, hasta conseguir un extracto a 20 °Brix. A continuación se describe cada operación desarrollada:

- a. Clarificación:** Este proceso se basó en la metodología de Laksameethanasan *et al.* (2012) y Doherty *et al.* (2002), con algunas modificaciones. Se colocaron 40 mL de extracto concentrado en un matraz y se adicionó lechada de cal al 50 por ciento (p/v), para lo cual se empleó hidróxido de calcio (p.a. Merck®, Germany), cuyas especificaciones se encuentran en el ANEXO 7, hasta ajustar al pH requerido (5,53 -

11), valor determinado según el diseño experimental, ya que la cal participa en la formación de sales insolubles que luego son floculados por acción del calor. Posteriormente, el extracto se calentó a 40 °C, pues Doherty *et al.* (2002) recomiendan un tratamiento de encalado a temperaturas entre 35 y 40 °C. El tiempo de calentamiento fue de 10 minutos, el cual fue determinado por ensayos previos.

- b. Centrifugación:** El extracto se centrifugó a 4000 RPM por 10 minutos para la separación de los flóculos formados y se recogió el sobrenadante.
- c. Regulación de pH:** Se empleó ácido fosfórico uno molar hasta ajustar el pH del extracto a 6,5, formando más sales que aumenta el efecto “red” de los aglomerados. Además, Qi *et al.* (2004) afirman que el decrecimiento de la capacidad de adsorción del carbón activado se da en rango de pH básico (7 – 10).
- d. Centrifugación:** El extracto se centrifugó a 4000 RPM por 10 minutos para la separación de los flóculos formados y se recogió el sobrenadante.
- e. Primera decoloración:** Se colocó el sobrenadante obtenido de la etapa anterior en un matraz y se procedió a adicionar carbón activado en polvo (CAP) (0,05 – 1,5 por ciento, Clarimex<sup>®</sup>, México), cuyas especificaciones se encuentran en el ANEXO 8. Seguidamente, se llevó a baño maría, con agitación constante, a una temperatura determinada (20 – 60 °C) (porcentaje de CAP y temperatura en concordancia con el diseño experimental), por un tiempo de 30 minutos (tiempo suficiente para que pueda alcanzar el equilibrio).
- f. Centrifugación:** El extracto se centrifugó a 4000 RPM por 15 minutos para la separación del carbón activado y se recogió el sobrenadante.
- g. Segunda decoloración:** Se realizó una segunda decoloración en las mismas condiciones en la que fue llevada a cabo la primera decoloración.
- h. Centrifugación:** El extracto se centrifugó a 4000 RPM por 15 minutos para la separación del carbón activado y se recogió el sobrenadante.

- i. **Filtración a vacío:** Se filtró el extracto empleando papel Whatman® N°1 para eliminar restos de carbón activado, garantizar la eliminación de impurezas y obtener finalmente un extracto de yacón clarificado y decolorado.

Finalmente, se determinó el color, turbidez y contenido de FOS de los extractos obtenidos según el diseño experimental. El flujo de operaciones para la clarificación y decoloración se muestra en la Figura 15.

### **3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

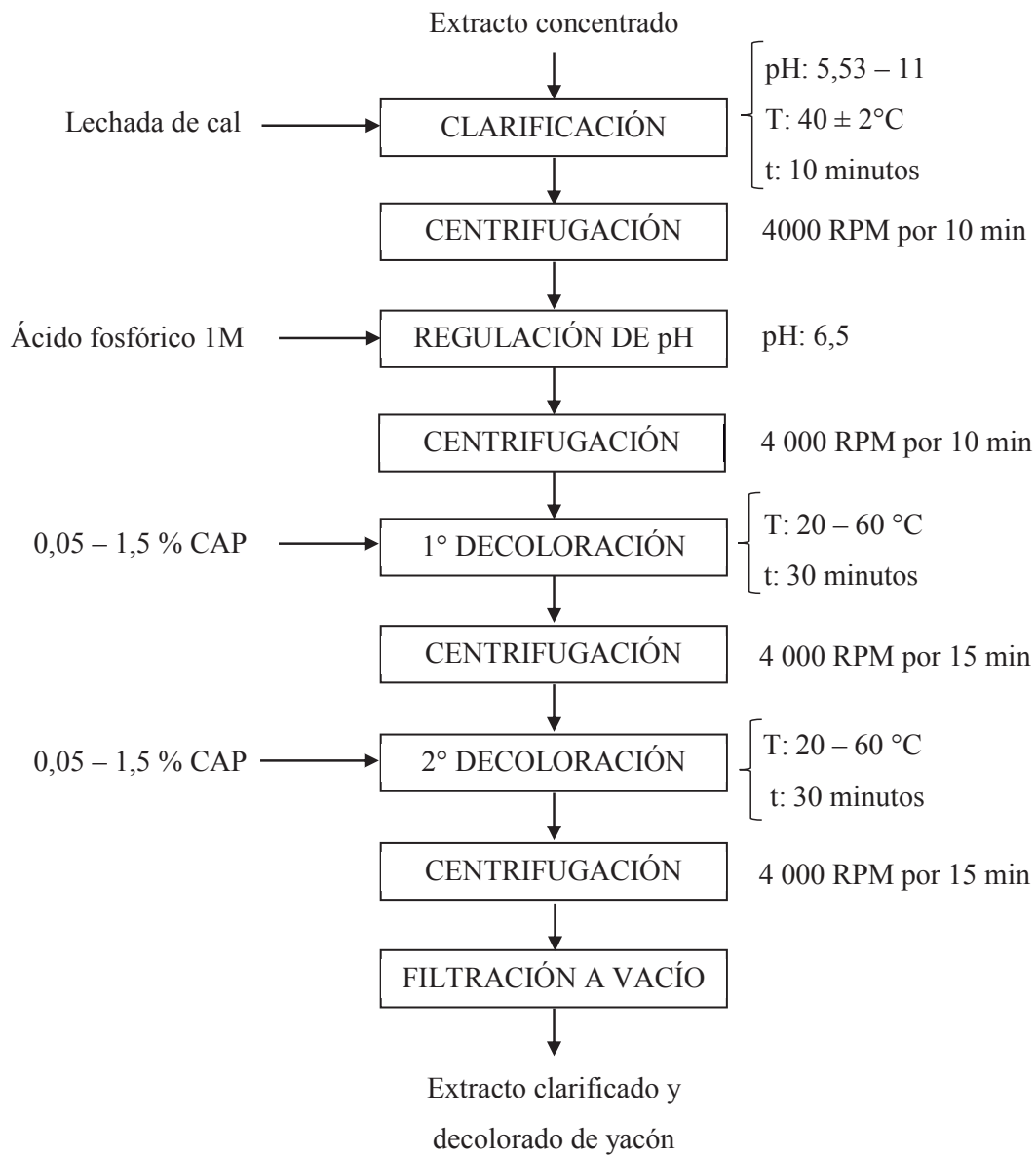
#### **3.6.1. EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE HARINA DE YACÓN**

Se siguió la metodología de superficie de respuesta, la que contempló dos etapas. En la primera etapa, se realizó un *screening* para seleccionar los factores de efecto significativo en el rendimiento de extracción de FOS a partir de harina de yacón y en la segunda etapa se optimizaron las condiciones de extracción con la mayor recuperación de FOS.

##### **a. SCREENING O CRIBADO**

Sobre la base de los resultados reportados en similares estudios (Lingyun *et al.*, 2007, Arango *et al.* (2008), Montañez *et al.* (2011), Kurtoğlu y Yildiz (2011), Puminat y Teangpook (2013)) y a pruebas preliminares, se identificaron tres factores para ser evaluados en esta etapa: relación MP:S ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) y tiempo de extracción ( $X_3$ ). Se determinó el efecto significativo de estos factores ( $p < 0,05$ ) sobre la variable respuesta: rendimiento de extracción de FOS ( $Y_1$ ), bajo un diseño factorial  $2^k$ .

Los niveles planteados de los factores se muestran en el Cuadro 5. El efecto de estos sobre cada variable respuesta fueron determinados con el análisis de varianza (ANVA) ( $p < 0,05$ ) y, representados en la gráfica de Pareto estandarizado. Para el análisis estadístico se empleó el software *Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).



**Figura 15: Flujo de operaciones de la clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón**

**Cuadro 5: Factores y sus niveles considerados en el arreglo factorial  $2^k$  aplicado en la etapa de *screening* para la extracción de FOS**

Factores experimentales		
Relación MP:S (p/v)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
X <sub>1</sub> (x <sub>1</sub> )	X <sub>2</sub> (x <sub>2</sub> )	X <sub>3</sub> (x <sub>3</sub> )
1:10 (-1)	30 (-1)	5 (-1)
1:70 (1)	90 (1)	40 (1)

X<sub>i</sub>: Variable no codificada, x<sub>i</sub>: Variable codificada

## b. OPTIMIZACIÓN

Los resultados de la etapa anterior identificaron un solo factor significativo: relación MP:S. Con el fin de determinar la relación MP:S que maximice la extracción de FOS, se aplicó el método de Variación No Significativa (Herrera, 2005), manteniendo constante la temperatura y el tiempo (30 °C y 5 minutos), el cual comprende dos partes: (i) ANVA usando el Diseño Completamente al Azar (DCA), a las medias de los resultados obtenidos con cada uno de las relaciones MP:S ensayadas (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:70, 1:90 y 1:100 (g/mL)) y (ii) la prueba de comparación de medias de Duncan ( $p < 0,05$ ), se aplicó luego de que el ANVA indicara diferencias significativas entre las medias de los resultados. El objetivo fue realizar una comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las otras.

Luego, la interpretación de los resultados, se consideró como la relación MP:S que maximiza el proceso, aquel en el cual se conjugan los dos requisitos siguientes: (i) la cantidad de FOS extraído sea mayor y (ii) la prueba de comparación de medias de Duncan indique que no existen diferencias significativas con la cantidad de FOS extraído en aquel relación MP:S subsiguiente mayor, pero sí con aquel anterior.

Para el análisis estadístico se empleó el *software Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).

### c. **CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE FOS**

Se evaluaron diferentes tiempos de extracción de FOS (1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, y 60 minutos) manteniendo constante la relación MP:S, seleccionada en la etapa anterior, y la temperatura del proceso a 30 °C. Se ajustaron los datos experimentales a dos modelos cinéticos, los que se definen en el Cuadro 6. Para el análisis estadístico se empleó el *software Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).

### 3.6.6. **CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE LA HARINA DE YACÓN**

Se siguió la metodología de superficie de respuesta, la que contempló dos etapas. En la primera etapa, se realizó un *screening* para evaluar el efecto significativo de los principales factores que afectan el proceso de clarificación y decoloración del extracto de yacón y, en base en los resultados obtenidos, se optimizó las condiciones de estas operaciones.

#### a. **SCREENING O CRIBADO**

Sobre la base de los resultados reportados en estudios similares (Chen, 1991; Carabasa *et al.*, 1998; Rein, 2002; Doherty *et al.*, 2002; Nasehi *et al.*, 2012; Laksameethanasan *et al.*, 2012) y pruebas preliminares, se identificaron tres factores a ser estudiados dentro del proceso completo de clarificación y decoloración: pH en la clarificación ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) y porcentaje de carbón activado ( $X_3$ ) en la decoloración. Se evaluó el efecto significativo de estas variables ( $p < 0,05$ ) sobre las variables respuestas: porcentaje de remoción de turbidez ( $Y_1$ ) y variación de color respecto al extracto inicial ( $\Delta E$ ,  $Y_2$ ).

En esta etapa se aplicó un diseño factorial  $2^k$ . Para  $k = 3$  variables, se tuvieron ocho puntos factoriales. Los niveles planteados de los factores se muestran en el Cuadro 7.



**Cuadro 6: Modelos cinéticos aplicados al proceso de extracción de fructooligosacáridos**

Modelo	Ecuación	Parámetros del Modelo	Referencia
Ley de Fick modificado por Qu <i>et al.</i> (2010)	$Ct = \frac{Ce^2Kt}{1+CeKt}$ Ecuación (14) $Ct = \frac{t}{\left(\frac{1}{h}\right) + \left(\frac{t}{Ce}\right)}$ Ecuación (15) $h = kCe^2$ Ecuación (16)	Ct: Concentración de FOS a un tiempo t (g/L) Ce: Concentración de equilibrio del FOS (g/L) K: Tasa de extracción (g/L min) h: Tasa inicial de extracción (g/L min)	Qu <i>et al.</i> (2010)
Ley de Fick modificado Chan <i>et al.</i> (2014)	$\frac{C_0 - C}{C_0} = ((1 - b')e^{-kt})$ Ecuación (17)	Co: Concentración del FOS en la matriz sólida (g/100g b.s.) C: Concentración del FOS remanente en la matriz sólida (g/100g b.s.) b': Coeficiente de extracción cinética en la etapa de lavado K: Coeficiente de extracción cinético en la etapa de difusión (min <sup>-1</sup> )	Chan <i>et al.</i> (2014)

**Cuadro 7: Factores y sus niveles considerados en el arreglo factorial  $2^k$  aplicado en la etapa de *screening* para la clarificación y decoloración**

Factores experimentales		
pH en la clarificación	Temperatura (°C)	Porcentaje de CAP (%, g/mL)
$X_1$ ( $x_1$ )	$X_2$ ( $x_2$ )	$X_3$ ( $x_3$ )
5,5 (-1)	20 (-1)	0,05 (-1)
11 (1)	60 (1)	1,5 (1)

$X_i$ : Variable no codificada,  $x_i$ : Variable codificada

El efecto de estos sobre cada variable respuesta fueron determinadas el análisis de varianza (ANVA) ( $p < 0,05$ ) y con la gráfica de Pareto estandarizado. Para el análisis estadístico se empleó el *software Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).

#### b. OPTIMIZACIÓN

Para optimizar el nivel de los factores determinados con efecto significativo en el *screening*, sobre el porcentaje de remoción de turbidez ( $Y_1$ ),  $\Delta E$  respecto al extracto inicial ( $Y_2$ ), contenido de FOS g/100 mL ( $Y_3$ ), se aplicó el Diseño Compuesto Central (DCC) para el análisis de superficie de respuesta de segundo orden que, según Box y Draper (1987), para  $k=2$  variables, consta de cuatro puntos factoriales ( $2^k$ ), cuatro puntos axiales (estrella) en los ejes coordenados (a una distancia  $\alpha$ ) con ocho repeticiones en el punto central; dando un total de 16 puntos experimentales. Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró  $\alpha = (n_f)^{1/4} = (4)^{1/4} = 1,14$  que, garantiza un DCC rotatable (Montgomery, 2002).

El punto axial -1,41 para el caso del porcentaje de CAP es -0,25, pero en la práctica a los tratamientos con dicho punto axial, no se le colocó carbón activado. Y para el caso del punto experimental -1,41 del pH en la clarificación que resultó ser 4,4; se mantuvo el pH natural del extracto.

Los niveles planteados de los factores se muestran en el Cuadro 8. El modelo y coeficiente de regresión fueron considerados significativos cuando  $p < 0,05$ .

**Cuadro 8: Factores y sus niveles considerados en el diseño compuesto central aplicado en la etapa de optimización de la clarificación y decoloración**

Factores experimentales	
pH en la clarificación	Porcentaje de CAP (% , g/mL)
X <sub>1</sub> (x <sub>1</sub> )	X <sub>3</sub> (x <sub>3</sub> )
4,4 (-1,41)	-0,25 (-1,41)
5,53 (-1)	0,05 (-1)
8,3 (0)	0,76 (0)
11 (1)	1,5 (1)
12,13 (1,41)	1,8 (1,41)

X<sub>i</sub>: Variable no codificada, x<sub>i</sub>: Variable codificada

El modelo de segundo orden para las variables respuestas planteadas fue:

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{u,j=1}^k b_{uj} X_u X_j + \sum_{j=1}^K b_{jj} X_j^2 \quad u \neq j \quad \text{Ecuación (18)}$$

Donde:

Y: Porcentaje de remoción de turbidez (%), ΔE respecto al extracto inicial

b<sub>0</sub>: Término independiente

b<sub>j</sub>: Efecto lineal

b<sub>uj</sub>: Efecto de las interacciones

b<sub>jj</sub>: Efecto cuadrático

X<sub>u</sub> y X<sub>j</sub>: Variables independientes o factores

k: Número de variables independientes o factores

Posteriormente, se realizó el ANVA (nivel de significación α = 0,05). La bondad de ajuste de la ecuación de regresión de las observaciones experimentales fue verificada por el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) y el coeficiente de determinación ajustado (R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub>). Para el análisis estadístico se empleó el *software Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).

Con la finalidad de brindar una visión panorámica de la variación del porcentaje de remoción de turbidez y ΔE, se graficó la superficie de respuesta (tridimensional) y la curva de contorno

correspondiente a la Ecuación (18), que representa el efecto de dos factores sobre la respuesta.

### **c. VALIDACIÓN DEL MODELO**

Para la validación de las condiciones óptimas de los niveles de las variables independientes, obtenidas mediante la Metodología de Superficie de Respuesta, se realizaron tres repeticiones experimentales con dichos valores y se compararon con los valores predichos por el modelo.

### **d. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL**

Se evaluó el contenido de compuestos fenólicos, proteínas, sólidos solubles, calcio y fosfatos, color y turbidez en el extracto final.

### **3.6.7. ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE COMPUESTOS COLOREADOS**

Para la obtención de los datos de color, se siguió el método de Arslanoğlu *et al.* (2005) con algunas modificaciones:

- Se determinó el color de la muestra de partida (extracto obtenido luego de la centrifugación previo ajuste del pH a 6,5 con ácido fosfórico) mediante la lectura de absorbancia a 420 nm.
- Se colocaron 15 mL de extracto bruto concentrado en matraces, con diferentes porcentajes de carbón activado (0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3 y 1,6 por ciento).
- Se llevaron los matraces a baño maría con agitación constante, a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), considerando un tiempo de contacto adsorbente – adsorbato de 60 minutos a fin de asegurar que la condición fuera alcanzada.
- Luego de ese tiempo, se retiraron los matraces del baño maría y se centrifugó para separar el material adsorbente (carbón activado).
- Se procedió a realizar la lectura de las absorbancias a 420 nm en el espectrofotómetro.
- Con los resultados obtenidos se realizaron las isotermas de adsorción.

La adsorción de los compuestos coloreados en el equilibrio ( $q_e$ ) se calculó mediante la Ecuación (19).

$$q_e = (A_0 - A_e) \times V/m \quad \text{Ecuación (19)}$$

donde  $A_0$  y  $A_e$  son los valores de absorbancia inicial y de equilibrio,  $V$  es el volumen del extracto ( $m^3$ ),  $m$  es el peso del carbón activado en polvo (kg).

La determinación de los valores de las constantes de los modelos matemáticos se realizó empleando la técnica de regresión lineal de múltiples variables, para lo cual se empleó el software *Statgraphics® Centurion XV.15.2.06* (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA).

La expresión matemática de los modelos estudiados (isotermas de Langmuir, Freundlich y Temkin) se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 9: Expresión matemática de los modelos de isotermas de adsorción**

Isoterma	Forma lineal	Gráfico	Parámetros del modelo
Langmuir	$\frac{A_e}{q_e} = \frac{1}{bQ^0} + \frac{A_e}{Q^0}$ Ecuación (20)	$\frac{A_e}{q_e}$ vs $A_e$	$A_e$ : Adsorbancia de equilibrio $b$ : Constante de Langmuir $q_e$ : Cantidad de adsorbato en el adsorbente en el equilibrio $Q^0$ : Adsorción máxima
Freundlich	$\ln q_e = \ln k_f + \frac{1}{n} \ln A_e$ Ecuación (21)	$\ln q_e$ vs $\ln A_e$	$A_e$ : Adsorbancia de equilibrio $k_f$ : Constante de Freundlich $n$ : Intensidad de adsorción $q_e$ : Cantidad de adsorbato en el adsorbente en el equilibrio
Temkin	$q_e = n_T \ln K_T + n_T \ln A_e$ Ecuación (22)	$q_e$ vs $\ln A_e$	$A_e$ : Adsorbancia de equilibrio $K_T$ : Constante de Temkin $n_T$ : Constante de Temkin $q_e$ : Cantidad de adsorbato en el adsorbente en el equilibrio

FUENTE: Arslanoğlu *et al.* (2005)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE YACÓN

Las raíces de yacón fueron seleccionadas, lavadas, cortadas en rodajas de cinco milímetros de espesor, sometidas a un blanqueado en agua a ebullición por seis minutos y secadas a una temperatura de 65 °C hasta alcanzar un contenido de humedad constante (3,5 por ciento); luego fueron molidas y finalmente la harina obtenida fue tamizada. En el Cuadro 10 se presentan las características de la harina de yacón destinada al estudio de optimización de la extracción de FOS.

**Cuadro 10: Características de la harina de yacón (\*)**

Componente	Contenido
Azúcares reductores (% b.s.)	33,14 ± 0,03
FOS (% b.s.)	37,90 ± 0,51
Sacarosa (% b.s.)	7,11 ± 0,25
Proteína (% b.s.)	6,54 ± 0,16
Humedad (%)	3,55 ± 0,11
Compuestos fenólicos (mg AGE/g harina b.s.)	3,39 ± 0,89

(\*) Promedio de tres repeticiones ± DS

Itaya *et al.* (2002) hace referencia que la raíz de yacón acumula grandes cantidades de fructanos y otros hidratos de carbono solubles, tales como fructosa, glucosa y sacarosa. La concentración de tales hidratos de carbono y la longitud de la cadena de los fructanos puede variar durante el crecimiento de la planta y después de la cosecha. La harina procesada contiene principalmente FOS (37,90 por ciento b.s.) y azúcares reductores (33,14 por ciento b.s.) y sacarosa (7,11 por ciento b.s.). Los resultados obtenidos se encuentran alrededor de los valores citados en las investigaciones realizadas por Juárez (2015), quien reportó valores de 49,2 por ciento de FOS y 24,7 por ciento de AR para la harina de yacón obtenida bajo las mismas condiciones que la presente investigación, y Mejía (2015), quien obtuvo 38,8 por

ciento de FOS, 30,3 por ciento de AR y 8,8 por ciento de sacarosa para la harina obtenida a partir de raíces enteras, las cuales se sometieron a ebullición durante 15 minutos para inactivar enzimas y luego secadas a 70 °C para ser finalmente molidas (todos los valores reportados en b.s.).

El contenido de proteína fue de 6,54 por ciento, tal como se muestra en el Cuadro 10, siendo muy cercano a lo reportado en otras investigaciones. Moscatto *et al.* (2004) y Coronado (2013) reportan una concentración de proteína de 8,32 y 5,52 por ciento en harina de yacón, respectivamente. Rein (2007) en su estudio de la extracción de azúcar de caña, menciona la importancia de la evaluación del contenido de proteínas ya que, aún en concentraciones muy bajas, pueden reaccionar con los azúcares reductores presentes en el jugo (reacción de Maillard) y, como consecuencia, producir el oscurecimiento del extracto. Por esta razón, la presencia de proteínas y azúcares reductores y su probable paso al extracto debe considerarse para las etapas siguientes de clarificación y decoloración.

El contenido de humedad fue de 3,55 por ciento, siendo cercanos a los reportados por Moscatto *et al.* (2004), Coronado (2013) y Mejía (2015), con valores de 3,37, 2,58 y 2,90 por ciento de humedad en harina de yacón, respectivamente.

El contenido de compuestos fenólicos en la harina fue de 3,39 mg AGE/g de harina b.s. Valentová *et al.* (2006) indican que, entre los principales antioxidantes en el yacón, se encuentran el ácido clorogénico, ferúlico, gálico, gentísico y cafeico. Estos compuestos son los principales sustratos de reacciones de oscurecimiento frente a la acción de las enzimas polifenoloxidasas y peroxidasas, los cuales se pueden producir en etapas posteriores a la extracción, por lo que se consideró importante su determinación.

El resultado del análisis de granulometría se muestra en el Cuadro 11. El tamaño de la partícula es un factor importante que determina la velocidad en el proceso de transferencia de masa; esta se encontró en el rango de 75 y 600  $\mu\text{m}$ , siendo 600  $\mu\text{m}$  el tamaño de partícula con mayor porcentaje (33,4 por ciento).

**Cuadro 11: Resultado del análisis de granulometría**

N° de malla	Luz de malla (µm)	% Retenido	% Retenido acumulado
30	600	33,04	33,04
40	425	20,59	53,63
50	300	17,25	70,88
60	250	5,91	76,79
70	212	6,31	83,10
100	150	12,27	95,37
200	75	4,33	99,70
	<75	0,30	100

#### 4.2. EXTRACCIÓN DE FOS

El método tradicional para extraer componentes intracelulares de tejidos de plantas está basado en una extracción sólido-líquido. Normalmente la cantidad de componentes que se transfieren al solvente líquido depende del grado de desintegración de las células del tejido. La membrana celular es un obstáculo importante para la extracción de componentes intracelulares (Chalermchat *et al.*, 2004). Debido a esto la desintegración mecánica y el calentamiento es usualmente un pre-tratamiento para destruir la membrana celular y facilitar la salida del soluto durante la extracción (Aguilera y Stanley, 1999; Sastry y Barach, 1999). Al mismo tiempo, la total ruptura de la membrana celular puede provocar el paso de sustancias no deseables siendo necesario procesos de purificación posterior (López *et al.*, 2009).

La agitación en el proceso de extracción facilita la transferencia por dos razones, incrementa la difusión y remueve la solución concentrada que prevalece en la superficie de la matriz para proporcionar un mayor gradiente y aumentar el rendimiento de la extracción (Azmir *et al.*, 2013). Otro factor a considerar para la eficiencia de la extracción es la elección del solvente (Cowan, 1999). La polaridad del componente elegido es el factor más importante para la elección del solvente. Al ser el agua un solvente polar tiene afinidad con componentes de esta misma naturaleza, los FOS con grupos OH en sus moléculas son de naturaleza muy hidrofílica. Asimismo el agua puede tener afinidad con otros componentes como polifenoles, sales inorgánicas, azúcares y otros compuestos hidrofílicos. Azmir *et al.* (2013) señala que



la afinidad molecular entre el soluto y el solvente, transferencia de masa, seguridad ambiental, toxicidad al ser humano y consideraciones económicas deben ser tomadas en cuenta en la selección del solvente. En consecuencia, el agua fue elegida como solvente de extracción.

#### 4.2.1. SCREENING O CRIBADO

Las corridas experimentales dadas por el diseño fueron ocho y los valores de rendimiento de extracción de FOS se muestran en el Cuadro 12.

El análisis de varianza (ANEXO 9) y su representación en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 16) indican que solo el factor relación MP:S tiene efecto significativo en el rendimiento de extracción de FOS ( $p < 0,05$ ). La temperatura y el tiempo de extracción no fueron significativos ( $p > 0,05$ ).

Asimismo, en la Figura 16, se puede observar que la barra de la relación materia prima:solvente (MP:S) se extiende más allá de la línea vertical que representa el límite de significancia estadística para los efectos (cinco por ciento), mas no así la temperatura y tiempo de extracción, al igual que las interacciones entre ellos (temperatura-relación MP:S, temperatura-tiempo, tiempo-relación MP:S).

Numerosas investigaciones que estudian la extracción de prebióticos demuestran que la temperatura es un factor determinante, a diferencia del resultado del presente estudio, que lo señala como un factor no significativo. Pasephol *et al.* (2007) recomiendan la extracción con agua en ebullición por 10 – 15 minutos para alcachofa de la variedad Jerusalem. Toneli *et al.* (2008), para raíces secas de chicoria, determinaron la difusión en agua caliente a una temperatura promedio de 80 °C por una hora con agitación continua. Para alcachofa variedad Globe, Ronkart *et al.* (2007) recomiendan agua a 80 °C, a pH 6,8.

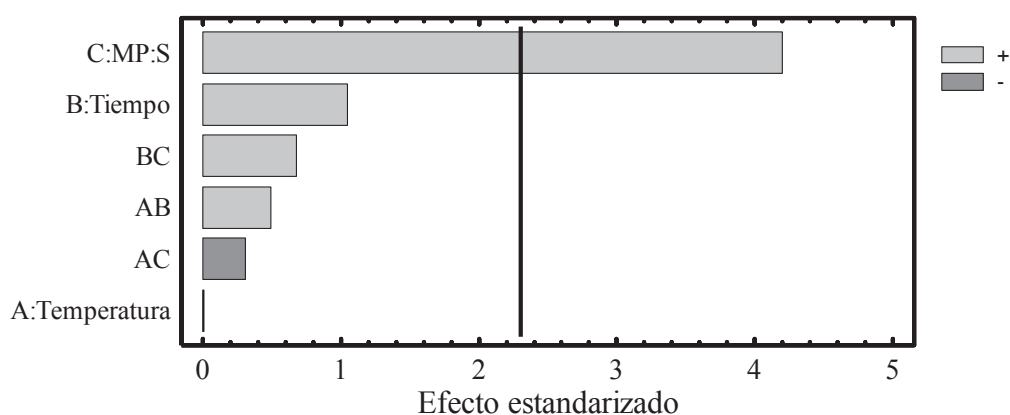
La diferencia puede deberse a que, en el caso del yacón, los prebióticos son de bajo peso molecular (FOS), mientras que en la alcachofa y achicoria se tiene oligofruktosas de alto peso molecular (inulina), cuya solubilidad sí se incrementa marcadamente con la temperatura, siendo casi insoluble a 25 °C y alcanzando alrededor de 35 por ciento (peso/volumen) a 90 °C (Dobre *et al.*, 2008). Adicionalmente, Apolinário *et al.* (2014)

mencionan que los fructooligosacáridos, dadas sus cadenas más cortas comparadas con la inulina, son altamente solubles en agua.

**Cuadro 12: Arreglo del diseño factorial  $2^k$  y respuesta experimental en la etapa del *screening* en el proceso de extracción de fructooligosacáridos**

Corrida	Factores (Variable independiente)			Variable respuesta
	$X_1(x_1)$	$X_2(x_2)$	$X_3(x_3)$	$\bar{Y}_1$
1	30 (-1)	5 (-1)	1:70 (1)	97,86 ± 1,68
2	90 (1)	40 (1)	1:10 (-1)	91,15 ± 2,94
3	90 (1)	5 (-1)	1:70 (1)	95,51 ± 2,47
4	90 (1)	40 (1)	1:70 (1)	100,47 ± 2,02
5	30 (-1)	40 (1)	1:70 (1)	99,33 ± 1,73
6	90 (1)	5 (-1)	1:10 (-1)	90,37 ± 5,04
7	30 (-1)	40 (1)	1:10 (-1)	90,50 ± 7,20
8	30 (-1)	5 (-1)	1:10 (-1)	89,89 ± 2,66

(\*) Promedio de tres repeticiones ± DS



**Figura 16: Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño factorial  $2^k$**

Pardo-Rueda *et al.* (2014) señalan que los procesos de extracción con agua caliente son empleados porque la elevada temperatura incrementa la solubilidad de los componentes, especialmente en aquellas moléculas complejas, de modo que favorece la transferencia de

masa durante la extracción. Tan *et al.* (2011) atribuyen este efecto a que el calor favorece la permeabilidad de la pared celular y decrece la viscosidad del solvente, lo que facilita su paso a través de la matriz sólida. Otros investigadores indican el efecto positivo en el coeficiente de difusión de acuerdo a los principios de transferencia de masa. No obstante, en el caso de ciertos componentes bioactivos, como los fructooligosacáridos, niveles de temperatura muy altos puede ser un factor que genere degradación.

Desde otro punto de vista, cierto nivel de temperatura podría tener un efecto negativo, Kim *et al.* (2003) mencionan que además de haber un incremento de la efectividad de la extracción de oligosacáridos con el aumento de la temperatura; temperaturas altas podrían causar la desnaturalización de proteínas solubles que luego reaccionan con los azúcares solubles, dificultando la extracción.

En cuanto al tiempo, es probable que las condiciones de operación (tamaño reducido de las partículas, nivel de agitación y solvente empleado) estén favoreciendo el proceso a través de una resistencia externa despreciable, llegando al equilibrio con el rendimiento máximo de extracción en un tiempo muy corto (menos de 10 minutos), añadido a las características granulométricas que determinan la distancia corta que el solvente recorre para acceder al interior de la matriz sólida durante la transferencia de masa.

Qu *et al.* (2010) señalan que las relaciones MP:S más altas generan un mayor gradiente de concentración durante la difusión del material interno a la solución y un incremento de la eficiencia de la extracción. Sin embargo, si la relación solvente/sólido es mayor del óptimo, el exceso no tiene un efecto significativo en el rendimiento de extracción de equilibrio, resultando en el empleo de solvente adicional innecesario.

Por lo tanto, en esta etapa se pudo identificar que la única variable que afecta significativamente el proceso de extracción de FOS a partir de la harina de yacón es la relación MP:S. Teniendo en cuenta criterios de ahorro de energía y tiempo de operación, se eligió 30 °C y cinco minutos como factores constantes para la optimización posterior.

#### 4.2.2. EFECTO DE LA RELACIÓN MATERIA PRIMA:SOLVENTE EN LA EXTRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Dado que se identificó la relación materia prima:solvente (MP:S) como el único factor significativo en la variable respuesta, se procedió al estudio del efecto de este en el rendimiento de extracción de FOS a fin de determinar el nivel que asegura la máxima recuperación. La cantidad de FOS extraído a partir de la harina de yacón con las diferentes relaciones MP:S, manteniendo constante la temperatura y el tiempo (30 °C y cinco minutos), se muestran en el Cuadro 13.

**Cuadro 13: Contenido de fructooligosacáridos en extractos obtenidos a diferentes relaciones MP:S manteniendo constante la temperatura y el tiempo (30 °C por 5 min) (\*)**

Relación MP:S (g/mL)	FOS (% b.s.)
1:10	34,46 ± 0,99 a
1:20	36,64 ± 0,49 c
1:30	37,60 ± 0,50 c
1:40	36,40 ± 0,90 c
1:50	37,77 ± 0,86 c
1:70	37,14 ± 1,08 c
1:90	34,97 ± 0,23 b
1:100	32,08 ± 0,24 a

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS; letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico ANVA (ANEXO 10) indica que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las medias de los resultados obtenidos. La prueba de comparación de medias de Duncan (ANEXO 11), indica que a partir de la relación 1:20 no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con niveles superiores.

Algunas investigaciones que estudian el efecto de este factor en los procesos de extracción señalan la relación directa entre la cantidad recuperada de compuestos bioactivos y la cantidad

de solvente. No obstante, es importante considerar que una mayor relación MP:S puede implicar un mayor consumo de solvente en la extracción y de energía en una etapa posterior de concentración si estuviese previsto. Teniendo en cuenta esta consideración y contemplando que, a relación MP:S de 1:20 (g/mL), se observaron problemas de recuperación del extracto del residuo sólido durante la filtración, es que se seleccionó una relación de 1:30 (p/v) para maximizar la recuperación de FOS.

Bajo la relación MP:S de 1:30 se obtiene 37,60 por ciento de FOS en b.s., lo que representa un rendimiento de extracción de 99,23 por ciento sobre el total de FOS presentes en la harina de yacón.

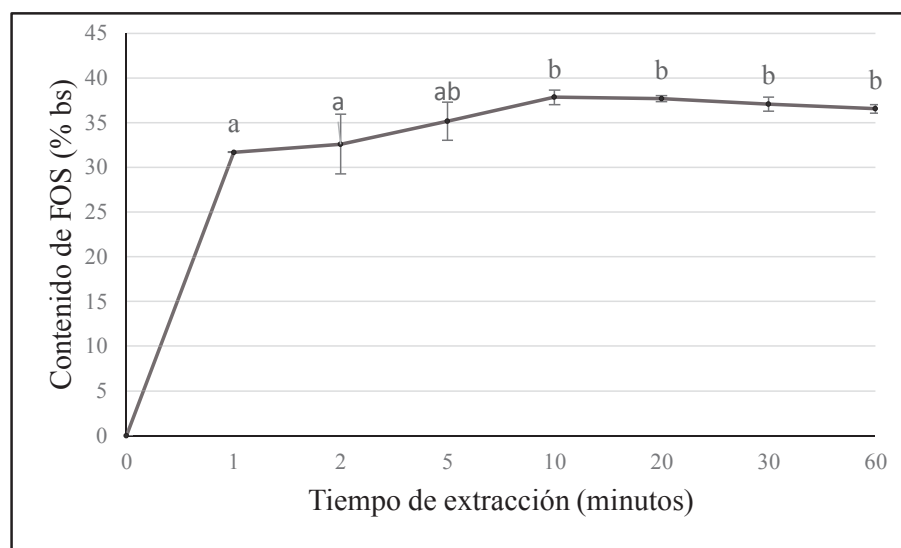
Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos corresponden a un extracto obtenido a partir de harina cuyo tamaño de partículas se encuentran entre 75 y 600  $\mu\text{m}$ , siendo 600  $\mu\text{m}$  el tamaño de partícula con mayor porcentaje (33,4 por ciento) y no es posible afirmar que, con un tamaño de partícula diferente, se puedan conseguir los mismos resultados.

#### **4.2.3. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

En la Figura 17 se muestra el contenido de FOS en extractos obtenidos a diferentes tiempos bajo los parámetros seleccionados en las etapas previas (temperatura: 30 °C, relación MP:S: 1:30 g/mL). El análisis estadístico ANVA (ANEXO 12) indica que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las medias de los resultados y, la prueba de comparación de medias de Duncan (ANEXO 13), permite concluir que a partir de 10 minutos de extracción no existen diferencias significativas.

En la Figura 17 se aprecia la tendencia típica de este tipo de operación: el contenido de FOS se incrementa rápidamente y luego alcanza un periodo estable. Este rápido incremento ocurre dentro de los primeros cinco minutos. Sin embargo, la máxima extracción de FOS se asegura a los 10 minutos. Esta tendencia es explicada por Chan *et al.* (2014), quienes señalan que la curva de extracción con solvente está compuesta típicamente de una etapa de extracción rápida (etapa de lavado) y una etapa de difusión. El mecanismo de extracción empieza cuando las moléculas del solvente penetran en la matriz vegetal, causando que la capa del

citoplasma sea expuesta directamente al solvente (Crossley y Aguilera, 2001), facilitando la disolución de los compuestos activos en este.



**Figura 17: Contenido de fructooligosacáridos en extractos obtenidos a diferentes tiempos manteniendo constante la relación MP:S y temperatura (1:30 g/mL y 30 °C)**

Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

Posteriormente los compuestos activos se difunden desde el interior de la matriz vegetal y se disuelven. El rendimiento de extracción durante esta etapa es muy dependiente de las células que quedan intactas después de la etapa de lavado. Las características de las etapas de lavado y difusión pueden ser determinadas por la proporción de células quebradas o intactas después de la preparación de la muestra (por ejemplo, la molienda) que reduce las barreras de la transferencia de masa y mejora la extracción. El rendimiento de extracción durante la etapa de lavado puede mejorar cuanto más pequeñas sean las partículas (Qu *et al.*, 2010), pero es desfavorable cuando este pequeño tamaño de partícula genera la salida de componentes indeseables (Cissé *et al.*, 2012). Mientras más pequeño sea el tamaño de las partículas, se incrementa la difusividad y mejora los mecanismos de transferencia de masa. Esto es debido a la mayor área de contacto superficial con el solvente y a la menor distancia de difusión promedio de los compuestos activos del sólido al solvente (Cissé *et al.*, 2012; Herodez *et al.*, 2003; Hojnik *et al.*, 2008). Como resultado, se requieren cortos tiempos de extracción.

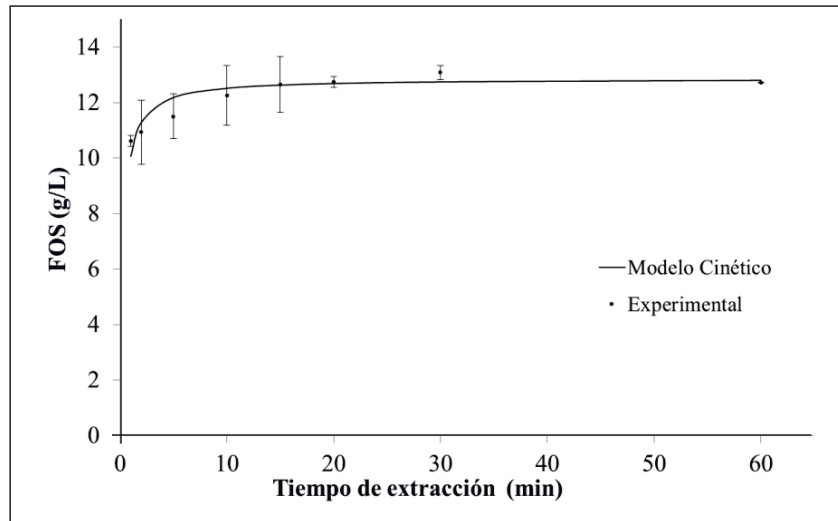
El Cuadro 14 muestra los parámetros estimados de los modelos de cinética aplicados al proceso de extracción; los valores de  $h$ ,  $C_e$  y  $K$  fueron obtenidos de la pendiente e intercepto al graficar  $t/Ct$  versus  $t$  (Ley de Fick modificado por Qu *et al.* (2010)). El valor  $h$  puede ser comparado con el obtenido en otros procesos de extracción en los cuales se aplica temperatura para obtener un mayor rendimiento, como los obtenidos en la extracción de compuestos antioxidantes de la granadilla cuando se aplica temperaturas por encima de 60 °C ( $h$  varía entre 35 - 100,7 g/L min) (Qu *et al.*, 2010). Con el modelo de Fick modificado por Chan *et al.* (2014) se halló  $b$  y  $k$ . Los altos coeficientes de determinación ( $R^2=0,98-0,99$ ) señalan que la extracción de FOS se ajusta adecuadamente a los dos modelos empleados.

**Cuadro 14: Parámetros de los modelos de cinética aplicados al proceso de a extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y 30 °C**

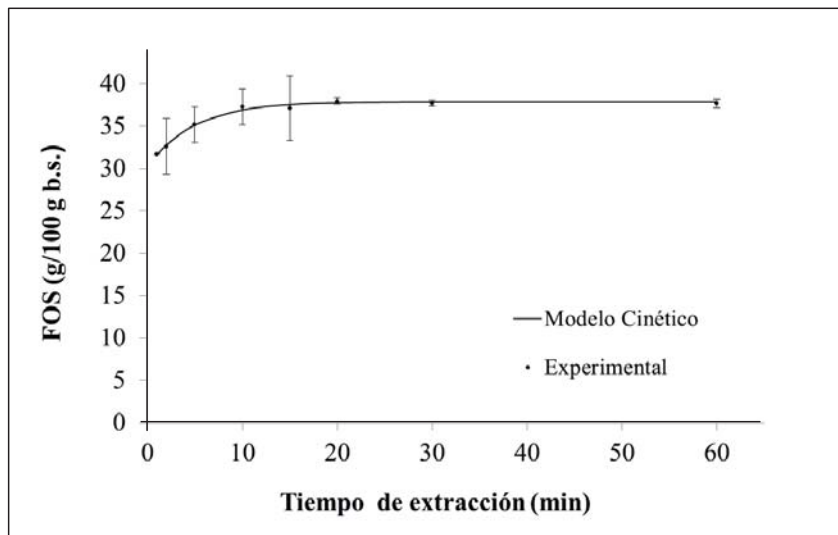
Componente	Parámetros estimados	Parámetros estimados	$R^2$	$R^2$
	(1)	(2)	(1)	(2)
FOS	$h=40,317$ (g/L min) $K=0,246$ (g/L min) $C_e:12,84$ (g/L)	$b=0,8128$ $k=0,2485$ min <sup>-1</sup>	0,99	0,98

(1) Ley de Fick modificado por Qu *et al.* (2010) (2) Ley de Fick modificado por Chan *et al.* (2014)

En las Figura 18 y Figura 19 se muestra las cinéticas de extracción de FOS, bajo los parámetros seleccionados en las etapas previas (temperatura: 30 °C, relación MP:S: 1:30 g/mL), ajustados a la Ley de Fick modificado por Qu *et al.* (2010) y Ley de Fick modificado por Chan *et al.* (2014) respectivamente y, se observa la tendencia típica de este tipo de operación, la cantidad extraída de FOS se incrementa rápidamente y luego alcanza un periodo constante de extracción. Este incremento rápido ocurre dentro de los primeros cinco minutos.



**Figura 18:** Cinética de extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y a 30 °C. Modelo Ley de Fick modificado por Qu *et al.* (2010)



**Figura 19:** Cinética de extracción de fructooligosacáridos a una relación MP:S 1:30 g/mL y a 30 °C. Modelo Ley de Fick modificado por Chan *et al.* (2014)



### **4.3. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO A PARTIR DE YACÓN**

En el Cuadro 15 se presentan las características del extracto concentrado; es de destacar su composición, principalmente de FOS (10,3 g/100 mL) y azúcares como: glucosa+fructosa (11,6 g/100 mL) y sacarosa (1,9 g/100 mL). Esta distribución está en correspondencia a la composición de las raíces sometidas a la extracción. Ohyama (1990) estima que alrededor del 90 por ciento del peso seco de la raíz tuberosa corresponde a carbohidratos, de los cuales una fracción estimada entre 50 a 70 por ciento corresponde a FOS y el porcentaje restante, a azúcares como: sacarosa, fructosa y glucosa, cuyos contenidos son variables dependiendo de los tratamientos en pre y pos cosecha. La variabilidad del contenido de FOS ha sido relacionada a la actividad de enzimas involucradas con la síntesis e hidrólisis de FOS tales como sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT) y 1-fructanexohidrolasa (1-FEH) (Campos *et al.*, 2012). Diferentes estudios han demostrado que, poco después de la cosecha, puede ocurrir una hidrólisis enzimática rápida de los FOS en azúcares simples: glucosa, fructosa y sacarosa (Graefe *et al.*, 2004), siendo la conversión más lenta durante almacenamiento de las raíces bajo refrigeración (Manrique y Párraga, 2005), por lo que estos tratamientos determinarían la composición final del extracto.

Asimismo, se reporta la presencia de otros componentes cuya importancia está relacionada a la función que cumplen en las reacciones de formación de color y turbidez durante las etapas de secado, extracción y concentración y en la propia clarificación y decoloración.

El extracto contiene 1,72 mg AGE/mL de compuestos fenólicos, la importancia de su presencia radica en su participación en reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático. Las raíces de yacón se oscurecen rápidamente durante el procesamiento y/o almacenamiento y esto está relacionado con su índice fenólico, especialmente con el contenido de ácido clorogénico y ácido cafeico y a la actividad de enzimas como polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) (Yan *et al.*, 1999; Lachman *et al.*, 2003).

La temperatura a la que se vean sometidas las raíces en operaciones de procesamiento que además signifiquen la ruptura de la estructura celular que ponga en contacto sustrato y enzima, estimula la actividad de PPO y POD y la oxidación enzimática de compuestos

fenólicos a quinonas, resultando en pigmentos marrones o negros después de la polimerización (Valentová y Ulrichová, 2003). Si bien es cierto que las raíces previas al secado han pasado por un proceso de inactivación, se menciona que existe una actividad residual a las que se le puede atribuir, aunque limitada por el nivel bajo, alguna contribución al color oscuro del extracto desarrollado durante la etapa de extracción y concentración.

**Cuadro 15: Características del extracto concentrado a partir de harina de yacón(\*)**

Componente	Contenido
Azúcares reductores (g/100 mL)	11,61 ± 0,13
Glucosa (g/100 mL)	3,63 ± 0,15
Fructosa (g/100 mL)	8,08 ± 0,08
Sacarosa (g/100 mL)	1,98 ± 0,07
FOS (g/100 mL)	10,35 ± 0,18
Compuestos fenólicos (mg AGE/mL)	1,72 ± 0,02
Proteína (g BSA/100 mL)	0,048 ± 0,0005
L	26,38 ± 0,16
Color a*	-3,37 ± 0,17
b*	3,84 ± 0,45
Sólidos Solubles (°Brix)	20
pH	5,47 ± 0,07
Turbidez (NTU)	2454,17 ± 38,54
Ca (ppm)	1278,75 ± 46,25
Fostatos (ppm)	298 ± 3,6

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS

Los compuestos fenólicos son conocidos por ser precursores de color en jarabes de azúcar de caña que conducen a la formación de compuestos coloreados con hierro y cobre y oxidación a polímeros coloreados de alto peso molecular. Estos están relacionados a la tendencia del azúcar a oscurecerse en el almacenamiento y no se eliminan durante la clarificación (Nguyen y Doherty, 2011).

Se ha reportado la participación del ácido clorogénico en la formación de complejos con el hierro, reacción responsable de la aparición de coloraciones oscuras después de procesos de

cocción en papa (Calder *et al.*, 2011), la que podría plantearse como hipótesis, dado que las raíces de yacón contienen hierro en una concentración de 0,2 mg/100 g (Lachman *et al.*, 2003) y 1,8-7,5 mg/100 g de ácido clorogénico (Campos *et al.*, 2012), ambos referidos a peso fresco.

El hierro está implicado en la formación de color en jugo de caña, presumiblemente por formación de complejos coloreados y productos de oxidación (quinonas y polímeros) con compuestos fenólicos intrínsecos. En el caso de azúcar de caña, clorofilas, xantofilas, polifenoles y flavanoides acompañan al extracto después de la molienda. Estos compuestos forman complejos metálicos de transición, particularmente con hierro, los cuales son altamente coloreados (Zerban, 1921).

El contenido de proteínas fue de 0,05 g BSA/100 mL. Este componente está relacionado con los valores de turbidez a través de las interacciones entre proteínas y polifenoles, con la consecuente formación de estructuras insolubles (Siebert *et al.*, 1996; Siebert, 2006), además de su participación en reacciones de tipo no enzimático (reacción de Maillard) que da lugar a la formación de productos coloreados (Carabasa *et al.*, 1998; Toribio y Lozano, 1984; Martins *et al.*, 2001).

Estas reacciones serían las responsables de los valores de turbidez (2454,17 NTU) y color ( $L = 26,38$ ,  $a^* = -3,37$  y  $b^* = 3,84$ ). La presencia de color y turbidez es típico en el proceso de extracción de azúcar de caña. Estas características pueden ser generadas por reacciones durante el procesamiento a causa de interacciones de los compuestos de la caña; las más comunes son las que ocurren entre fenoles y sustancias nitrogenadas y/o la de los fenoles y el hierro, componentes que acompañan al jugo y una parte de ellos se transforma en complejos coloreados durante el proceso completo (Paton, 1992). De forma general, la clarificación del jugo pretende proporcionar condiciones de temperatura, pH y concentración iónica adecuadas para maximizar la precipitación de las impurezas solubles, insolubles o coloidales, además de producir un jugo claro de alta calidad (valores mínimos turbidez).

Pinelo *et al.* (2010) mencionan que la percepción visual de la turbidez en zumos de frutas es el resultado de la dispersión de la luz causada por sustancias en suspensión. La estructura celular del yacón consiste principalmente de celulosa, hemicelulosa y una pequeña parte de pectina, que está unida covalentemente a las primeras, lo que explicaría su baja solubilidad

(Castro *et al.*, 2013) y su presencia como coloides en suspensión en el extracto, contribuyendo a su turbidez inicial.

Otro componente importante, por la participación en el proceso de clarificación, es el contenido de fosfatos, el cual fue de 298 ppm. Se debe conocer la cantidad de fosfato que contiene el jugo naturalmente, dado que esta cuantificación es importante al ser el fosfato el que favorece la formación de flóculos con el posterior agregado de calcio, formando fosfato tricálcico. Al respecto, Chen (1991) indica que es importante que el contenido de fosfatos sea mantenido a un mínimo de 300 ppm. Esto con el fin de que se formen fácilmente los fosfatos tricálcicos y se produzca una floculación más eficiente.

El contenido de calcio en el extracto concentrado inicial fue de 1278,75 ppm. Chen (1991) menciona que el calcio es necesario en la formación de puentes de calcio-fosfato que ayudan en el proceso de floculación en el jugo de caña de azúcar. A pesar de que la caña de azúcar y el extracto proveniente de la harina de yacón tienen sus diferencias, estas consideraciones podrían ser trasladadas a esta investigación.

#### **4.4. CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN DEL EXTRACTO PROVENIENTE DE HARINA DE YACÓN**

Para la identificación de las etapas a incluir dentro de un flujo de partida se realizó una revisión y análisis de los procesos empleados en la clarificación y decoloración de azúcar de caña (Doherty y Edye, 1999; Laksameethanasan *et al.*, 2012; Prati y Moretti 2010), remolacha, jarabes de glucosa y jugo de sorgo dulce (Andrzejewski *et al.*, 2013), así como pruebas preliminares.

La clarificación de jugo de caña de azúcar se produce por coagulación, floculación y precipitación de los coloides y sustancias pigmentadas, que más adelante se eliminan por decantación y filtración, es decir, se forma un precipitado insoluble que absorbe y arrastra estos compuestos del jugo (Marín, 2012).

Para que se produzca la coagulación, son necesarias condiciones alcalinas propias del medio o por la presencia de agentes alcalinizantes, tales como óxido de calcio (cal viva), hidróxido de calcio (cal apagada), hidróxido de sodio, o carbonato de sodio. Cuando se añade al jugo,

tales reactivos modifican el pH y, junto con el efecto de la temperatura, forman precipitados que eliminan impurezas (Koblitz, 1998; Koblitz y Moretti, 1999; Stupiello, 1987 citados por Prati y Moretti, 2010).

También se añaden floculantes para aumentar la eficiencia y el rendimiento de este proceso. Estos productos añadidos al jugo pueden contribuir significativamente a la eliminación de impurezas, ya que su principal objetivo es hacer que los flóculos sean más densos y puedan decantar fácilmente. Estas sustancias incluyen arcilla, sílice activado, ácido fosfórico, bentonita, polielectrolitos y óxido de magnesio (Prati y Moretti, 2010).

Del mismo modo, en el caso del extracto de raíz de chicoria, una fuente industrial de inulina, también se efectúa una clarificación del extracto crudo por encalado y carbonatación a alto pH y altas temperaturas como paso previo a la concentración y precipitación para la eliminación de pectina, proteínas y sólidos suspendidos (Luo *et al.*, 2013).

Estas prácticas en otras industrias permitieron realizar pruebas preliminares para plantear un flujo de operaciones base e identificar las etapas críticas. En el acápite 3.5.6 se muestra el flujo planteado y básicamente se distinguieron dos etapas críticas: la clarificación por encalado y la decoloración por carbón activado.

Los coloides presentes en el jugo de la caña puede ser liofílicos (coloide que tiene fuerte afinidad por el líquido en el que se dispersa) y liofóbicos (coloide que carece de afinidad por el líquido en el que se dispersa) cuya presencia en el jugo de la caña es desfavorable, ya que pueden evitar la coalescencia de las partículas en suspensión durante la clarificación. Los compuestos liofílicos son principalmente componentes orgánicos, que pueden ser pentosanos, pectinas y proteínas y se caracterizan por su fuerte afinidad por el líquido. Los coloides liofóbicos, por otro lado, son menos hidratados y representan una dispersión más estable que tiene poco efecto sobre la viscosidad del líquido. Los principales coloides liofóbicos presentes en el jugo de la caña son grasas y ceras, las partículas del suelo y otros materiales extraños derivados de operaciones de molienda. Las partículas coloidales en el jugo de la caña de azúcar normalmente llevan una carga negativa. Estas cargas estabilizan el sistema coloidal y evitan la sedimentación rápida al hacer que las partículas se repelen entre sí (Chen, 1991).

Con el proceso de clarificación se pretende formar flóculos que se encarguen de atrapar todo el material suspendido, el cual debe sedimentar rápidamente, produciendo un volumen mínimo de lodos y un jugo claro de alta calidad (valores bajos de turbidez y contenido de iones de calcio disueltos, que tenga un pH adecuado que logre disminuir la inversión de la sacarosa en los procesos siguientes de extracción). Todo lo anterior con el objeto de reducir costos de producción de fábrica y tiempo de residencia en los clarificadores (Marín, 2012).

El método más antiguo de clarificación de jugo, y de hecho uno de los más eficientes empleados a nivel mundial, involucra de manera general cal (óxido de calcio) y calor y es conocido como proceso simple de defecación. El proceso de defecación ha tenido modificaciones a lo largo de la historia con el propósito de mejorar la clarificación y darle un tratamiento especial a los jugos difíciles de tratar que produzcan ciertas variedades de caña, conservando siempre su principio base (Marín, 2012).

La acción de la cal y el calor forman en conjunto lo que se conoce como coagulación de las impurezas. Se ha estudiado que el material en suspensión del jugo diluido transporta cargas electronegativas que, por diferentes tipos de fuerzas (Van der Waals, London, Movimientos Brownianos), impiden la aglomeración de las impurezas y por tanto su eliminación. La cal en el jugo tiene la función de neutralizar y formar sales de calcio insolubles. Las materias coloidales tales como pectinas, hemicelulosas, proteínas y compuestos coloreados son adsorbidos por los iones precipitados y algunos coloides flocculan por el calor; con esto se eliminan impurezas y desciende la turbidez (Marín, 2012).

La función de la coagulación es contrarrestar el efecto repulsivo entre partículas en suspensión con la misma carga mediante su neutralización, facilitando la colisión y formación de macromoléculas (coágulos), obteniendo como resultado la precipitación primaria de las impurezas (Giraldo, 2005; Ochoa, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009).

Aunque con la acción conjunta de la cal y el calor se forma un precipitado denso de composición compleja, que arrastra consigo la mayor parte del material en suspensión del jugo y promueve la clarificación, si se desea incrementar de manera relevante la eficiencia y la velocidad de la clarificación de jugo, se requiere de un proceso alterno denominado floculación que involucra la aplicación de polielectrolitos como agentes floculantes (Prati y Moretti, 2010).

Otra práctica en los procesos de purificación de extractos de caña de azúcar es la adición de ácido fosfórico (fosfatación) al zumo para ayudar en la clarificación. El ácido precipita parte de los coloides y materia colorante en el jugo mientras que la cal precipita principalmente fosfato tricálcico, que es difícil de filtrar. El método de la fosfatación normalmente da como resultado el uso de más cal debido a la caída en el pH. La cantidad de ácido fosfórico añadido depende del contenido de fosfato del jugo y esto varía normalmente entre 50 – 200 ppm como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Hugot, 1972).

Otra etapa importante en los tratamientos de extractos azucarados es la decoloración y es la adsorción principalmente la operación en la que se basan las técnicas empleadas para este fin. La adsorción se utiliza comúnmente para purificar fluidos contaminados, los típicos adsorbentes estudiados para la extracción de polifenoles y el color marrón de los zumos de fruta incluyen carbón activado, gelatina, bentonita, caseína, ceras de intercambio iónico y polivinilpirrolidona (Giovanelli y Ravasini, 1993).

Los carbones activados son ampliamente utilizados como adsorbentes en los procesos de descontaminación debido a su elevada área superficial, alta capacidad de adsorción, estructura microporosa y reactividad superficial especial (Ania *et al.*, 2002). El carbón activado se ha usado ampliamente para eliminar contaminantes orgánicos incluyendo fenoles, debido a la existencia de grupos funcionales tales como carboxilos, lactonas, aldehídos, cetonas, quinonas, hidroquinonas, anhídrido y estructuras etéreos (Jung *et al.*, 2001).

La capacidad de adsorción de un carbón activado en solución depende de diferentes factores, entre ellos se tiene la estructura de los poros, la química superficial y el contenido de materia mineral del carbón. Otros factores importantes son las condiciones de las soluciones tales como: el pH, la temperatura, la concentración del adsorbato y la presencia de otros posibles adsorbatos, además de la fuerza iónica (Villacañas *et al.*, 2006; Moreno-Castillo *et al.*, 1995).

#### **4.4.1. SCREENING O CRIBADO**

El total de corridas experimentales se presentan en el Cuadro 16. Se evaluó el efecto de los factores: pH en la clarificación (X<sub>1</sub>), temperatura (X<sub>2</sub>) y porcentaje de CAP (X<sub>3</sub>), sobre las

variables respuestas: porcentaje de remoción de turbidez ( $Y_1$ , %) y  $\Delta E$  respecto al extracto inicial ( $Y_2$ ).

**Cuadro 16: Arreglo del diseño factorial  $2^k$  y respuestas experimentales en la etapa de *screening* (\*)**

Corrida	Factores (Variable independiente)			Variable respuesta	
	$X_1$ ( $x_1$ )	$X_2$ ( $x_2$ )	$X_3$ ( $x_3$ )	$\bar{Y}_1$	$\bar{Y}_2$
1	5,5 (-1)	60 (1)	1,5 (1)	94,10 ± 0,09	20,94 ± 0,00
2	5,5 (-1)	60 (1)	0,05 (-1)	91,88 ± 0,13	13,06 ± 0,36
3	5,5 (-1)	20 (-1)	1,5 (1)	92,92 ± 0,03	20,21 ± 0,39
4	11 (1)	20 (-1)	1,5 (1)	99,65 ± 0,01	27,76 ± 0,14
5	11 (1)	60 (1)	1,5 (1)	99,38 ± 0,05	26,07 ± 0,10
6	11 (1)	20 (-1)	0,05 (-1)	99,67 ± 0,01	26,42 ± 0,55
7	11 (1)	60 (1)	0,05 (-1)	99,45 ± 0,05	25,31 ± 0,23
8	5,5 (-1)	20 (-1)	0,05 (-1)	92,79 ± 0,16	9,93 ± 0,41

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS

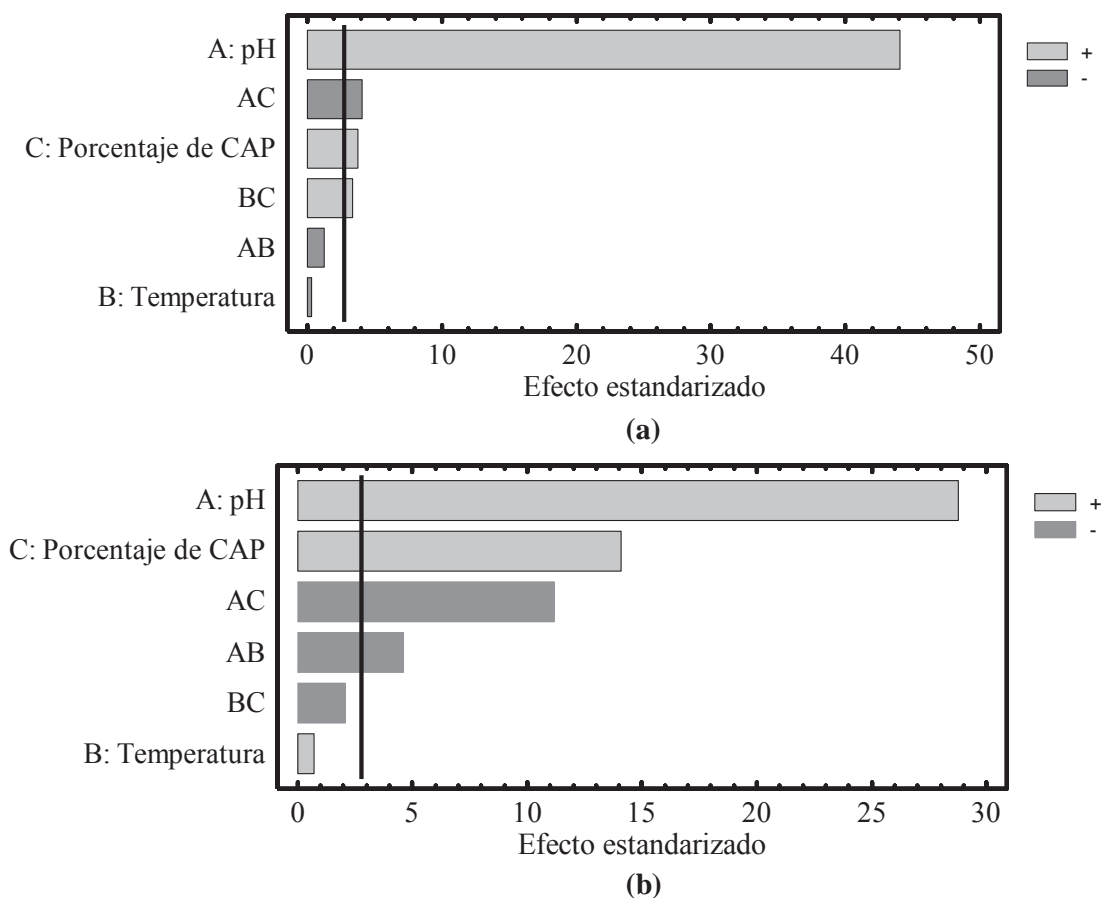
Los análisis de varianza para las dos variables respuestas: porcentaje de remoción de turbidez (ANEXO 14) y  $\Delta E$  (ANEXO 15) mostraron que, a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , a excepción de la temperatura, las variables pH y porcentaje de CAP influyeron significativamente sobre la  $\Delta E$  y porcentaje de remoción de turbidez en dichos procesos, puesto que presentan una  $p$ -valor menor que 0,05.

Lo expuesto anteriormente se aprecia en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 20 (a) y (b)) para cada variable respuesta. Se observa que, para el caso de la  $\Delta E$  y porcentaje de remoción de turbidez, las barras de pH y porcentaje de CAP se extienden más allá de la línea vertical que representa el límite de significancia estadística para los efectos (cinco por ciento), lo cual quiere decir que ejercen un efecto significativo sobre el proceso, lo que no se aprecia con la temperatura.

Respecto al efecto del pH en la clarificación, Honig (1969) hace referencia a que, si este es demasiado bajo, entonces no se conseguirá una completa precipitación de fosfatos ya que, como indican Doherty y Rackemann (2009), se debe añadir cal en el jugo a clarificar para



elevar el pH y formar sales insolubles al contacto con los fosfatos presentes en el jugo (en su mayoría fosfato de calcio). Estas partículas están involucrados en la formación de flóculos, los cuales, al atrapar las impurezas y ser eliminadas por medio de la precipitación, disminuyen la turbidez y, por lo tanto, son la clave en el proceso de clarificación.



**Figura 20: Diagrama de Pareto estandarizado del diseño factorial  $2^k$  (etapa *screening*): (a) Porcentaje de remoción de turbidez (b) Variación del color**

Courtin *et al.* (2009) mencionan que los oligosacáridos no digeribles, a temperaturas de 100 y 120 °C, presentan descomposición alcalina (pH 11), siendo los de cadena corta más sensibles que los de cadena larga debido a que tienen una mayor cantidad de extremos reductores. Es por ello que en esta investigación la clarificación se realizó a 40 °C. Además, Qi *et al.* (2004) afirman que la capacidad de adsorción del carbón activado decrece en rangos de pH básico (7 – 10), lo cual puede ser debido a la desprotonación de los grupos funcionales del carbón activado ácido y de las moléculas carboxiladas presentes en solución de ácidos fenólicos. Por esta razón, antes de la decoloración, se disminuyó el pH a 6,5 con ácido

fosfórico uno molar en aquellos tratamientos que se trabajaron a un pH mayor a siete durante la clarificación.

En cuanto a la temperatura de decoloración, algunas investigaciones mencionan un efecto positivo de este factor. Nasehi *et al.* (2012) mencionan que la eficiencia de adsorción se incrementa con el aumento de la temperatura debido a la reducción de la viscosidad, lo cual afecta la difusión del adsorbato hacia el adsorbente, siendo favorable para la transferencia externa y difusión dentro del adsorbente sólido. En posición contraria, otros investigadores indican que la capacidad de adsorción disminuye con el aumento de temperatura debido a la mayor movilidad de las moléculas y a la desorción de las que previamente se adsorbieron (Fischer y Hofsommer, 1992). Asimismo, en otra investigación al estudiar la adsorción de compuestos coloreados de jugos de frutas con diferentes tipos de carbón activado, se encontró que en algunos, la respuesta a la temperatura dependía del nivel de este factor. Para un tipo de carbón activado, se determinó un intervalo óptimo de temperatura de 20 a 40 °C, disminuyendo sustancialmente la eficiencia a 10 y 50 °C, ya que a estas últimas temperaturas podría haber dos efectos antagónicos, el efecto viscoso y el efecto de movilidad (Carabasa *et al.*, 1998). Es decir, a 10 °C prevalece el efecto viscoso, afectando la difusión del adsorbato hacia el adsorbente; en cambio, a 50 °C, el efecto de movilidad hace que aumente la probabilidad de que las moléculas adsorbidas se disocien de la superficie del adsorbente.

Respecto al efecto significativo del porcentaje de CAP, se puede entender que, al incrementar su concentración en el extracto, aumenta la superficie de adsorción, incrementando la adsorción de compuestos responsables del color y turbidez.

Es así que, en esta etapa se pudo identificar que el pH en la clarificación y el porcentaje de CAP, afectan significativamente los procesos de clarificación y decoloración del extracto a partir de harina de yacón y se continuó con la siguiente etapa para estimar los modelos de segundo orden de las respuestas y ubicar el punto óptimo.

#### **4.4.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE CLARIFICACIÓN Y DECOLORACIÓN**

Para la etapa de optimización, se consideró un Diseño Compuesto Central (DCC) de segundo orden que, según Box y Draper (1987), para  $k=2$  variables consta de cuatro puntos factoriales

( $2^k$ ), cuatro puntos axiales (estrella) en los ejes coordenados (a una distancia  $\alpha$ ) con ocho repeticiones en el punto central; es decir, un total de 16 puntos experimentales. Las pruebas se realizaron en forma aleatoria.

Se consideraron los dos factores significativos obtenidos en la etapa de *screening*: pH ( $X_1$ ) en la clarificación y porcentaje de CAP ( $X_3$ ) en la decoloración. La temperatura ( $X_2$ ) se mantuvo a temperatura ambiente, ya que en la etapa anterior, no se encontraron diferencias significativas en los resultados, optando por la menor temperatura y así evitar gastos de energía.

Los niveles de los factores, los valores experimentales ( $\bar{Y}$ ) y predichos ( $\hat{Y}$ ) para cada punto experimental se presentan en el Cuadro 17. El análisis de regresión múltiple realizado con los valores obtenidos generó las siguientes ecuaciones polinomiales de segundo grado:

$$\hat{Y}_1 = 99,499 - 2,555X_1 - 1,067X_3 + 0,219X_1^2 - 0,019X_1X_3 + 1,205X_3^2 \quad \text{Ecuación (23)}$$

$$\hat{Y}_2 = 5,605 + 0,295X_1 + 20,073X_3 + 0,114X_1^2 - 1,076X_1X_3 - 4,339X_3^2 \quad \text{Ecuación (24)}$$

donde  $\hat{Y}_1$  representa el porcentaje de remoción de turbidez estimado (%);  $\hat{Y}_2$ , la  $\Delta E$  estimada;  $X_1$ , el pH en la clarificación y  $X_3$ , el porcentaje de CAP en la decoloración (%), p/v), en su forma no codificada (valores reales).

En el Cuadro 18 se presenta el ANVA para el modelo cuadrático de la Ecuación (23) y en el Cuadro 19 el ANVA para la Ecuación (24). En estos se reportan los términos lineales, los términos cuadráticos y las interacciones. Los bajos  $p$ -valor para las interacciones y los términos cuadráticos (0,0) sugieren que hay curvatura en la superficie de respuesta, tal como se verá más adelante en los gráficos. Además, se puede observar que el pH en la clarificación y el porcentaje de CAP afectan significativamente el proceso, al tener un  $p$ -valor menor a 0,05. Con respecto al error puro, se aprecia que la suma de cuadrados es pequeña (2,18 y 7,10) en comparación con la suma de cuadrados total (311,15 y 939,64), presentando así una buena reproducibilidad en el punto central (Ayala y Pardo, 1995).

**Cuadro 17: Diseño compuesto central, respuesta experimental y predicho en la etapa de optimización (\*)**

Corrida	Factores (Variable Independiente)		Variables Respuesta			
	X <sub>1</sub> (x <sub>1</sub> )	X <sub>3</sub> (x <sub>3</sub> )	Ŷ <sub>1</sub>	Ŷ <sub>1</sub>	Ŷ <sub>2</sub>	Ŷ <sub>2</sub>
1	4,4 (-1,41)	0,76 (0)	92,24 ± 0,14	91,93	21,10 ± 0,25	19,21
2	5,5 (-1)	1,5 (1)	92,92 ± 0,02	93,05	20,21 ± 0,67	22,14
3	8,3 (0)	0,76 (0)	93,01 ± 0,26	92,92	21,70 ± 0,80	21,64
4	8,3 (0)	-0,25 (-1,41)	92,35 ± 0,10	93,13	11,67 ± 0,38	15,24
5	12 (1,41)	0,76 (0)	99,07 ± 0,01	100,22	24,54 ± 0,54	28,47
6	8,3 (0)	1,8 (1,41)	94,91 ± 0,13	94,83	21,44 ± 0,10	21,83
7	8,3 (0)	0,76 (0)	92,89 ± 0,27	92,92	21,65 ± 0,11	21,64
8	11 (1)	1,5 (1)	99,65 ± 0,01	98,79	28,17 ± 0,00	25,21
9	8,3 (0)	0,76 (0)	92,81 ± 0,15	92,92	21,45 ± 0,60	21,64
10	5,5 (-1)	0,05 (-1)	92,79 ± 0,11	92,04	9,93 ± 0,72	11,40
11	8,3 (0)	0,76 (0)	93,68 ± 0,19	92,92	22,58 ± 0,28	21,64
12	8,3 (0)	0,76 (0)	93,26 ± 0,24	92,92	22,29 ± 0,25	21,64
13	11 (1)	0,05 (-1)	99,67 ± 0,01	97,93	26,42 ± 0,95	23,00
14	8,3 (0)	0,76 (0)	93,22 ± 0,20	92,92	22,11 ± 0,02	21,64
15	8,3 (0)	0,76 (0)	93,25 ± 0,20	92,92	21,27 ± 0,41	21,64
16	8,3 (0)	0,76 (0)	93,24 ± 0,01	92,92	21,88 ± 0,49	21,64

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS, Y<sub>1</sub>: porcentaje de remoción de turbidez (%), Y<sub>2</sub>: ΔE respecto al extracto inicial

**Cuadro 18: Análisis de Varianza del modelo cuadrático para el porcentaje de remoción de turbidez en la etapa de optimización**

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
X <sub>1</sub>	202,99	202,99	1954,19	0,00
X <sub>3</sub>	5,22	5,22	50,26	0,00
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	64,86	64,86	624,42	0,00
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,016	0,016	0,16	0,69
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	9,62	9,62	92,63	0,00
Falta de ajuste	26,23	1,38	13,29	0,00
Error puro	2,18	0,10		
Total (corr.)	311,15			
R <sup>2</sup> = 90,9 por ciento				
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub> = 89,8 por ciento				

**Cuadro 19: Análisis de Varianza del modelo cuadrático para la ΔE en la etapa de optimización**

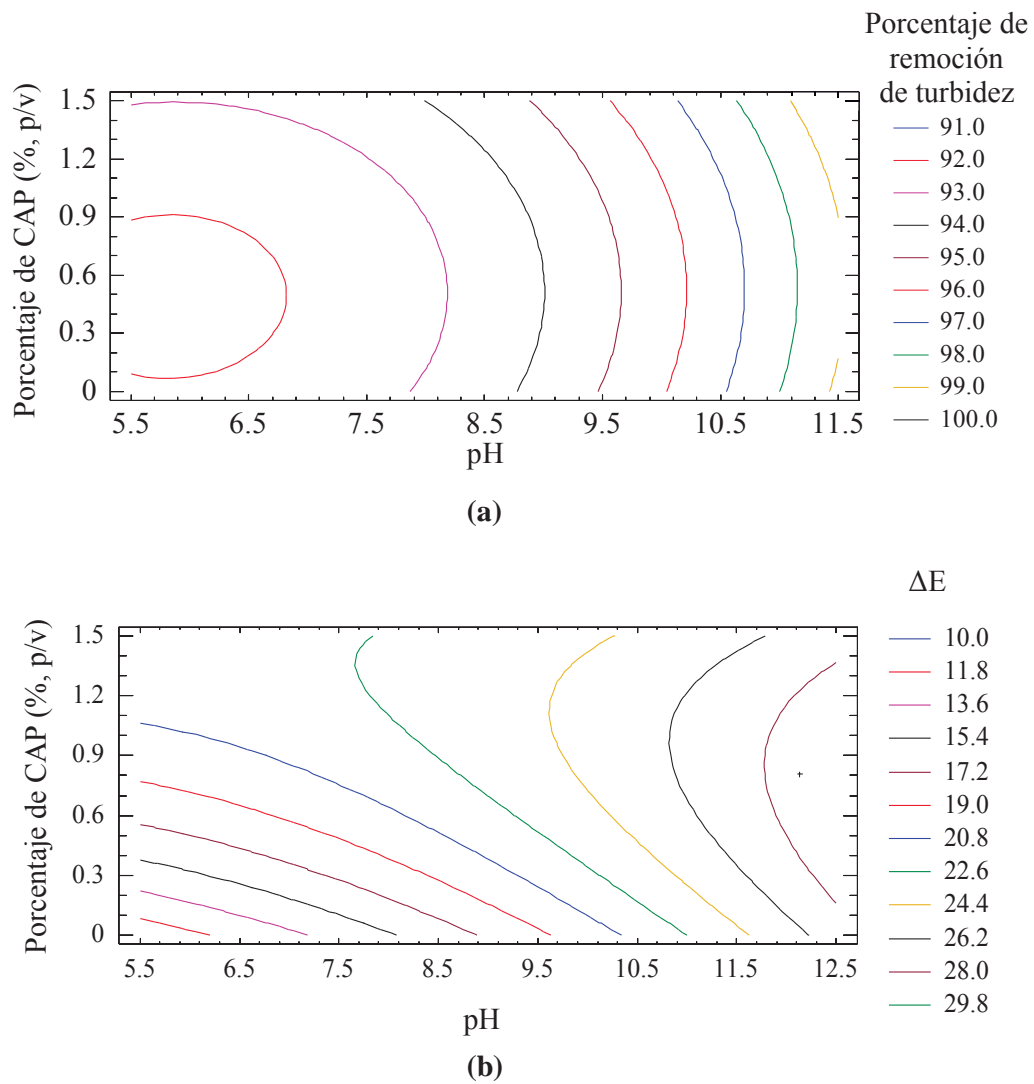
Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	P-Valor
X <sub>1</sub>	322,22	322,25	952,09	0,00
X <sub>3</sub>	250,28	250,28	739,53	0,00
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	17,33	17,33	51,22	0,00
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	54,61	54,61	161,36	0,00
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	124,88	124,88	369,00	0,00
Falta de ajuste	163,16	8,58	25,38	0,00
Error puro	7,11	0,34		
Total (corr.)	939,64			
R <sup>2</sup> = 81,9 por ciento				
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub> = 79,7 por ciento				

Aunque la falta de ajuste fue significativa para ambos casos, no invalida el modelo para propósito predictivo, porque el  $R^2$  fue 90,9 y 81,9 por ciento, es decir que, aproximadamente el 90,9 y 81,9 por ciento de variabilidad total de los resultados, para la variable respuesta porcentaje de remoción de turbidez y  $\Delta E$ , respectivamente, es explicado por el modelo seleccionado (existe una adecuada correlación entre los valores obtenidos y estimados de la respuesta); siendo significativo para representar la relación existente entre las respuestas (porcentaje de remoción de turbidez y  $\Delta E$ ) y las variables estudiadas (pH en la clarificación y porcentaje de carbón activado).

En la Figura 21 (a) y (b) se muestran la gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada para el porcentaje de remoción de turbidez y la  $\Delta E$  en el extracto clarificado y decolorado, respectivamente, donde se aprecia que para ambas variables respuestas, el incremento del pH en el proceso de clarificación y, de la proporción de CAP tiene un efecto significativamente positivo, provocando un aumento en las respuestas conforme su nivel crece, alcanzando un porcentaje de remoción de turbidez y variación de color más altos cuando el pH fue 11 y el porcentaje de CAP 1,5 por ciento. Las superficies de respuesta estimada se pueden observar en el ANEXO 16 (a) y (b).

Esta tendencia es reportada por Andrzejewski *et al.* (2013), al observar que, al elevar el pH del jugo (sorgo dulce) a clarificar agregando lechada de cal, obtuvo flóculos más grandes, que se produjeron cuando el jugo fue calentado, eliminando el 94 por ciento de turbidez. Por otro lado, Zhao *et al.* (2013) indican que, para el caso de la clarificación de un extracto de alcachofa por carbonatación y encalado, el incrementar el pH del extracto de alcachofa a 13,4 con cal parece ser el óptimo para la eliminación de proteínas, gomas y fibras. Koblitz y Moretti (1999) citados por Prati y Moretti (2010) estudiaron la eficacia de diferentes concentraciones de floculante en la clarificación de los jarabes de azúcar a diferentes valores de pH (7, 9 y 11), produciendo los mejores resultados en términos de eliminación de color y turbidez a pH de 9 y 11.

Para que se produzca la coagulación, el medio debe ser alcalino y producido por el medio o por la presencia de agentes alcalinizantes, tales como óxido de calcio (cal viva), hidróxido de calcio (cal apagada), hidróxido de sodio, o carbonato de sodio. Cuando se añade al extracto, tales reactivos modifican el pH, y junto con el efecto de la temperatura, forman precipitados que eliminan impurezas (Koblitz, 1998, citado por Prati y Moretti, 2010).



**Figura 21: Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada para el porcentaje de remoción de turbidez (a) y la  $\Delta E$  (b)**

Chen (1991) menciona que, al añadir cal hidratada (hidróxido de calcio), en el caso de jugo de caña, a menudo en forma de lechada de cal, para aumentar el pH, provoca: (i) la neutralización de ácidos, (ii) una reducción de la degradación de azúcares por inversión, (iii) la formación de flóculos de fosfato de calcio y (iv) la introducción de las partículas cargadas positivamente en la solución de jugo. Respecto a lo último, la carga positiva interactúa con la partícula cargada negativamente de la caña de azúcar, cambiando el potencial zeta de la partícula y provocando la disminución de la estabilidad coloidal general. Esto implica que los jugos tratados con lechada de cal mejoran la atracción de las partículas y reducen la turbidez del jugo debido a la alta concentración de calcio (Doherty *et al.*, 2002).

El calcio del jugo o de la lechada de cal y los fosfatos que contienen naturalmente el jugo de la caña de azúcar son necesarios en la formación de fosfato de calcio, el cual es un precipitado floculento que remueve ciertos coloides por adsorción superficial y que, al ir sedimentando, arrastra mecánicamente algunos coágulos de calcio y algunas otras impurezas en suspensión (Chen y Chou, 1993). Honig (1969) indica que, en el caso de jugo de caña, si el contenido de fosfatos es alto, el contenido de cal deberá ser mayor, concluyendo que el pH óptimo está condicionado por la composición del jugo. Entonces la cantidad de fosfatos en el extracto puede ser determinante para fijar el punto final de alcalinización. En esta investigación, la concentración de fosfatos fue de 298 ppm, para lo cual se requirió una alcalinización a pH 11, para obtener la mayor remoción de turbidez.

Angin (2014) hace referencia a que, al aumentar la concentración de carbón activado, aumenta el número de sitios de adsorción disponibles. Asimismo, Nasehi *et al.* (2012) indica que la capacidad de carbón activado para adsorber sustancias orgánicas está esencialmente relacionada con su gran área de superficie, de su alta capacidad de adsorción, estructura microporosa y reactividad especial de la superficie. De hecho, los incrementos de eficiencia de adsorción en concentraciones más altas de carbón activado se deben a la disponibilidad de grupos funcionales en la superficie del carbón activado. Es probable que el carbón activado no solo haya adsorbido compuestos responsables del color, sino también de la turbidez y por ello contribuyó en su disminución.

Luego de la etapa de optimización empleando la MSR, se determinaron los parámetros que maximizan los procesos de clarificación y decoloración, para lo cual se prefirió tomar en cuenta la respuesta optimizada correspondiente a la  $\Delta E$  para la optimización final, en donde el porcentaje de carbón activado y el pH en la clarificación resultaron tener un efecto significativo en el proceso.

Las condiciones, que maximizan el proceso, recomendado por el modelo de segundo orden son las siguientes: el valor 12,1 de pH en la clarificación y 0,81 por ciento de CAP. Debido a las dificultades presentadas en las corridas a pH 12 (se observó que se producen reacciones que impiden la recuperación del sobrenadante después de la centrifugación), se prefirió adoptar el valor de pH 11. Finalmente, en el Cuadro 20 se muestran las condiciones que maximizan los procesos de clarificación y decoloración.



**Cuadro 20: Condiciones que maximizan los procesos de clarificación y decoloración**

Variable Independiente	Condiciones óptimas
pH	11
CAP (% g/mL)	0,81

La comparación de los valores predichos y experimentales ( $\Delta E$  y porcentaje de remoción de turbidez) se presenta en el Cuadro 21.

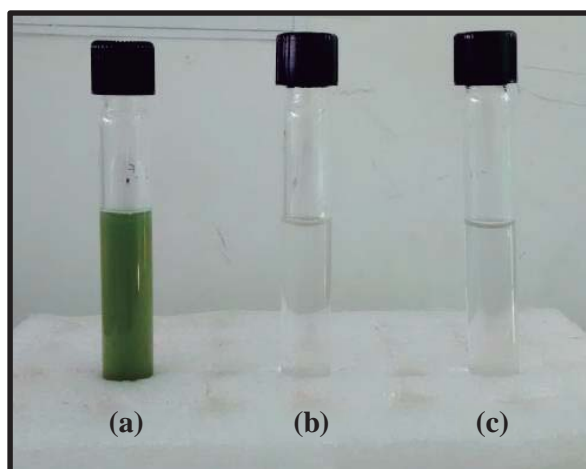
**Cuadro 21: Valores predichos y experimentales de las variables respuestas bajo las condiciones que maximizan los procesos de decoloración y clarificación**

Variable respuesta	Valor predicho	Valor experimental (*)
$\Delta E$	26,43	28,198 $\pm$ 0,262
Porcentaje de remoción de turbidez (%)	97,74	99,76 $\pm$ 0,012

(\*)Promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS

#### 4.4.3. CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO FINAL

En la Figura 22 se puede observar las diferencias entre el extracto concentrado inicial (a), el extracto clarificado y decolorado (c) y el agua destilada (b) como referencia.



**Figura 22: Extracto concentrado a partir de harina de yacón (a), agua destilada (b) y extracto clarificado y decolorado (c)**

En el Cuadro 22 se presenta las características del extracto clarificado y decolorado obtenido con los parámetros que maximizan las operaciones estudiadas. Entre los resultados, se encuentra la evaluación del color (L, a\* y b\*) del extracto clarificado. Respecto a la luminosidad (L), se determinó que, luego de la clarificación, esta varió de 26,38 a 54,37, es decir, el extracto final mostró mayor luminosidad. Con respecto a los parámetros cromáticos (a\* y b\*), el valor de a\* varió de -3,38 a -0,36 y b\*, de 3,84 a 2,22, obteniendo un  $\Delta E$  con respecto al extracto concentrado inicial de 28,20 y un  $\Delta E$  respecto al agua destilada de 1,07. De lo anterior se puede decir que se logró una buena decoloración ya que la diferencia de color con respecto al agua destilada es un valor muy bajo, como se observa en la Figura 22 (b) y (c). Adicionalmente, en el en el Cuadro 23 se puede apreciar el comparativo de las coordenadas L, a\* y b\* entre el extracto crudo, el extracto clarificado y decolorado y el agua destilada.

Al respecto Castellanos *et al.* (2004) consideran que una  $\Delta E$ , entre el agua destilada y la muestra, es imperceptible cuando este valor es menor a uno. Por lo mencionado anteriormente, se puede decir que el extracto obtenido con los parámetros, que maximizan los procesos de clarificación y decoloración, se asemeja al agua destilada, en cuanto al color. Esto indica la efectividad en la reducción drástica de compuestos que aportan color (flavonoides, melanoidinas, componentes generados por la reacción entre fenoles y sustancias nitrogenadas o hierro (Marín, 2012)) al trabajar con un pH de 11 en la clarificación y un porcentaje de 0,81 por ciento de carbón activado en los procesos de clarificación y decoloración del extracto a partir de la harina de yacón.

Respecto al extracto bruto, se aprecia una reducción de los niveles de azúcares reductores, glucosa, fructosa, sacarosa y FOS en 10, 28, 20, 30 y 18 por ciento, respectivamente después de la clarificación y decoloración. Esta tendencia fue reportada por Carabasa *et al.* (1998), quienes, partiendo de jugo de durazno oscuro de 12 °Brix y tratado con carbón activado a 30 °C a una concentración de 0.06 g/g, reportaron un descenso de los sólidos solubles alrededor de nueve por ciento. En otra investigación en la cual se estudió la clarificación de jarabe de sorgo dulce (13,18 °Brix) bajo calentamiento a 80 °C, enalado con lechada de cal (MOL) a pH 6,3, y floculación con un floculante polianiónico, se observó un descenso de 19 por ciento del contenido total de glucosa, fructosa y sacarosa (Andrzejewski *et al.*, 2013).

**Cuadro 22: Características del extracto clarificado y decolorado obtenido con los parámetros que maximizan las operaciones estudiadas(\*)**

Componente	Contenido
Azúcares reductores (g/100 mL)	10,43 ± 0,50
Glucosa (g/100 mL)	2,65 ± 0,34
Fructosa (g/100 mL)	6,44 ± 0,30
Sacarosa (g/100 mL)	1,38 ± 0,004
FOS (g/100 mL)	8,41 ± 0,59
Compuestos fenólicos (mg AGE/mL)	0,03 ± 0,03
Proteína (g BSA/100 mL)	0,005 ± 0,0002
<i>L</i>	54,37 ± 0,27
Color <i>a*</i>	-0,36 ± 0,14
<i>b*</i>	2,22 ± 0,05
$\Delta E$ (con respecto al extracto inicial)	28,20 ± 0,26
$\Delta E$ (con respecto al agua destilada)	1,07 ± 0,04
Sólidos Solubles (°Brix)	18,6
pH	4,4
Turbidez (NTU)	5,69 ± 0,30
Porcentaje de remoción de turbidez (%)	99,8 ± 0,01
Ca (ppm)	1463,75 ± 98,75
Fostatos (ppm)	728 ± 2,6

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS

**Cuadro 23: Valores *L*, *a\** y *b\** del extracto concentrado inicial, extracto clarificado con los parámetros que maximizan las operaciones estudiadas y agua destilada (\*)**

Análisis		Extracto concentrado (Inicial)	Extracto clarificado y decolorado (final)	Agua destilada
Color	<i>L</i> (Luminosidad)	26,38 ± 0,15	54,37 ± 0,27	55,62 ± 0,42
	<i>a*</i> (Tonalidad rojo-verde)	-3,37 ± 0,17	-0,36 ± 0,14	-0,35 ± 0,05
	<i>b*</i> (Tonalidad amarillo-azul)	3,84 ± 0,45	2,22 ± 0,05	1,62 ± 0,07

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS

También podría plantearse como hipótesis la reducción del contenido de éstos azúcares y los FOS debido a una degradación alcalina. Se han reportado reacciones de degradación alcalina que tienen lugar a altos niveles de pH (8 – 11) en la producción de azúcar de remolacha. La tasa de degradación en presencia de cationes de calcio es de aproximadamente cuatro veces más rápido que en presencia de cationes de sodio, pero la intensidad del color es más de tres veces mayor en este último caso. La formación de productos de degradación tiene lugar principalmente durante la etapa de purificación, donde la temperatura aumenta hasta 85 °C y el pH aumenta hasta valores básicos (11 – 12) (Coca *et al.*, 2004). El azúcar más afectado es la fructosa y, en menor medida, la glucosa; tendencia que pareciera ocurrir con los resultados obtenidos (Davis, 2001). En la presente investigación, la temperatura más alta a condición alcalina fue de 40 °C, por lo que probablemente la velocidad de estas reacciones ha sido baja.

El contenido de proteínas fue de  $0,005 \pm 0,0002$  g BSA/100 mL, disminuyendo en un 89,5 por ciento con respecto al extracto inicial. Marín (2012) hace referencia a que las proteínas precipitan casi por completo por la desnaturalización provocada durante el calentamiento y aumento del pH en la clarificación. Además, menciona que es importante eliminar la mayor cantidad posible de proteínas durante la clarificación del jugo debido a que estas actúan como protectoras de los coloides, impidiendo la desestabilización de la materia en suspensión; asimismo, reducen la actividad del ion calcio, incrementando su concentración en el jugo, incrementan la viscosidad de las meladuras y reducen la velocidad de cristalización de la sacarosa. Andrzejewski *et al.* (2013) mencionan que, en la clarificación con cal en caliente, permite la formación de partículas coloidales, particularmente las proteínas coagulan y forman flóculos naturales, los cuales serán eliminados en el proceso de centrifugación.

Del mismo modo, hubo una disminución en el contenido de compuestos fenólicos, obteniendo finalmente  $0,03 \pm 0,03$  mg AGE/mL, lo que representa una disminución de 98,4 por ciento de dicho compuesto. Esto se podría deber a que el carbón activado posee una excelente capacidad de adsorción para compuestos orgánicos de peso molecular relativamente bajo, tales como los fenoles (Haghseresht *et al.*, 2002).

La naturaleza química de la superficie del carbono activado es el factor más importante aparte de la estructura porosa que determina sus propiedades de adsorción. La presencia de

grupos de oxígeno e hidrógeno en la superficie afecta fuertemente las propiedades de adsorción del carbón activado. El origen de estos grupos en la superficie puede ser del material original o del proceso de activación o la introducción después de la preparación a través de post-tratamientos (Bhabendra y Sandle, 1993; Chen *et al.*, 2003). El oxígeno, por ejemplo, puede estar presente en diversas formas, tales como carboxilos, fenoles, lactonas, aldehídos, cetonas, quininas, hidroquinonas, anhídridos o estructuras etéreas (León y León y Radovic, 1994).

Por otra parte, el contenido de calcio (1463,75 ppm) y fosfatos (728 ppm) aumentó en el extracto, debido a la adición de lechada de cal y de ácido fosfórico, que, al parecer, no llegaron a reaccionar completamente a pesar de que el extracto presentó un descenso drástico en el contenido de turbidez, quedando estos en el extracto.

#### **4.5. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE COMPUESTOS COLOREADOS**

El modelamiento del proceso de adsorción se llevó a cabo empleando los modelos de las isotermas de Langmuir, Freundlich y Temkin. En el Cuadro 24 se presentan los resultados de ajuste, es decir, constantes de las isotermas de adsorción, coeficientes de correlación y raíz del cuadrado medio (RMS).

La forma lineal de la isoterma de Langmuir se muestra en la Figura 23 (a), la capacidad máxima de adsorción ( $Q^0$ ) fue -0,073 y la intensidad de adsorción ( $b$ ) -3,7. Paredes (2011) indica que cuando los valores de  $Q^0$  y  $b$  son negativos, los resultados experimentales no se correlacionan adecuadamente con el modelo.

La forma lineal de la isoterma de Freundlich se muestra en la Figura 23 (b) y los valores de la pendiente ( $1/n$ ) y la intersección ( $\text{Log } K_f$  como  $K_f$ ) se muestran en el Cuadro 24.  $K_f$  representa la constante de Freundlich y es tomada como un indicador de la capacidad de adsorción (Arslanoğlu *et al.* 2005), en esta investigación el valor de  $K_f$  fue 17,17 ((u.a.)  $\text{m}^3$  extracto/kg CAP). En cuanto al valor de  $1/n$  (intensidad de adsorción) fue 2,59; del cual se obtiene que el valor de  $n$  es 0,38. Al respecto, Ahdno y Jafarizadeh-Malmiri (2015) señalan que si el valor de  $n$  se encuentra entre 0 y 1, indica que la intensidad de adsorción es favorable en toda la gama de temperatura estudiada, cabe señalar que en esta investigación la temperatura estudiada fue de 20 °C.

En la Figura 23 (c) se observa la gráfica de la isoterma de adsorción de Temkin y los parámetros del modelo se encuentran en el Cuadro 24. Los valores bajos de  $n_T$  en este estudio indican una interacción débil entre adsorbente y adsorbato que soporta un mecanismo de intercambio iónico.

Los valores de  $R^2$  de los modelos estudiados descienden en el orden: Freundlich > Temkin > Langmuir. Estos resultados revelaron la adsorción de los compuestos coloreados del extracto se ajustan mejor a los modelos de Freundlich y Temkin, ya que tienen coeficientes de correlación de 0,982 y 0,949, respectivamente, lo que permite establecer que el proceso de adsorción se llevó a cabo en centro activo energéticamente heterogéneos.

**Cuadro 24: Parámetros de los modelos de las isothermas de adsorción de compuestos coloreados a diferentes porcentajes de carbón activado en la clarificación y decoloración del extracto de yacón (\*)**

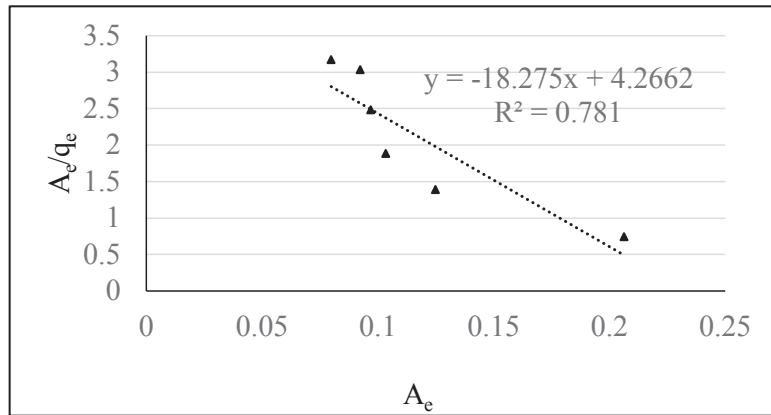
Isoterma de adsorción	Parámetros de adsorción			
<b>Langmuir</b>	$Q^0$ ((u.a.)m <sup>3</sup> ext/kg CAP)	$b$ (1/u.a.)	$R^2$	<b>RMS</b>
	-0,073 ± 0,028	-3,7 ± 0,8	0,781	0,471
<b>Freundlich</b>	$K_f$ ((u.a.)m <sup>3</sup> ext/kg CAP)	$1/n$	$R^2$	<b>RMS</b>
	17,17 ± 0,007	2,59 ± 1,48	0,982	0,148
<b>Temkin</b>	$K_T$	$n_T$	$R^2$	<b>RMS</b>
	13,5 ± 1,93	0,28 ± 0,01	0,949	0,024

(\*)Promedio de tres repeticiones ± DS, u.a. = unidades de absorbancia

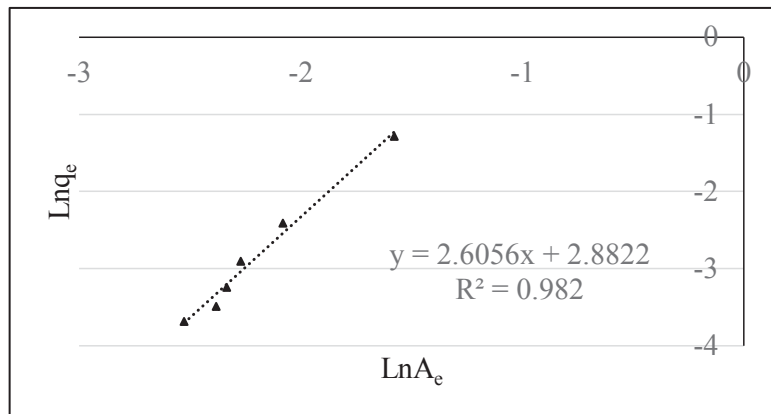
Cuanto mayor es el valor de  $R^2$  y cuanto menor es el valor de RMS, mejor será la calidad del ajuste. El modelo de Temkin obtuvo el menor valor de RMS (0,024), seguido del modelo de Freundlich (0,148).

Las isothermas de Freundlich y de Temkin tienen dos parámetros ajustables, mientras que la isoterma de Langmuir tiene solo uno. Por ello las dos primeras pueden ajustarse con éxito a numerosos sistemas (Izquierdo *et al.*, 2004). Ng *et al.* (2002) menciona que la ecuación de Freundlich se ajusta a los datos con intermedias y altas concentraciones y puede proporcionar un mal ajuste a los datos a bajas concentraciones.

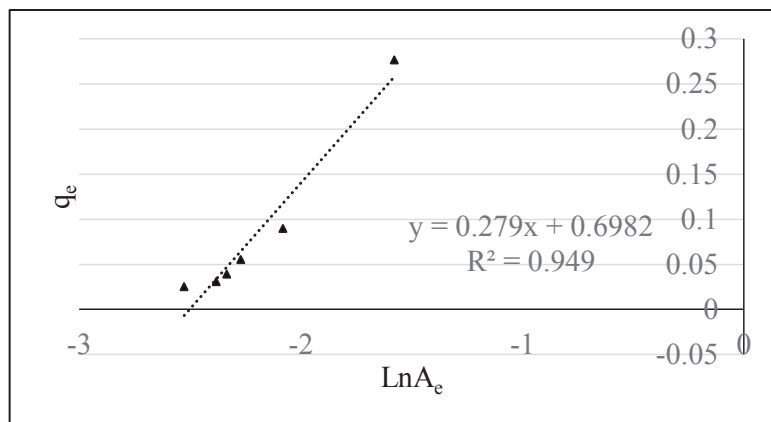
En la Figura 23 (a), (b) y (c) se puede apreciar la linealización de los modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich, y Temkin para la adsorción de compuestos coloreados del extracto concentrado a partir de harina de yacón en carbón activado en polvo.



(a)



(b)



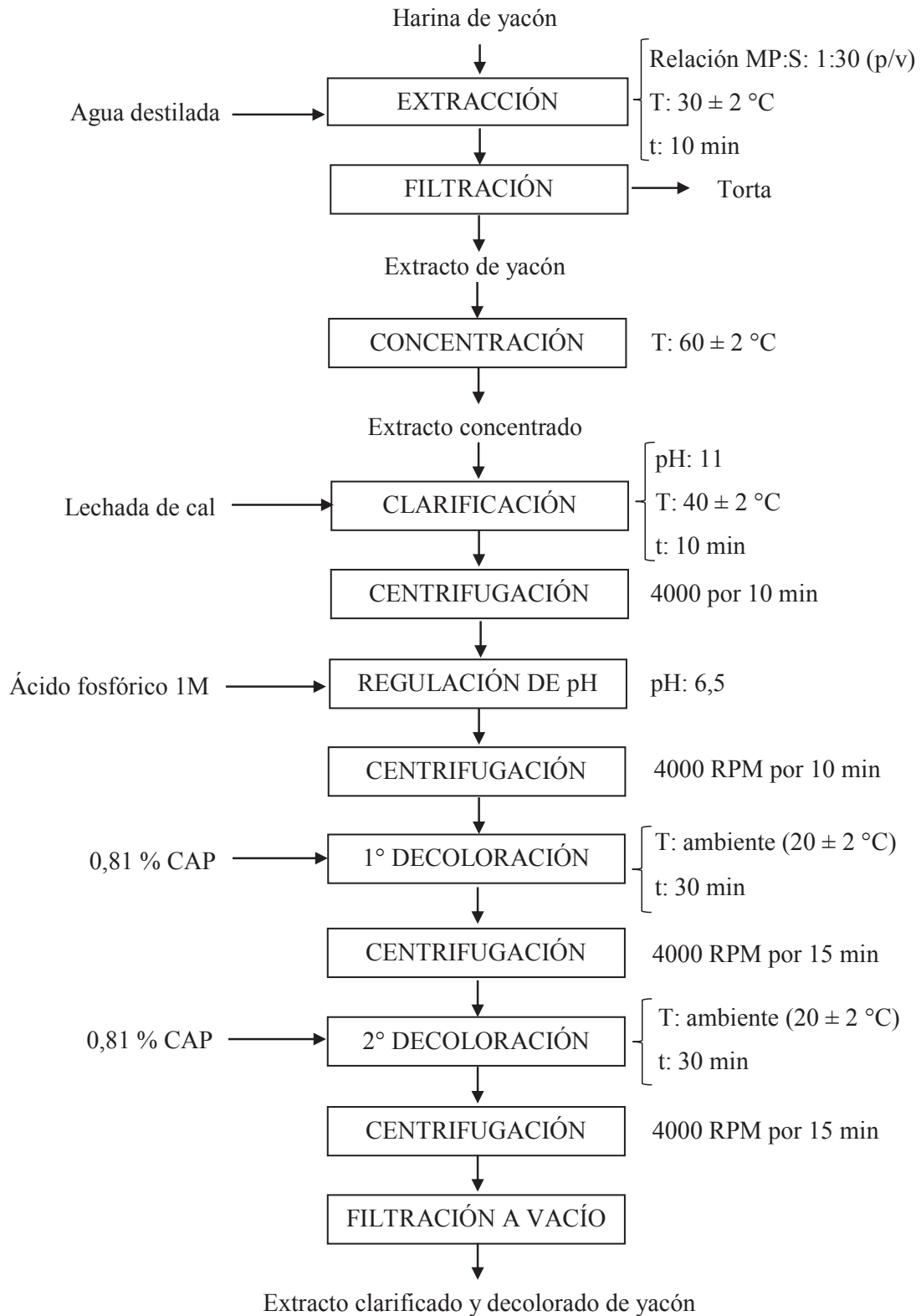
(c)

**Figura 23: Linealización de los modelos de Langmuir (a) Freundlich (b) y Temkin (c) para la adsorción de compuestos coloreados del extracto concentrado a partir de harina de yacón en carbón activado en polvo**

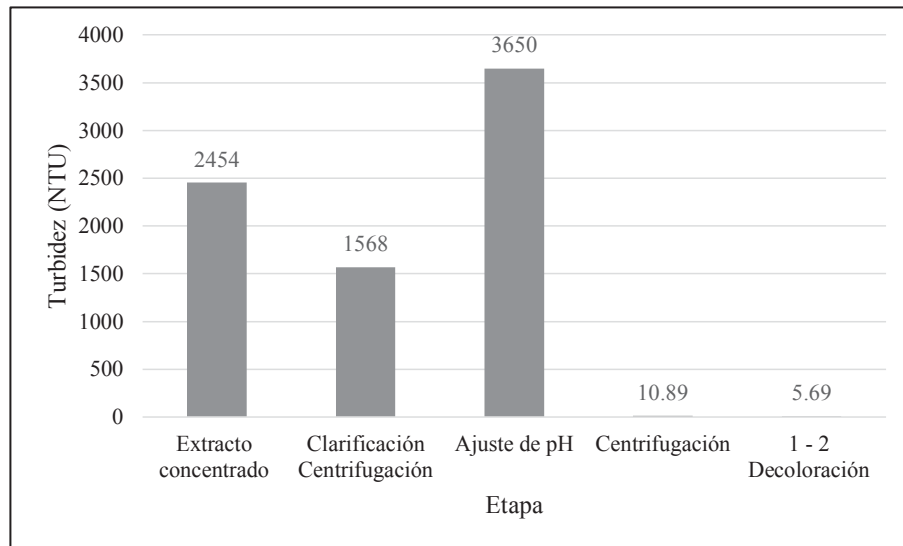


#### **4.6. PRESENTACIÓN DEL FLUJO DEFINITIVO CON LOS PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN LAS OPERACIONES ESTUDIADAS**

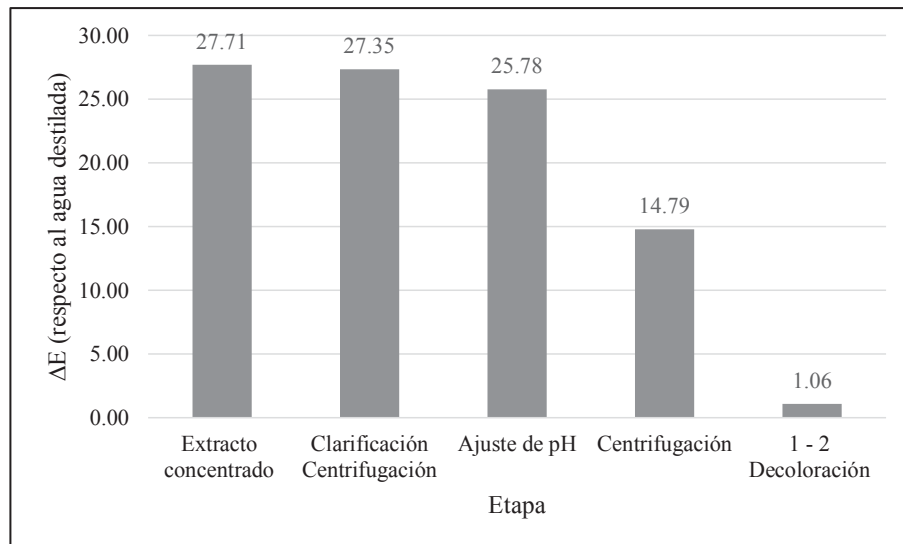
En la Figura 24 se presenta el flujo definitivo con los parámetros que maximizan la clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón. En la Figura 25 se puede observar la contribución de cada etapa en la disminución de turbidez y cambio de color ( $\Delta E$ ) del proceso de clarificación y decoloración de extracto concentrado de harina de yacón.



**Figura 24: Flujo de operaciones con los parámetros que maximizan la clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón**



(a)



(b)

**Figura 25: Contribución de (a) la disminución de turbidez y (b) la variación de color ( $\Delta E$ ) en cada etapa del proceso de clarificación y decoloración de extracto concentrado a partir de harina de yacón**

## V. CONCLUSIONES

1. De los factores estudiados en el proceso de extracción de FOS a partir de harina de yacón, solo la relación MP:S tuvo efecto significativo en el rendimiento de extracción de FOS.
2. Los parámetros que aseguran una máxima extracción de FOS a partir de harina de yacón, con un rendimiento de 99,23 por ciento de FOS son: MP:S de 1:30 (g/mL) por un tiempo de 10 minutos y a una temperatura de 30 °C.
3. Los modelos cinéticos de la ley de Fick modificado por Qu *et al.* (2010) y por Chan *et al.* (2014), simulan adecuadamente el proceso de extracción de FOS de la harina de yacón.
4. La extracción de FOS a partir de la harina de yacón es acompañada con la extracción de otros compuestos solubles como: compuestos fenólicos, azúcares y proteínas, que le imparten turbidez y color al extracto, haciendo necesario la clarificación y decoloración.
5. En el proceso de clarificación y decoloración se identificó como factores con efecto significativo: el pH en la clarificación y la proporción de carbón activado. Las condiciones óptimas para estos procesos fueron: pH 11 y 0,81 por ciento de CAP.
6. Con los valores que maximizan las operaciones estudiadas, se ha propuesto un flujo que permite la reducción del 99,8 por ciento de la turbidez inicial, una variación de color ( $\Delta E$ ) de  $28,30 \pm 0,27$  respecto al extracto inicial, y de  $1,07 \pm 0,04$  respecto al agua pura y una recuperación de FOS de 81,25 por ciento. Las isothermas de Freundlich y Temkin fueron las que mejor describieron el proceso de adsorción de los componentes coloreados presentes en el extracto de yacón en carbón activado.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Los resultados de la presente investigación permiten recomendar la continuación de estudios orientados a:

- Evaluar la tecnología de filtración por membranas, como método alternativo en la clarificación y decoloración de extracto de yacón.
- Estudiar procesos de purificación de FOS como: técnicas cromatográficas y de filtración por membranas.
- Evaluar la posibilidad del aprovechamiento de los azúcares libres presentes en el extracto de yacón, como fructosa y sacarosa, para la síntesis de FOS mediante biotransformación enzimática.
- Estudiar el proceso de cristalización de FOS para la obtención de un producto en polvo a partir de extracto purificado.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera J. M., Stanley D. W. 1999. Simultaneous heat and mass transfer: dehydration. In: Microstructural principles of food processing & engineering (2nd ed.) Gaithersburg, MA, USA: Aspen Publishers, Inc. p. 373 – 411.
2. Ahdno, H.; Jafarizadeh-Malmiri, H. 2015. Clarification of Date Syrup by Activated Carbon: Investigation on Kinetics, Equilibrium Isotherm, and Thermodynamics of Interactions. *International Journal of Food Engineering*. 11(5): 651 – 658.
3. Andrzejewski, B.; Eggleston, G.; Lingle, S.; Powell, R. 2013. Development of a sweet sorghum juice clarification method in the manufacture of industrial feedstocks for value-added fermentation products. *Industrial Crops and Products* 44: 77– 87.
4. Angin, D. 2014. Utilization of activated carbon produced from fruit juice industry solid waste for the adsorption of Yellow 18 from aqueous solutions. *Bioresource Technology* 168: 259 – 66.
5. Ania, C. O.; Parra, J. B. y Pis, J. J. 2002. Effect of texture and surface chemistry on adsorptive capacities of activated carbons for phenolic compounds removal. *Fuel Processing Technology*, 77–78, 337–343.
6. AOAC. 1995. The Assn. of Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15 ed. Washinton, DC. 1298 p
7. Apolinário, A.C.; Goulart de Lima B.P.; Esberard de Macedo, N.; Pessoa, A.; Converti, A.; Alessandro da Silva. 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers* 101: 368 – 378.
8. Arango, O.; Cuarán, G.; Fajardo, J. 2008. Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 6(2): 16 – 19.
9. Arce, L. 2011. Obtención de extracto clarificado (concentrado de fructooligosacáridos de la raíz de yacón (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. & Ende). Tesis (Mag Sc). UNALM. Lima, Perú.

10. Arslanoğlu, F.N.; Kar, F.; Arslan, N. 2005. Adsorption of dark coloured compounds from peach pulp by using powdered-activated carbon. *Journal of Food Engineering* 71(2): 156 – 163.
11. Ayala, J.; Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicación en ingeniería. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima – Perú. 261p.
12. Azmir J., Zadul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117: 426 – 436.
13. Berk, Z. 2013. *Food Process Engineering and Technology*. 2 ed. USA. Elsevier Inc. 677p.
14. Beylot, M. 2005. Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *Br.J.Nutr.* 93: 163 – 168.
15. Bhabendra, K. P.; Sandle, N. K., 1993. Effect of different oxidizing agent treatments on the surface properties of activated carbons, *Carbon*, 37 (8): 1323 –1332.
16. Bhongoletu, V. 2004. Isolation, purification and characterization of inulin and fructooligosaccharides from *Chicorium intybus* and inulinase from *Aspergillus niger*. Thesis Master of Science of Rhodes University in the Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Faculty of Science. South Africa.
17. Bornet, F.R.J. 1994. Undigestible sugars in food products. *Am J Clin Nutr.* 59: 769.
18. Bornet, F.R.; Brouns, F.; Tashiro, Y.; Duvillier, V. 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig.Liver Dis.* 34: 111 – 120.
19. Box, G.; Draper, N. 1987. *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons. Sao Paulo. 145 p.
20. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.
21. Calder, B.L.; Skonber, D.L.; Dentici, K.D.; Hugues, B.H.; Bolton, J.C.2011. The Effectiveness of Ozone and Acidulant Treatments in Extending the Shelf Life of FreshCut Potatoe. *Journal Food Science* 76: 498.
22. Campos, D.; Betalleluz-Pallardel, I.; Chirinos, R.; Aguilar-Galvez, A.; Noratto, G.; Pedreschi R. 2012. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. &

- Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem.* 135: 1592- 1599
23. Carabasa, M.; Ibarz, A.; Garza, S.; Barbosa-Cánovas, G.V. 1998. Removal of dark compounds from clarified fruit juices by adsorption processes. *Journal of Food Engineering* 37: 25-41.
  24. Cardona, M.L. 2009. Seguimiento de las variables fisicoquímicas del clarificador SRI y verificación de la eficiencia del tacho continuo Fletcher Smith para la optimización de la elaboración de azúcar en el Ingenio Risaralda. Tesis (Tecnólogo Químico). Universidad Tecnológica de Pereira Escuela de Tecnología Química. Pereira – Colombia.
  25. Castellanos, O.F.; Cruz, G.T.; González, G.; Rentería, A.Y. 2004. Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón. *Ingeniería e Investigación Universidad Nacional de Colombia.* 24(2): 8 – 21.
  26. Chacón, A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 265-286.
  27. Chan, C.; Yusoff, R.; Ngoh, G. 2014. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chem. Eng. Res. Des.* 92(6): 1169-1186.
  28. Chapman, H.; Pratt, P. 1973. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Editorial Trillas. México. 195 p.
  29. Chalermchat, Y.; Fincan, M.; Dejmek, P. 2004. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering.* 64(2): 229 – 236.
  30. Chen J. 1991. Manual de la caña de azúcar. 1 ed. México. Editorial Limusa. 1200p.
  31. Chen, J.C.P.; Chou, C.C.1993 Cane sugar handbook: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12th Edition. Editorial John Wiley & Sons. 1116 p.
  32. Chen J.P.; Shunnian, W.; Chong, K.H. 2003. Surface modification of a granular activated carbon by citric acid for enhancement of copper adsorption. *Carbon.* 41: 1979 – 1986.
  33. Chirinos, R. 1999. Obtención y caracterización de los oligofruetosanos a partir de la raíz del yacón (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. &Endl.). Tesis (Magister Scientiae). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 157 p.
  34. Cissé, M.; Bohuon, P.; Sambe, F.; Kane, C.; Sakho, M.; Dornier, M. 2012. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* 109(1): 16 – 21.



35. Coca, M.; García M.T.; González, M.; Peña M., García J. 2004. Study of coloured components formed in sugar beet processing Food Chemistry 86: 421–433
36. Coronado, A.2013. Elaboración de la harina de yacón (*smallanthus sonchifolius*) y su influencia en el crecimiento de dos bacterias probióticas. Trabajo de grado presentado para optar el título de Químico Farmacéutico. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 71 p.
37. Coulson, J.M.; Richardson, J.F.; Backhurst, J.R.; Harker J.H. 2003. Ingeniería Química. 3° Edición. España. Editorial Reverté, S.A. 1037 p.
38. Courtin, C.M.; Swennen, K.; Verjans, P.; Delcour, J.A. 2009. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. Food Chemistry 112: 831 – 837.
39. Cowan, M.M.1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12: 564 – 582.
40. Crossley, J.I.; Aguilera, J.M. 2001. Modeling the effect of microstructure on food extraction. Journal Food Process. Eng. 24: 161 – 177.
41. Cruz-Guzmán, M. 2007. La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales. Editorial de la Universidad de Sevilla. España. 223p.
42. Davis, S.B. 2001. The chemistry of color removal: a processing perspective. Proc. S. Afr. Sugar Technol Ass., 75: 328 – 336.
43. Delzenne, N.M.; Daubioul, C.; Neyrinck, A.; Lasa, M.; Taper, H.S. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. Br.J.Nutr. 87: 255 – 259.
44. Dobre, T.; Stroescu, M.; Stoica, A.; Draghici, E.; Antohe, N. 2008. Inulin Extraction and Encapsulation. Rev Chimie. 53(67): 215 – 217.
45. Doherty, W.O.S.; Edye, L.A. 1999. An overview on the chemistry of clarification of cane sugar juice. Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol. 21: 381 – 388.
46. Doherty, W.O.S.; Greenwood, J.; Pilaski, D.; Wright; P.G. 2002. The effect of liming conditions in juice clarification. Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists. 24: 443 – 451.
47. Doherty, W.O.S.; Rackemann, D.W. 2009. Some aspects of calcium phosphate chemistry in sugarcane clarification. International Sugar Journal 111(1327): 448 – 455.
48. Fanaro, S.; Boehm, G.; Garssen, J.; Knol, J.; Mosca, F.; Stahl, B.; Vigi, V. 2005. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. Acta Paediatr.Suppl. 94: 22 – 26.

49. Fischer, K.P.; Hofsommer, H.J. 1992. Application of the adsorption technique in the fruit juice industry. *Confructa Studien*, 36(3-4): 101 – 107.
50. Foo, K.Y.; Hameed, B.H. 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal* 15: 2 – 10.
51. García, A.M; Vázquez, D.R. 1998. Cuantificación de Proteínas: una revisión. *Bitácora* 3: 77 – 88.
52. Gil, N. 2008. Consideraciones acerca del desempeño operacional de las estaciones de clarificación y filtración. *Carta Trimestral. CENICAÑA*. 30 (3 y 4): 15 – 19.
53. Giovanelli, G.; Ravasini, G. 1993. Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process. *Lebensmittel–Wissenschaft and Technologie*, 26: 1–7.
54. Giraldo, M. 2005. Evaluación del efecto de materia extraña vegetal (hojas, cogollos, chulquines) en el proceso de clarificación de jugos de caña de azúcar. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Ingeniería Agroindustrial. Palmira.
55. Gómez, A.; Rincón, S.; Klose, W. 2010. Carbón activado de cuesco de palma. Estudio de termogravimetría y estructura. Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 104 p.
56. Goyal, M. 2012. Nonenvironmental Industrial Applications of Activated Carbon Adsorption. In: *Novel Carbon Adsorbents*. p. 605 – 638.
57. Graefe, S.; Hermann, M.; Manrique, I.; Golombek, S.; Buerkert, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research* 86: 157-165.
58. Grau, A.; Rea, J. 1997. Yacón *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) H. Robinson. En: Hermann, M.; Heller, J. 1997. *Andean Roots and tubers: Ahipa, Maca and Yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
59. Haghseresht, F.; Nouri, S.; Finnerty, J.J.; Lu, G.Q. 2002. Effects of Surface Chemistry on Aromatic Compound Adsorption from Dilute Aqueous Solutions by Activated Carbon 106(42): 10935-10943.
60. Hermann, M.; Freire, I.; Pazos, C. 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. Impact on changing world: Program report 1997-1998. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 425-432.

61. Hernández, P; Jiménez, MT. 2010. Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructooligosacáridos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 4 -1*: 1 – 8.
62. Herodez, S.S.; Hadolin, M.; Skerget, M.; Knez, Z. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis L.*) leaves. *Food Chem.* 80(2): 275 – 282.
63. Herrera, J.C. 2005. Ahorro energético en la extracción por lixiviación del pigmento del maíz morado (*Zea mays L.*). Tesis (Ing Ind Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 116 p.
64. Hojnik, M.; Skerget, M.; Knez, Z. 2008. Extraction of lutein from marigold flower petals – experimental kinetics and modelling. *LWT – Food Sci. Technol.* 41(10): 2008 – 2016.
65. Honig, P. 1969. Principios de tecnología azucarera. Editorial Continental S.A., Tomo 1. 639 p.
66. Hugot, E. 1972. Handbook of Cane Sugar Engineering, Amsterdam, Elsevier Publishing Company.
67. Ibarz, A.; Barbosa-Canovas, G. 2005. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Madrid, España. Mundi-Prensa. 865 p.
68. Itaya, N.M.; De Carvalho, M.A.M.; Figueiredo-Ribeiro, R.D.L. 2002. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia (Asteraceae)*. *Physiol. Plant.* 116: 451 – 459.
69. Izquierdo, J.P.; Cunill, F.; Tejero, J.; Iborra, M.; Fité, Ca. 2004. Cinética de las reacciones químicas. Gráficas Rey, S.L. Barcelona, España. 307 p.
70. Jaime, L.; Martín-Cabrejas, M.; Mollá, E.; López-Andréu, F.; Esteban, R. 2001. Effect of storage on Fructan and Fructooligosaccharide of Onion (*Allium cepa L.*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 982 – 988.
71. Joglekar, M.; May, T. 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Food World* 32(12): 857 – 868.
72. Juárez, S.S. 2015. Influencia del blanqueado y secado de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) en el contenido de azúcares. Tesis (Ing Ind Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 123 p.
73. Jung, M.W.; Ahn, K.H.; Lee, Y.; Kim, K.P.; Rhee, J.S.; Park, J.T. 2001. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). *Microchemical Journal.* 70: 123 – 131.

74. Kim, S.; Kim, W.; Hwang, I.K. 2003. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. *International Journal of Food Science and Technology* 38: 337 – 342.
75. Kuehl, R.O. 2001. *Diseño de experimentos: principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. Segunda edición. International Thomson Editores, S.A. Impreso en México. 663 p.
76. Kurtoğlu, G.; Yildiz, S. 2011. Extraction of Fructo-Oligosaccharide Components From Banana Peels. *GU J Sci.* 24(4): 877-882.
77. Lachman, J.; Fernandez, E.C.; Orsák; M. 2003. Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. Et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review. *Plant Soil Environ* 49: 283 – 290.
78. Laksameethanasana, P.; Somla, N.; Janprem, S.; Phochuen, N. 2012. Clarification of sugarcane juice for syrup production. *Procedia Engineering* 32: 141– 147.
79. León y León, C.A.; Radovic, R.L. 1994. Interfacial chemistry and electrometry of carbon surfaces, en P.A. Thrower (Ed.) *Chem Phys. Carbon*, vol, 24 Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 213-310.
80. Lingyun, W.; Jianhua, W.; Xiaodong, Z.; Da, T.; Yalin, Y.; Chenggang, C.; Tianhua, F.; Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering* 79: 1087 – 1093.
81. López N., Puértolas E., Condón S., Raso J., Álvarez I. 2009. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering.* 90: 60 – 66.
82. Luo, J.; Zhu, Z.; Ding, L. 2013. Flux behavior in clarification of chicory juice by high-shear membrane filtration: Evidence for threshold flux. *Journal of Membrane Science.* 435: 120 –129.
83. Madrigal, L; Sangronis, E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4): 387 – 396.
84. Mafart, P.; Béliard, E. 1994. *Ingeniería Industrial Alimentaria; técnicas de separación*. Zaragoza, España. ACRIBIA, S.A. Volumen II. 275 p.
85. Manahan, S. 2007. *Introducción a la química ambiental*. Universidad nacional Autónoma de México. DF. México. 45 p.
86. Manrique, I.; Hermann, M. 2003. El potencial del yacón en la salud y la nutrición. XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos. Cochabamba, Bolivia. 1 p.

87. Manrique, I; Hermann, M; Bernet, T. 2004. Ficha técnica: Yacón. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 2 p.
88. Manrique, I; Párraga, A; Hermann, M. 2005. Jarabe de yacón: Principios y procesamiento. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 31 p.
89. Marín, L. 2012. Determinación de las condiciones apropiadas de preparación de un floculante como componente fundamental en el proceso de clarificación de jugo en Riopaila Castilla S.A., Planta Riopaila. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 149 p.
90. Martins, S.I.F.S.; Jongen, W.M.F.; Van Boekel, M.A.J.S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*. 11: 364 – 373.
91. Mejía, R.A. 2015. Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana. Tesis (Ing Ind Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 123p.
92. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
93. Montañez, J.; Venegas, J.; Vivar, M.; Ramos, E. 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber Azul. *Bioagro*. 23(3): 199 – 206.
94. Montgomery, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México D.F, México. 686 p.
95. Moreno-Castilla, C.; Rivera-Utrilla, J.; López-Ramón, M.V.; Carrasco-Marín, F. 1995. Adsorption of some substituted phenols on activated carbons from a bituminous coal. *Carbon*. 33(6): 845 – 851.
96. Moscatto, JA; Prudencio-Ferrira, SH; Haully, MCO. 2004. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulacao de bolo de chocolate. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 24(4): 634 – 640.
97. Mussato, S.; Mancilha, I. 2007. Non – digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrates Polymers*. 68 (3): 587 – 597.
98. Nasehi, S.; Ansari, S.; Sarshar, M. 2012. Removal of dark colored compounds from date syrup using activated carbon: A kinetic study. *Journal of Food Engineering* 111: 490 – 495.

99. National Research Council. 1989. Yacón. In: Lost corps of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washintong DC. P. 114 – 147.
100. Ng, C.; Losso, J.N.; Marshall, W.E.; Rao, R.M. 2002. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin – water system. *Bioresource Technology*. 85: 131 – 135.
101. Nguyen, D.M.T.; Doherty, W. O. S. 2011. Phenolics in sugar cane juice: potential degradation by hydrogen peroxide and Fenton's reagent. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, Australian Society of Sugar Cane Technologists, Mackay, Queensland, Australia*.
102. Niness, K. 1999. Inulin and Oligofructose: What are they?. *Journal Nutrition*. 129: 1402 – 1406.
103. Niño, I.V.; Ortiz, D. 2008. Evaluación de dos clases de carbón activado granular para su aplicación efectiva en la remoción de fenoles en los vertimientos de una empresa de jabones. Tesis (Ing. Ambiental y Sanitario). Universidad de La Salle. Bogotá-Colombia. 130 p.
104. Ochoa, C.R. 2008. Propuesta para Automatización del Proceso de Clarificación del Jugo de Caña, por medio de Controladores de Lazos Múltiples. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Ingeniería Mecánica. Guatemala. 227 p.
105. Ohyama, T.; Ito, O.; Yasuyoshi, S.; Ikarashi, T.; Minamisawa, K.; Kubota, M.; Tsukihashi, T.; Asami, T. 1990. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Sci. Plant Nutr*. 36: 167 – 171.
106. Pardo-Rueda, A.J.; Quintero-Ramos, A.; Genovese, D.B.; Camacho-Dávila, A.; Zepeda-Rodrigue, A.; Contreras-Esquivel, J.C.; Bizarro, A.P. 2014. Efficient extraction of fructans from stool plant (*Dasyilirion leiophyllum*) enhanced by a combination of enzymatic and sonothermal treatments. *Food and Bioproducts Processing*. 92: 1169 – 1186.
107. Paredes, A.L. 2011. Estudio de la adsorción de compuestos aromáticos mediante carbón activado preparado a partir de la cáscara de castaña. Tesis (Licenciado en química). Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. 116p.
108. Paseephol, T.; Small, D.; Sherkat, F. 2007. Process optimization for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Food Chemistry* 104(1): 73 – 80.

109. Paton, NH. 1992. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour part III Role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning of cane juice. *International Sugar Journal* 94(1124):170 – 176.
110. Perez, E.E.; Carelli, A.A.; Crapiste, G.H. 2011. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. *J. Food Eng.* 105(1): 180–185.
111. Pinelo, M.; Zeuner, B.; Meyer, A.S. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice Turbidity. *Food and Bioproducts Processing.* 88(2-3): 259 – 265.
112. Polanco, M. 2011. Caracterización morfológica y molecular de materiales de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl) H. Robinson colectados en la eco región eje cafetero de Colombia. Tesis (Magister en Ciencias agrícolas con énfasis en Fitomejoramiento). Universidad Nacional de Colombia, Palmira-Colombia. 92 p.
113. Prati, P; Moretti, R. 2010. Study of clarification process of sugar cane juice for consumption. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30(3): 776 – 783.
114. Primera, O.; Colpas, F.; Meza, E.; Fernández, R. 2011. Carbones activados a partir de bagazo de caña de azúcar y zuro de maíz para la adsorción de cadmio y plomo. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 35(136): 387 – 396.
115. Puminat, W.; Teangpook, Ch. 2013. Extraction and Powder Product of Fructo-oligosaccharide from Jerusalem Artichoke. *Journal of Food Science and Engineering.* 3: 141 – 148.
116. Qi, J.; Li, Z.; Gou, Y.; Xu, H. 2004. Adsorption of phenolic compounds on micro-and mesoporous rice husk-based active carbons. *Mater. Chem. Phys.* 87: 96 – 101.
117. Qu, W.; Pan, Z.; Ma, H. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering.* 99(1): 16 – 23.
118. Reece, N. 2001. Optimizing aconitate removal during clarification. A Thesis for the degree of Master of Science in Biological and Agricultural Engineering in The Department of Biological and Agricultural Engineering. Louisiana, EEUU. 122p.
119. Rein, P. 2007. Cane sugar engineering. Bartens, Berlin, Germany. 768 p.
120. Reinoso, F. 2005. Carbón activado: Estructura, preparación y aplicaciones. *Revista UNIANDES.* 3: 66 – 69.
121. Roberfroid, M.B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br.J.Nutr.* 93: 13 – 25.
122. Rodríguez, J.; Gil, Z.N.; Castillo, M.E.; Erazo, V. 2009. Caracterización y Evaluación de Algunos Floculantes Industriales Utilizados para la Clarificación de Jugos de Caña



- de Azúcar en Colombia. Documento de trabajo No. 670. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA). Santiago de Cali.
123. Rodríguez, O.; Cortada, A.; Rodríguez, J.A.; Santos, B. 2012. Fructooligosacáridos y probióticos en leches fermentadas, una alternativa nutricional y saludable. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 22(3): 53 – 59.
  124. Ronkart, S.; Deroanne, C.; Paquot, M.; Fougnyes, C.; Lambrechts, J.C.; Blecker, C. 2007. Characterization of the physical state of Spray-Dried inulin. *Food Biophys* 2(2): 83 – 92.
  125. Rubinos, D.A. 2007. Utilización de lodos rojos de bauxita en la contención e inactivación de residuos tóxicos y peligrosos. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España. 757 p.
  126. Sabater, M. 2008. Efectos de las poliaminas y los fructooligosacáridos de la dieta sobre la maduración intestinal en cerdos destetados precozmente. Tesis Doctoral en Biología, Universidad de Murcia, 2008, Murcia-España. 185 p.
  127. Santana, I.; Cardoso, M.N. 2008. Raíz tuberosa de yacón (*Smallanthus sonchifolius*): Potencialidades de cultivo, aspectos tecnológicos y nutricionales. *Ciencia Rural* 38: 898 – 905.
  128. Sastry S.K. barach J.T. 1999. Ohmic and inductive heating. *Journal of Food Science*, 65: 42 – 46
  129. Seminario, J.; Valderrama, M.; Manrique, I. 2003. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, 60 p.
  130. Sepúlveda, A.; Bustamante, F.; Silvestre, J.; Suárez, S.; Orozco, N. 2008. Adsorbentes para la eliminación de COVs. Del libro Eliminación de emisiones atmosféricas de COVs por catálisis y adsorción. Cooperación Iberoamericana, Argentina.
  131. Sharapin, N.; Machado, L.; Souza, E.; Rocha de Albuquerque, E.M.; Valverde, E.; Lpoes de Almeida, J.M. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 1º Edición. Ed. Roberto Pinzón S. Colombia. 248 p.
  132. Siebert, K.J.; Troukhanova, N.V.; Lynn, P.Y. 1996. Nature of Polyphenol–Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1): 80 – 85.
  133. Siebert, K.J. 2006. Haze formation in beverages. *Food Science and Technology*. 39(9): 987 – 994.



134. Singleton, V.; Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdeic – phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144 – 158.
135. Tan, P.W.; Tan, C.P.; Ho, C.W. 2011. Antioxidant properties: Effect of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal* 18: 553 – 558.
136. Tokunaga, T. 2004. Novel physiological function of fructooligosaccharides. *Biofactors*. 21: 89 – 94.
137. Toneli, JTCL; Park, KJ; Murr, FEX; Negreiros, AA. 2008. Effect of moisture on the microstructure of inulin powder. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28 (1): 122 – 131.
138. Toribio, J.L.; Lozano, J.E. 1984. Nonenzymatic browning in apple juice concentrate during storage. *Journal of Food Science*. 49: 889 – 892.
139. Urango, L. 2012. Elaboración de un queso fresco semigraso, adicionado con fructooligosacáridos (FOS). Tesis (Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín-Colombia. 107 p.
140. Valentová, K.; Lebeda, A.; Delezalová, I.; Jirovský, D.; Simonovska, B.; Vovk, I.; Kosina, P.; Gasmanová, N.; Dziechciarková, M.; Urlichová, J. 2006. The biological and chemical variability of yacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1347 – 1352.
141. Vásquez, Y.M. 2009. Influencias de las condiciones de proceso en la calidad de zumo de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & ENDL). Tesis (Ingeniero en Industrias Alimentarias). UNALM. Lima, Perú. 124 p.
142. Villacañas, F.; Pereira, M.; Órfao, J. Figueiredo, J. 2006. Adsorption of simple aromatic compounds on activated carbons. *J. Colloid Interface Sci.* 293: 128 – 136.
143. Worch, E. 2012. Adsorption technology in water treatment. Fundamentals, processes, and modeling. Editorial Walter de Gruyter. Germany. 344 p.
144. Yan, X.; Suzuki, M.; Ohnishi-Kameyama, M.; Sada, Y.; Nakanishi, T.; Nagata, T. 1999. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4711–4713.
145. Zamora, G.N. 2010. Obtención de Carbón Activado a partir de semillas de dos palmeras de la amazonia peruana “Sapaja” (*Attalea phalerata*) y “Aguaje” (*Mauritia flexuosa*). Tesis (Ing. Forestal). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. 80 p.

146. Zerban, F.W. 1921. Relative Importance of Some Colouring Matters in Cane Juices and Syrups. *Int. Sug. J.* 23(265): 32 – 35.

Zhao, Z.F.; Zhu, H.J.; Yu, J.J.; Li, C.; Gao, G.y.; Zeng, Y.W. 2009. Impurity Removal from inulin extract of Jerusalem artichoke tubers by carbonation. *Food Science.* 30(14): 67 – 71.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

#### Preparación de reactivos

##### DNS

1. Disolver 11 g de hidróxido de sodio, 10 g de DNS, 2 g de Fenol y 0,5 g de bisulfito de sodio y llevar a un litro de agua destilada.

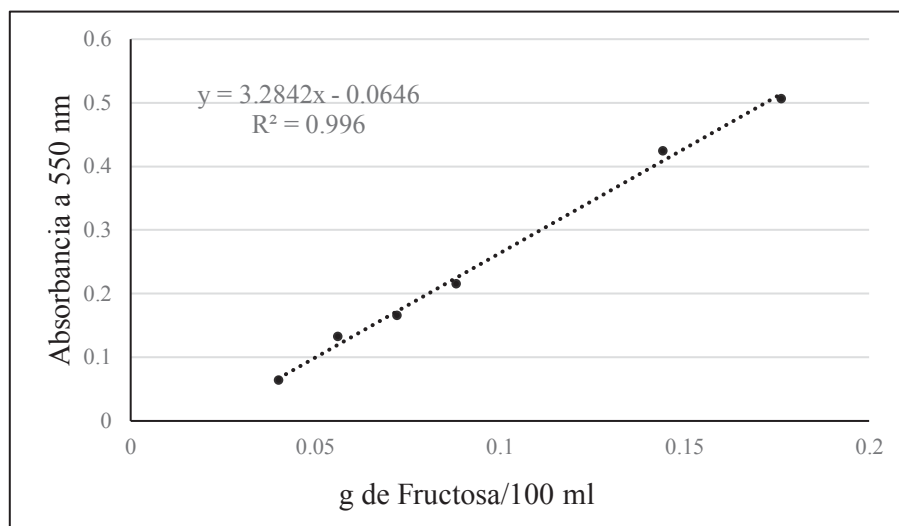
##### Sal de Rochelle

2. Preparar una solución al 40 % de tartrato de sodio y potasio.

#### Procedimiento

1. Tomar 0,5 ml de muestra a analizar.
2. Adicionar 3 ml de solución de DNS.
3. Calentar a baño maría a 100 °C por 5 minutos.
4. Adicionar 1 ml de sal de Rochelle, seguido de 10 ml de agua destilada.
5. Agitar y leer la absorbancia a 550 nm.
6. Calcular el contenido en base a la curva estándar.

En la Figura 1-A se muestra la curva estándar con soluciones de fructosa. Los resultados se expresan como g de Fructosa/100 ml.



**Figura 1-A: Curva estándar de fructosa**

Ecuación:  $y = 3,2841x - 0,0646$

Donde:

y: Absorbancia a 550 nm

x: g de Fructosa/100 ml

## **ANEXO 2: Determinación del contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y FOS por HPLC**

### **Preparación de reactivos**

- **Buffer acetato (pH=4,5):** Pesar 4,102 g de acetato de sodio. Se procede a enrasar a 50 ml en fiola con agua destilada. Tomar 20 ml de agua de esta solución y enrasar con ácido acético 1M a 50 ml hasta llegar a pH 4,5.
- **Solución de enzima inulinasa activa:** 0,5 ml de enzima inulinasa (Sigma) se diluye en 9,5 ml de buffer acetato.
- **Solución de enzima inulinasa inactiva:** La solución de enzima inulinasa activa, se lleva a ebullición por 5 minutos.

### **Procedimiento de preparación de la muestra (seca)**

1. Se toma 2 g de muestra seca (harina de yacón) y se homogeniza con 100 ml de solución de etanol al 70%.
2. El homogenizado se lleva a ebullición durante 10 minutos y luego se centrifuga a 4 000 RPM por 14 minutos para recolectar el sobrenadante y nuevamente se realiza la extracción de la torta.
3. El proceso anterior se repite dos veces más y todos los sobrenadantes se mezclan.
4. El sobrenadante recolectado se filtran con ayuda de papel Whatman® N°1.
5. Se concentra a vacío a 45 °C hasta alcanzar un volumen de 25 ml aproximadamente.
6. Los extractos concentrados son sometidos a hidrólisis enzimática.

Nota: En el caso de muestras líquidas (extracto bruto, clarificado y decolorado) se realiza la hidrólisis directamente previa dilución.

### **Procedimiento de hidrólisis**

1. El extracto proveniente de la muestra seca (harina de yacón) y de las muestras líquidas, deben diluirse apropiadamente dependiendo de la concentración de FOS, para que estos puedan ser leídos en el HPLC.

2. Por cada muestra debe realizarse dos extractos:
  - a. **Extracto hidrolizado:** 2,8 ml de extracto (diluido o tal cual) más 0,2 ml de solución enzimática.
  - b. **Extracto no hidrolizado:** 2,8 ml de extracto (diluido o tal cual) más 0,2 ml de solución enzimática inactiva.
3. Incubar a 60 °C por 3 horas (sin agitación).
4. Filtrar en el vial y correr en el HPLC.

### **ANEXO 3: Determinación de turbidez**

#### **Procedimiento**

1. Prender el turbidímetro.
2. Esperar 10 minutos para calentamiento.
3. Calibrar las escalas del turbidímetro insertando el patrón, colocando el botón en la escala apropiada y ajustando el valor del patrón en la escala a través del botón “estandarización”.
4. Agitar la muestra para dispersar perfectamente los sólidos.
5. Colocar la muestra en el tubo.
6. Insertar el tubo con la muestra en el lugar apropiado y hacer la lectura directamente.
7. Entre una lectura y otra lavar los tubos con agua destilada y enseguida con la muestra a ser analizada.
8. Secarlos por fuera con papel suave.

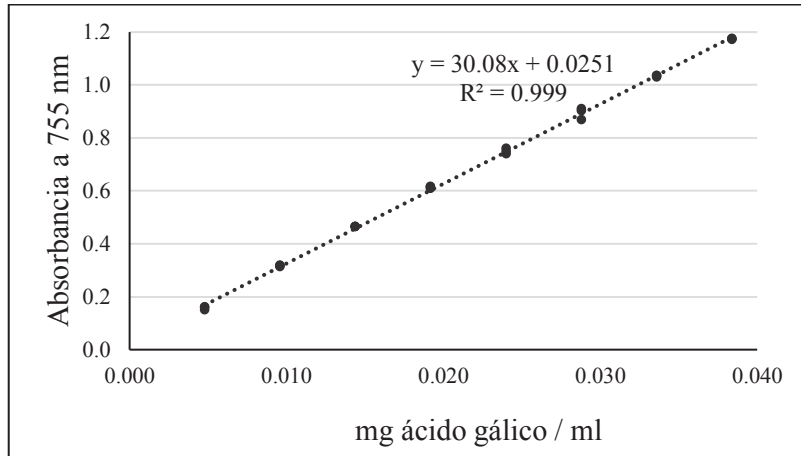
## ANEXO 4: Determinación del contenido de compuestos fenólicos (Singleton y Rossi, 1965)

### Procedimiento

1. Preparar una solución de carbonato de sodio de una concentración de 75 g/L.
2. Preparar una solución de Folin – Ciocalteau 1 N.
3. Colocar en un tubo de ensayo 500 µl del extracto diluido, 250 µl del reactivo de Folin – Ciocalteau 1 N y 1250 µl de carbonato de sodio (75 g/L).
4. Agitar y dejar reposar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Leer en el espectrofotómetro a 755 nm.
6. Calcular el contenido según la curva estándar de compuestos fenólicos.

El contenido de compuestos fenólicos se calcula usando una curva estándar de ácido gálico, y los resultados se expresan como mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ ml de muestra.

En la Figura 4-A se muestra la curva estándar empleada para la determinación de compuestos fenólicos



**Figura 4-A: Curva estándar de compuestos fenólicos**

Ecuación:  $y = 30,08x + 0,0251$

Donde:

y: absorbancia a 755 nm

x: mg ácido gálico/mL

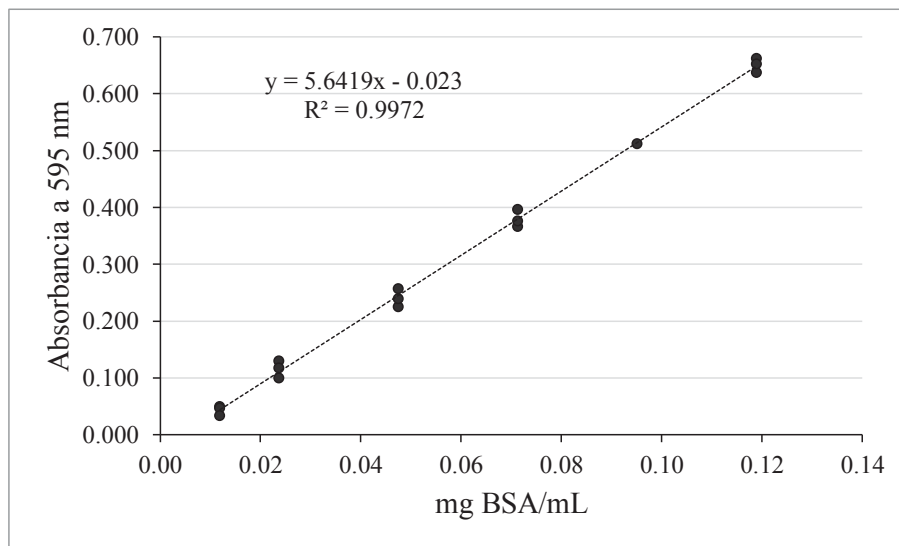


## ANEXO 5: Determinación del contenido de proteínas (Bradford, 1976)

### Procedimiento

1. Tomar 0,1 ml de solución de muestra y agregar 0,9 mL de solución de NaCl 1,5 M.
2. Agregar 5 ml de solución de Reactivo de Bradford a cada tubo.
3. Agitar y leer la absorbancia a 595 nm después de 10 minutos.
4. Calcular el contenido en base a la curva estándar de albúmina bovina sérica (por sus siglas en inglés BSA).

En la Figura 5-A se muestra la curva estándar empleada para la determinación de proteínas.



**Figura 5-A: Curva estándar de proteínas**

Ecuación:  $y = 5,6419x - 0,023$

Donde:

y: absorbancia a 595 nm

x: mg BSA/mL

## **ANEXO 6: Determinación del contenido de calcio (Chapman y Pratt, 1973)**

### **Procedimiento**

1. Pesar un gramo de la muestra y calcinarlo a 550 °C, durante varias horas.
2. Enfriarlo y añadir tres mililitros de ácido clorhídrico concentrado y cinco mililitros de agua destilada.
3. Secar para deshidratar el silicio.
4. Enfriar y añadir dos mililitros de ácido clorhídrico 2,5 N y 10 mL de agua destilada.
5. Calentar en una parrilla y añadir cinco mililitros de solución de cloruro de bario, mientras se agita.
6. Mantener caliente durante una hora y, luego, filtrar y colocarlo en un matraz volumétrico de 100 mL.
7. Lavar el precipitado con varias porciones de agua destilada y mezclar.
8. Para determinar el contenido de calcio, utilizar la longitud de onda de 422,7 m $\mu$ .

**ANEXO 7: Especificaciones del hidróxido de calcio**

<b>INFORMACIÓN DEL PRODUCTO</b>	
Fórmula química	Ca(OH) <sub>2</sub>
Masa Molar	74,09 g/mol
Marca	Merck®
<b>INFORMACIÓN FISICOQUÍMICA</b>	
Punto de ebullición	2850 °C (1013 hPa) (descomposición)
Densidad	2,24 g/cm <sup>3</sup> (20 °C)
Punto de fusión	550 °C (descomposición)
Valor de pH	12,6 (H <sub>2</sub> O, 20 °C) (solución saturada)
Presión de vapor	(20 °C)
Densidad aparente	400 kg/m <sup>3</sup>
Solubilidad	1,7 g/l (20 °C)
<b>ESPECIFICACIONES</b>	
Ensayo (acidométrico)	≥ 96,0 %
Sustancias insolubles en ácido clorhídrico	≤ 0,03 %
Carbonato (como CaCO <sub>3</sub> )	≤ 3,0 %
Cloro (Cl)	≤ 0,005 %
Compuesto de azufre (como SO <sub>4</sub> )	≤ 0,1 %
Metales pesados (Pb)	≤ 0,003 %
Hierro (Fe)	≤ 0,05 %
Potasio (K)	≤ 0,05 %
Magnesio (Mg)	≤ 0,5 %
Sodio	≤ 0,05 %
Estroncio (Sr)	≤ 0,05 %

## ANEXO 8: Especificaciones del carbón activado

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
pH	2-4
Humedad (%)	Máximo 8
Actividad relativa en melazas	Mínimo 103
Adsorción de azul de metileno (g AM/100g)	Mínimo 23
Granulometría (% que pasa malla 325)	60-80
Densidad aparente (g/cc)	0,3
Adsorción de Iodo (mg I <sub>2</sub> /g)	700-850
Cenizas (%)	10

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE HARINA DE YACÓN**

**ANEXO 9: ANVA de la regresión para el rendimiento de extracción de FOS a partir de harina de yacón en la etapa de *screening***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:Temperatura	4,13106	1	4,13106	0,24	0,6353
B:Tiempo	17,8718	1	17,8718	1,05	0,3352
C:Relación MP:S	324,991	1	324,991	19,12	<b>0,0024</b>
AB	2,79726	1	2,79726	0,16	0,6956
AC	10,0965	1	10,0965	0,59	0,4630
BC	7,79806	1	7,79806	0,46	0,5173
bloques	0,0885062	1	0,0885062	0,01	0,9442
Error total	135,989	8	16,9986		
Total (corr.)	503,763	15			
R-cuadrado= 73 por ciento					
R-cuadrado (ajustada por g.l.) = 55 por ciento					

**Factores:** Temperatura, tiempo y relación MP:S

**Variable respuesta:** Rendimiento de extracción de FOS

**Número de niveles:** 2

**ANEXO 10: ANVA para el contenido de FOS por relación materia prima:solvente**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	82,1609	7	11,7373	25,61	0,0000
Intra grupos	7,33274	16	0,458296		
Total (Corr.)	89,4936	23			

**Factor:** Relación materia prima:solvente**Variable respuesta:** Contenido de FOS**ANEXO 11: Pruebas de múltiple rangos para el contenido de FOS por relación materia prima:solvente**

Relación MP:S	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	32,07	X
10	3	34,46	X
90	3	34,96	X
20	3	36,64	X
40	3	37,08	X
70	3	37,13	X
30	3	37,60	X
50	3	37,76	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

**ANEXO 12: ANVA para el contenido de FOS por tiempo de extracción**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	73,6898	6	12,2816	5,03	0,0262
Intra grupos	17,0964	7	2,44234		
Total (Corr.)	90,7862	13			

**Factor:** Tiempo**Variable respuesta:** Contenido de FOS

**ANEXO 13: Pruebas de múltiple rangos para el contenido de FOS por tiempo de extracción**

<b>Tiempo</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
1	2	31,69	X
2	2	32,60	X
5	2	35,15	XX
60	2	36,55	X
30	2	37,07	X
20	2	37,70	X
10	2	37,83	X

Método: 95,0 porcentaje Duncan

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE FOS A PARTIR DE HARINA DE YACÓN**

**ANEXO 14: ANVA de la regresión para el porcentaje de remoción de turbidez en los procesos de clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón en la etapa de *screening***

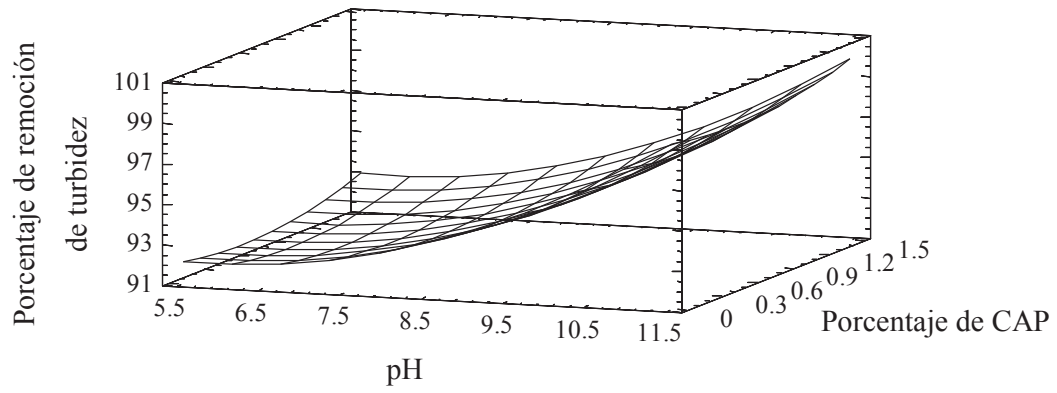
<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:pH	174,985	1	174,985	1936,99	0,0000
B:Temperatura	0,0103392	1	0,0103392	0,11	0,7521
C:% de carbón activado	1,26794	1	1,26794	14,04	0,0200
AB	0,141734	1	0,141734	1,57	0,2786
AC	1,4919	1	1,4919	16,51	0,0153
BC	1,04409	1	1,04409	11,56	0,0273
bloques	0,0000344232	1	0,0000344232	0,00	0,9854
Falta de ajuste	49,5558	10	4,95558	54,86	0,0008
Error puro	0,361355	4	0,0903387		
Total (corr.)	228,858	21			
R-cuadrado = 78,2 por ciento					
R-cuadrado (ajustada por g.l.) = 69,4 por ciento					



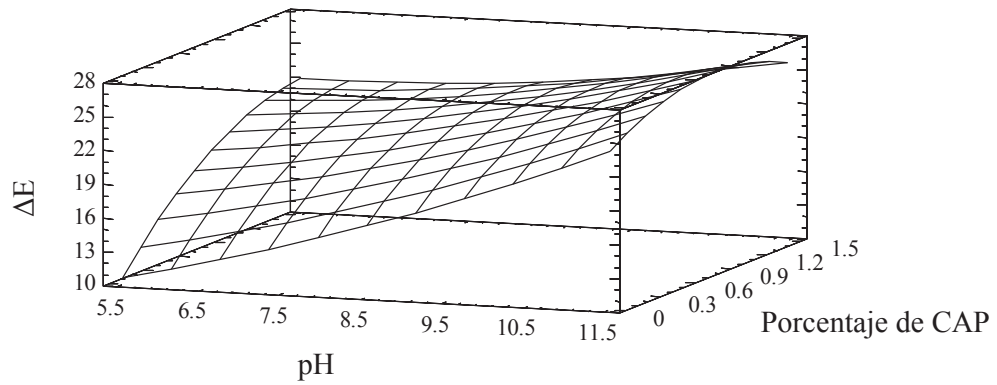
**ANEXO 15: ANVA de la regresión para la  $\Delta E$  en los procesos de clarificación y decoloración del extracto proveniente de harina de yacón en la etapa de *screening***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:pH	428,863	1	428,863	829,02	0,0000
B:Temperatura	0,277729	1	0,277729	0,54	0,5044
C:% de carbón activado	102,465	1	102,465	198,07	0,0001
AB	11,0324	1	11,0324	21,33	0,0099
AC	64,5612	1	64,5612	124,80	0,0004
BC	2,22308	1	2,22308	4,30	0,1069
bloques	0,647413	1	0,647413	1,25	0,3259
Falta de ajuste	5,81467	10	0,581467	1,12	0,4954
Error puro	2,06924	4	0,51731		
Total (corr.)	617,953	21			
R-cuadrado = 98,7 por ciento					
R-cuadrado (ajustada por g.l.) = 98,2 por ciento					

**ANEXO 16: Superficie de respuesta estimada para (a) el porcentaje de remoción de turbidez y (b) la  $\Delta E$  en el extracto clarificado y decolorado**



**(a)**



**(b)**