

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“PURIFICACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE
YACÓN (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) MEDIANTE
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS”**

Presentada por:

LILID MARIEL MESCUA MENDEZ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2016

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“PURIFICACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE
YACÓN (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) MEDIANTE
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:
LILID MARIEL MESCUA MENDEZ**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Patricia Glorio Paulet
PRESIDENTE

Dra. Ana Aguilar Galvez
PATROCINADOR

Dr. David Campos Gutiérrez
PATROCINADOR

Mg.Sc. Indira Betalleluz Pallardel
MIEMBRO

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios quién me ciñe de fuerza y despeja mi camino, para él mi corazón, mi emoción, mis mañanas, mis sueños, cada paso en esta vida y cada meta que consiga.

A Oswaldo Mescua, por darme la vida; a pesar de nuestra distancia física, siento que siempre estás conmigo, y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

A Rómulo Quispe, por ser como un padre para mí, por su apoyo moral, sus sabios consejos, sus chistes, su generosidad y amabilidad, por inculcarme a seguir estudiando; que aunque ya no te tengo, seguiremos haciendo mucho.

A ti que me diste tu vida, tu amor y tu espacio. A ti mi guerrera invencible, a ti luchadora incansable. A ti mi amiga gaviota. A ti te dedico mis versos, mis victorias. A ti madre querida.

A mis queridos hermanos, Carlos, Edwin y Jessica, por el cariño y apoyo moral, porque son un ejemplo para mí y porque siempre están conmigo. A mis sobrinos, en especial a Mathias y Ariela por transmitirme esa energía, alegría y frescura, que sin hacer nada hacen mucho por mí.

A toda mi familia en general, por su apoyo incondicional y comprensión, los llevo siempre en el corazón.

A ese ser tan especial que Dios puso en mi camino, a Ángel.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque ha puesto su amor en mí, por ayudarme a permanecer consciente a través de la locura y el caos, por darme entendimiento y no permitirme caer en la confusión. Cuando yo decía mi pie resbala, su palabra y misericordia me sustentaba. Sin él, mi alma moraría en el silencio.

Al Dr. David Campos por su orientación y retroalimentación constante, por su paciencia, motivación y porque siempre ha estado disponible para aconsejarme.

A la Dra. Ana Aguilar por su orientación y exigencia, por sus contribuciones de tiempo e ideas.

A las profesoras del jurado, Rosana Chirinos e Indira Betalleluz por la revisión del documento de tesis y sugerencias, por el buen ánimo, por la colaboración y buena disposición.

Al profesor Luis Briceño por su buen ánimo y por su disponibilidad de tiempo.

A las personas que nos proporcionaron las muestras para el desarrollo de la presente tesis. A Fiorela Díaz de Element Trading por las muestras de carbón activado granular Cabot Norit. A Sushil Amlani de Itochu Chemicals America Inc. por las resinas Diaion UBK555 Ca, Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK530 Na. A Erik de Vries de Technical Sales Manager Life TechTM for the Americas, por las resinas Purolite PCR642 Ca, Purolite PCR642 K. A Marcie Mirgon de Dow Water & Process Solutions por proporcionarnos la resina Dowex Monosphere 99 Ca/320.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto “Optimización del Proceso de Extracción de los Fructooligosacáridos de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) y de su Purificación mediante Técnicas Cromatográficas y de Biotransformación Enzimática” (Contrato N° 142-FINCYT-IA-2013).

ÍNDICE GENERAL

	pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. YACÓN.....	3
2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	3
2.1.2. PRODUCCIÓN DE YACÓN.....	3
2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL YACÓN	5
2.1.4. EFECTOS FUNCIONALES DEL YACÓN	7
2.2. FRUCTOOLIGOSACARIDOS	7
2.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA	7
2.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	9
2.2.3. FUNCIONALIDAD Y APLICACION DE LOS FOS.....	10
2.2.4. PRODUCCIÓN DE FOS	11
2.3. PURIFICACIÓN DE FOS	12
2.3.1. PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO	13
2.3.1.1. ADSORCIÓN.....	13
2.3.1.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL CARBÓN ACTIVADO.....	13
2.3.1.3. PURIFICACION DE AZÚCARES.....	14
2.3.2. PURIFICACIÓN DE FOS RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	16
2.3.2.1. PROCESOS DE INTERCAMBIO DE IONES.....	16
2.3.2.2. RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO	17
2.3.2.3. TIPOS DE RESINA	17
2.3.2.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	19
2.3.2.5. PURIFICACION DE AZÚCARES.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	22
3.2. MATERIA PRIMA	22
3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	22
3.3.1. MATERIALES.....	22
3.3.2. REACTIVOS.....	23
3.3.3. EQUIPOS	23
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	25
3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	25

3.4.2.	DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES	25
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE pH	25
3.4.4.	DETERMINACIÓN DE COLOR.....	25
3.4.5.	DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	26
3.4.6.	DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ	26
3.4.7.	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	26
3.4.8.	DETERMINACIÓN DE FOS POR HIDRÓLISIS ÁCIDA	27
3.4.9.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA, FOS	27
3.4.10.	CARGA DE COLUMNA	29
3.4.11.	NÚMERO DE PLATOS O CANTIDAD TEÓRICA DE PLATOS (N)	29
3.4.12.	ALTURA DE PLATO (H).....	29
3.4.13.	RESOLUCIÓN (R_s).....	30
3.5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30
3.5.1.	OBTENCIÓN DE LA HARINA DE YACÓN	30
3.5.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO Y CLARIFICADO DE YACÓN.....	32
3.5.2.1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO DE YACÓN.....	32
3.5.2.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN	33
3.5.3.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DESMINERALIZADO DE YACÓN	33
3.5.4.	CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN	35
3.5.4.1.	PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO	35
3.5.4.2.	PURIFICACIÓN DE FOS CON RESINAS DE INTERCAMBIO CATIÓNICO.....	37
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
3.6.1.	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO	40
3.6.2.	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIPO DE RESINA EN LA PURIFICACIÓN DE FOS	40
3.6.3.	INFLUENCIA DE LA CARGA DE COLUMNA O CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO EN LA PURIFICACIÓN DE FOS CON RESINAS	40
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE YACÓN	43
4.1.1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN	43

4.1.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DESMINERALIZADO DE YACÓN	45
4.2.	PURIFICACIÓN DE FOS POR CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN CON CARBÓN ACTIVADO.....	48
4.3.	PURIFICACIÓN DE FOS POR CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN CON RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO	56
4.3.1.	EFECTO DEL TIPO DE RESINA Y TEMPERATURA	60
4.3.2.	EFECTO DE LA CARGA DE COLUMNA.....	68
V.	CONCLUSIONES.....	77
VI.	RECOMENDACIONES	78
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
VIII.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición química en base seca de la raíz de Yacón	5
Cuadro 2: Contenido de sacáridos en yacón raíces tuberosas	6
Cuadro 3: Comparación entre inulina, oligofructosa y FOS	9
Cuadro 4: Propiedades fisicoquímicas de las resinas de intercambio catiónico	38
Cuadro 5: Características físicas de los extractos bruto y clarificado de yacón	43
Cuadro 6: Características físicas del extracto bruto, clarificado y desmineralizado de yacón	46
Cuadro 7: Efecto del desmineralizado en el contenido de azúcares del extracto de yacón	48
Cuadro 8: Polaridad de los solventes utilizados en la elución	50
Cuadro 9: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 25 °C.....	52
Cuadro 10: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 40°C.....	54
Cuadro 11: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 25 y 40°C.....	55
Cuadro 12: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK535L Ca a 25°C	57
Cuadro 13: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con diferentes resinas a 25°C	62
Cuadro 14: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con diferentes resinas a 60°C	65
Cuadro 15: Resultado de la prueba comparación múltiple de medias para el porcentaje de rendimiento y pureza obtenidos con diferentes resinas.....	67
Cuadro 16: Capacidad de adsorción de las diferentes resinas a 25 y 60°C	67
Cuadro 17: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 6.5 por ciento.....	69
Cuadro 18: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 15.1 por ciento.....	71

Cuadro 19: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 27.4 por ciento	71
Cuadro 20: Efecto de la carga de columna en el rendimiento y pureza de FOS	72
Cuadro 21: Número de platos teóricos (N), altura de plato (H) y resolución de la columna (Rs)	74
Cuadro 22: Comparación de resultados de la purificación de FOS utilizando dos técnicas cromatográficas	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de tres principales FOS	8
Figura 2: Modelo estructural de resina de intercambio catiónico.....	18
Figura 3: Flujo de operaciones para la obtención de la harina de yacón	32
Figura 4: Flujo de operaciones para la obtención del extracto bruto y clarificado.....	35
Figura 5: Diseño experimental para la purificación de FOS	42
Figura 6: (A) Extracto bruto (B) Extracto clarificado (C) Extracto desmineralizado	47
Figura 7: Cromatograma obtenido de la elución del extracto clarificado de yacón en la columna de carbón activado. Elución a 25°C. Flujo 1ml/min. Volumen de cada fracción 5 ml.....	51
Figura 8: Cromatograma obtenido de la elución del extracto clarificado de yacón en la columna de carbón activado. Elución a 40°C. Flujo 1ml/min. Volumen de cada fracción 5 ml.....	53
Figura 9: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK535L Ca. Elución a 25°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3 ml.....	57
Figura 10: (a) Anómeros de D-Glucosa, conformación C1 (b) Anómeros de D-Fructosa, conformación 1C	59
Figura 11: Cromatogramas obtenidos de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columnas de diferentes resinas de intercambio iónico. Elución a 25°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3ml	61
Figura 12: Cromatogramas obtenidos de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columnas de diferentes resinas de intercambio iónico. Elución a 60°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3 ml	64
Figura 13: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 6.5 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml	68
Figura 14: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 15.1 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml	70

Figura 15: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 27.4 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml.....	70
Figura 16: Efecto de la carga de columna. Diaion UBK530 Na a 60°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Determinación de azúcares reductores (Método Miller).....	91
Anexo 2: Determinación de FOS por hidrólisis ácida	92
Anexo 3: Características generales de las resinas de intercambio iónico utilizadas en la desmineralización.....	93
Anexo 4: Características generales del carbón activado granular.....	93
Anexo 5: Análisis Estadístico - Características físicas del extracto bruto y clarificado de yacón	94
Anexo 6: Análisis Estadístico - Características físicas del extracto bruto, clarificado y desmineralizado o desionizado de yacón	99
Anexo 7: Análisis Estadístico - Purificación de FOS con carbón- Efecto de la temperatura en el rendimiento y pureza de FOS	104
Anexo 8: Análisis Estadístico - Purificación de FOS con resinas - Efecto de la temperatura y tipo de resina sobre el rendimiento y pureza de FOS.....	106
Anexo 9: Análisis Estadístico - Efecto de la concentración del extracto o carga de la columna sobre el rendimiento y pureza de FOS	111

RESUMEN

En la presente investigación se estudió la purificación de los fructooligosacáridos (FOS) del yacón, utilizando carbón activado y diferentes resinas de intercambio catiónico. Los experimentos se realizaron por cromatografía a baja presión, empleado columnas de vidrio enchaquetadas (16 cm de longitud x 1.2 cm diámetro interno y 2.8 cm diámetro externo). Con columnas de carbón activado se evaluó la purificación a dos temperaturas (25 y 40°C) del extracto previamente clarificado, los mejores resultados se obtuvieron a 25°C lográndose aumentar la pureza del extracto clarificado de 50.6 a 92.1 por ciento con una recuperación de FOS de 75.1 por ciento. En el estudio de purificación con resinas de intercambio catiónico del extracto previamente clarificado y desmineralizado, se evaluó la influencia de la temperatura (25 y 60°C) y tipo de resina catiónica (Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK555 Ca, Diaion UBK530 Na, Dowex 99 Ca/320, Purolite PCR642 Ca, Purolite PCR642 K). Mediante un ANVA multifactorial se determinó que la interacción de estos dos factores tiene un efecto significativo en la purificación de FOS. Mejores resultados se obtuvieron a 60°C y con la resina Diaion UBK530 Na. Se logró aumentar la pureza del extracto clarificado y desmineralizado de 54.5 hasta 88.2 por ciento, con una recuperación de 99.4 por ciento. Esta investigación demuestra que las columnas empacadas con carbón activado o resinas de intercambio catiónico son una buena alternativa para la obtención de FOS de alta pureza, siendo necesario estudios de escalamiento para la aplicación de estas tecnologías a nivel industrial.

Palabras clave: yacón, purificación, fructooligosacáridos, carbón activado, resinas, cromatografía

SUMMARY

In this research the purification of fructooligosaccharides (FOS) yacon, using activated carbon and different cation exchange resins was studied. Experiments were performed by low pressure chromatography, used jacketed glass column (16 cm length x 1.2 cm internal diameter and 2.8 cm outside diameter). With activated carbon columns, purification at two temperatures (25 and 40 °C) of the extract previously clarified was evaluated, the best results were obtained at 25 °C achieving increase the purity of the clarified extract of 50.6 up to 92.1 percent with a recovery of FOS 75.1 percent. In the study of purification with cation exchange resins of the extract previously clarified and demineralized, the influence of the temperature (25 and 60 °C) and type of cationic resin was evaluated (Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK555 Ca, Diaion UBK530 Na, Dowex 99 Ca/320, Purolite PCR642 Ca, Purolite PCR642 K). Through a multivariate ANOVA it was determined that the interaction of these two factors has a significant effect on the purification of FOS. Best results were obtained at 60 °C and with the resin Diaion UBK530 Na. Was achieved increase the purity of the clarified extract and demineralised of 54.5 up to 88.2 percent, with a recovery of 99.4 percent. This research shows that the columns packed with activated carbon or cation exchange resins are a good alternative for obtaining high purity FOS, scaling studies being necessary for the application of these technologies at industrial level.

Key words: yacon, purification, fructooligosaccharides, activated carbon, resins, chromatography

I. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos no digeribles como: galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS) e inulina son considerados prebióticos debido a que no se hidrolizan ni se absorben en la parte superior del tracto digestivo, son fermentados por las bacterias del intestino grueso y estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas como las bifidobacterias y los lactobacilos (Bouhnik *et al.*, 2004; Rastall y Gibson, 2006).

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) es una raíz nativa de los andes, es conocida como una fuente importante de β -(2 \rightarrow 1) fructooligosacáridos (Goto *et al.*, 1995). Diversos estudios confirman el carácter prebiótico de este compuesto proveniente del yacón (Pedreschi *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2012), se suele consumir bajo la forma de jarabes para equilibrar la microflora intestinal, debido a sus ventajas prebióticas originadas por su alto contenido de FOS (Graefe *et al.*, 2004).

Comercialmente, los FOS son obtenidos por hidrólisis enzimática de la inulina (principalmente a partir de la achicoria) mediante la enzima endoinulinasa o por síntesis a partir de sacarosa, a través de la reacción de transfructosilación (Crittenden y Playne, 1996). Frente a ello, la raíz de yacón es una alternativa interesante, pues contiene alrededor de 50-70 por ciento de FOS en peso seco, además estas moléculas presentan bajo grado de polimerización (DP promedio de 4) (Chirinos, 1999).

Por tanto, el yacón podría ser un potencial prebiótico, pues no requiere de una operación intermedia de hidrólisis como en el caso de la inulina obtenida de la achicoria; sin embargo, el extracto de yacón, también contiene cantidades importantes de glucosa (G), fructosa (F) y sacarosa (S), cuyos contenidos dependen del genotipo (azúcares reductores y sacarosa 19.7-75 por ciento y 2-16.8 por ciento en base seca, respectivamente) (Campos *et al.*, 2012), los cuales reducen su actividad prebiótica. Por lo tanto es necesario evaluar técnicas que permitan separar los FOS de estos azúcares simples, y con ello obtener un producto que pueda ser empleado como aditivo prebiótico en la industria de alimentos.

Una manera conveniente de separar los sacáridos más pequeños de los FOS es mediante la cromatografía de adsorción con carbón activado (Kuhn *et al.*, 2010; Nobre *et al.*, 2012), donde los FOS son adsorbidos con mayor fuerza que la S, F y G. Para la elución se utiliza gradientes de etanol (Sanz *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006; Nobre *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2014), y los azúcares se eluyen de la columna de acuerdo a su polaridad. Otra técnica utilizada en la purificación de azúcares es la cromatografía de intercambio iónico, mediante resinas catiónicas de diferentes formas iónicas (Na^+ , K^+ y Ca^{+2}), estas resinas tienen mayor afinidad por monosacáridos y consecuentemente se eluyen primero los fructooligosacáridos (Vaňková, y Polakovič, 2010b; Nobre *et al.*, 2014); siendo los carbohidratos moléculas carentes de carga en un amplio rango de pH, el mecanismo real de separación no ocurre por intercambio de iones (Gramblička y Polakovič, 2007), sino que intervienen factores como la exclusión por tamaño, formación de complejos (entre los cationes de la resina y los azúcares), y la separación por partición (Goulding *et al.*, 1975; Vente *et al.*, 2005; Mostafazadeh *et al.* 2011; Nobre *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en el presente estudio se investigó la purificación de los FOS de yacón empleando carbón activado y seis diferentes resinas catiónicas.

Por ello se planteó como objetivos específicos:

- Estudiar la purificación de FOS del extracto clarificado de yacón mediante columnas de carbón activado, evaluándose dos temperaturas 25 y 40°C.
- Estudiar la purificación de FOS del extracto clarificado y desmineralizado de yacón en columnas de intercambio iónico, empleando diferentes resinas y dos temperaturas, 25 y 60°C.
- Determinar la influencia de la carga de columna en la purificación de FOS a partir del extracto desmineralizado de yacón, con el mejor tratamiento del experimento anterior.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. YACÓN

2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El yacón es una especie de la familia Asteraceae o Compositae, su nombre científico es *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl.) (Seminario *et al.*, 2003); su clasificación taxonómica se presenta a continuación:

Súper reino:	Eucariontes
Reino:	Plantae
Sub-reino:	Embriofita
Filo:	Tracofita
Superclase:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae (Compositae)
Género:	<i>Smallanthus</i>
Especie:	<i>sonchifolius</i> (Poepp. & Endl.)
Nombre común:	Yacón, Ilacon, aricoma, jícama (Santana y Cardoso; 2008)

2.1.2. PRODUCCIÓN DE YACÓN

En casi todos los departamentos del Perú se siembra yacón, siendo Amazonas, Cajamarca, Huánuco y Puno los lugares con mayor área sembrada. La siembra del yacón se inicia mayormente entre los meses de Setiembre a Noviembre, en la época de inicio de las lluvias; crece en suelos ricos en materia orgánica y de pH neutro a ligeramente ácido. Los requerimientos de agua son relativamente altos y su escasez puede afectar fuertemente el

rendimiento. La duración del ciclo de cultivo varía entre 6 y 12 meses (Manrique *et al.*, 2004).

La cosecha en las zonas bajas y templadas es temprana y en las zonas altas es tardía. Los indicadores para saber si ha llegado el momento de la cosecha son el amarillamiento de las hojas y el cese de la floración. En Cajamarca, la cosecha se realiza entre los 7.5 y 12 meses después de la siembra, dependiendo de la zona geográfica y del cultivar empleado (Seminario *et al.*, 2003).

En el territorio alto-andino la producción media de yacón es normalmente de 20 a 40 ton/ha de peso fresco (peso seco 10-14 por ciento) y en las cercanías de Cajamarca 40-50 ton/ha (Hermann *et al.*, 1999).

Con la cosecha de las raíces empieza un rápido proceso de conversión de los oligofructanos en azúcares simples. Así, con el fin de obtener productos con mayor contenido posible de fructooligosacáridos (FOS) es necesario procesar las raíces inmediatamente después de la cosecha o refrigerarlas para disminuir la tasa de degradación de los oligofructanos. Por otro lado, la costumbre tradicional de solear (exponer al sol) las raíces por unos días para que se vuelvan más dulces, acelera el proceso de conversión de oligofructanos en azúcares simples.

Las variaciones del contenido de FOS en el yacón pueden depender de factores como la localización, la agricultura, la estación de crecimiento, la época de la cosecha y la temperatura en la post-cosecha (Lobo *et al.*, 2007).

La tercera parte de los FOS del yacón se pierde durante el almacenamiento debido a la hidrólisis de la cadena de fructanos (12 días de almacenamiento a 15-25 °C, en una habitación oscura y bien ventilada), aumentando progresivamente el contenido de fructosa y glucosa durante el almacenamiento (Graefe *et al.*, 2004).

La raíz de yacón se oscurece rápidamente en almacenamiento, incluso a bajas temperaturas. Esta reacción de pardeamiento parece estar relacionado con el contenido de compuestos fenólicos del yacón, especialmente de ácido cafeico y clorogénico, también de la actividad polifenol oxidasa endógena (Neves y Da Silva, 2007).

2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL YACÓN

Una parte importante de la biomasa de la raíz está compuesto de agua, que por lo general es superior al 70 por ciento del peso fresco. Debido a un alto contenido de agua, el valor energético de la raíz es baja. El 70-80 por ciento de materia seca se compone de sacáridos, principalmente FOS; y un contenido de 0.3 a 3.6 por ciento de proteína (Goto *et al.* 1995; citado por Lachman *et al.* 2003). El reporte de varios estudios realizados sobre la composición química del yacón se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Composición química en base seca de la raíz de Yacón

Componentes (%)	Moscatto <i>et al.</i> (2007)	Lobo <i>et al.</i> (2006)	Ribeiro (2008)	Choque Delgado <i>et al.</i> (2012)
Humedad	7.49 ± 0.17	ND	8.09 ± 1.74	8.02 ± 0.08
Proteína	6.48 ± 0.15	2.64 ± 0.07	4.50 ± 1.26	2.45 ± 0.09
Lípidos	0.31 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.67 ± 0.19	0.87 ± 0.10
Cenizas	3.56 ± 0.02	3.85 ± 0.06	2.88 ± 0.13	2.53 ± 0.14
Fibra insoluble	ND	7.85 ± 0.17	11.79 ± 0.36	3.46 ± 0.12
Carbohidratos ^a	82.16	ND	ND	86.13
Calcio (mg/g)	ND	0.83 ± 0.01	0.22 ± 0.4	ND
Magnesio (mg/g)	ND	0.62 ± 0.09	0.40 ± 0.00	ND

ND: No determinado; ^a: Estimado por diferencia

FUENTE: Choque *et al.* (2013)

Castro *et al.* (2013) reportan un contenido de fibra dietaria total de 10.4 g/100 g de yacón en base seca (b.s), de los cuales 8.7 g pertenece a la fracción insoluble y 1.7 g a la fracción soluble. Debido a sus beneficios para la salud, los FOS se consideran ahora una fibra dietética y según la investigación anterior, el yacón contiene de 24 a 35 g de FOS/100 g de yacón en b.s y la cantidad de fructosa libre reportada fue de 16 a 23 g /100 g yacón en b.s. Así mismo, Campos *et al.* (2012) reportan de 7.5 a 19.1 por ciento de materia seca, de 19.7 a 75.9 por ciento de azúcares reductores, mientras que la sacarosa varía de 2 a 16.8 por ciento y los FOS se encuentran entre 6.4 a 65 por ciento en b.s.

El Cuadro 2 muestra el contenido de los carbohidratos solubles encontrado en el yacón, el contenido de fructosa libre es muy alta, alrededor de 35 por ciento de la materia seca y el contenido total de mono y disacárido (Fructosa + Glucosa + Sacarosa) representan el 58 por ciento de la materia seca. La estructura de los oligofruktanos en el yacón son fructanos del tipo inulina ($\beta - 1,2$), como en las otras plantas Compositae (Ohyama *et al.*, 1990).

Cuadro 2: Contenido de sacáridos en yacón raíces tuberosas

Sacárido	Contenido (mg/g de materia seca)
Fructosa	350.1 ± 42.0
Glucosa	158.3 ± 28.6
Sacarosa	74.5 ± 19.0
GF ₂	60.1 ± 12.6
GF ₃	47.4 ± 8.2
GF ₄	33.6 ± 9.3
GF ₅	20.6 ± 5.2
GF ₆	15.8 ± 4.0
GF ₇	12.7 ± 4.0
GF ₈	9.6 ± 7.2
GF ₉	6.6 ± 2.3
Inulina	13.5 ± 0.4

FUENTE: Ohyama *et al.* (1990)

Según el estudio anterior, el contenido de oligofruktanos disminuye gradualmente con el aumento del grado de polimerización de los fructanos. La inulina es detectada en la fracción insoluble con etanol al 80 por ciento, pero el contenido fue significativamente bajo, 13.5 ± 0.4 mg/g b.s.

Yan *et al.* (1999) determinaron la actividad antioxidante del yacón a partir de seis raíces diferentes e identificaron a dos principales antioxidantes: ácido clorogénico 48.5 ± 12,9 ug/g y L-triptófano 14.6 ± 7,1 ug /g (peso fresco). Mientras que, Takenaka *et al.* (2003) encontraron cinco diferentes derivados del ácido cafeico en las raíces de yacón como

principales compuestos fenólicos solubles en agua, todos ellos con propiedades antioxidantes.

2.1.4. EFECTOS FUNCIONALES DEL YACÓN

El yacón administrado como un suplemento dietético es bien tolerado y no produce respuesta negativa, toxicidad o efectos nutricionales adversos. Así, Genta *et al.* (2009) demostraron que el consumo diario de jarabe de yacón reducía significativamente el peso corporal, circunferencia de la cintura y el índice de masa corporal; también observaron un aumento en la frecuencia de defecación y saciedad.

El bajo contenido de glucosa y alta concentración de FOS del yacón, permiten el estudio en pacientes con enfermedades metabólicas, como diabetes y síndrome metabólico (Genta *et al.*, 2005). En este sentido, el yacón ha demostrado reducir los niveles de glucosa en ratas normales y diabéticas con hiperglucemia (Aybar *et al.*, 2001). A la vez, el consumo de yacón conduce a un aumento en los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que protegen contra el cáncer de colon (De Moura *et al.*, 2012).

El jugo de yacón contiene 850 ppm de compuestos polifenólicos, como: el ácido clorogénico que se considera como un antioxidante primario del yacón, triptófano y derivados del ácido cafeico (Takenaka *et al.*, 2003). Los compuestos fenólicos del yacón protegen biomoléculas como: ADN, lípidos y proteínas, contra el daño causado por los radicales libres (Simonovska *et al.*, 2003).

2.2. FRUCTOOLIGOSACARIDOS

2.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

En el grupo de fructanos se encuentran los FOS, la oligofructosa e inulina (Biedrzycka y Bielecka, 2004). Los fructanos consisten en moléculas de fructosa unidas entre sí, que pueden o no pueden tener residuo de glucosa en su configuración inicial, donde la primera unidad de la cadena es un extremo no reductor (Roberfroid, 2001; citado por Chacón, 2006). Por lo tanto, los fructanos son mezclas de ambas moléculas GF_n y FF_n, con $n > 2$; donde G

y F representan la glucosa y la fructosa, respectivamente, y “n” representa el grado de polimerización (Nobre, 2011).

Los FOS son polímeros cortos de fructosa, unidas entre sí por un enlace β (2 \rightarrow 1) que usualmente tienen una molécula de D-glucosa terminal unida a una fructosa por un enlace α -(2 \rightarrow 1), la naturaleza de estos enlaces tiene importantes implicaciones bioquímicas que se asocian a una marcada baja digestibilidad en el organismo (Perrin *et al.*, 2001). Están compuestos principalmente por kestosa (GF₂), nistosa (GF₃) y fructofuranosil nistosa (GF₄) como se muestra en la Figura 1.

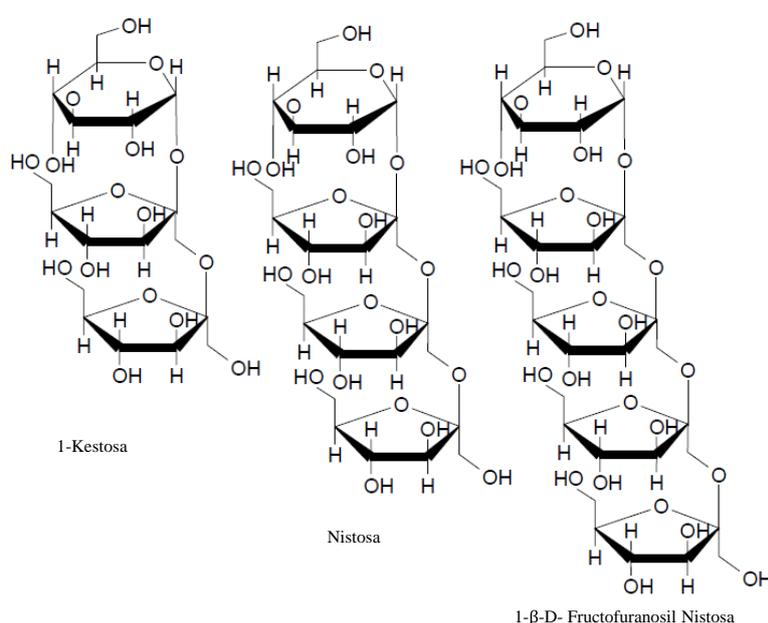


Figura 1: Estructura química de tres principales FOS

FUENTE: Lachman *et al.* (2003)

Tanto la inulina, como la oligofructosa y los FOS, presentan una estructura polimérica predominantemente lineal. Las diferencias radican en el grado de polimerización, siendo la inulina, el compuesto con mayor rango y promedio. Los FOS y la oligofructosa son muy similares, pero con diferencias estructurales asociadas a sus diferentes orígenes (hidrólisis enzimática de inulina para la oligofructosa y transfructosilación de sacarosa para los FOS). Las cadenas de oligofructosa son más largas que aquellas producidas por transfructosilación de la sacarosa. No todas las cadenas tienen una glucosa terminal en la oligofructosa, pero los FOS sí las tienen (Crittenden y Playne, 1996; citado por Madrigal y Sangronis, 2007). En el Cuadro 3, se presenta una comparación entre los tres fructanos.

Cuadro 3: Comparación entre inulina, oligofructosa y FOS

	Inulina	Oligofructosa	FOS
Origen	Extracción a partir de vegetal (Achicoria)	Hidrólisis enzimática de la inulina	Transfructosilación de la sacarosa
Rango GP	2-60	2-9	2-4
GP _{prom.}	10-12	4-5	3-7
Estructura química	Lineal (1-2% de ramificación)	Lineal	Lineal

FUENTE: Biedrzycka y Bielecka (2004), citado por Madrigal y Sangronis (2007)

2.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Los FOS son altamente higroscópicos; por ello es difícil mantener la estabilidad de los productos liofilizados en condiciones atmosféricas por largos períodos. La viscosidad de una solución de FOS es relativamente mayor que el de la sacarosa al mismo nivel de concentración, y la estabilidad térmica de los FOS también es mayor al de la sacarosa. Además, los FOS son muy estables en el rango normal de pH de los alimentos (4 a 7) y a temperaturas de refrigeración más de un año. Algunas propiedades como solubilidad, congelación y punto de ebullición de los FOS se asemejan al de la sacarosa (Yun, 1996).

Los oligosacáridos reflejan mayor estabilidad en condiciones neutras o básicas, y menor estabilidad a pH ácido. Los oligosacáridos protonados se hidrolizan más rápidamente a pH ácido que a valores de pH neutros o básicos (L'homme *et al.*, 2003). Bajo condiciones ácidas la hidrólisis de FOS es insignificante a 60 °C; sin embargo, a 70-80 °C es tan considerable, que la cantidad de ellos podría ser hidrolizada en 1-2 horas. Mientras tanto, todos los oligómeros se degradan en 1-1.5 horas a 90-100 °C (Matusek *et al.*, 2009).

Los FOS son susceptibles a la hidrólisis durante la pasteurización de zumos de frutas y bebidas. La cantidad de sacáridos hidrolizados es mayor cuanto menor es el pH (2.7 a 4.2), se producen mayores pérdidas en la fracción de tetrasacáridos (GF₃) que en el de trisacáridos (GF₂) (Klewicki, 2007; citado por Matusek *et al.*, 2009). Por otro lado, los oligofructanos presentan pesos moleculares muy variables según la fuente, pero en términos generales oscilan en el intervalo entre 1000 y 4500 Da (Losso y Hakai 1997).

Los azúcares son muy polares debido a la presencia de muchos grupos OH y no son solubles en disolventes orgánicos. Sin embargo, cuando se adoptan determinadas conformaciones, los oligosacáridos pueden generar superficies apolares que son capaces de interactuar con las soluciones y adsorbentes no polares (Yano *et al.*, 1988). La hidrofobicidad está relacionada con la extensión de restos de CH y -CH₂ y aumenta, con la extensión de la longitud de la cadena y esto ocurre cuando la configuración estereoquímica y el enlace glicosídico son favorables (Sundari y Balasubramanian, 1997). Por lo tanto, la hidrofobicidad de disacáridos y sacáridos superiores, aumentan con el número de unidades de monosacárido que constituyen el oligosacárido (Yano *et al.*, 1988).

Los grupos OH de los azúcares son polares y forman enlaces hidrógeno con el agua. La orientación estérica del grupo OH determina la capacidad de los azúcares para formar enlaces hidrógeno y enlaces complejos con otras sustancias. Los grupos OH son axial-ecuatorial (ax-eq) y la estabilidad del complejo formado por los azúcares, depende de las secuencias ax-eq. La sacarosa no tiene pares de grupos OH con orientación ax-eq (Nobre, 2011).

La sacarosa es un disacárido, que resulta de la combinación de una unidad de α -D-glucosa y una unidad de β -D-fructosa, unidas por un enlace glucosídico entre C1 en la subunidad de glucosilo y C2 en la unidad de fructosil. La sacarosa es también llamado β -D-fructofuranosil (2 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosil. Dado que la sacarosa no contiene grupos hidroxilo (OH) anoméricos, está clasificada como un azúcar no reductor (Nobre, 2011). Así mismo, debido a que los FOS son carbohidratos no reductores, no sufren reacción de Maillard y son solubles en etanol y agua (Van Loo *et al.*, 1999), se pueden utilizar para controlar el pardeamiento debido a reacciones de Maillard en los alimentos procesados por calor (Crittenden y Playne, 1996).

2.2.3. FUNCIONALIDAD Y APLICACION DE LOS FOS

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales ya que estas enzimas solo hidrolizan enlaces glucosídicos de tipo alfa. Los fructanos permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de la parte inferior del tracto gastrointestinal

(intestino grueso, colón) (Roberfroid, 2002). Como los FOS son oligosacáridos no digeribles, fomentan el crecimiento de las bifidobacterias e inhiben el crecimiento de microorganismos que tienen tendencia a causar la putrefacción en el colón (Yun, 1996). Las bifidobacterias promueven la absorción de calcio y la síntesis de vitamina B. Los fructanos presentan una tercera parte del dulzor de la sacarosa y aportan un valor calórico reducido (1.5 kcal/g) si se compara con los carbohidratos digeribles (4 kcal/g) (Slavin, 2003).

Los FOS son los oligosacáridos más estudiados y mejor implementado en el mercado europeo, presentan excelentes propiedades que permiten su incorporación como fibra en los alimentos líquidos a la vez que mejoran el sabor, la sensación en la boca y textura de los productos, ya que proporcionan una alta capacidad de retención de humedad, previenen la sequedad excesiva y reducen el contenido de actividad de agua, disminuye el desarrollo microbiano, y por lo tanto aumenta la vida en anaquel de los productos (Crittenden y Playne, 1996); se añaden a los alimentos en una dosis que varía entre 2 y 50 por ciento (Franck, 2002).

El grado de polimerización del fructano determina su solubilidad en agua, viscosidad, capacidad de retención de agua, así como la capacidad para formar una textura cremosa (Roberfroid y Delzenne, 1998). Por ejemplo, se puede usar sólo 0.25 g de inulina para sustituir 1g de grasa, debido a su cadena larga (Coussement, 1999). Por otro lado, los FOS son más solubles que la inulina (Niness, 1999). Los FOS se utilizan como sustitutos del azúcar, en alimentos dietéticos y diabéticos, bajos en calorías (Cummings *et al.*, 1997), también es usado parcialmente como sustituto del azúcar y se combinan con otros azúcares o edulcorantes con mayor intensidad, para no aumentar significativamente el contenido calórico del producto final (Coussement, 1999), además es usado como ingrediente de alimentos funcionales en galletas, productos de panadería, rellenos, bebidas, yogures, productos lácteos, cereales para el desayuno, tabletas, postres congelados, fórmulas infantiles, preparaciones de frutas, productos dietéticos y en edulcorantes (Manning y Gibson, 2004).

2.2.4. PRODUCCIÓN DE FOS

Los FOS representan uno de los principales oligosacáridos bifidogénicos en cuanto a su volumen de producción y se fabrican por dos procesos diferentes. El primer método consiste

en obtener FOS a partir de la sacarosa utilizando la actividad transfructosilación de la enzima β -fructofuranosidasa. Los FOS formados en este proceso contienen entre dos y cuatro unidades de fructosil $\beta(1\rightarrow2)$, enlazados a un terminal residual α -D-glucosa. Como sub productos de la reacción queda glucosa y pequeñas cantidades de fructosa, como también sacarosa sin reaccionar, estos oligosacáridos son removidos de la mezcla usando procedimientos cromatográficos para producir FOS de alta pureza (Crittenden y Playne, 1996).

El segundo método utilizado para la producción de FOS es la hidrólisis enzimática controlada de la inulina. La mezcla de FOS formado por este proceso se asemeja mucho a la mezcla producida por el proceso de transfructosilación. Sin embargo, no todas las cadenas fructosil $\beta(1\rightarrow2)$ están unidas a una glucosa terminal. Además, la mezcla de oligosacáridos contiene más cadenas de fructooligómeros que el producido por transfructosilación de sacarosa (Crittenden y Playne, 1996).

2.3. PURIFICACIÓN DE FOS

La mayoría de los FOS comercializados no son puros debido a los bajos rendimientos del proceso de producción industrial. Los productos comerciales tienen entre 55 a 99 por ciento de pureza. La presencia de otros azúcares en la mezcla disminuye su valor prebiótico e incrementa el valor calórico y cariogénico del producto final, por lo que se evita la inclusión de estos alimentos para diabéticos y en alimentos benéficos para la salud. Además, los FOS puros son esenciales para aplicaciones farmacéuticas y para evaluar sus propiedades físico-químicas y funcionales (por ejemplo, la actividad prebiótica *in vitro*) (Franck, 2002; Nobre, 2011).

En el caso de mezclas, es difícil separar los FOS de los carbohidratos. La tecnología de membranas, principalmente ultrafiltración y nanofiltración, ha sido utilizado por diversos autores para fraccionar y purificar los oligosacáridos (Pinelo *et al.*, 2009).

La cromatografía es un proceso para separar dos o más componentes, utiliza dos fases, una estacionaria y una móvil, las cuales se pueden ajustar para cada sistema de separación. La cromatografía es versátil y puede ser altamente selectivo; es aplicable a problemas de separación difíciles donde otros procesos de separación fallan. Debido a que, las demandas

de pureza aumentan, la cromatografía gana importancia como una operación unitaria para problemas de separación complejas (Beste *et al.*, 2000).

2.3.1. PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO

2.3.1.1. ADSORCIÓN

Una técnica ampliamente utilizada en la industria es la adsorción en lecho fijo, que consiste en la percolación a través de un lecho empaquetado en una columna vertical, de un fluido que contiene el soluto que se desea adsorber. En los procesos de adsorción, el soluto retenido se denomina adsorbato y el sólido sobre el que se retiene es el adsorbente o simplemente sorbente. Como adsorbentes se utilizan sólidos que tiene gran superficie de contacto, y en general, suelen ser porosos. Las fuerzas con las que el soluto es retenido pueden ser de tres tipos: electrostáticas, de Van der Waals y químicas. Las primeras son debidas a atracciones entre un soluto con cierta carga y puntos del adsorbente con carga contraria. Cuando las fuerzas son de Van der Waals, la adsorción se denomina física, y suele ser reversible. Sin embargo, la adsorción puede deberse a una reacción química entre el soluto y el adsorbente, denominándose quimisorción. Mientras que en la adsorción física el soluto puede ser retenido en cualquier punto de la superficie del sorbente, en la quimisorción el adsorbente presenta puntos activos sobre los cuales es retenido el adsorbato (Ibarz y Barbosa, 2005).

Tres pasos consecutivos de transporte de masa son asociados con la adsorción del soluto de la solución por el adsorbente poroso. Primero, el adsorbato migra a través de la solución hasta la superficie de la partícula, luego ocurre la difusión del soluto dentro de los poros internos y, finalmente, el soluto se adsorbe en los sitios activos del interior de la partícula adsorbente (Faust y Aly, 1987; citados por Tan *et al.*, 2008).

2.3.1.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL CARBÓN ACTIVADO

El carbón activado es un material adsorbente que, como su nombre lo indica, es materia carbonizada de origen vegetal o mineral. Se denomina “activado” debido a que la materia carbonizada presenta un elevado y variado grado de porosidad, una considerable superficie interna y un cierto contenido de grupos químicos superficiales principalmente de oxígeno y nitrógeno que le confieren la capacidad para adsorber ciertas sustancias. La capacidad de

adsorción del carbón se debe principalmente a sus características estructurales y su textura porosa que les da una gran área superficial, y su naturaleza química que puede ser fácilmente modificado por tratamiento químico a fin de aumentar sus propiedades (Babel y Kurniawan, 2003).

El carbón activo es el adsorbente más utilizado debido a que presenta un área de superficie grande en el orden de 800 a 1500 m²/g, de ahí que tiene una buena capacidad de sorción. El diámetro de los microporos es menor a 2 nm y el volumen entre 0.2 a 0.6 cm³/g (Bansal y Goyal, 2005).

La capacidad de adsorción se determina por la superficie total, la estructura de poros internos y la presencia de grupos funcionales en la superficie de poros (Ahmedna, 2000); donde el área superficial varía dependiendo de la materia prima y del proceso de activación (Moreno, 2004). Las materias primas más comunes para la producción comercial de carbones activados son antracita y hulla bituminosa, lignito, turba, materiales de madera, cáscaras de coco lignocelulósicos (Pollard *et al.*, 1992). La estructura química del carbón influye en la interacción con adsorbatos polares y no polares, y los sitios activos determinan el tipo de reacción química con otras moléculas (Bansal *et al.*, 1988). Adicionalmente, las condiciones de pirólisis/activación utilizadas influirán en el tamaño de partícula, densidad aparente, dureza, pH y ceniza (Gergova *et al.*, 1994).

2.3.1.3. PURIFICACION DE AZÚCARES

El área de superficie desarrollada en los poros del carbón es en realidad mucho mayor que el área superficial externa de las partículas, y en la mayoría de los azúcares la adsorción se produce en la superficie del poro (Nobre, 2011). El área superficial es no polar o hidrófobo; por lo tanto, cuando más hidrófobo sea el soluto, será mejor adsorbido (Abe *et al.*, 1983). La adsorción de los azúcares se debe a las fuerzas de Van der Waals, las cuales son reversibles (Hung *et al.*, 2005).

El carácter hidrófobo del azúcar está relacionada con la extensión de los grupos CH, por consiguiente los azúcares serán adsorbidos de acuerdo a su peso molecular, siempre que la configuración estereoquímica y el enlace glicosídico sean favorables (Sundari y Balasubramanian, 1997). Por lo tanto, los FOS se adsorben más sobre el carbón activado que

los sacáridos más pequeños como sacarosa, fructosa y glucosa, permitiendo su separación (Nobre, 2011).

El proceso más común que se utiliza para purificar los oligosacáridos con carbón activado se divide en tres pasos: a) el carbón activado se carga con la mezcla de oligosacárido; b) los compuestos no retenidos se lavan con agua pura; c) los azúcares adsorbidos se recuperan selectivamente usando un gradiente de etanol (Nobre *et al.*, 2012).

Al respecto, Sanz *et al.* (2005) señala que los azúcares se pueden desorber selectivamente usando diferentes porcentajes de agua/etanol. Los monosacáridos se recuperan utilizando agua o porcentajes pequeños de etanol; los disacáridos, porcentajes comprendidos entre 5 y 10 por ciento de etanol y los oligosacáridos utilizando 15 a 50 por ciento de etanol. De acuerdo al método 954.11 (AOAC, 1995) la desorción se realiza con diferentes proporciones de etanol: 1 por ciento para monosacáridos, 5 por ciento para disacáridos y 50 por ciento para oligosacáridos.

Así, Yun (1996) señala que se han utilizado columnas de carbón-celite para separar los diferentes componentes de FOS con una elución en gradiente de etanol. Hidaka *et al.* (1988) purificaron GF₂ y GF₃ en una columna de carbón activado y luego purificaron las moléculas de GF₄ utilizando cromatografía preparativa por HPLC. Kaplan y Hutkins (2000) purificaron FOS de una mezcla comercial; eluyendo la glucosa y fructosa con agua destilada, la sacarosa con etanol al 5 por ciento y los FOS con etanol al 15 por ciento.

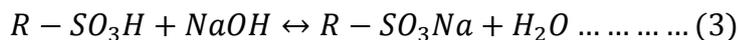
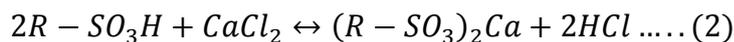
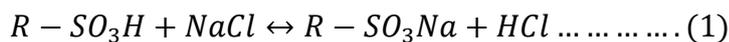
Así mismo, Kuhn y Maugeri (2010) purificaron FOS a partir de una mezcla de azúcares utilizando una columna de lecho fijo de carbón activado a 50°C con etanol al 15% como eluyente alcanzando 80 por ciento de recuperación de FOS con 97.8 por ciento de pureza. La eficiencia de separación entre fructosa, glucosa y FOS fue buena; sin embargo fue baja entre sacarosa y FOS. Kuhn *et al.* (2014) evaluaron la influencia de la temperatura, concentración de etanol y tipos de elución: gradiente lineal y escalonado, en la eficiencia de separación y pureza de fructooligosacáridos. Los autores obtuvieron 94 por ciento de pureza y 3.03 de eficiencia de separación mediante una elución por etapas utilizando dos soluciones de etanol 3.5 y 15 por ciento (v/v) a 40°C.

2.3.2. PURIFICACIÓN DE FOS RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

2.3.2.1. PROCESOS DE INTERCAMBIO DE IONES

El intercambio iónico consiste en la sustitución de iones de una disolución por otros contenidos en las resinas de intercambio de iones. Se puede considerar al intercambio iónico como una adsorción química, en la que el intercambio de iones se realiza sobre puntos definidos de la resina (Ibarz, 2005).

Las reacciones (1) y (2) son reversibles por lo que existe un equilibrio en las operaciones por batch. Sin embargo, se puede intercambiar cationes de manera efectiva cuando se pasa la solución objetivo a través de una columna repleta de la resina (Diaion, 2008).



Dónde:

R : Matriz de la resina

SO_3^- : Ión fijo

H^+ : Ión intercambiable

El fenómeno de intercambio iónico se explica a través de las siguientes etapas: (1) Difusión del ion móvil desde la fase líquida hasta la superficie de la resina. La agitación en batch o el paso a través de una columna, ayudan a llegar al ión móvil a la resina (2) difusión del ión móvil en el interior de la resina, hasta encontrar el grupo activo en donde se realizará el intercambio de iones (3) proceso de intercambio de iones, intercambio químico entre el catión móvil de la fase líquida y el catión intercambiable de la resina, es la etapa más rápida a comparación de las otras (4) difusión de los iones intercambiables hacia la superficie de la resina (5) los iones intercambiables se difunden en la disolución. La etapa más lenta será la que gobierne la velocidad de intercambio. El cambio iónico es un fenómeno fundamentalmente de difusión (Valcárcel y Gómez, 1988). Sin embargo, algunos trabajos han considerado el intercambio iónico como un proceso de adsorción, mientras que otros lo ven como un proceso de intercambio de iones (Borba *et al.*, 2011).

Las resinas de intercambio catiónico adsorben todo tipo de cationes, pero la capacidad de adsorción varía con el tipo de resina. Se describe la fuerza de adsorción como la selectividad. En iones típicos, la selectividad es proporcional a la valencia (Por ejemplo, $\text{Na}^+ < \text{Ca}^{++} < \text{Al}^{+++} < \text{Th}^{++++}$). Cuando el número de valencia es el mismo, la selectividad aumenta según aumenta el peso atómico ($\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$, $\text{Mg}^{++} < \text{Ca}^{++} < \text{Sr}^{++} < \text{Ba}^{++}$) (Diaion, 2008).

2.3.2.2. RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

Se fabrican mediante la introducción de grupos funcionales como ácido sulfónico ($-\text{SO}_3^-$) y amonio cuaternario ($-\text{NH}_4^+$) a la matriz de un polímero reticulado, cuya estructura es tridimensional con cadenas de poliestireno elástico reticuladas con divinilbenceno (DVB) en longitudes e intervalos irregulares (Figura 2). La reticulación aumenta el peso molecular de la longitud de la cadena del polímero, con lo cual disminuye la solubilidad del polímero y aumenta su estabilidad mecánica (Luz *et al.*, 2008, Fritz y Gjerde, 2009). Los grupos de ácido sulfónico ($-\text{SO}_3^-$), están enlazados químicamente a la matriz de la resina y las resinas tienen alta concentración de cargas fijas negativas, estas cargas negativas se balancean por medio de contraiones móviles como H^+ , Na^+ ó Ca^{2+} para las resinas de intercambio de cationes (Mc Cabe *et al.*, 2007). Los grupos funcionales se denominan "iones fijos" porque están unidos químicamente a la estructura del polímero. Por el contrario, los iones móviles que son neutralizados eléctricamente se denominan iones fijos (Diaion, 2008). Los productos industriales estándar son de forma esférica, con diámetros de 300-1180 μm (50-14 mesh).

2.3.2.3. TIPOS DE RESINA

Las resinas de intercambio iónico están clasificadas de acuerdo a su funcionalidad en (a) resinas de intercambio catiónico las cuales pueden intercambiar cationes y (b) resinas de intercambio aniónico para el intercambio de aniones. A la vez, las resinas de intercambio catiónico se clasifican en resinas de intercambio catiónico de ácido fuerte y de ácido débil (Diaion, 2008). Las resinas de ácido fuerte son más comúnmente utilizados para las separaciones de azúcar a nivel industrial, por lo cual son las más investigadas (Nobre *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2010; Saari *et al.*, 2010; Pedruzzi *et al.*, 2008; Gramblicka y Polakovic, 2007).

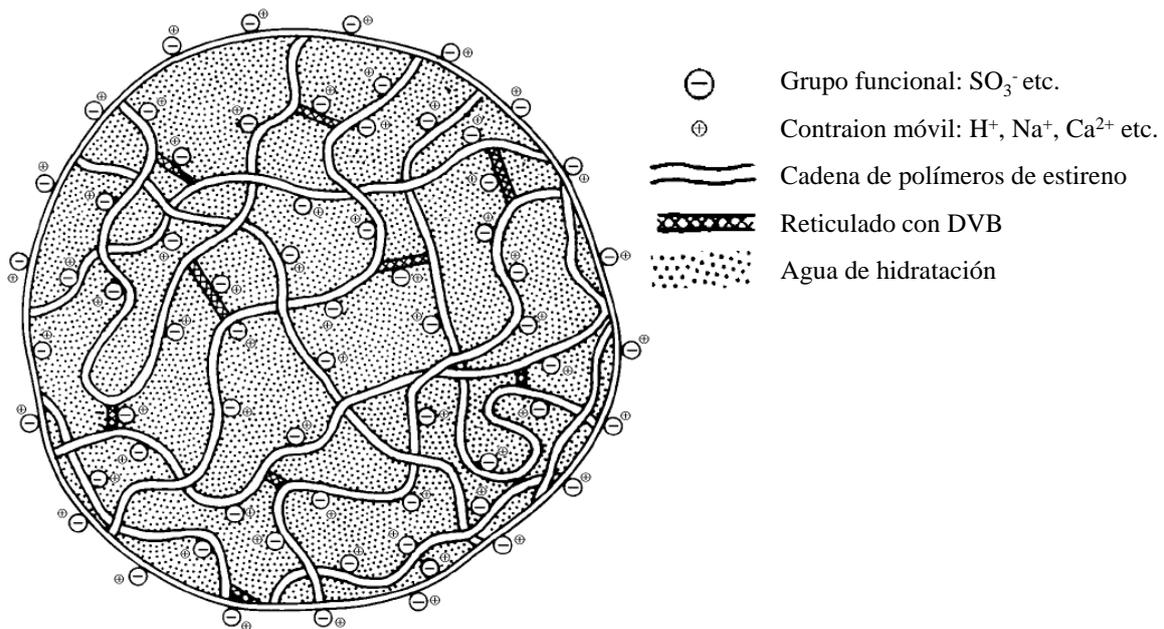


Figura 2: Modelo estructural de resina de intercambio catiónico

FUENTE: Adaptado de Diaion, (2008)

En las resinas de intercambio catiónico ácido fuerte, debido a la presencia del grupo del ácido sulfónico ($-\text{SO}_3\text{H}$), fuertemente ácido, se disocia no sólo en soluciones alcalinas, sino también en soluciones ácidas ($-\text{SO}_3\text{H}^+$). Este grupo $-\text{SO}_3^-$ actúa como un ion fijo y el H^+ como un contraion o ion móvil, estas resinas pueden intercambiar sus contraiones con sales neutras o con bases y en todo el rango de pH (Diaion, 2008). Las resinas de intercambio catiónico ácido débil tienen grupos de ácidos carboxílicos (COOH) como grupos de intercambio iónico. Dado que estos grupos son débilmente ácidos, no se disocian en iones de soluciones ácidas, no pueden dividir sales neutras, como NaCl y Na_2SO_4 . Sin embargo, pueden intercambiar cationes con bases como NaOH y ácidos débiles como NaHCO_3 (Dardel, 2013).

Las resinas también son clasificadas de acuerdo al contenido de DVB, en resinas tipo gel o microporosas y resinas macroporosas (Dardel, 2013). Las resinas de tipo gel tienen microporos, normalmente contienen menos de 12 por ciento de DVB, son suaves, compresibles, de apariencia transparente y estructura de gel, pueden hincharse con el disolvente apropiado, pero a la vez, estas propiedades pueden restringir su uso en aplicaciones cromatográficas donde la contrapresión puede alcanzar valores altos (Abrams y Millar, 1997; Sherrington, 1998). Las resinas macroporosas tienen una gran cantidad de

macroporos en la matriz del polímero, contienen más de 20 por ciento de DVB, presenta áreas específicas mucho más grandes que la del tipo gel, su estructura porosa es permanente y no se contrae. Debido a su alto contenido de DVB, son resistentes a la degradación causada por choque osmótico y la oxidación (Abrams y Millar, 1997; Sherrington, 1998; Diaion, 2008).

2.3.2.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Realizar la separación de azúcares a temperatura superior a la del ambiente, es de interés para la industria alimentaria, con el fin de prevenir el crecimiento microbiológico. Efectos positivos adicionales son la disminución de la viscosidad y el aumento de la solubilidad de los componentes en el disolvente (Beste *et al.*, 2000).

El efecto de la temperatura en el equilibrio de adsorción de azúcar sobre resinas tipo gel, usando una sola mezcla de componentes de azúcares ha sido publicado por diversos investigadores (Pedruzzi *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2009; Mostafazadeh *et al.*, 2011), reportando una disminución en la capacidad de adsorción a altas temperaturas.

Una alta concentración de azúcar conduce a un aumento de la viscosidad de la fase móvil, con el consiguiente aumento en la caída de presión y una disminución en la solubilidad de los azúcares. Como resultado, muchos autores han utilizado temperaturas por encima de 70°C para promover una disminución de la viscosidad y un aumento de la solubilidad (Azevedo y Rodrigues, 2001; Luz *et al.*, 2008; citado por Nobre, 2011).

En un estudio sobre separación de fructosa y glucosa realizado por Beste *et al.* (2000), mencionan que un cambio de temperatura afecta la termodinámica y la transferencia de masa. La constante de equilibrio de la glucosa aumenta con la temperatura, mientras que la constante de equilibrio de la fructosa disminuye a 60°C y aumenta de nuevo a 80°C. Los coeficientes de transferencia de masa de ambos componentes aumentan con la temperatura.

2.3.2.5. PURIFICACION DE AZÚCARES

El mecanismo real de intercambio de iones se da en los procesos de desmineralización de agua, sin embargo en la separación de sacáridos ningún intercambio de iones se lleva a cabo

debido a la electroneutralidad de los azúcares en un amplio rango de pH (Gramblička y Polakovič, 2007) más bien el mecanismo de separación involucrado en la purificación de FOS con resinas de intercambio de cationes se basa principalmente en tres fenómenos: exclusión por tamaño, adsorción por partición e intercambio de ligando basado en la formación de complejos entre los sacáridos y los iones funcionales del intercambiador de iones (Goulding *et al.*, 1975; Churms, 1996; Stefansson y Westerlund, 1996; Mostafazadeh *et al.* 2011; Vente *et al.*, 2005).

Varios factores influyen en la separación de FOS a partir de una mezcla de azúcares, como la elección de la resina catiónica comercial (Diaion, Dowex, Purolite, Amberlite, Lewatit, etc), sea de tipo gel o macroporosa, la forma iónica de la resina (Na^+ , K^+ , Ca^{+2}), el porcentaje de divinilbenceno en la resina catiónica para la formación de microporos, la temperatura del sistema de purificación, etc.

El uso de resinas de intercambio catiónico permite la separación de carbohidratos muy similares, tales como isómeros, y muestra un alto potencial para separar los FOS (Nobre, 2011). En las separaciones de azúcares, se han aplicado mayormente las resinas de intercambio catiónico ácido fuerte tipo gel, que las resinas macroporosas. Las resinas de tipo gel pueden hincharse, y por tanto, su capacidad de retención de agua es mayor en comparación con las resinas macroporosas, de lo cual resulta una cinética de difusión más rápida (Abrams y Millar, 1997; Sherrington, 1998). La reticulación de la resina disminuye su elasticidad. Por tanto, la capacidad de hincharse y retener agua, la partición disminuye. El número de hidratación de los contraiones aumenta con la valencia iónica (Tiihonen *et al.*, 2002). En consecuencia, los cationes univalentes sólo forman complejos débiles con azúcares. En contraste, los iones con mayor número de valencia pueden formar complejos fuertes con los azúcares. Sin embargo, la absorción de agua disminuye con el aumento de la valencia iónica (Tiihonen *et al.*, 1999).

Al respecto Mostafazadeh *et al.* (2011) señala que en las resinas de tipo gel en forma de calcio forman complejos más fuertes con la fructosa que con la glucosa. Por otro lado, Nobre *et al.* (2009) compararon el equilibrio de adsorción de fructosa, glucosa y sacarosa en una resina tipo gel en forma de K^+ y una resina macroporosa en forma de Na^+ ; la resina tipo gel K^+ mostró mejor selectividad para la separación de los tres azúcares.

Por otro lado, los contraiones son capaces de formar complejos con los grupos OH de los azúcares. La fuerza del complejo formado dependerá de la hidratación y del radio iónico del contraión y del número y orientación del grupo OH (Angyal, 1989; Tiihonen *et al*, 2002). Sin embargo, la conformación del azúcar y el contraión involucrado determinan la afinidad del catión por el azúcar, y, en consecuencia, el grado de adsorción. La estabilidad del complejo formado depende del número de pares OH orientados de manera axial-ecuatorial (ax-eq). La fructosa tiene más pares que la glucosa, por lo que se espera sea más adsorbido. La sacarosa y los FOS no tienen grupo ax-eq orientado, por lo que son excluidos de la resina. Como resultado, la separación de azúcares de gran tamaño molecular se produce principalmente por exclusión de tamaño (Nobre, 2011).

La separación de la glucosa a partir de fructosa es el proceso de separación de azúcar más conocido. Los cationes calcio forman complejos fuertes con la fructosa y permiten la separación de isómeros (Beste *et al.*, 2000). Sin embargo, el mecanismo de separación con contraiones monovalentes proporciona velocidades de adsorción más altas en comparación con las resinas que forman complejos fuertes con azúcares (Nobre, 2011).

Vente *et al.* (2005) estudiaron la influencia de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , como contraiones de una resina catiónica, en el equilibrio de adsorción de mono y disacáridos, que son relevantes para la separación de oligosacáridos. Los resultados mostraron que la resina en su forma de Ca^{2+} proporciona un valor alto de selectividad para la separación fructosa/oligosacáridos, debido a los complejos formados con fructosa. Mientras que para la separación de glucosa/oligosacáridos, todas las resinas estudiadas presentaron la misma selectividad. Sin embargo, la resina en forma de K^+ tiene una alta capacidad comparada con las resinas Na^+ y Ca^{2+} . Por lo tanto, la resina K^+ parece ser más adecuado para la separación prevista.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBT) área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIA PRIMA

Las raíces de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) fueron adquiridas del Mercado Mayorista N° 2 de Frutas, ubicado en el distrito de La Victoria- Lima.

3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1. MATERIALES

- Columna Shodex Asahipak (Modelo NH2P-40 3E, 3 mm diámetro interno x 250 mm, Japan) y precolumna Shodex (Modelo NH2P-50G 3A, 3 mm diámetro interno x 10 mm, Japan)
- Columna de vidrio con chaqueta de protección térmica (16 cm de longitud x 1.2 cm diámetro interno y 2.8 cm diámetro externo) para la cromatografía de baja presión en la purificación de fructooligosacáridos (FOS).
- Columnas (13 cm de longitud x 2.5 cm de diámetro) para la cromatografía de baja presión en la desmineralización del extracto de yacón.
- Dispensador automático de 0.5-5 ml; 1-10 ml (Brand, USA)
- Filtros jeringa de membrana de PVDF Millipore (0.22 µm de poro y 13 mm de diámetro).
- Material de vidrio en general: embudo Büchner, matraces Kitasato, matraces Erlenmeyer, fiolas, probetas, tubos de ensayo, tubos para el colector de fracciones, vasos de precipitado, entre otros.

- Micropipetas de 20-200 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL (Brand, USA).

3.3.2. REACTIVOS

- Ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (p.a. Sigma, USA)
- Acetato de sodio (p.a. Merck, Alemania)
- Ácido fosfórico 85 por ciento (p.a. J.T. Baker, USA)
- Acetonitrilo (grado HPLC. J.T. Baker, USA)
- Ácido acético glacial (p.a. J.T. Baker, USA)
- Alcohol etílico (p.a. J.T. Baker, USA)
- Bisulfito de sodio (Mallinckrodt, México)
- Carbón activado granular (12 x 40; 1.68 x 0.42 mm; Cabot- Norit)
- Cloro (con 4% de hipoclorito de sodio)
- Cloruro de calcio (p.a. Merck, Alemania)
- Cloruro de potasio (p.a. Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio (p.a. Merck, Alemania)
- Enzima Inulinasa (I6285, Sigma)
- Enzima Invertasa (M6130, Sigma)
- Fenol (p.a. Mallinckrodt)
- Fructosa (Sigma, USA)
- Glucosa (Fermont, México)
- Hidróxido de calcio (p.a. Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio (p.a. J.T. Baker, México)
- Sacarosa (p.a. Merck, Alemania)
- Tartrato de sodio y potasio (Scharlau, España)
- Resinas Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK555 Ca, Diaion UBK530 Na (Mitsubishi Chemical, Japón)
- Resina Dowex 99 Ca/320 (DOW Chemical, USA)
- Resina Purolite PCR642 Ca, Purolite PCR642 K (Purolite, USA)
- Resina Lewatit Monoplus M600 Cl, Lewatit Monoplus S108 Na (Lewatit, Alemania)

3.3.3. EQUIPOS

- Agitador magnético (Cat, Modelo M6, Alemania)

- Agitador vórtex (VELP científica, modelo F202A0175, Europa)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2140, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS, modelo Scout, China)
- Baño de recirculación con termostato de inmersión (Julabo, modelo ED V.2, Alemania)
- Baño maría con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand. Modelo ME2C, Alemania)
- Bomba peristáltica (Master Flex L/S, modelo 7523-70, USA)
- Cabina de secado con flujo de aire recirculado (Fravill, Perú)
- Centrifuga (Hettich. Modelo Mikro 20, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa, Perú)
- Colector de fracciones (Eldex, modelo UFC, USA)
- Colorímetro (Konica Minolta, modelo CR- 400/410, Japón)
- Concentrador al vacío (Labconco, Kansas USA)
- Conductímetro (Thermo Scientific, Orion Star A212)
- Congelador (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo de fase líquida de Alta Performancia (HPLC) (Waters Associate, modelo 2695) con detector de Índice de Refracción (Waters Associates, modelo 2414.)
- Desgasificador (Bransonic Ultrasonic Corporation, modelo 3510R-DTH, USA)
- Espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, modelo 4001/4, USA)
- Estufa al vacío (VWR, modelo Shellab 1400 E-2, USA)
- Incubador orbital (Incubated shaker Jeio Tech, modelo SI-300, Corea)
- Licuadora (Oster, modelo 4655-053, México)
- Mufla (Griffin & George, Bretaña)
- Potenciómetro digital (Thermo Orion, modelo 410, USA)
- Refractómetro de mano 0-32 Brix (VWR, BX Series, N°12777-982)
- Refractómetro de mano 28-62 Brix (Schmidt + Haensch 51491)
- Refrigerador (LG, modelo GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph, modelo Heizbad HB digit, Alemania)
- Selladora (Machintek, modelo KF-300H)
- Sistema de agua ultra pura (Simplicity UV Millipore, modelo SIMSV0000, Francia)
- Tamiz ASTM N° 35 (W.S. Tyler, USA)
- Tamiz de malla N°18

- Turbidímetro (WTW Turb 555, Serie 308763, USA)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se fundamenta en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa de secado al vacío a 65°C según el método 925.45-A de la AOAC (1995).

3.4.2. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

Se determinó el contenido de sólidos solubles en los extractos de yacón (bruto, clarificado y desmineralizado) por el método 932.14-C de la AOAC (1995), reportándose los resultados en grados Brix. Se colocó unas gotas del extracto de yacón sobre el prisma del refractómetro de mano, previamente calibrado con agua destilada y una solución de sacarosa conocida (p/p). La escala de medición muestra el porcentaje de concentración de los sólidos solubles totales contenidos en el extracto de yacón.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE pH

Se determinó el pH en los extractos de yacón de acuerdo al método 981.12 de la AOAC (1990). Para obtener los valores de pH se utilizó un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. Las mediciones fueron realizadas directamente sobre los extractos a 25°C.

3.4.4. DETERMINACIÓN DE COLOR

Se determinó el color de los extractos de yacón, utilizando un colorímetro de refracción (Minolta) mediante el método CIELAB, donde L* es la luminosidad que varía de 0 (negro) a 100 (blanco), a* que varía de rojo (+a*) a verde (-a*), y b* que varía de azul (+b*) a amarillo (-b*). Las muestras fueron colocadas en una cubeta transparente y se empleó agua destilada como patrón o blanco de comparación. La medición de color se expresó como la diferencia total de color (ΔE) entre la muestra y el agua destilada, según la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2]^{0.5}$$

$$\Delta a = a_{muestra} - a_{blanco}$$

$$\Delta b = b_{muestra} - b_{blanco}$$

$$\Delta L = L_{muestra} - L_{blanco}$$

3.4.5. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica se define como la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones (NMX, 2000). El valor de conductividad se relaciona con el grado de mineralización del agua y con la cantidad de sólidos disueltos en una solución. Una conductividad menor a $5 \mu S/cm$ nos indica que el agua es pura.

Para realizar esta determinación se utilizó un conductímetro previamente calibrado con una solución de cloruro de sodio certificado, y se realizaron las mediciones colocando directamente el sensor de conductividad en los extractos de yacón. Esta determinación también se utilizó en la regeneración de las resinas de intercambio catiónico. El equipo muestra valores de conductividad en unidades de mili Siemens (mS/cm) y micro Siemens ($\mu S/cm$). Las mediciones fueron realizadas a $25^\circ C$.

3.4.6. DETERMINACIÓN DE TURBIDEZ

La turbidez es producida por partículas de diferentes tamaños como sustancias en suspensión, que absorben o dispersan la luz (a mayor dispersión de luz corresponde una mayor turbidez), produciendo el característico aspecto turbio o lechoso (NMX, 2001). Para realizar esta determinación se utilizó un turbidímetro calibrado con sus respectivos estándares, se midió la turbidez a los extractos bruto, clarificado y desmineralizado, esta lectura de turbidez se expresó en unidades nefelometrías de turbidez (NTU).

3.4.7. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Es un método colorimétrico, el cual se basa en la reacción entre el ácido 3,5 dinitrosalicílico y el grupo reductor de la fructosa o glucosa, formando un compuesto de color marrón cuya

intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes. Durante este proceso, el grupo aldehído del azúcar reductor se oxida en su respectivo ácido carboxílico.

Los azúcares reductores fueron calculados mediante una curva estándar de fructosa. Se utilizó el método DNS como análisis de rutina, para cuantificar la concentración de azúcares reductores en cada fracción colectada al final de la purificación de FOS. El procedimiento de determinación de azúcares reductores según el método Miller (1959) se detalla en el Anexo 1.

3.4.8. DETERMINACIÓN DE FOS POR HIDRÓLISIS ÁCIDA

La determinación de FOS por medio de una hidrólisis ácida se realizó como una forma de determinación rápida pero aproximada para la cuantificación de FOS (Chirinos, 1999); lo que justifica dado el gran número de fracciones separadas mediante la cromatografía y que fueron analizadas. El procedimiento se basa en que la hidrólisis ácida libera glucosa y fructosa de las moléculas de sacarosa y FOS los que fueron cuantificados como azúcares reductores mediante el método DNS (Miller, 1959).

La hidrólisis ácida se realizó en un tubo de ensayo con 400 μ l de muestra más 100 μ l de solución de HCl 2N, durante 5 min en baño maría en ebullición. Se prosiguió con la reacción de DNS, obteniéndose la cantidad de azúcares reductores totales. También se determinó los azúcares reductores en la muestra sin hidrolizar. La diferencia, de azúcares reductores totales y azúcares reductores iniciales, nos proporcionan la cantidad aproximada de FOS más sacarosa presente en cada fracción. En el Anexo 2 se detalla este procedimiento.

3.4.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA, FOS

Se determinó el contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS usando el procedimiento señalado por Jaime *et al.* (2001), con algunas modificaciones (Campos *et al.*, 2009).

El método para la determinación de FOS está basado en un tratamiento enzimático con una mezcla de inulinasa e invertasa. Para esto se tomó 1.4 ml de cada fracción colectada obtenida de la salida de la columna de purificación de FOS, y se añadió 100 μ l de la mezcla de enzimas

al cual se le nombró muestra hidrolizada. Paralelo a esto, a 1.4 ml de la misma fracción se le añadió 100 ul de enzima inactiva y se le denominó muestra no hidrolizada. Posteriormente, las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas se llevaron a baño maría a 60 °C con agitación durante 3 horas.

Pasado este tiempo, las muestras pasaron por filtros de membrana de PVDF Millipore antes de ser inyectadas al equipo de Cromatografía líquida de alta perfomancia HPLC 2695 (Waters), equipado con un autoinyector, un detector de índice de refracción (IR 410), una columna Shodex (3 x 250 mm) y el software Empower. La fase móvil consistió en acetonitrilo al 72.5 por ciento (v/v), a un flujo de 0.35 ml/min., durante 45 min para las muestras no hidrolizadas y 15 min para las muestras hidrolizadas.

Se cuantificaron e identificaron los azúcares mediante la comparación de sus tiempos de retención con estándares conocidos e inyectados previamente. Para esto se emplearon curvas de calibración de fructosa, glucosa, y sacarosa a diferentes concentraciones (0.125; 0.25; 0.5 y 1 por ciento). El contenido de FOS se hizo en base al contenido de glucosa, fructosa y sacarosa y fue calculada de acuerdo a lo reportado por Prosky y Hoebregs (1999) según las ecuaciones:

$$G = \left(G_H - G_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right) * FC$$

$$F_T = \left(F_H - F_{NH} - \left(\frac{S}{1.9} \right) \right) * FC$$

Donde:

G_T : Glucosa (g/100ml)

G_H : Glucosa proveniente de la muestra hidrolizada (g/100ml)

G_{NH} : Glucosa proveniente de la muestra no hidrolizada (g/100ml)

$\frac{S}{1.9}$: Fructosa liberada de la sacarosa (S)

FC : Factor de corrección equivalente a (1.5/1.4)

F : Fructosa (g/100ml)

F_H : Fructosa proveniente de la muestra hidrolizada (g/100ml)

F_{NH} : Fructosa proveniente de la muestra no hidrolizada (g/100ml)

El contenido de fructanos es la suma de G y F, corregido para la pérdida de agua durante la hidrólisis:

$$FOS_{Total} = K(G + F); \quad K = 0.925$$

3.4.10. CARGA DE COLUMNA

La carga de la columna está definida como la relación de la masa total del sacárido en la alimentación y la masa del adsorbente seco en la columna (Vaňková y Polakovič, 2010b).

$$CC = \frac{(Masa\ total_{F,G,S\ y\ FOS})}{Masa\ del\ adsorbente} * 100\%$$

3.4.11. NÚMERO DE PLATOS O CANTIDAD TEÓRICA DE PLATOS (N)

Considerando que los picos son simétricos y presentan una forma Gaussiana, se utilizó el número de platos teóricos como una medida cuantitativa de la eficiencia de la columna cromatográfica. Es determinado para cada pico cromatográfico según la siguiente ecuación (Skoog *et al.*, 2009).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Donde:

N : Número de platos

t_R : Tiempo de retención de la muestra

W : Ancho del pico cromatográfico en minutos

3.4.12. ALTURA DE PLATO (H)

La altura de plato es otro término a fin a la cantidad de plato, se suele utilizar como medida para determinar la eficiencia de la columna y está dada por la ecuación:

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde:

H : Altura de plato

L : Longitud del relleno de la columna (cm)

3.4.13. RESOLUCIÓN (R_s)

La resolución de una columna señala qué tan separados están dos picos en relación con sus anchos. Todos los términos del segundo miembro de la ecuación se definieron del cromatograma.

$$R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)}$$

Donde:

t_R : Tiempo de retención del compuesto A, B

W : Ancho del pico cromatográfico en minutos

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación se dividió en tres etapas:

- Obtención del extracto clarificado y extracto desmineralizado a partir de la harina de yacón.
- Purificación de FOS a partir del extracto clarificado mediante carbón activado.
- Purificación de FOS a partir del extracto clarificado y desmineralizado mediante resinas de intercambio catiónico.

3.5.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE YACÓN

La obtención de harina de yacón se realizó según la metodología propuesta por Juárez (2015). A continuación, se describe la secuencia de operaciones realizadas para la obtención de harina de yacón, y en la Figura 3 se muestra dicha secuencia de operaciones.

a. Selección

En esta primera etapa se eliminaron las raíces que mostraron algún daño físico o microbiológico.

b. Lavado/Desinfección

Se lavaron las raíces con agua potable para eliminar los residuos de tierra, y la desinfección se realizó con una solución de 200 ppm de cloro por 10 min.

c. Cortado

La raíz de yacón se cortó en rodajas de aproximadamente 5 mm de espesor.

d. Blanqueado

Se realizó por inmersión en agua caliente ($98 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 6 min con una relación materia prima (MP): agua de 1:5. Esta operación se realizó con el fin de inactivar las enzimas presentes en las raíces de yacón, como la peroxidasa y la polifenol oxidasa, las cuales están relacionadas con el pardeamiento, y la fructano 1-exohidrolasa, vinculada a la hidrólisis de los FOS (Juárez, 2015).

e. Acondicionamiento

Las rodajas blanqueadas fueron sumergidas en una solución de CaCl_2 al uno por ciento durante 5 min, en una relación materia prima: solución CaCl_2 de 1:4. En esta operación se empleó una sal con la finalidad de dar firmeza a los tejidos mediante la formación de pectatos de calcio y favorecer la salida del agua durante el secado (Fellows, 2000; Padilha *et al.*, 2009 citados por Juárez, 2015).

f. Secado

Las rodajas fueron secadas a 65°C en un secador de cabina con flujo de aire recirculado, con una velocidad de aire de 1.5 m/s por 16 horas aproximadamente. La presente operación se detiene cuando el producto alcanza una humedad aproximada de 5 por ciento.

g. Molienda

Las hojuelas deshidratadas se molieron y pasaron por un tamiz N° 35 ASTM (luz de malla equivalente a 0.5 mm).

h. Almacenamiento

La harina obtenida se conservó en bolsas de polietileno de alta densidad

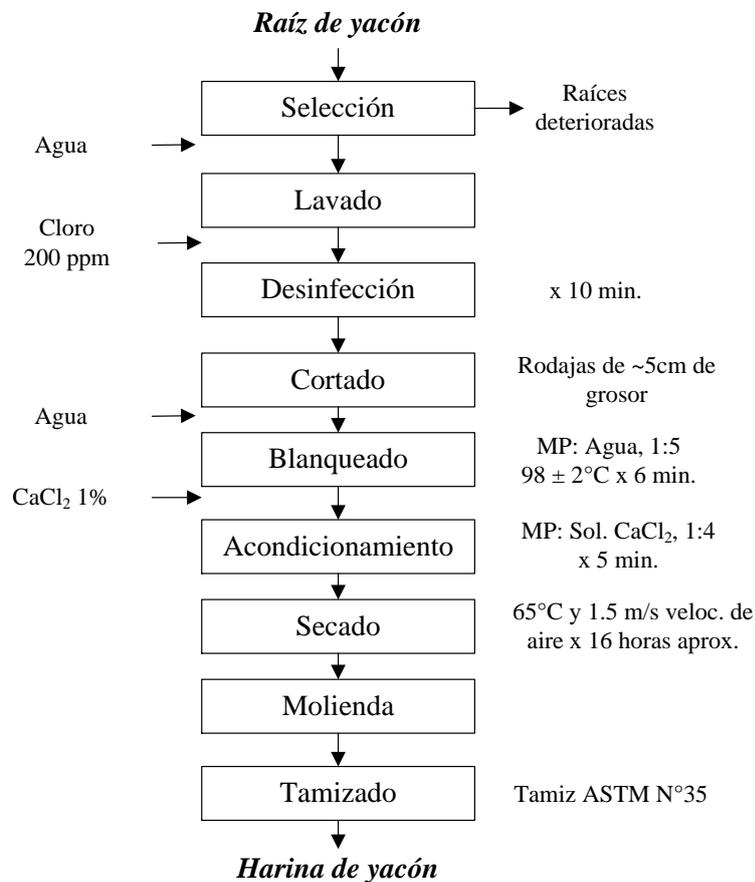


Figura 3: Flujo de operaciones para la obtención de la harina de yacón

3.5.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO Y CLARIFICADO DE YACÓN

La obtención del extracto bruto y clarificado de yacón se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Mejía (2015) con algunas modificaciones realizadas. El flujo de operaciones se muestra en la Figura 4.

3.5.2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO DE YACÓN

La harina de yacón fue tratada con agua destilada, en una relación de 1:20 (p:v, g/ml) a 80°C durante 10 min, para extraer la mayor cantidad de FOS. Seguidamente la mezcla fue filtrada a través de papel Whatman N°1, obteniéndose así una torta y el primer sobrenadante. La

torta obtenida fue re-extraída a las mismas condiciones pero con 30 por ciento del volumen de agua añadida inicialmente. Los sobrenadantes se mezclaron, y se procedió a concentrar a 55°C en un rotavapor hasta 20°Brix de sólidos solubles.

3.5.2.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN

El pH del extracto bruto se ajustó a 11 con hidróxido de calcio al 50 por ciento, con la finalidad de provocar la formación de sales en forma de flóculos y atrapar los compuestos insolubles (Mejia, 2015) causantes de la turbidez. Luego de regular el pH, el extracto bruto se colocó en baño maría a 40°C por 5 min para la formación del precipitado, que se separó por centrifugación a 2397 g por 10 min.

La parte soluble se llevó a pH 5.5-6 con ácido fosfórico 1M para: formar más sales que aumenta el efecto red de los aglomerados (Mejia, 2015), para retirar parte de las sustancias responsables de color (Chen y Chou, 1993) y para evitar la pérdida de FOS por hidrólisis alcalina. Seguidamente, el extracto fue sometido a un segundo calentamiento a 90°C por 2 min, y se separó el precipitado del líquido sobrenadante por centrifugación a 2397 g por 10 min.

Al término de la clarificación, se midió algunas características físicas al extracto clarificado de acuerdo a las metodologías descritas en los acápites 3.4.2-3.4.6.

El extracto clarificado presentó alrededor de 19 °Brix de sólidos solubles, y se utilizó: (1) como muestra en la purificación de FOS por cromatografía a baja presión con carbón activado granular, y también (2) fue desmineralizado para utilizarlo en la purificación de FOS por cromatografía a baja presión con resinas de intercambio catiónico.

3.5.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DESMINERALIZADO DE YACÓN

La desmineralización del extracto clarificado de yacón se realizó con la finalidad de disminuir el contenido de sales presentes, propias del yacón y las provenientes del proceso de clarificación. Así mismo, con este proceso se busca tener una mezcla solo de FOS, fructosa, glucosa y sacarosa. Por ello se procedió según la metodología propuesta por Nobre *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

Para desmineralizar el extracto clarificado se empleó una mezcla de dos tipos de resinas: aniónica Lewatit Monoplus M600 en forma de Cl^- y catiónica Lewatit Monoplus S108 en forma de Na^+ en proporción de 5:4, respectivamente. Las características físico-químicas de estas resinas se muestran en el Anexo 3.

Antes de iniciar la desmineralización, las resinas se trataron por separado. Se empacó una columna con la resina aniónica y se hizo pasar aprox. 500 ml de una solución de NaOH (40 g/L) para intercambiar los contraiones Cl^- de la resina con los iones OH^- de la solución de hidróxido de sodio. De manera similar se empaco otra columna con resina catiónica y se hizo pasar aprox. 500 ml de una solución de H_2SO_4 (80 g/L) para intercambiar los contraiones Na^+ de la resina con los iones H^+ de la solución de ácido sulfúrico. El proceso de conversión finalizó cuando la conductividad de salida de la columna fue igual a la conductividad del inicio de cada solución. Seguidamente las resinas se lavaron con abundante agua destilada. Posteriormente, se mezclaron las dos resinas en un matraz y se hicieron lavados continuos hasta llegar a una conductividad cercana a la del agua destilada (menor a 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Con la mezcla de resinas se llenaron tres columnas que luego fueron conectadas en serie.

Para la desmineralización, 1000 ml de extracto clarificado de yacón a 20 °Brix (ver Figura 4) se pasaron por las columnas conectadas en serie, a una velocidad de flujo de 1ml/min; se colectaron fracciones cada 20 min y a cada fracción se le midió la conductividad eléctrica.

Luego de pasar toda la muestra, las columnas se alimentaron con aproximadamente 5 volúmenes de columna con agua destilada, y el proceso de desmineralización terminó cuando las fracciones colectadas presentaron un color amarillo, y una conductividad mayor a 1 mS/cm (Nobre *et al.*, 2014), estas características indicarían una posible saturación del lecho fijo por las sustancias cromóforas, y por las sales disueltas contenidas en el extracto clarificado. Por ello aquellas fracciones con estas características fueron separadas de las primeras, ya que la presencia de estos compuestos podría interferir en el proceso de purificación de FOS con resinas de intercambio iónico.

Finalmente las primeras fracciones colectadas se mezclaron, y se obtuvo el extracto desmineralizado de yacón de 14.4 °Brix de sólidos solubles, al cual se le midió algunas características físicas de acuerdo a las metodologías descritas en los acápite 3.4.2-3.4.6. El

extracto desmineralizado se utilizó en la purificación de FOS por cromatografía a baja presión mediante resinas de intercambio catiónico.

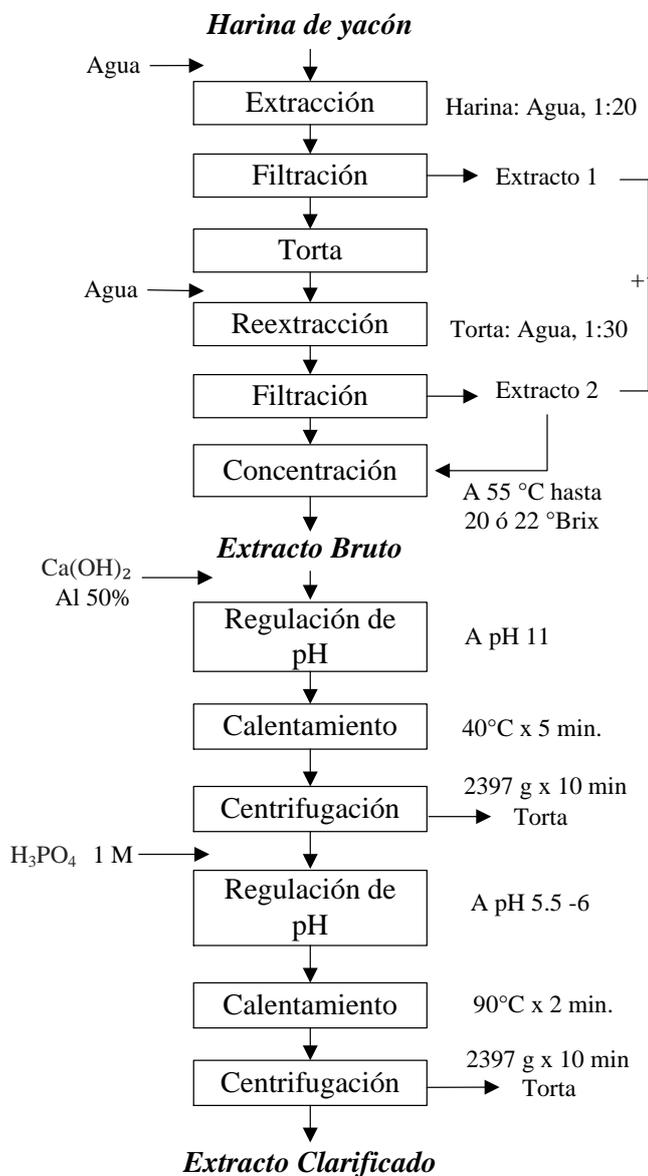


Figura 4: Flujo de operaciones para la obtención del extracto bruto y clarificado

3.5.4. CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN

3.5.4.1. PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO

En esta segunda etapa de purificación de FOS con carbón activado, se utilizó un extracto de yacón solamente clarificado, ya que por ser el carbón activado un adsorbente muy poroso y presentar un gran área superficial no polar o hidrófobo, podría posiblemente adsorber

simultáneamente a los azúcares, a las sustancias responsables de color y a las sales disueltas contenidos en el extracto clarificado.

Para desarrollar esta metodología, se utilizó carbón activado granular (CAG) de marca Norit. Las características se muestran en el Anexo 4. El carbón, fue tamizado y se seleccionó aquel que quedó retenido entre los tamices N°18 y 35 ASTM, obteniéndose tamaños de partícula comprendidos entre 0.5 y 1 mm.

El carbón mezclado con agua Milli-Q (agua ultra pura) se desgasificó utilizando una bomba de vacío, para eliminar las burbujas de aire del interior del carbón que podrían impedir la adsorción de los azúcares.

Se empacó la columna de vidrio enchaquetada con aproximadamente 7.5 g de carbón activado, y se conectó a un baño de recirculación con termostato de inmersión para el control de la temperatura. Haciendo uso de una bomba peristáltica se estabilizó la columna usando tres volúmenes de columna de agua ultrapura desgasificada, a un flujo de 1 ml/min.

Teniendo preparado el sistema de cromatografía a baja presión, se procedió a inyectar 1.5 ml de extracto clarificado y se inició la elución con 35 ml de agua ultra pura, con la finalidad de arrastrar los azúcares no adsorbidos (Nobre *et al.*, 2012). Seguidamente, se eluyó la columna con 50 ml de etanol al 5 por ciento, luego con 50 ml de etanol al 10 por ciento y finalmente con 75 ml de etanol al 30 por ciento. Durante todo el proceso se colectaron fracciones de 5 ml. Estas fracciones fueron colocadas en un concentrador rotatorio a 55°C para eliminar el etanol y luego se llevó al volumen inicial con agua ultrapura.

Al final de la cromatografía, se cuantificó azúcares reductores y FOS a todas las fracciones colectadas de acuerdo a las metodologías descritas en los acápites 3.4.7 y 3.4.8. Después de esto, se cuantificó fructosa, glucosa, sacarosa y FOS, por HPLC según la metodología descrita en el acápite 3.4.9 para obtener un cromatograma que muestre aquellas fracciones ricas en FOS. Luego, dichas fracciones se mezclaron para obtener FOS de alta pureza, y en esta mezcla final se cuantificó fructosa, glucosa, sacarosa y FOS, por HPLC para determinar el porcentaje de rendimiento y pureza de FOS alcanzada utilizando carbón activado.

El rendimiento indica el porcentaje de FOS en cada etapa de elución, respecto a la cantidad de FOS inyectada al inicio; mientras que la pureza representa el porcentaje de FOS que está presente en la mezcla final. Se determinó el porcentaje de rendimiento y pureza de FOS con las siguientes fórmulas:

$$\% R = \frac{(M_{FOS})_{Final}}{(M_{FOS})_{Inicial}} \times 100$$

$$\% P = \frac{(M_{FOS})_{Final}}{M_T} \times 100$$

Donde:

$\% R$: Porcentaje de rendimiento de FOS por cada etapa de elución (5, 10 y 30 por ciento)

$\% P$: Porcentaje de pureza de FOS por cada etapa de elución (5, 10 y 30 por ciento)

$(M_{FOS})_{Final}$: Masa de FOS (g) en cada etapa de elución (5, 10 y 30 por ciento)

$(M_{FOS})_{Inicial}$: Masa inicial de FOS inyectado en la columna (g)

M_T : Masa total (Fructosa + Glucosa + Sacarosa + FOS) (g) por cada etapa de elución (5, 10 y 30 por ciento)

3.5.4.2. PURIFICACIÓN DE FOS CON RESINAS DE INTERCAMBIO CATIONICO

En esta última etapa de purificación de FOS con resinas catiónicas, se empleó un extracto clarificado y desmineralizado, debido a que los iones del extracto clarificado posiblemente se intercambien con los cationes de la resina y al ocurrir esto, quizás no se lleve a cabo las reacciones de adsorción por partición, y formación de complejos entre el catión de la resina y los monosacáridos. Es decir, las sales disueltas del extracto clarificado podrían interferir en la separación de los FOS.

En esta metodología se utilizó seis resinas de intercambio catiónico de ácido fuerte tipo gel, basado en una matriz de poli (estireno-co-divinilbenceno-DVB), con iones fijos denominados sulfonatos $-(SO_3^-)$, y con diferentes formas iónicas (Na^+ , K^+ y Ca^{+2}). En el Cuadro 4 se presenta las propiedades físico-químicas de las resinas empleadas.

Las resinas se lavaron varias veces con agua ultra pura hasta llegar a un pH de 6 (Nobre *et al.*, 2009) y se desgasificaron. Luego, se procedió a llenar la columna de vidrio enchaquetada con aproximadamente 13.3 g de resina húmeda, y la columna se conectó a un baño de recirculación con termostato de inmersión para el control de la temperatura.

Cuadro 4: Propiedades fisicoquímicas de las resinas de intercambio catiónico

	Diaion ^a UBK535L Ca	Diaion ^a UBK555 Ca	Diaion ^a UBK530 Na	Dowex ^b 99 Ca/320 Ca ⁺²	Purolite ^c PCR642 Ca	Purolite ^c PCR642 K
Forma Iónica	Ca ⁺²	Ca ⁺²	Na ⁺	Ca ⁺²	Ca ⁺²	K ⁺
Capacidad total eq/L (Forma de H ⁺)	> 1.6	> 2.0	> 1.6	1.5	1.5	1.5
Retención de agua (%)	48-52	42-46	52-56	57-61	59-62	59-62
Tamaño de partícula (µm)	320	220	220	320	295-335	295-335
Reticulación (%)	6	8	6	Tipo Gel	Tipo Gel	Tipo Gel

FUENTE: ^a Diaion (2015); ^b Dow (2014); ^c Purolite (2015)

La columna se equilibró con 50 ml de solución de CaCl₂ 0.01M para las cuatro resinas en forma de calcio, con 50 ml de NaCl 0.01 M para la resina en forma de sodio, y con 50 ml de KCl 0.01M para la resina en forma de potasio, el flujo de salida de eluyente fue de 1 ml/min.

Teniendo listo el sistema de cromatografía a baja presión, se procedió a inyectar 3ml de extracto desmineralizado de yacón, y se inició la elución de los azúcares con agua ultra pura desgasificada manteniendo un flujo constante de 0.5 ml/min. Simultáneamente, se colectaron fracciones de 3 ml.

Al final de la cromatografía, se cuantificó azúcares reductores y FOS a todas las fracciones colectadas según las metodologías descritas en los acápites 3.4.7 y 3.4.8. Después de esto, se le cuantificó fructosa, glucosa, sacarosa y FOS por HPLC según el acápite 3.4.9. Con los datos obtenidos se procedió a realizar un cromatograma para identificar aquellas fracciones ricas en FOS. Luego, dichas fracciones se mezclaron para obtener FOS de alta pureza, y en

esta mezcla final se cuantificó fructosa, glucosa, sacarosa y FOS, por HPLC para determinar el porcentaje de rendimiento (% *R*) y pureza (% *P*) de FOS alcanzada por cada resina catiónica, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% R = \frac{(M_{FOS})_{Final}}{(M_{FOS})_{Inicial}} \times 100$$

$$\% P = \frac{(M_{FOS})_{Final}}{M_{Total}} \times 100$$

Donde:

$(M_{FOS})_{Final}$: Masa final de FOS en la mezcla (g)

$(M_{FOS})_{Inicial}$: Masa inicial de FOS inyectada en la columna (g)

$(M_{FOS})_{Total}$: Masa total (Fructosa + Glucosa + Sacarosa + FOS) (g)

Para los experimentos de carga de columna, se utilizó el extracto desmineralizado que fue concentrado a 34 y 60 °Brix en un rotavapor a 55°C.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudió la purificación de FOS a partir de una mezcla de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS, contenidos en el extracto de yacón, para ello se utilizó un sistema de cromatografía a baja presión empleando como fase estacionaria, carbón activado y seis diferentes resinas de intercambio catiónico. En ambos casos, los azúcares se separan gradualmente en varias fracciones, para luego ser cuantificados. Como resultado de los experimentos de purificación, se obtuvo por cada tratamiento un cromatograma y un porcentaje de rendimiento y pureza de FOS. Todas las pruebas experimentales se realizaron por triplicado.

En la Figura 5 se muestra el diseño experimental de esta investigación, se realizaron tres experimentos que fueron planteados de la siguiente manera.

3.6.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA PURIFICACIÓN DE FOS CON CARBÓN ACTIVADO

En el primer experimento de purificación de FOS con carbón activado granular, se evaluó la influencia de la temperatura (25 y 40°C) en el rendimiento y pureza de FOS. Se trabajaron a dichos valores de temperaturas, debido a que la adsorción de compuestos sobre la superficie del carbón activado es de tipo físico, y se produce a bajas temperaturas (Ruthven, 1984), temperaturas más altas podrían incrementar la velocidad de desorción. Así mismo Kuhn *et al.* (2014) obtuvieron mejores resultados de separación entre glucosa y FOS a 40°C.

3.6.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIPO DE RESINA EN LA PURIFICACIÓN DE FOS

En el segundo experimento de purificación de FOS con resinas de intercambio catiónico, se evaluó el efecto de la combinación de dos factores: temperatura (25 y 60°C) y tipo de resina comercial (Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK555 Ca, Diaion UBK530 Na, Dowex 99Ca/320, Purolite PCR642 Ca, Purolite PCR642 K) en la separación de FOS, y se seleccionó aquel tratamiento con mejores resultados de rendimiento y pureza de FOS.

Se trabajó con un valor de temperatura de 60°C para disminuir la viscosidad (Vaňková y Polakovič, 2010b) del extracto, aumentar la solubilidad de los azúcares, y prevenir el crecimiento de microorganismos (Azevedo *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 2008 citados por Nobre *et al.*, 2014). Además la temperatura de 60°C es un valor de uso industrial.

3.6.3. INFLUENCIA DE LA CARGA DE COLUMNA O CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO EN LA PURIFICACIÓN DE FOS CON RESINAS

Con el mejor tratamiento del experimento anterior, se evaluó la influencia de la carga de columna o concentración del extracto desmineralizado en el rendimiento y pureza de FOS. Se evaluaron tres porcentajes de carga de columna 6.5, 15.1 y 27.4 por ciento, que corresponden a un extracto desmineralizado de 14.4; 34 y 60 °Brix de sólidos solubles.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Teniendo los resultados de rendimiento y pureza de cada tratamiento, se procedió a analizar los datos estadísticamente utilizando el *software* Statgraphics Centurion XV.

Para el primer experimento, se realizó un análisis de varianza simple al 5 por ciento de significación, para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de rendimiento y pureza de FOS obtenidos a 25 y 40°C.

Para el segundo experimento, se realizó un análisis de varianza multifactorial ($p < 0.05$) para determinar, si la interacción de los factores: temperatura y tipo de resina, tiene efecto en la purificación de FOS. Luego, mediante un análisis de comparación medias a través de la prueba de Tukey, se seleccionó el mejor tratamiento.

Para el tercer experimento, se realizó un análisis de varianza simple para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de rendimiento y pureza de FOS de las tres cargas de columna.

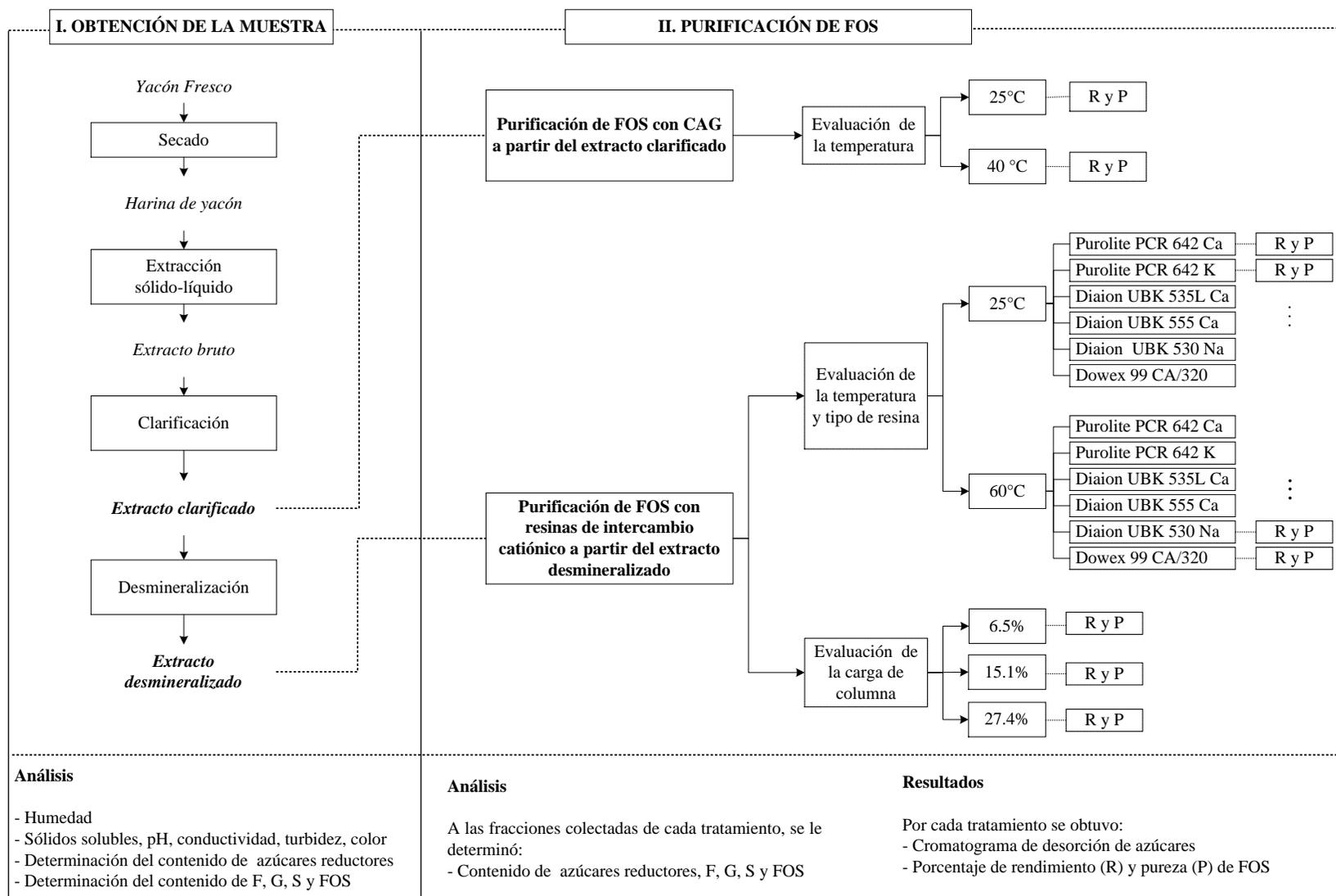


Figura 5: Diseño experimental para la purificación de FOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE YACÓN

4.1.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN

El propósito de la clarificación es separar las impurezas presentes en el extracto bruto, obtenido a partir de la mezcla de agua y harina de yacón. De acuerdo al Cuadro 5 (Anexo 5) el extracto bruto presentó una turbidez de 536.2 NTU lo cual indica que contiene una considerable cantidad de sólidos suspendidos que podrían ser residuos fibrosos como polisacáridos celulósicos y no celulósicos (Castro *et al.*, 2013), que deben eliminarse para conseguir solo una mezcla de azúcares al final del proceso. A la vez, en el extracto bruto se encuentran sólidos disueltos o solubles, los cuales involucran a azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa y fructooligosacáridos (FOS); a sales como calcio y potasio; y a compuestos orgánicos como sustancias nitrogenadas y ácidos fenólicos (Ojansivu *et al.*, 2011; Manrique *et al.*, 2004).

Cuadro 5: Características físicas de los extractos bruto y clarificado de yacón

	Extracto Bruto	Extracto Clarificado
Turbidez (NTU)	536.2 ± 2.0 ^a	4.6 ± 0.2 ^b
Conductividad (uS/cm)	5800 ± 0.0 ^a	5700 ± 0.0 ^b
Diferencia de color total (ΔE)	32.7 ± 0.3 ^a	31.6 ± 0.1 ^b
pH	5.4 ± 0.0 ^b	5.8 ± 0.0 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	20.0 ± 0.0 ^a	19.0 ± 0.0 ^b

Promedio de tres repeticiones ± DS. Los valores medios que presentan letras diferentes dentro de la misma fila denotan diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

Puesto que el azúcar es incoloro y los únicos responsables del color y la turbidez en el extracto son aquellos contaminantes que no son azúcares (Chen y Chou, 1993), antes de iniciar la purificación de FOS, se necesita remover los sólidos no disueltos e impurezas no solubles como proteínas (Doherty *et al.*; 2002) a través del proceso de clarificado.

El proceso de clarificación, redujo la turbidez de 536.2 a 4.6 NTU (Cuadro 5); debido a que en medio alcalino la presencia de iones calcio, facilita la coagulación de los sólidos suspendidos, debido la formación de complejos entre calcio y los carbohidratos (Bichsel *et al.*, 1981). Por otro lado, la adición de ácido fosfórico también permitió retirar parte de los sólidos suspendidos, puesto que forma sales insolubles como fosfato de calcio (Hernández *et al.*, 2003), y a la vez permitió reducir el pH del extracto para evitar pérdida de FOS por hidrólisis. Los procedimientos mencionados fueron seguidos, tal como se muestra en el acápite 3.5.2.2. correspondiente a la clarificación.

Respecto a la conductividad, el extracto bruto de yacón a 20 °Brix presentó un valor de conductividad de 5800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Sin embargo Mohammad *et al.* (2012) obtuvieron un jarabe de dátiles de 76.1°Brix con un valor de conductividad de 350 $\mu\text{S}/\text{cm}$. De acuerdo a esto, se observa que el valor de conductividad del extracto bruto es elevado, lo cual podría deberse a que las rodajas frescas de yacón fueron sumergidas en una solución de cloruro de calcio al uno por ciento, previo a la obtención de la harina, incrementando con ello la concentración de iones calcio y el valor de conductividad en el extracto bruto. Además, de la riqueza de minerales propia de la raíz. Los resultados del Cuadro 5 muestran que el proceso de clarificación no reduce la conductividad del extracto.

Se realizó la medición de color de los extractos obtenidos, y se expresó como la diferencia de color total (ΔE) entre el blanco y la muestra a evaluar; siendo el blanco agua destilada. Los resultados del Cuadro 5 muestran que el extracto bruto presentó un valor ΔE de 32.7, el cual es un valor elevado si se considera que valores ΔE menores que 1, indican que las diferencias de color entre el blanco y la muestra, son imperceptibles (Castellanos *et al.*, 2004). La elevada diferencia de color total entre el agua destilada y el extracto bruto de yacón, posiblemente sea por la presencia de compuestos fenólicos del yacón como ácido cafeico, clorogénico y ferúlico (Simonovska *et al.*, 2003), quienes podrían haber participado en las reacciones de oxidación, generando con ellos productos altamente coloreados (Schieweck *et al.*, 1998) como melaninas (Rein, 2012). También, los productos de la

reacción de Maillard como las melanoidinas que provienen de reacciones no enzimáticas, podrían ser las responsables de color (Chou, 2000).

Así mismo, el valor ΔE del extracto clarificado fue de 31.6 (Cuadro 5). Esto indica que el proceso de clarificación no remueve las sustancias coloreadas del extracto. Según Chen y Chou (1993) el color removido es proporcional a la cantidad de ácido fosfórico añadido, probablemente sea este el motivo, ya que en la clarificación se añadió pequeñas cantidades de ácido fosfórico para no hidrolizar las moléculas de FOS. Según los resultados de color se necesitaría un proceso adicional, para eliminar el color del extracto clarificado.

El extracto clarificado mantiene un valor de pH de 5.8, al respecto los FOS son muy estables en el rango de pH de 4 a 7 (Yun, 1996). Por otro lado, los sólidos solubles disminuyen a causa de las reacciones de formación de complejos entre iones calcio y azúcares (Bichsel *et al.*, 1981), estos resultados se observan en el Cuadro 5.

4.1.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DESMINERALIZADO DE YACÓN

El extracto desmineralizado se obtuvo a partir del extracto clarificado de yacón. La desmineralización y decoloración complementaria del extracto clarificado concentrado a 22 °Brix, se llevó a cabo en tres columnas cromatográficas de lecho mixto conectadas en serie (Acápite 3.5.3). El proceso de desmineralización del extracto clarificado se realizó antes de la purificación de FOS, con el fin de alcanzar una conductividad menor 1 mS/cm (Nobre *et al.*, 2014).

El extracto clarificado de yacón que ingresa a través del lecho mixto de resinas de intercambio de iones, intercambia la mayor parte de las sustancias que aún quedan disueltas en forma de cationes y aniones, por los iones hidrógeno e hidroxilo que liberan las resinas. Dado que las resinas aniónica y catiónica están mezcladas en el mismo lecho, el intercambio iónico se lleva a cabo simultáneamente, por lo que el balance de iones hidrógeno e hidroxilo se mantienen aproximadamente constante y el pH del extracto no se ve afectado, con lo cual se evita la condición ácida del extracto que podría promover la inversión de la sacarosa (Bojorquez *et al.*, 2010) y FOS, que normalmente se presenta cuando el proceso de desmineralización se realiza en columnas de intercambio iónico de lechos independientes (Chen y Chou, 1993).

Los resultados del Cuadro 6 (Anexo 6) muestran que el proceso de desmineralización logró reducir la turbidez y conductividad del extracto clarificado a 0.4 NTU y 17.8 uS/cm, respectivamente. Al respecto, Bojorquez *et al.* (2010) indican que al pasar el jarabe clarificado a través de un lecho mixto con resinas catiónica: aniónica en una proporción de 1:3 se reduce paralelamente el contenido de cenizas conductimétricas ICUMSA hasta en un 99 por ciento y a la vez se reduce el color ICUMSA hasta un 85 por ciento.

Cuadro 6: Características físicas del extracto bruto, clarificado y desmineralizado de yacón

	Extracto Bruto	Extracto Clarificado	Extracto Desmineralizado
Turbidez (NTU)	537 ± 2.0 ^a	4.6 ± 0.2 ^b	0.4 ± 0.0 ^c
Conductividad (uS/cm)	5800 ± 0.0 ^a	5700 ± 0.0 ^b	17.8 ± 0.1 ^c
Diferencia de color total (ΔE)	32.7 ± 0.3 ^a	31.9 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.0 ^c
pH	5.4 ± 0.0 ^c	5.8 ± 0.0 ^b	6.0 ± 0.1 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	22.0 ± 0.0 ^a	20 ± 0.0 ^b	14.4 ± 0.0 ^c

Promedio de tres repeticiones ± DS. Los valores medios que presentan letras diferentes dentro de la misma fila denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

De acuerdo a los resultados de la Figura 6, el proceso de desmineralización no solo retira las sales del extracto, sino que también es muy eficaz removiendo los compuestos que le confieren color al extracto clarificado. El valor ΔE del extracto clarificado fue de 31.9 y mediante el proceso de desmineralización se logró disminuir hasta 0.5. Esto indica que las diferencias de color entre el blanco y la muestra son casi imperceptibles (Castellanos *et al.*, 2004).

Según Bojorquez *et al.* (2010) las sustancias que proporcionan el color ámbar característico al jarabe de azúcar crudo, son normalmente compuestos aromáticos o alifáticos y ellos son retenidos por los grupos iónicos funcionales de la resina aniónica. Dichos investigadores utilizaron una resina aniónica de estireno Lewatit M600, la cual además de intercambiar sustancias colorantes aniónicas, también absorbe sustancias colorantes que no son de naturaleza iónica.

Por otro lado, Gökmen y Serpen (2002) realizaron un estudio cinético sobre la adsorción de compuestos de color oscuro de jugo de manzana utilizando una resina adsorbente macroporoso (Dowex S112) sin grupo funcional, y encontraron que la naturaleza de adsorción es endotérmica y es controlado por mecanismos físicos en lugar de mecanismos químicos, además los datos de adsorción de los compuestos de color se ajustaron bien a los modelos de Langmuir y Freundlich.

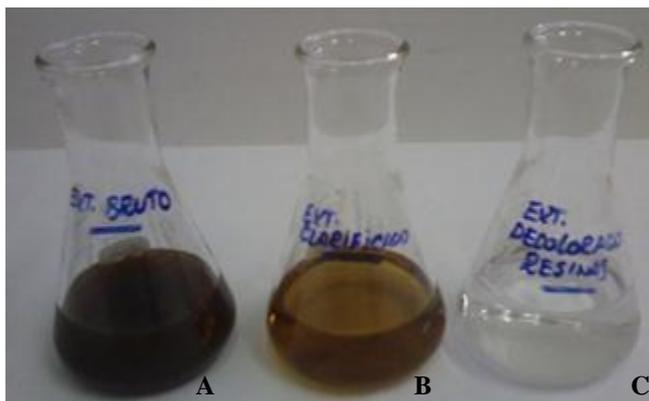


Figura 6: (A) Extracto bruto (B) Extracto clarificado (C) Extracto desmineralizado

En cuanto al pH, se observó un ligero incremento de dicho valor de 5.8 a 6.0 (Cuadro 6) debido a que en el lecho mixto, había mayor cantidad de resina aniónica, lo cual produce que en el intercambio de aniones, se desprendan los iones hidroxilo y pasen al extracto de yacón, y por ende suba el valor de pH del extracto por una mayor concentración de iones hidroxilo.

Así mismo, en el Cuadro 6 se puede observar que los sólidos solubles, disminuyen en el extracto desmineralizado, debido a que la elución cromatográfica causa una dilución en el producto final.

De acuerdo a los datos del Cuadro 7, tanto la clarificación como la desmineralización eliminaron alrededor de 15 y 10 por ciento de los azúcares contaminantes, respectivamente. Luego de la desmineralización la mezcla final de azúcares presentó una pureza de FOS de 52.7 por ciento aproximadamente, y fue menos concentrada en monosacáridos. En un proceso similar de desmineralización, Nobre *et al.* (2014) reportan que los monosacáridos

como fructosa y glucosa presentan mayor afinidad por las resinas del lecho mixto que los FOS.

Cuadro 7: Efecto del desmineralizado en el contenido de azúcares del extracto de yacón

Etapas	Vol. (ml)	g/100 ml				FOS	Pureza FOS (%)
		F	G	S			
Extracto bruto	1100	5.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	1.9 ± 0.0	9.5 ± 0.1	49.5	
Clarificación	1000	4.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	9.9 ± 0.1	51.7	
Desmineralización	1180	3.6 ± 0.1	1.9 ± 0.0	1.4 ± 0.0	7.7 ± 0.1	52.7	
Recuperación de azúcares (%)		75.9	77.0	79.1	87.4		

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa

Luego de obtener los extractos clarificado (Figura 6B) y desmineralizado (Figura 6C), se procedió a la purificación de FOS por cromatografía de baja presión a partir de dichos extractos, mediante el uso de carbón activado granular y resinas de intercambio iónico respectivamente.

4.2. PURIFICACIÓN DE FOS POR CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

En este primer estudio se evaluó el efecto de la temperatura 25 y 40°C en el proceso de purificación de FOS a partir del extracto clarificado de yacón, el cual contiene una pureza inicial de FOS de 50.6 por ciento. Para la separación de los azúcares se utilizó tres concentraciones de etanol 5, 10 y 30 por ciento. Dado que varias investigaciones indican que los monosacáridos se pueden recuperar con un bajo porcentaje de etanol, los disacáridos con soluciones entre 5 y 10 por ciento de etanol y los oligosacáridos con 15 a 50 por ciento de etanol (Sanz *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006; Nobre *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2014).

Se puede ver en el cromatograma de la Figura 7, que los sacáridos se separan de acuerdo a su polaridad saliendo primero los más polares; como F y G, y posteriormente los FOS. Así mismo se observa la formación de dos picos cromatográficos, separados mediante (1) la elución de fructosa-glucosa con etanol al 5 por ciento, y (2) la elución de sacarosa-FOS con

etanol al 30 por ciento. De acuerdo a este cromatograma se podría decir, que la adsorción de los sacáridos disminuye a medida que aumenta su polaridad.

Estudios anteriores obtuvieron picos cromatográficos desarrollados principalmente por glucosa y FOS (Kuhn y Filho, 2010; Kuhn *et al.*, 2014). En nuestro estudio los picos están formados principalmente por fructosa y FOS, debido a que la fructosa está presente en concentraciones más altas en el extracto clarificado que la glucosa, y en los estudios reportados es la glucosa la que se encuentra en mayor concentración en la mezcla de azúcares.

Los azúcares que ingresan al lecho fijo, se adsorben de forma instantánea en la superficie del carbón, y no se eluyen cuando pasa agua a través de la columna (Figura 7). La adición de un disolvente polar como el agua sirve para retirar los azúcares no adsorbidos, y para que se produzca una mayor adsorción de FOS. Hung *et al.* (2005) mencionan que, en sistemas acuosos los solutos no polares se adhieren más fuerte y rápido sobre el carbón que los solutos polares.

Los azúcares se adsorben físicamente sobre el carbón activado mediante un proceso reversible de fuerzas de Van der Waals (Babel y Kurniawan, 2003; Hung *et al.*, 2005). La adsorción de cada azúcar en un sitio específico del carbón, va depender del tamaño de los microporos del carbón activado granular (Hidaka *et al.*, 1981 citado por Nobre *et al.*, 2012). Generalmente los microporos presentan un ancho inferior a 2 nm y poseen un área superficial relativamente grande como para adsorber moléculas pequeñas (Rodríguez y Silvestre, 2016) y excluir a las moléculas grandes. En cambio, los macroporos presentan un ancho mayor de 50 nm (Inglezakis y Pouloupoulos, 2006) y adsorben mejor a las moléculas grandes.

Luego de la adsorción, los azúcares se separan gradualmente de acuerdo a la afinidad que presentan por los eluyentes. Una fuerte afinidad soluto-eluyente indica una alta solubilidad del soluto en el eluyente, lo cual produce el rompimiento del enlace físico soluto-adsorbente.

El uso de diferentes concentraciones de etanol se justifica por su polaridad, Skoog *et al.* (2009) indican que el índice de polaridad para una mezcla de solventes se determina con la siguiente formula $P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$; donde P' es el índice de polaridad de Snyder y ϕ indica la fracción en volumen de cada solvente. Sobre la base de esta información el Cuadro

8 presenta la polaridad de estas soluciones, el cual va disminuyendo conforme se incrementa la concentración de etanol.

Según el Cuadro 8, la solución de etanol al 5 por ciento presenta un índice de polaridad de 9.9, este valor indica que el solvente es altamente polar, y en efecto desorbe a las moléculas polares. De acuerdo a la Figura 7, este solvente eluye al mismo tiempo a la fructosa (F) y glucosa (G) obteniendo así, picos cromatográficos totalmente superpuestos. No existe separación entre estos azúcares posiblemente debido a que ambos azúcares son isómeros y presentan mismo tamaño molecular (Matijašević *et al.*, 1997).

Los grupos hidroxilo de la F y G son los responsables de la polaridad de estos azúcares, y son estos grupos los que presentan mayor afinidad por la solución de etanol al 5 por ciento que por el adsorbente. Por ello, estos azúcares migran a mayor velocidad por la columna e inician la salida.

Cuadro 8: Polaridad de los solventes utilizados en la elución

Solventes	Polaridad (P'_{AB})
Agua	10.2
5% Etanol	9.9
10% Etanol	9.6
30% Etanol	8.4

El ingreso de etanol al 10 por ciento con índice de polaridad de 9.6 (Cuadro 8), no forma ningún pico cromatográfico (Figura 7), más bien sirve para eliminar la parte final de los monosacáridos y parte de la sacarosa (S). El inconveniente de este eluyente, es que también elimina el 20.5 por ciento de los FOS (Cuadro 9).

En cambio, la elución con etanol al 30 por ciento permitió recuperar el 75.4 por ciento de los FOS (Cuadro 9), debido posiblemente a que este eluyente presenta un índice de polaridad adecuado (8.4) en donde los FOS son más solubles (Figura 7).

Según el perfil cromatográfico de la Figura 7, los FOS son los últimos en salir de la columna, esto indica que los FOS se encuentran más fuertemente retenidos sobre el carbón activado

que la fructosa y glucosa (Figura 7); debido posiblemente a que la superficie principal del carbón activado es no polar o hidrófobo, y cuando el soluto es más hidrófobo entonces es más adsorbido por el carbón activado (Abe *et al.*, 1983). Además, el carbón adsorbe mejor a las moléculas largas, no polares y no solubles o poco solubles (Inglezakis y Pouloupoulos, 2006). Específicamente, son los restos CH y -CH₂ de los FOS (Sundari y Balasubramanian, 1997 citados por Nobre *et al.*, 2013) que interactúan con la superficie hidrófoba del carbón activado, formando una intensa fuerza de interacción Van der Waals, que tiende a incrementar con el aumento de peso y tamaño molecular de la molécula del adsorbato (Hung *et al.*, 2005; Berck, 2013). Por ello en esta última etapa, se utilizó un eluyente más concentrado en etanol que brinde la fuerza de desorción adecuada para la recuperación de los FOS (Nobre *et al.*, 2012).

Estudios anteriores indican que el yacón contienen FOS de diferente grado de polimerización (de 3 a 10) (Ohyama *et al.*, 1990). Posiblemente los FOS de menor grado de polimerización se encuentren en las fracciones eluidas con etanol al 10 por ciento, ya que presentan menor hidrofobicidad. Mientras que los FOS más hidrófobos y de mayor grado de polimerización podrían encontrarse en las fracciones eluidas con etanol al 30 por ciento. De acuerdo a esto, los FOS podrían salir de la columna en orden de su grado de polimerización.

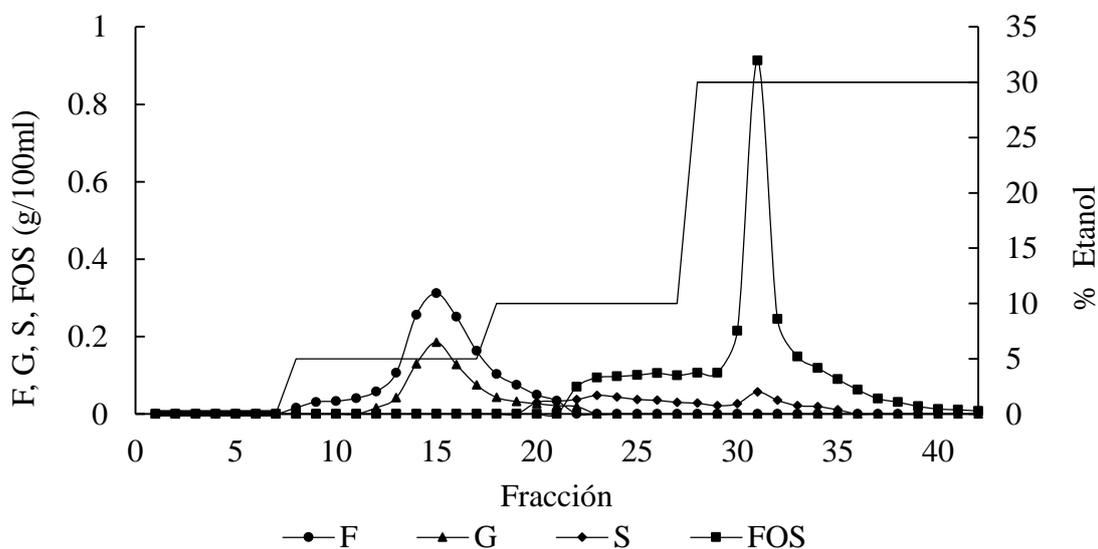


Figura 7: Cromatograma obtenido de la elución del extracto clarificado de yacón en la columna de carbón activado. Elución a 25°C. Flujo 1ml/min. Volumen de cada fracción 5 ml

En un estudio de cinética de adsorción de azúcares en matraces agitados realizado por Nobre *et al.* (2012) encontraron que los azúcares son selectivamente adsorbidos de acuerdo con sus pesos moleculares sobre la superficie del carbón activado granular. El perfil de adsorción obtenido por dichos investigadores, demostró que la retención de los azúcares aumenta en el siguiente orden F, G, S y FOS, siendo las moléculas de FOS los más retenidos.

En el Cuadro 9 se muestran los datos necesarios para calcular el rendimiento y pureza de FOS correspondientes a la Figura 7. Para obtener esto, se mezclaron las fracciones colectadas de acuerdo a cada eluyente, dichas mezclas fueron analizadas para determinar el contenido de azúcares. Según los resultados, la fase móvil compuesta por etanol al 10 por ciento eliminó parte de la sacarosa y 20.5 por ciento de FOS. Por el contrario, la solución de etanol al 30 por ciento permitió recuperar el 75.4 por ciento de los FOS, con una pureza de 92.1 por ciento (p/p).

Cuadro 9: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 25 °C

	Vol. (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		g/100 ml					
EC	1.5	4.65	2.17	1.54	8.56	100	50.6
Agua	15	0.00	0.00	0.00	0.00		
5% Et.	15	0.39	0.17	0.00	0.00		
10% Et.	15	0.06	0.04	0.09	0.18	20.5 ± 0.5	
30% Et.	15	0.00	0.00	0.06	0.65	75.4 ± 0.4	92.1 ± 0.3
Salida (%)		97.3 ± 0.1	96.2 ± 0.5	95.4 ± 1.1	95.9 ± 0.1		

Promedio de tres repeticiones ± DS. Et. Etanol. Vol: Volumen. EC: Extracto clarificado. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa

En la Figura 8 se muestra un cromatograma realizado a 40°C, el orden de desorción de azúcares es similar a la de 25°C. Sin embargo, el incremento de la temperatura y la elución con etanol al 10 por ciento eliminan el 25 por ciento de los FOS (Cuadro 10), y en efecto disminuye la recuperación de FOS con etanol al 30 por ciento. Al parecer, los FOS de menor grado de polimerización presentan mayor movilidad molecular con el incremento de la temperatura, con lo cual aumenta la probabilidad de que por su movimiento térmico se rompa el enlace físico, y escapen de la superficie del carbón. Asimismo, hay que considerar que la

solubilidad de los FOS de menor grado de polimerización, podría incrementar con el aumento de la temperatura y esto también incrementaría la velocidad de desorción de FOS.

Por tanto, para este caso el incremento de la temperatura podría reducir la capacidad de adsorción de FOS del carbón activado. Estudios previos indican que el proceso de adsorción con carbón activado granular es exotérmico, debido a que la fijación de moléculas libres en una superficie sólida libera calor como resultado de la reducción en la energía cinética de las partículas adsorbidas, y el aumento de la temperatura podría reducir el grado de adsorción (Inglezakis y Pouloupoulos, 2006; citados por Nobre *et al.*, 2012).

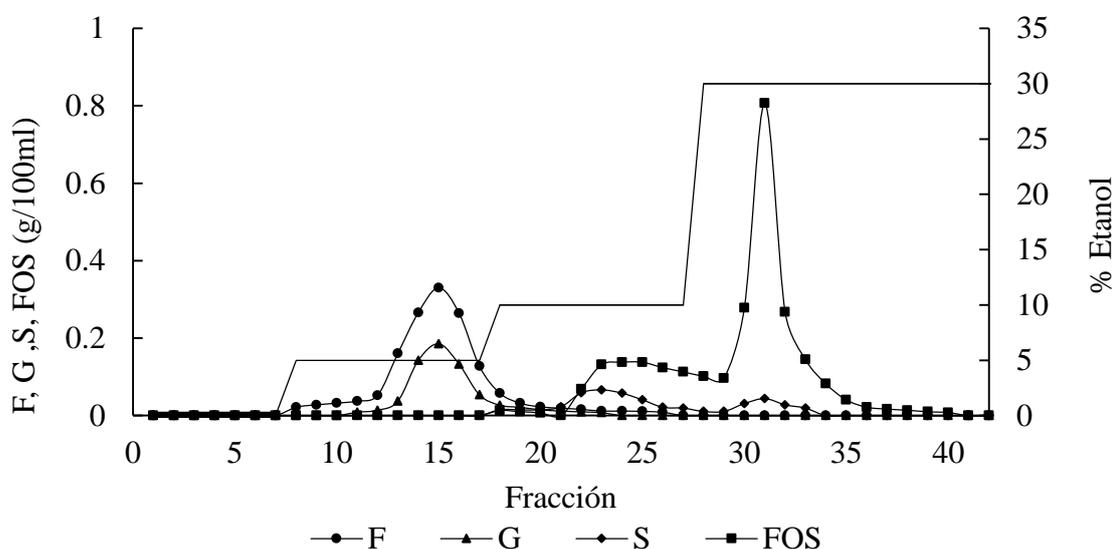


Figura 8: Cromatograma obtenido de la elución del extracto clarificado de yacón en la columna de carbón activado. Elución a 40°C. Flujo 1ml/min. Volumen de cada fracción 5 ml

De acuerdo a la Figuras 7 y 8, las fracciones colectadas mediante la elución con etanol al 30 por ciento, contienen principalmente FOS pero aún tienen la presencia de sacarosa. Por lo tanto, el incremento de la temperatura no produce una mejor separación entre sacarosa y FOS. Esto quizás se deba al tipo de elución elegida para la desorción, que en este caso fue de tipo escalonada o por etapas. Probablemente mediante una elución de tipo gradiente lineal, y aumentando la longitud de la columna se podría conseguir la separación de los picos sacarosa-FOS, lo cual conlleva a un mayor grado de purificación.

Un comportamiento similar fue reportado por Kuhn y Filho (2010), quienes realizaron la purificación de FOS con carbón activado a 50°C y mediante una elución isocrática de etanol al 15 por ciento, obtuvieron una buena eficiencia de separación para FOS-F y FOS-G; pero dichos investigadores también encontraron una baja separación entre sacarosa y FOS.

En el Cuadro 10 se detalla el resultado de la purificación de FOS a 40°C; la solución de etanol al 30 por ciento permitió recuperar solo el 72 por ciento de FOS, debido a que la solución de etanol al 10 por ciento elimina un 25 por ciento de FOS. La pureza de FOS disminuye de 92.1 a 91.3 por ciento, a consecuencia de que la mezcla rica en FOS contiene menor concentración de FOS que el experimento anterior realizado a 25°C.

Cuadro 10: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 40°C

	Vol (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		(g/100 ml)					
EC	1.5	4.65	2.17	1.54	8.56	100	50.6
Agua	15	0.00	0.00	0.00	0.00		
5% Et.	15	0.37	0.18	0.00	0.00		
10% Et.	15	0.07	0.03	0.09	0.21	25.0 ± 0.2	
30% Et.	15	0.00	0.00	0.06	0.62	72.0 ± 0.3	91.3 ± 0.3
Salida (%)		94.7 ± 0.6	96.0 ± 0.4	96.8 ± 0.5	97.0 ± 0.4		

Promedio de tres repeticiones ± DS. Et. Etanol. Vol: Volumen. EC: Extracto clarificado. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa

Mediante el resultado del ANOVA (Anexo 7) que se presenta en el Cuadro 11, se demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del rendimiento y pureza de FOS a 25 y 40°C, obteniéndose mejores resultados a 25°C.

Estos resultados son similares a lo reportado por Nobre *et al.* (2012), quienes realizaron la purificación de FOS a 25°C y lograron la separación de F, G, S y FOS mediante una elución en gradiente, obteniendo así un rendimiento y pureza de FOS de 74.5 y 92.9 por ciento, respectivamente. En dicha investigación utilizaron una mezcla de azúcares de 50.6 por ciento de pureza de FOS, provenientes de la síntesis enzimática.

Cuadro 11: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto clarificado en carbón activado a 25 y 40°C

Temperatura	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
25 °C	75.4 ± 0.4 ^a	92.1 ± 0.3 ^a
40 °C	72.0 ± 0.3 ^b	91.3 ± 0.3 ^b

Promedio de tres repeticiones ± DS. Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia significativa

En otra investigación realizado por Kuhn *et al.* (2014), reportaron un rendimiento y pureza de FOS de 56.5 y 94 por ciento, respectivamente, cuando realizaron la purificación de FOS a 40°C. Así mismo, obtuvieron una buena eficiencia de separación FOS-glucosa de 3.03 usando solo dos concentraciones de etanol 3.5 y 15 por ciento.

Por otro parte, se debe tener en cuenta que los compuestos que le confieren color al extracto clarificado y las sales presentes en el extracto, podrían interferir en el proceso de purificación de FOS. Asimismo, el aumento de la temperatura no solo reduce la viscosidad del extracto, sino que también acelera el movimiento térmico de los pigmentos y las sales, y aumenta la velocidad de difusión a través del líquido a los sitios de adsorción; en consecuencia podría incrementar la adsorción de las sales disueltas y de las sustancias coloreadas (Qiu *et al.*, 2007), y a la vez podría disminuir la adsorción de los azúcares.

Como se reportó en el Cuadro 5, el extracto clarificado presentó una conductividad de 5700 $\mu\text{S}/\text{cm}$, lo cual indica que contiene una concentración elevada de sales. Después del proceso de purificación de FOS se mezclaron las fracciones colectadas correspondientes a la elución con etanol al 30 por ciento (fracciones que contienen FOS) y se obtuvo una conductividad de 46.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esto coincide con lo reportado por Nobre *et al.* (2012) quienes indican que después del proceso de purificación, las fracciones puras de FOS estaban libres de iones.

El aumento de la temperatura no solo acelera el movimiento molecular (Fischer & Hofsommer, 1992; citados por Qiu *et al.*, 2007) de los azúcares, sino también de los pigmentos del extracto clarificado de yacón. Ibarz *et al.* (2012) reportan que el incremento de la temperatura, aumenta el movimiento de los pigmentos en el medio. Este comportamiento favorece las diferentes etapas de adsorción (transferencia externa y de

difusión dentro del adsorbente) y hace que la adsorción de los compuestos coloreados sea favorable en la superficie y en el interior del adsorbente. De esto, se podría decir que los pigmentos contenidos en el extracto clarificado se adsorben sobre la superficie del carbón y probablemente podrían competir con los azúcares por los sitios de adsorción. Además, los pigmentos presentan un alto peso molecular entonces se adsorben más rápido, y podrían impedir la adsorción de los azúcares. Por ello, los compuestos coloreados del extracto deben ser eliminados antes del proceso de purificación, para obtener un mayor rendimiento de FOS.

De este primer estudio se puede decir, que en ambos tratamientos 25 y 40°C, se obtuvieron pérdidas de FOS con la elución de etanol al 10 por ciento, y la pureza no llega a ser máxima debido a que las fracciones ricas en FOS salen siempre contaminadas con sacarosa. Así mismo, el aumento de la temperatura no incrementa el rendimiento de FOS, y no tiene efecto en la separación de sacarosa y FOS. Quizás se podría obtener mejores resultados de rendimiento utilizando un extracto decolorado de yacón, y utilizando una concentración adecuada de etanol para la separación de sacarosa y FOS.

4.3. PURIFICACIÓN DE FOS POR CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN CON RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

En la Figura 9 se muestra el perfil de elución de azúcares (determinados mediante HPLC-IR) del extracto desmineralizado inyectado en una columna Diaion UBK535L Ca a 25°C. Se puede observar que los azúcares salen de la columna en el siguiente orden FOS, S, G, F. Los FOS se adsorben débilmente sobre la resina, lo cual favorece parcialmente su separación de la F, G y S. Los tiempos de retención disminuyen al aumentar el peso molecular de cada molécula. La sacarosa presenta un tiempo de retención muy cercano al de los FOS. A la vez, los picos de concentración de la sacarosa y glucosa se superponen más al pico de concentración de FOS.

Perfiles de elución similares a la Figura 9 fueron reportados por Vaňková y Polakovič (2010b) y Nobre *et al.*, (2014) quienes utilizaron una resina Amberlite CR1320 Ca y Diaion UBK530 Ca, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos por dichos autores también presentaron un menor tiempo de retención para FOS que para S, G y F.

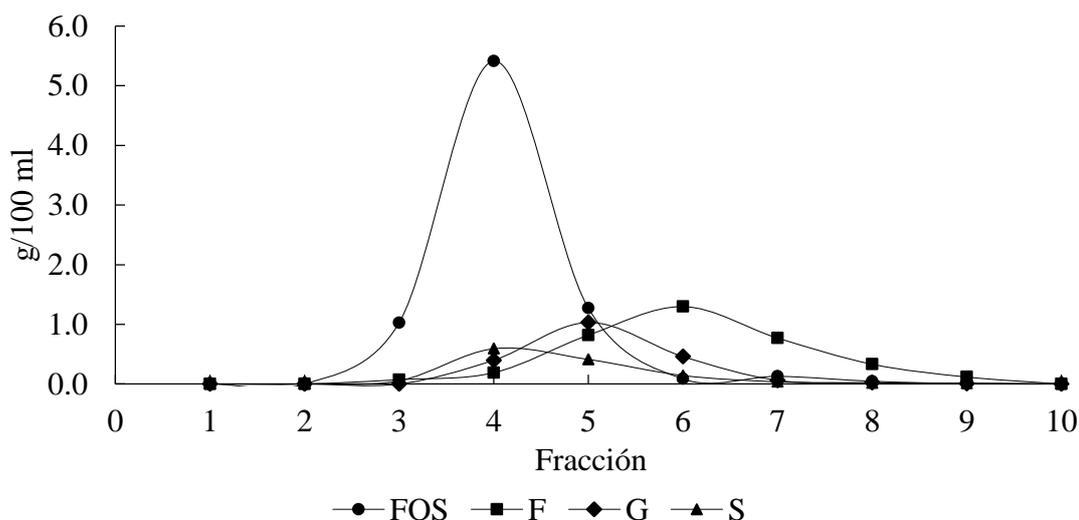


Figura 9: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK535L Ca. Elución a 25°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3 ml

En el Cuadro 12 se muestra el porcentaje de rendimiento y pureza alcanzada por la resina Diaion UBK535L Ca, también se muestra las concentraciones de la mezcla de fracciones ricas en FOS (3 y 4) y de la mezcla de fracciones del sub producto (del 5 al 10).

Cuadro 12: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK535L Ca a 25°C

	Vol. (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		(g/100 ml)					
ED	3	3.75	2.03	1.33	8.53		54.5
Fracciones 3-4	6	0.15	0.25	0.33	3.12	73.1 ± 1.6	81.0 ± 0.6
Fracciones 5-10	18	0.57	0.25	0.11	0.35		
Salida (%)		98.6	98.4	99.0	97.7		

Promedio de tres repeticiones ± DS. Vol: Volumen. ED: Extracto desmineralizado.

F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa

Varias investigaciones indican que en la separación de azúcares, la resina de intercambio iónico no funciona como un intercambiador real de iones, debido a la electroneutralidad de los azúcares en un amplio rango de pH (Gramblička y Polakovič, 2007). Más bien, los tres principales mecanismos que gobiernan la separación de estos azúcares son: (a) el intercambio de ligando basado en la formación de complejos entre los grupos hidroxilo (OH)

de los monosacáridos y los cationes del intercambiador, (b) el fenómeno de adsorción por partición debido a que los monosacáridos se distribuyen entre el agua de la resina y el eluyente, y (c) el efecto de exclusión por tamaño (Gramblička y Polakovič, 2007; Vaňková *et al.*, 2010a; Saari *et al.*, 2010; Nobre *et al.*, 2014).

La reacción química principal que se da en el caso de la fructosa y glucosa con los cationes de la resina, es la formación de complejos (Walton, 1985). Esta reacción ocurre entre los grupos OH orientados favorablemente en una secuencia axial-ecuatorial (ax-eq) de los azúcares, y los cationes de la resina. Aunque la fructosa y glucosa sean isómeros, con mismo tamaño molecular, estructura y propiedades químicas similares (Matijašević *et al.*, 1997) no presentan igual número de grupos OH con secuencia axial-ecuatorial. En la Figura 9, se puede ver que la resina Diaion UBK535L Ca adsorbe más fuertemente a la fructosa que a la glucosa, esto probablemente se deba a que la fructosa presenta más grupos OH con secuencia axial-ecuatorial que la glucosa, y por ello la fructosa es mejor adsorbida (Nobre *et al.*, 2014).

Un comportamiento similar fue observado en un estudio de separación de fructosa y glucosa utilizando una resina Purolite PCR642 Ca, donde encontraron que los iones calcio de la resina forman complejos más fuertes con la fructosa que con la glucosa, y fueron las moléculas de fructosa las que salieron de la columna después de la glucosa (Mostafazadeh *et al.* 2011).

En la Figura 10 se muestra aquellos grupos hidroxilo de la glucosa y fructosa, que intervienen en la formación de complejos con el catión de la resina. Estos grupos determinan la estabilidad del complejo formado y su retención cromatográfica (Angyal, 1989).

En la Figura 10a, el anómero α -D-glucopiranososa presenta una secuencia o un par ax-eq de grupos OH adyacentes, mientras que el anómero β no presenta ningún grupo OH en posición axial, su secuencia eq-eq de los grupos hidroxilo del carbono 1 y 2 es menos favorecido que ax-eq, debido a que en este último hay una mayor distancia entre los átomos de oxígeno (Goulding, 1975).

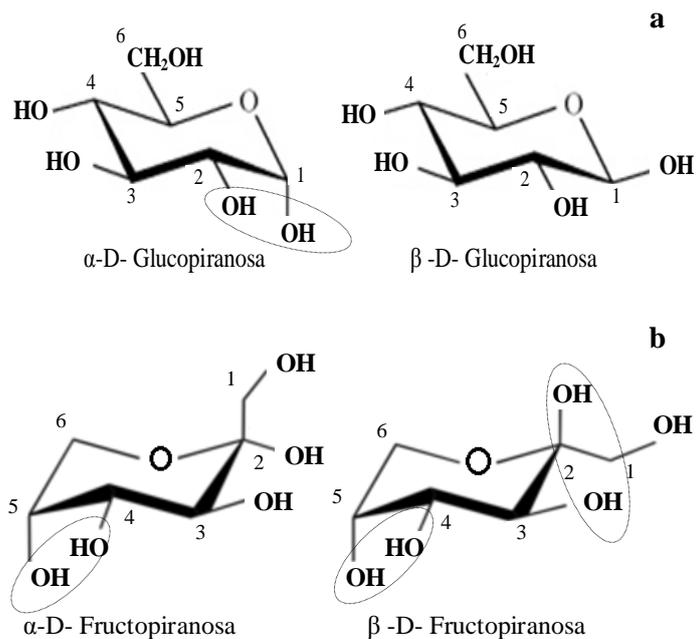


Figura 10: (a) Anómeros de D-Glucosa, conformación C1 (b) Anómeros de D-Fructosa, conformación 1C

En la Figura 10b se muestra la conformación preferida (1C) de la D-fructosa en medio acuoso. La forma α -D-fructopiranososa, presenta un par ax-eq y la β -D-fructopiranososa presenta dos pares ax-eq de grupos OH adyacentes (Goulding, 1975) y en solución, la D-fructosa existe como una mezcla en equilibrio de 70 por ciento de β -D-fructopiranososa y alrededor de 23 por ciento de β -D-fructofuranosa (Afrin *et al.*, 2014), y suponiendo que la β -D-fructopiranososa es la que se encuentra en mayor concentración en la muestra, entonces los dos pares ax-eq de grupos OH adyacentes favorecen la formación y estabilidad del complejo. Posiblemente por ello, la fructosa es mejor retenida por la resina que la glucosa. Además, la β -D-fructopiranososa formaría un complejo bidentado, debido a que presenta 2 pares ax-eq, además el grupo OH del carbono 1 también podría contribuir a la unión con el catión, cuando en dicha formación participan los oxígenos de los carbonos 2 y 3 (Goulding, 1975).

A parte de las reacciones de formación de complejos, otro fenómeno también estaría implicado en la retención de los monosacáridos. Este sería el mecanismo de adsorción por partición, el cual ocurre dentro de la resina. Es decir, los monosacáridos se podrían adsorber en los microporos de la resina por la unión puente hidrógeno con el agua libre de la resina (Nobre *et al.*, 2014).

Por otro lado, los FOS y la sacarosa no presentan en sus estructuras químicas ningún par de grupos OH orientados favorablemente para la formación de complejos con los cationes de la resina. En el caso de la sacarosa, se podría confirmar que no presenta grupos OH orientados de manera axial-ecuatorial, ya que en solución acuosa no hay formación de complejo detectable entre sacarosa y cualquier catión (Angyal, 1989). Por ello, podría ser que tanto los FOS como la sacarosa se excluyen de la resina por ser moléculas más grandes que la F y G. Como resultado, la separación de estos azúcares se produce principalmente por exclusión de tamaño (Nobre, 2011).

4.3.1. EFECTO DEL TIPO DE RESINA Y TEMPERATURA

En este segundo estudio, se evaluó el efecto de la combinación de los factores tipo de resina y temperatura 25 y 60°C, utilizando un extracto desmineralizado de yacón de 54.5 por ciento de pureza de FOS.

En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos a 25°C, utilizando cuatro resinas en forma de calcio (Diaion UBK535L Ca, Diaion UBK555 Ca, Dowex 99 Ca/320, Purolite PCR642 Ca) una en forma de sodio (Diaion UBK530 Na) y otra en forma de potasio (Purolite PCR642 K). En este caso, los picos de separación están compuestos por FOS+S y azúcares reductores (AR), debido a que para la cuantificación de azúcares se utilizó el método de DNS (Acápites 3.4.7 y 3.4.8). Asimismo, los picos de FOS+S y AR se encuentran parcialmente superpuestos independientemente de la resina utilizada.

Los cromatogramas de la Figura 11 permiten visualizar de manera general aquellas fracciones que presentan mayor contenido de FOS, y también permiten ver cuán contaminadas se encuentran las fracciones ricas en FOS con los azúcares reductores. En este caso, serían las fracciones 3 y 4 las que presentaron mayor contenido de FOS en las seis resinas evaluadas, y se puede ver en los cromatogramas de las resinas Diaion UBK530 Na y Purolite PCR642 K, que las fracciones 3 y 4 se encuentran menos contaminadas con azúcares reductores. Entonces al mezclar estas fracciones, se determinó el porcentaje de rendimiento y pureza de FOS por cada resina, estos resultados se resumen en el Cuadro 13.

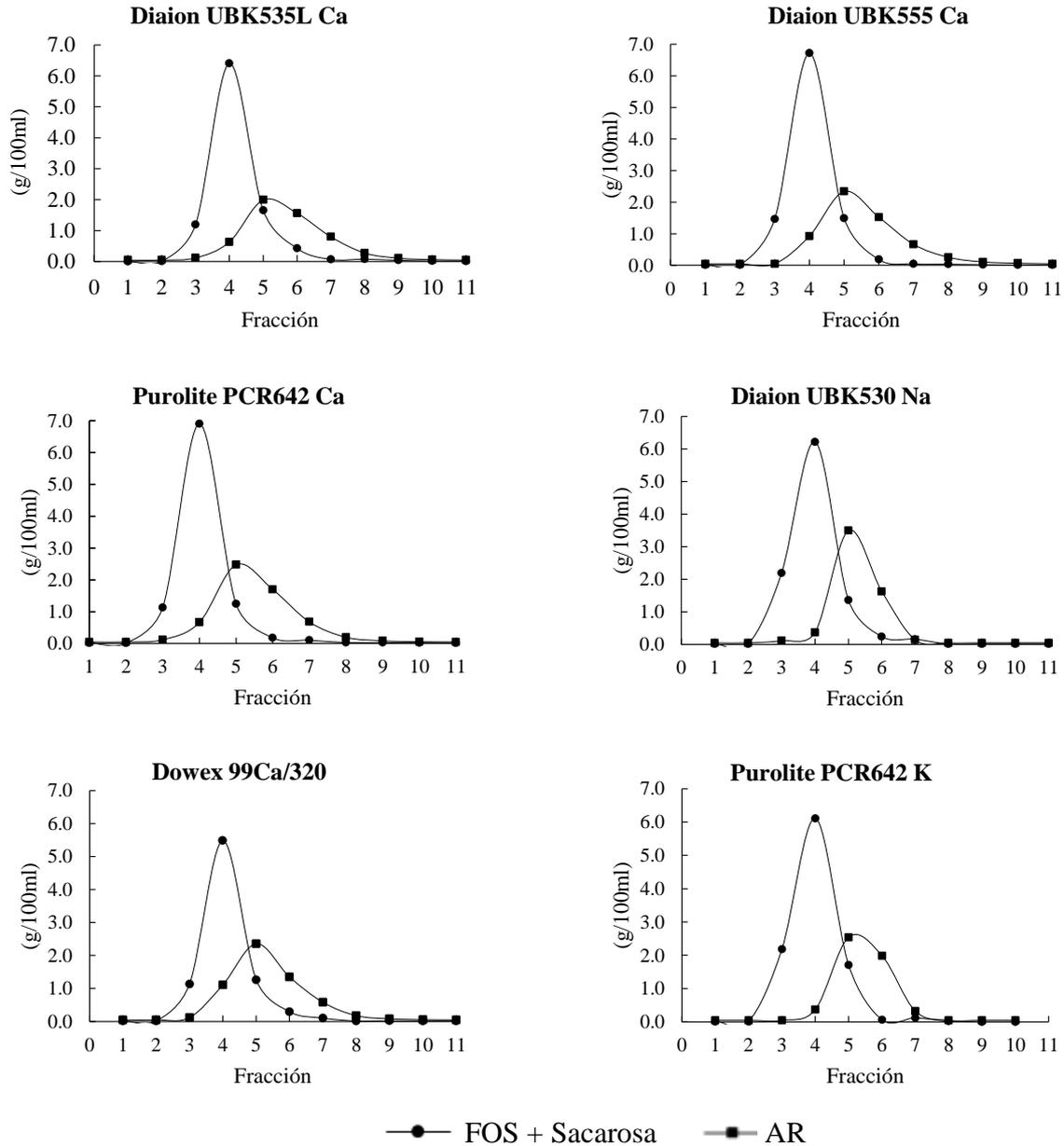


Figura 11: Cromatogramas obtenidos de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columnas de diferentes resinas de intercambio iónico. Elución a 25°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3ml

De acuerdo al Cuadro 13, la resina Diaion UBK555 Ca permitió obtener una mayor recuperación de FOS pero con una bajo valor de pureza. Sin embargo, valores superiores de pureza se encontraron con las resinas en forma de sodio Diaion UBK530 Na y potasio Purolite PCR642 K, y no con las cuatro resinas en forma de calcio. Esto posiblemente se debe a que, la forma catiónica de la resina influye en la separación de los FOS, independientemente de la estructura de la resina.

Cuadro 13: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con diferentes resinas a 25°C

25°C	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)	F (%)	G (%)	S (%)
Diaion UBK555 Ca	86.2 ± 1.1 ^a	75.0 ± 2.4 ^c	5.1 ± 0.4 ^b	10.1 ± 0.6 ^a	9.8 ± 0.5 ^a
Diaion UBK530 Na	81.8 ± 0.7 ^b	84.2 ± 0.1 ^{ab}	5.2 ± 0.0 ^b	3.7 ± 0.0 ^c	7.0 ± 0.0 ^c
Dowex 99Ca/320	80.7 ± 0.8 ^b	76.2 ± 0.8 ^c	5.2 ± 0.1 ^b	9.4 ± 0.4 ^a	9.2 ± 0.3 ^{ab}
Purolite PCR642 K	79.7 ± 1.0 ^{bc}	84.6 ± 1.4 ^a	5.7 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.0 ^d	7.1 ± 0.1 ^c
Purolite PCR642 Ca	76.5 ± 1.9 ^{cd}	76.4 ± 0.7 ^c	7.4 ± 0.5 ^a	7.5 ± 0.6 ^b	8.8 ± 0.5 ^b
Diaion UBK535L Ca	73.1 ± 1.6 ^d	81.0 ± 0.6 ^b	3.8 ± 0.0 ^c	6.5 ± 0.2 ^b	8.6 ± 0.3 ^b

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia significativa

El radio de los iones aumenta en el siguiente orden $\text{Ca}^{2+} < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (Sigel *et al.*, 2012) y el número de hidratación, es conocido como el número de moléculas de agua que bordean al catión. Cationes con menor radio iónico y mayor carga, presentan mayor número de hidratación ($\text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+}$) (Fassbender, 1975), pero altas capas de hidratación en el catión con mayor valencia, se traduce en una disminución del agua libre en la resina y menos adsorción de azúcares (Tiihonen *et al.*, 2002).

El agua en la resina se encuentra en dos formas (1) como agua de hidratación de los cationes y (2) como agua libre dentro de los microporos de la resina disponible para la adsorción de monosacáridos por partición (Nobre, 2011), y cuanto mayor sea el contenido de agua en la resina, mayor será la adsorción de los sacáridos (Vente *et al.*, 2003).

Estudios previos indican que, los iones calcio presentan varias capas de hidratación a su alrededor (Fassbender, 1975; Sigel *et al.*, 2012), y las resinas en esta forma iónica presentan menos agua libre disponible para la adsorción (Tiihonen *et al.*, 2002) de los monosacáridos; y por ser tan grande el ion hidratado, posiblemente la resina contiene menos iones calcio para que se lleve a cabo las reacciones de formación de complejos.

Sin embargo, los iones Na^+ y K^+ presentan menor radio iónico hidratado que significa que las resinas en estas formas iónicas, presentan mayor contenido de agua para la adsorción

(Nobre *et al.*, 2014) de los monosacáridos, y posiblemente presentan mayor contenido de iones para la formación de complejos con los monosacáridos.

Por tanto, se obtuvieron mejores valores de pureza con las resinas en forma de sodio y potasio, posiblemente debido a que la adsorción de fructosa y glucosa, es mejor en cationes con menor radio iónico hidratado como Na^+ y K^+ .

Otro factor importante que influye sustancialmente en la cantidad de sorción del azúcar es el grado de reticulación, que corresponde al porcentaje de divinilbenceno (DVB) que contiene la resina (Vente *et al.*, 2003). Un mayor grado de reticulación indica una estructura de poros más cerrados y una cinética de difusión más lenta (Pedruzzi *et al.*, 2008). Del Cuadro 4, se puede ver que la resina Diaion UBK555 Ca contiene un mayor contenido de DVB, y aún eso, presenta un buen rendimiento en la separación de FOS - F, G y S (Cuadro 13). Un menor grado de reticulación significa que la resina presenta poros amplios, los cuales pueden contribuir a la mejora de las características de transferencia de masa (Vajda *et al.*, 2015) debido a que estos poros grandes permiten el ingreso de los azúcares. De esta manera se puede obtener un mayor coeficiente de difusión. En cambio, cuando el tamaño del sustrato es similar al tamaño del poro, el coeficiente de difusión disminuye drásticamente. Un alto porcentaje de DVB indica que la resina tiene poros muy pequeños, y en algunos casos estos poros son menores que el tamaño del sustrato, por lo que, excluyen a las moléculas más grandes, y los valores de coeficiente de difusión son de cero (Buttersack, 1989). Entonces, el contenido de DVB puede ser elegido de tal manera que los FOS se excluyan y los monosacáridos se adsorban en la resina, retardando así su elución (Vente *et al.* 2003).

En la Figura 12 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos a 60°C. El comportamiento de desorción es similar a la de 25°C. Sin embargo, los picos de FOS+S son más altos que los de la Figura 11, debido a que el incremento de la temperatura permitió recuperar mayor cantidad de FOS en las fracciones 3 y 4.

De acuerdo a los resultados reportados en el Cuadro 14, en las seis resinas se encontró un mayor rendimiento y pureza de FOS a 60°C que a 25°C, y mayores valores de pureza se obtuvieron con las resinas en forma de sodio y potasio, ya que presentaron menor contenido de fructosa y glucosa en la mezcla final. Resultados similares de rendimiento y pureza de FOS fueron reportados por Nobre *et al.* (2014).

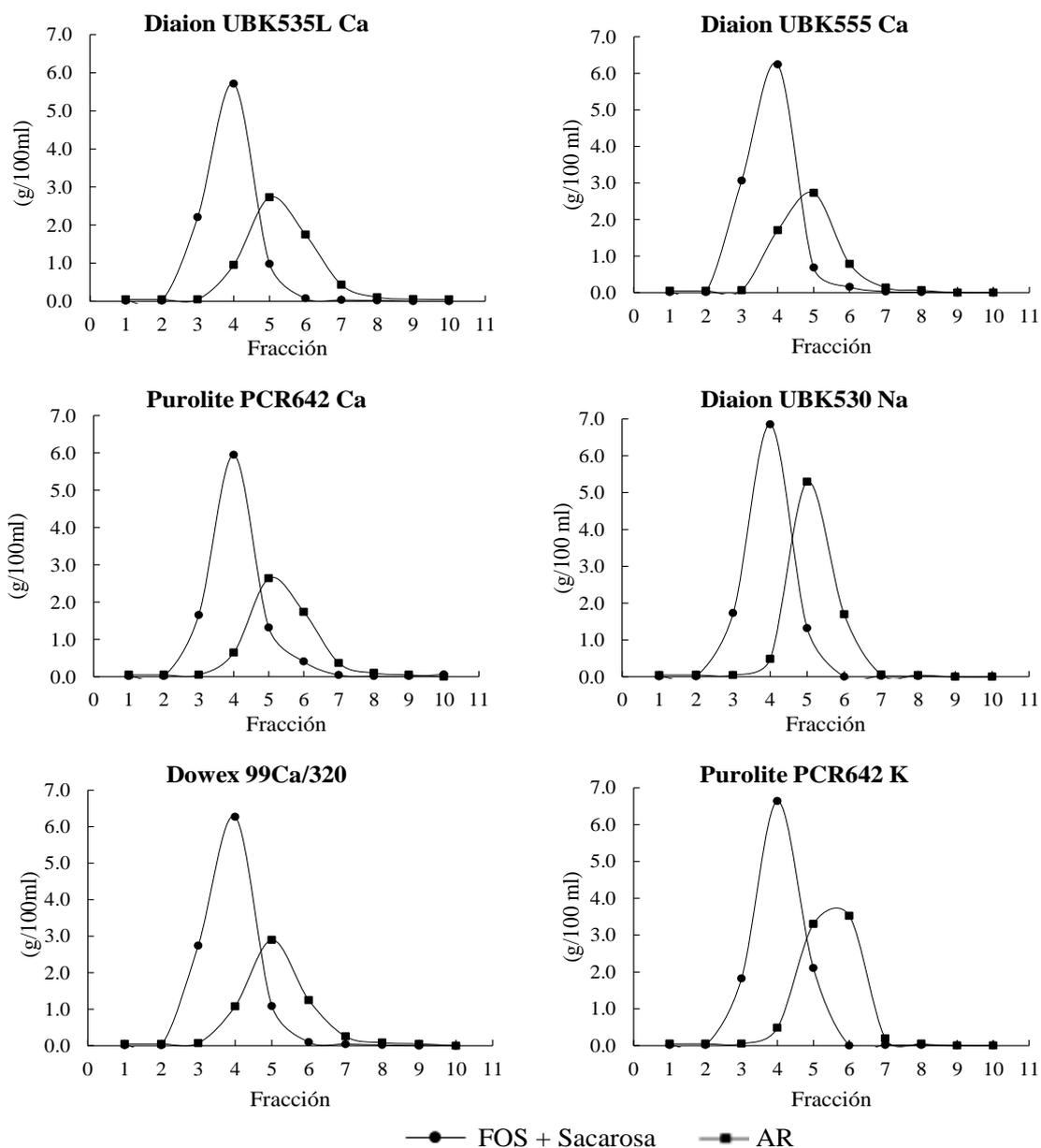


Figura 12: Cromatogramas obtenidos de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columnas de diferentes resinas de intercambio iónico. Elución a 60°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 3 ml

El incremento de la temperatura influyó favorablemente en la retención de los monosacáridos. Este comportamiento es de esperarse, puesto que el incremento de temperatura disminuye la viscosidad del extracto y esto favorece la transferencia de masa, (Vaňková y Polakovič, 2010b; Gökmen y Serpen, 2002) y la difusión de la fructosa y glucosa en los microporos de la resina, donde son retenidos probablemente por más tiempo.

En las seis resinas ensayadas a 60°C, la fructosa es el monosacárido que se encuentra en menor proporción en la mezcla final (Cuadro 14) al parecer, el aumento de temperatura favorece en mayor intensidad la retención de la fructosa por la resina. Basolo (1980) indica que las reacciones de formación de ligando podrían aumentar con el aumento de la temperatura, pues este aumento produce una mayor velocidad en los azúcares.

Cuadro 14: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con diferentes resinas a 60°C

60°C	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)	F (%)	G (%)	S (%)
Diaion UBK555 Ca	97.1 ± 0.4 ^{ab}	75.6 ± 0.3 ^d	3.9 ± 0.3 ^a	11.5 ± 0.1 ^a	9.0 ± 0.1 ^a
Diaion UBK530 Na	99.4 ± 0.2 ^a	88.2 ± 0.5 ^a	1.6 ± 0.1 ^c	2.7 ± 0.2 ^d	7.5 ± 0.1 ^b
Dowex 99Ca/320	98.0 ± 0.6 ^{ab}	79.8 ± 0.5 ^c	3.0 ± 0.2 ^b	8.6 ± 0.2 ^b	8.7 ± 0.1 ^a
Purolite PCR642 K	94.7 ± 0.0 ^{bc}	87.3 ± 1.8 ^a	2.8 ± 0.2 ^b	3.0 ± 0.3 ^d	6.9 ± 0.4 ^c
Purolite PCR642 Ca	90.5 ± 3.8 ^c	82.7 ± 0.5 ^b	2.5 ± 0.1 ^b	7.1 ± 0.2 ^c	7.7 ± 0.3 ^b
Diaion UBK535L Ca	97.1 ± 1.2 ^{ab}	83.2 ± 0.0 ^b	2.5 ± 0.2 ^b	6.6 ± 0.6 ^c	7.7 ± 0.0 ^b

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia significativa

Así mismo, entre las dos resinas que presentaron mayor valor de pureza, la resina en forma de sodio Diaion UBK530 Na permitió obtener un mayor rendimiento de FOS que la resina en forma de potasio Purolite PCR642 K (Cuadro 14). Estudios anteriores de purificación indican que el tamaño de partícula influye en el rendimiento de las separaciones cromatográficas (Popovici *et al.*, 2004; Pedruzzi *et al.*, 2008; Saari, 2011; Vajda *et al.*, 2015).

De acuerdo a los datos de las fichas técnicas (Cuadro 4), la resina Diaion UBK530 Na presenta menor tamaño de partícula que la resina Purolite PCR 642K, y cuanto menor es el tamaño de partícula más rápida es la cinética de transferencia de soluto entre la fase estacionaria y móvil; y mayor el rendimiento obtenido. Mientras que grandes tamaños de partículas causan cinética de difusión más lentas y conducen a picos cromatográficos más amplios (Pedruzzi *et al.*, 2008). Además, las partículas de menor tamaño ofrecen mayor resolución y mayor número de platos teóricos (Vajda *et al.*, 2015).

Entonces, probablemente debido al menor tamaño de partícula de la resina Diaion UBK530 Na es que se obtuvo una mayor recuperación de FOS.

Por otro lado, en las cuatro resinas en forma de calcio se observó que con el incremento de la temperatura se obtiene menor cantidad de sacarosa en la mezcla final (Cuadros 13 y 14). Por el contrario, en la mezcla final obtenida con la resina Diaion UBK530 Na, la sacarosa aumenta de 7 a 7.5 por ciento con el incremento de temperatura, y en la resina Purolite PCR642 K el porcentaje de sacarosa se mantiene entre 6.9 y 7 por ciento, esto indica que la separación de FOS y sacarosa es muy pobre sobre todo en la resina Diaion UBK530 Na. En un estudio realizado por Gramblička y Polakovič (2007) sobre el equilibrio de adsorción de F, G, S y FOS se encuentra, que las resinas en forma de sodio (Lewatit S2568 y Diaion UBK530) presentan un valor de selectividad sacarosa/kestosa cercano a 1 y por ello esta separación no sería eficaz. En cambio, reportan mayor valor de selectividad para las resinas en forma de calcio, en especial para la resina Amberlite CR1320Ca.

Nobre *et al.* (2009) encontraron que la sacarosa se adsorbe mejor en una resina macroporosa en forma de sodio, en cambio, la adsorción de la glucosa es igual en resinas macroporosas y de tipo gel, y la fructosa presenta una alta adsorción en resinas de tipo gel en forma de potasio, también mencionan que a bajas temperaturas, el comportamiento de los azúcares muestra un efecto competitivo en la adsorción. Sin embargo, a altas temperaturas los azúcares muestran un efecto sinérgico, puesto que la presencia de otros azúcares en la mezcla conduce a un incremento en la carga de adsorción.

De los resultados mostrados en los Cuadros 13 y 14, se obtiene el análisis de interacción de las seis resinas y dos temperaturas evaluadas (Cuadro 15), el cual indica que estos dos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento y pureza de FOS con un 95 por ciento de confianza (Anexo 8).

Según Nobre *et al.* (2014) indican que el rendimiento está relacionado con la forma iónica y porosidad de las partículas de la resina, así mismo reportan que las resinas en forma de calcio presentan mayor porosidad que las resinas en forma de sodio y potasio, lo cual indica que las resinas con baja porosidad de partícula tienen mayor resistencia a la transferencia de masa dentro de los poros, que conduce a valores más altos de factores de retención que afectan al rendimiento. En cambio, indican que la pureza de FOS parece estar relacionada

con la fracción hueca y tamaño de partícula de la resina, y altos valores de fracción hueca conducen a una disminución en la pureza.

Cuadro 15: Resultado de la prueba comparación múltiple de medias para el porcentaje de rendimiento y pureza obtenidos con diferentes resinas

Tipo de Resina	Rendimiento	Pureza
	FOS (%)	FOS (%)
Diaion UBK555 Ca	91.7 ^a	75.3 ^d
Diaion UBK530 Na	90.6 ^a	86.2 ^a
Dowex 99Ca/320	89.3 ^{ab}	78.0 ^c
Purolite PCR642 K	87.2 ^{bc}	86.0 ^a
Diaion UBK535L Ca	85.1 ^{cd}	82.1 ^b
Purolite PCR642 Ca	83.5 ^d	79.5 ^c

Los valores medios que presentan letras diferentes dentro de la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

De acuerdo al Cuadro 16, las resinas Diaion UBK530Na y Purolite PCR642K son las que adsorben más moléculas de azúcar con el incremento de temperatura y, es la resina Diaion UBK530Na la que presenta mayor capacidad de adsorción de azúcares totales y FOS.

Cuadro 16: Capacidad de adsorción de las diferentes resinas a 25 y 60°C

	25°C		60°C	
	q (mg AT/g RS)	q (mg FOS/g RS)	q (mg AT/g RS)	q (mg FOS/g RS)
Diaion UBK530 Na	63.1 ± 0.1	35.8 ± 0.1	67.5 ± 0.1	38.3 ± 0.1
Diaion UBK535L Ca	59.8 ± 1.1	32.6 ± 1.3	53.4 ± 0.2	30.3 ± 0.1
Purolite PCR642 K	54.4 ± 0.1	30.8 ± 0.1	57.9 ± 0.2	32.7 ± 0.1
Purolite PCR642 Ca	53.1 ± 0.3	30.0 ± 0.1	53.0 ± 0.5	30.3 ± 0.6
Diaion UBK555 Ca	49.1 ± 0.6	27.9 ± 0.1	50.7 ± 0.1	28.8 ± 0.1
Dowex 99 Ca/320	43.1 ± 0.3	24.5 ± 0.1	43.0 ± 0.1	24.4 ± 0.1

AT: Azúcares totales (Fructosa + Glucosa + Sacarosa + FOS) q: capacidad de adsorción de azúcares por gramo resina seca (RS)

De este segundo estudio se puede decir que, la interacción de temperatura y tipo de resina tiene un efecto significativo en la separación de FOS. Se obtuvieron mejores resultados a 60°C que a 25°C. Sin embargo en todos los tratamientos realizados se encontró una débil separación entre FOS y sacarosa, debido a que este disacárido se encuentra en mayor proporción en la mezcla rica en FOS. Así mismo, se obtuvieron mayores valores de rendimiento y pureza con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. La pureza no llega ser máxima debido que la mezcla que contiene principalmente FOS se encuentra con bajas concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa.

4.3.2. EFECTO DE LA CARGA DE COLUMNA

Debido a que se encontraron mejores resultados con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C, entonces fue seleccionada para evaluar la carga de columna, la cual está definida como la relación de la masa total del sacárido en la alimentación y la masa del adsorbente seco en la columna (Vaňková y Polakovič, 2010b).

El cromatograma de la Figura 13 fue obtenido con una carga de columna de 6.5 por ciento de manera similar que los experimentos anteriores, si no que para este caso se cambió el volumen de colecta de 3 a 1.5 ml.

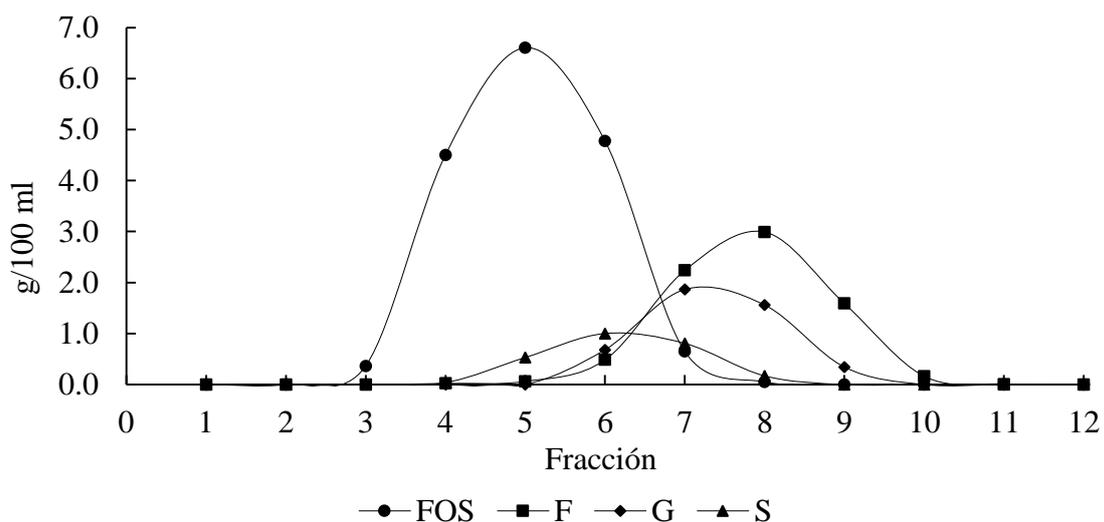


Figura 13: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 6.5 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml

Se puede ver en el cromatograma de la Figura 13 que los picos de FOS, S, G y F son más elevados que los picos de la Figura 9 debido a que en la Figura 13, las fracciones colectadas presentan menor volumen y mayor concentración. A la vez, se podría obtener una fracción del producto que contenga sólo FOS; para el caso de la Figura 9 sería la fracción 3 y para la Figura 13 sería la fracción 4, pero ello solo sería posible a expensas de una gran pérdida de FOS en la porción de subproductos de F, G y S.

La Figura 13 presenta picos de separación muy amplios en la base y la forma de los picos es poco similar a los de un cromatograma ideal, con un ancho de base estrecho y pico simétrico que conducen a una alta eficiencia de la columna (Fritz y Gjerde, 2009); aún eso se pudo recuperar una gran parte de los FOS utilizando un adecuado tiempo de corte. El tiempo de corte divide a todas las fracciones de salida de la columna en dos partes (Jupke *et al.*, 2002): fracciones que contienen principalmente FOS y fracciones que contienen F, G y S. como sub productos. Es decir, del cromatograma de la Figura 13 se pueden recuperar las fracciones 3, 4, 5 y 6 para obtener un mayor rendimiento y pureza de FOS, así como se muestra en el Cuadro 17.

Cuadro 17: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 6.5 por ciento

	Vol. (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		(g/100 ml)					
ED	3	3.64	2.12	1.12	7.97		
Fracciones 3-6	6	0.08	0.09	0.35	3.91	98.2 ± 0.2	88.4 ± 0.3
Fracciones 7-10	6	1.73	0.96	0.21	0.05		
Salida (%)		99.4	98.7	99.2	99.5		

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. ED: Extracto desmineralizado

Incrementando la concentración de la muestra a 34 y 60 °Brix de sólidos solubles, se obtuvieron los cromatogramas de las Figuras 14 y 15. Se puede ver que la concentración de la muestra afecta: al ancho del pico, a la máxima concentración de salida y al tiempo de retención de los azúcares. Así mismo, una elevada concentración del extracto se traduce en

un pico más ancho y más alto, pero a la vez los picos van perdiendo su forma y se van superponiendo aún más (Figura 15). Según Skoog *et al.* (2009), cuanto más lento es la velocidad de los procesos de transferencia de masa que ocurren mientras un soluto migra por la columna, más ancho es el pico cromatográfico en la salida de la columna.

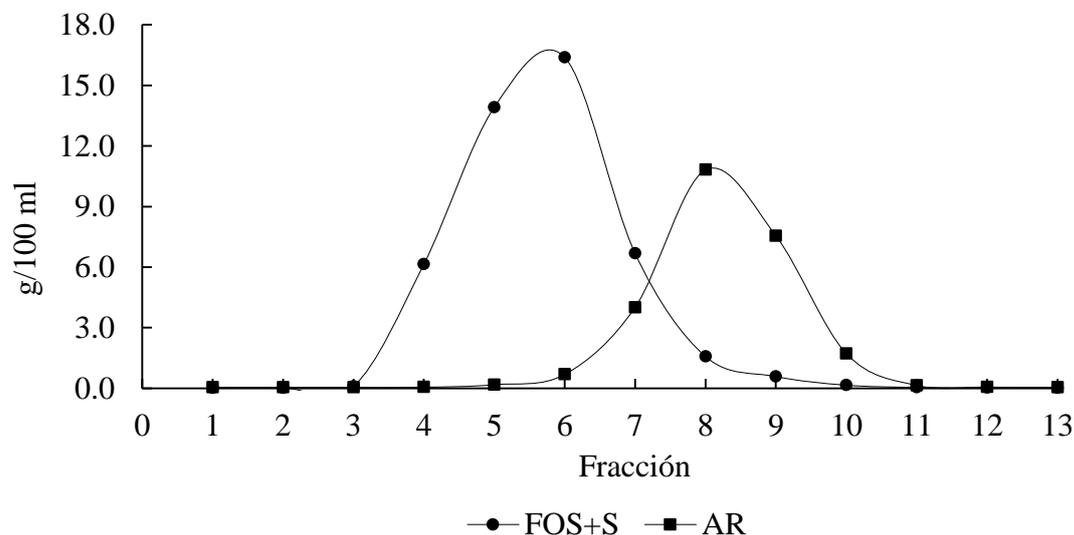


Figura 14: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 15.1 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml

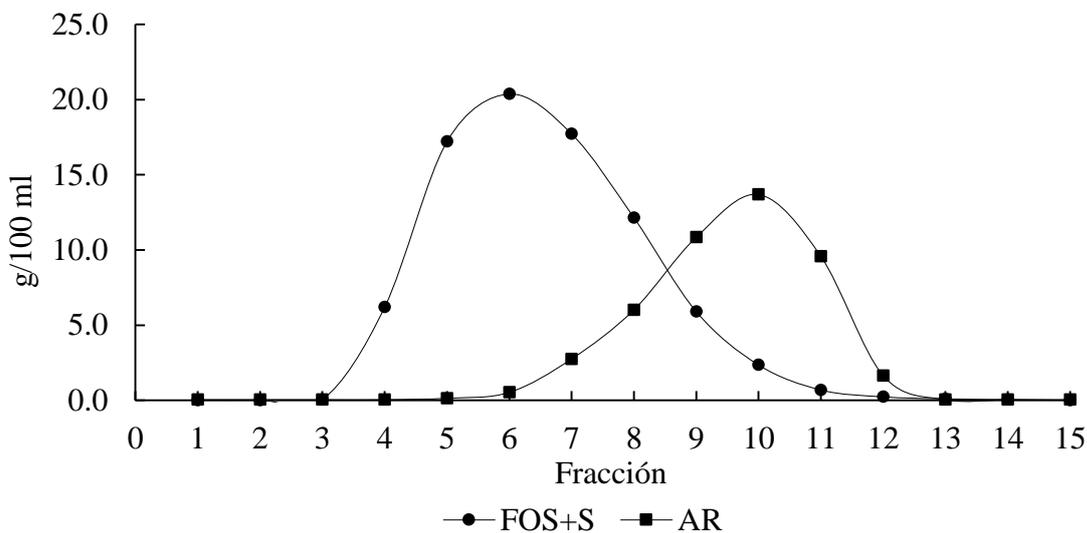


Figura 15: Cromatograma obtenido de la elución del extracto desmineralizado de yacón en columna de resina Diaion UBK530 Na. Elución a 60°C. Carga de columna de 27.4 por ciento. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml

Los Cuadros 18 y 19 muestran los datos de concentración necesarios para calcular el rendimiento y pureza de FOS de acuerdo a los cromatogramas de las Figuras 14-15. Se obtienen menores resultados de rendimiento a 27.4 por ciento de carga de columna. Esto posiblemente se deba, a la inyección de una masa excesiva de muestra (concentración del extracto 60 Brix) que produjo una sobrecarga en la columna.

Cuadro 18: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 15.1 por ciento

	Vol. (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		(g/100 ml)					
ED	3	8.19	3.72	2.89	19.38		
Fracciones 4-6	4.5	0.07	0.06	1.00	11.14	86.2 ± 0.6	90.8 ± 0.1
Fracciones 7-13	10.5	2.30	1.03	0.39	0.74		
Salida (%)		99.6	99.4	99.0	99.6		

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. ED: Extracto desmineralizado

Cuadro 19: Rendimiento y pureza de FOS obtenidos de la cromatografía del extracto desmineralizado con la resina Diaion UBK530 Na a 60°C. Carga de columna de 27.4 por ciento

	Vol. (ml)	F	G	S	FOS	Rendimiento FOS (%)	Pureza FOS (%)
		(g/100 ml)					
ED	3	13.73	7.53	5.60	35.16		
Fracciones 4-7	6	0.52	0.49	1.23	13.91	79.1 ± 0.6	86.1 ± 0.0
Fracciones 8-15	12	3.10	1.60	0.78	1.79		
Salida (%)		97.8	98.1	99.6	99.5		

Promedio de tres repeticiones ± DS. F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. ED: Extracto desmineralizado

Los resultados obtenidos a diferentes porcentajes de carga de columna o diferentes concentraciones del extracto desmineralizado se resumen en el Cuadro 20 y el análisis estadístico se muestra en el Anexo 9.

Los resultados del Cuadro 20 indican que el aumento de las concentraciones iniciales del extracto desmineralizado de 14 a 60 Brix; produce un aumento en la capacidad de adsorción de azúcares totales (q Azuc.Tot.) de 65.1 a 270.7 mg, y a la vez incrementa la capacidad de adsorción de FOS de 35 a 154.3 mg por gramo de resina seca. Al respecto, Gramblička y Polakovič (2007) mencionan que la isoterma de adsorción para FOS no se ve afectada por la presencia de otros azúcares en la mezcla y el comportamiento de adsorción revela un efecto sinérgico, es decir, la presencia de azúcares adicionales incrementa la adsorción de un determinado azúcar (Nowak *et al.*, 2007).

Cuadro 20: Efecto de la carga de columna en el rendimiento y pureza de FOS

CC (%)	MI (g)	Muestra (Brix)	q Azuc. Tot. (mg/g RS)	q FOS (mg/g RS)	TC (min)	FOS* (g)	Rend. (%)	Pureza (%)
6.5	0.45	14	65.1	35.0	18	0.2	98.2 ^a	88.4 ^b
15.1	1.03	34	150.0	85.1	18	0.5	86.2 ^b	90.8 ^a
27.4	1.86	60	270.7	154.3	21	0.8	79.1 ^c	86.1 ^c

CC: Carga de la columna, empacada con 6.8 g de resina seca. MI: Muestra inicial. RS: resina seca. TC: Tiempo de corte. *: Gramos de FOS recuperado en 3 ml de muestra inyectada. Rend: Rendimiento de FOS

En un determinado tiempo de corte se puede conseguir el mayor porcentaje de rendimiento y pureza de FOS. De acuerdo al Cuadro 20, con una carga de columna de 6.5 por ciento (Figura 13) y un tiempo de corte de 18 min se puede recuperar 98.2 por ciento de FOS con 88.4 por ciento de pureza. Sin embargo, si se aumenta la carga de la columna a 27.4 por ciento (Figura 15) el rendimiento y pureza de FOS disminuye aunque se prolongue el tiempo de corte a 21 min. Aumentando el tiempo de corte se puede incrementar el rendimiento en la separación de FOS, pero a la vez, la pureza disminuye debido a la acumulación de F, G y S.

Asimismo, algunas fracciones del reciclado que contienen FOS se podrían volver a procesar por separado, aunque esto podría aumentar los costos de operación. Además, el volumen de la fracción de reciclado no debe exceder del límite determinado por el proceso y la composición debe ser similar a la solución de alimentación para evitar el debilitamiento de la separación (Saari, 2011).

Vaňková y Polakovič (2010b) obtuvieron resultados de rendimiento y pureza de FOS de alrededor de 80 por ciento cuando trabajaron en una columna pequeña con 1.85 por ciento de carga y un tiempo de corte menor a 10 min; pero cuando incrementaron 14 veces el volumen del lecho y tomaron 0.62 por ciento como carga de columna, entonces aumentó el rendimiento y pureza de FOS a más del 90 por ciento.

En la Figura 16 se observa el efecto que tiene la carga de la columna sobre el porcentaje de rendimiento, pureza y tiempo de corte, a la vez Vaňková y Polakovič (2010b) indican que también la velocidad superficial tiene efecto sobre estas tres variables, a mayor velocidad superficial mayor será la recuperación y menor será la pureza y el tiempo de corte.

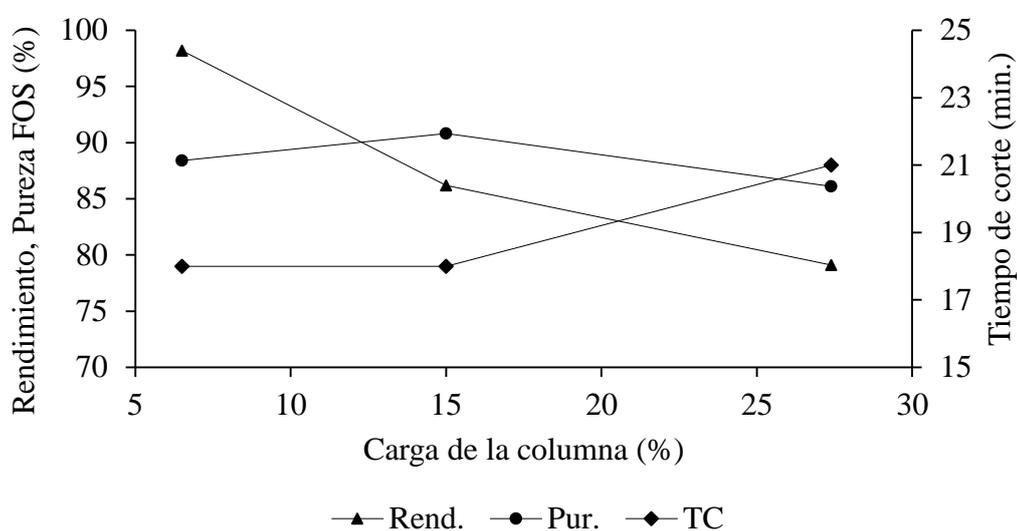


Figura 16: Efecto de la carga de columna. Diaion UBK530 Na a 60°C. Flujo 0.5 ml/min. Volumen de cada fracción 1.5 ml

La capacidad o eficiencia de separación de una columna cromatográfica se mide a menudo por el número de platos teóricos (N). Los resultados del Cuadro 21 indican que el porcentaje de carga de columna influye en el número de platos teóricos de los sacáridos. A menor carga de la columna mayor son los valores de N para cada sacárido, mayor es la eficiencia y mayor el rendimiento de FOS. A medida que se incrementa carga, el número de platos para cada sacárido disminuye y por tanto también disminuye el rendimiento de FOS. Pero, aumentando la longitud de la columna o conectando varias columnas en serie, se podría obtener un mayor número de platos teóricos y una mejor resolución (Nowak *et al.*, 2007).

Cuadro 21: Número de platos teóricos (N), altura de plato (H) y resolución de la columna (Rs)

	Eficiencia de la columna			Resolución (R _s)	
		N	H (cm)		
Diaion UBK530 Na 6.5%	FOS	25.0	0.72	F/FOS	0.75
	S	41.0	0.44	F/S	0.52
	G	49.0	0.37	F/G	0.25
	F	64.0	0.28		
Diaion UBK530 Na 15.1%	FOS+S*	21.3	0.85		
	AR	58.0	0.31		
Diaion UBK530 Na 27.4%	FOS+S*	13.6	1.32		
	AR	49.8	0.36		

F: Fructosa. G: Glucosa. S: Sacarosa. AR: Azúcares reductores. (*) Contiene principalmente FOS

Además, en los tres porcentajes de carga de columna ensayados, son los FOS los que presentan menor número de platos teóricos que otros sacáridos, ello indica que son pocos los momentos de equilibrio que alcanza los FOS con las fases líquida y sólida (Fritz y Gjerde, 2009). El menor número de platos para los FOS se puede relacionar con su menor tiempo de retención, en cambio los monosacáridos presentan mayor valor de N y por ello son los más retenidos en la columna; por tanto el número de platos varía con la magnitud del tiempo de retención del sacárido.

La altura del plato teórico (H) también sirve para medir la eficiencia del lecho fijo, un valor bajo para H indica una alta eficiencia de la columna. Los resultados presentados en el Cuadro 21, muestran que los FOS presentan mayor altura de plato, esto coincide con lo reportado por Vaňková y Polakovič (2010b) quienes obtienen valores de H para F, G, S, GF₂, GF₃, GF₄ de 0.28; 0.5; 0.65; 0.71; 0.75 y 0.8 cm, respectivamente. Además, los valores de H se relacionan directamente con la carga de la columna.

La resolución cromatográfica mide el grado de separación de dos picos adyacentes, y es un parámetro importante para distinguir entre el compuesto de interés y las impurezas (Vajda *et al.*, 2015). De acuerdo al Cuadro 21, los valores de resolución para dos compuestos son

menores a uno, ello indica que hay cierta superposición de los dos picos en sus bases. Aún eso, se obtiene una mayor separación entre F/FOS, en cambio la separación entre F/G es casi nula (Figura 13).

Sin embargo, para este estudio, la resolución puede haberse afectado por la cantidad y concentración de la muestra inyectada, pues ello causa un ensanchamiento en la base de los picos. Un aumento en la longitud de la columna podría producir una buena resolución, debido a que la columna soporta un gran número de platos teóricos por metro (Fritz y Gjerde, 2009).

Nobre (2011) encuentra valores de resolución de hasta 1.4 en la separación de FOS y SGF, cuando trabaja en una columna de 30 cm de longitud con una resina Dowex 99K/320 y a una velocidad de flujo de alrededor de 0.5 ml/min. Así mismo indica que la resolución depende de la selectividad, factor de retención y eficiencia de la columna.

Se podría obtener un mayor número de platos teóricos y mayor resolución disminuyendo el tamaño de partícula del adsorbente y aumentando la velocidad de flujo, puesto que el número máximo de platos no aumenta fuertemente a velocidades de flujo muy bajas (Vajda *et al.*, 2015).

De este tercer estudio se puede decir que, el incremento de la carga de columna reduce el rendimiento en la separación de FOS. Se encontraron mejores resultados a 6.5 por ciento de carga de columna, y la pureza no aumenta debido principalmente a una baja separación entre sacarosa y FOS.

Por otro lado, en el Cuadro 22 se muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos en esta investigación. En la purificación de FOS con carbón activado, se utilizó un extracto clarificado de 50.6 por ciento de pureza de FOS. Y a 25°C se logró purificar hasta 92.1 por ciento con una recuperación de 75.4 por ciento, y la mezcla rica en FOS está contaminada solamente con sacarosa. Sin embargo, se podría encontrar mejores valores de rendimiento utilizando un extracto clarificado y decolorado con carbón activado en polvo.

En cambio, para la purificación de FOS con la resina Diaion UBK530 Na, se utilizó un extracto desmineralizado de 54.5 por ciento de pureza de FOS. Y a 60°C se logró purificar

hasta 88.2 por ciento con una recuperación de 99.4 por ciento. Así mismo, la mezcla rica en FOS contiene bajas concentraciones de azúcares reductores y sacarosa. Sin embargo, en este caso se podría obtener un mayor valor de pureza incrementando la longitud de la columna.

Cuadro 22: Comparación de resultados de la purificación de FOS utilizando dos técnicas cromatográficas

Técnica cromatográfica	Tipo de muestra	% Rend. FOS	% Pureza FOS	% de azúcares contaminantes
Purificación de FOS con carbón activado - 25°C	Extracto clarificado	75.4 ± 0.4	92.1 ± 0.3	7.9% - S
Purificación de FOS con resina Diaion UBK530 Na - 60°C	Extracto desmineralizado	99.4 ± 0.2	88.2 ± 0.5	1.6% - F 2.7% - G 7.5% - S

Promedio de tres repeticiones ± DS. Rend: Rendimiento

En resumen, este trabajo de investigación describe dos técnicas eficientes para purificar los FOS del extracto de yacón. Sin embargo, para la aplicación de estas tecnologías a una escala mayor, hay que tener en cuenta algunas consideraciones que podrían influir en los costos de operación: Para el primer caso de purificación de FOS mediante carbón activado se emplea un extracto de yacón solamente clarificado, el proceso de purificación se realiza a 25°C, y el adsorbente se podría reutilizar lavando la columna con etanol al 60 por ciento.

En cambio, para la purificación de FOS con la resina Diaion UBK530 Na, se utiliza un extracto clarificado y desmineralizado en columnas de lecho mixto (con resinas aniónicas y catiónicas). El proceso de separación de FOS se realiza a 60°C, y la resina se regenera con una solución de cloruro de sodio.

Por último, el precio de los adsorbentes carbón activado y resina, están en relación de 1:5 aproximadamente.

V. CONCLUSIONES

- En la purificación de FOS por cromatografía en columna de carbón activado, se determinó que la temperatura influye significativamente en el rendimiento y pureza de FOS. Mejores resultados se consiguieron a 25°C que a 40°C, obteniéndose 92.1 por ciento de pureza de FOS con una recuperación de 75.4 por ciento. Se obtuvo una buena separación entre FOS-glucosa y FOS-fructosa pero no entre FOS-sacarosa.
- La purificación de FOS mediante cromatografía en columna con diferentes resinas de intercambio catiónico a 25 y 60 °C muestra que la interacción de los factores temperatura y tipo de resina influyen significativamente en el rendimiento y pureza de FOS. Los mejores resultados se obtuvieron a 60°C con la resina Diaion UBK530 Na, obteniéndose 88.2 por ciento de pureza de FOS con una recuperación de 99.4 por ciento. Con todas las resinas evaluadas se obtuvo una buena separación de los FOS con la fructosa y glucosa, pero no con la sacarosa.
- La composición en carbohidratos del extracto purificado con carbón activado fue de 92.1 por ciento de FOS y 7.9 por ciento de sacarosa; mientras que el extracto purificado con la resina Diaion UBK530 Na tuvo 88.2 por ciento de FOS, 1.6 por ciento de fructosa, 2.7 por ciento de glucosa y 7.5 por ciento de sacarosa.
- De los experimentos de la influencia de la carga de columna, realizados con la resina Diaion UBK530Na a 60°C, se obtuvo que este factor influye significativamente en la purificación de FOS. Mejores resultados se obtuvieron con 6.5 por ciento de carga de columna, valores de 15.1 y 27.4 por ciento reducen la recuperación de FOS.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la purificación de fructooligosacáridos del extracto desmineralizado de yacón variando la longitud de la columna y el flujo de elución.
- Evaluar la posibilidad de utilizar la fracción residual rica en fructosa como un edulcorante natural.
- Estudiar la purificación de FOS del extracto desmineralizado de yacón mediante cromatografía en lecho móvil simulado con el fin de aumentar la pureza.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, I; Hayashi, K; Kitagawa, M. 1983. Adsorption of saccharides from aqueous solution onto activated carbon. *Carbon* 21 (3): 189-191.
2. Abrams, IM; Millar, JR. 1997. A history of the origin and development of macroporous ion-exchange resins. *Reactive and Functional Polymers* 35 (1-2): 7-22.
3. Afrin, T; Nusrat, N; Muhibur, M; Yousuf, M; Mollaha, A; Susan, M. 2014. Temperature perturbed water structure modification by D (-)-fructose at different concentrations. *Royal Society of Chemistry Advances* 4 (92):50906-50913.
4. Ahmedna, M. 2000. Surface properties of granular active carbons from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization. *Bioresource Technology* 71(2):103-112.
5. Angyal, J. 1989. Complexes of Metal-Cations with Carbohydrates in Solution. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 47:1-43.
6. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analysis. 15 th Edition. Washington, USA.
7. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Methods of Analysis. Edit. Board. Washington, USA. v2.
8. Aybar, M; Sánchez, A; Grau, A; Sánchez, S. 2001. Hypoglycemic effect of the water of *Smallantus sonchifolius* (Yacón) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2):125-132.
9. Azevedo, S; Rodrigues, E. 2001. Fructose-glucose separation in a SMB pilot bed plants with low efficient stationary phases: separation of fructose and glucose. *Journal of Chromatography* 868 (2): 169-188.
10. Babel, S; Kurniawan, TA. 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal Hazardous Mater* 97(1-3): 219–243.
11. Bansal, R; Goyal, M. 2005. Activated Carbon adsorption. Taylor y Francis.
12. Bansal, RC; Donnet, JB; Stoeckli, F. 1988. Active Carbon. Ed. M. Dekker. New York
13. Basolo, F; Johnson, R. 1980. Química de los compuestos de coordinación. Ed. Reverte. Barcelona- España.

14. Berck, Z. 2013. Food process engineering and technology. Second edition. Academic Press. USA.
15. Beste, Y; Lisso, M; Wozny, G; Arlt, W. 2000. Optimization of simulated moving bed plants with low efficient stationary phases: separation of fructose and glucose. *Journal of Chromatography A* 868(2):169–188.
16. Bichsel, ES; Dark, NF; Eagan, WY. 1981. Production de Fructose and useful by-products. Patente 4 263 052. Departamento of Commerce, Washington, DC. EUA.
17. Biedrzycka, E; Bielecka, M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructanos of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Technol*, 15: 170-175.
18. Bojorquez, MC; Perez, FJ; Montano, F. 2010. Liquid sugar from raw granulated cane sugar purifying process. Patent 20100307485A1. US.
19. Borba, C; Silva, A; Spohr, S; Santos, G; Guirardello, R. 2011. Application of the mass action law to describe ion exchange equilibrium in a fixed-bed column. *Chemical Engineering Journal* 172(1):312– 320.
20. Bouhnik, Y; Raskine, L; Simoneau, G; Vicaut, E; Neut, C; Flourie, B. 2004. The capacity of non digestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacterias in healthy humans: A double blind, randomized, placebo controlled, parallel-group, dose-response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(6):1658–1664.
21. Buttersack, C. 1989. Accessibility and catalytic activity of sulfonic acid ion-exchange resins in different solvents. *Reactive Polymers* 10(2-3):143-164.
22. Cabot- Norit. 2014. Información del producto Norit® GAC 1240 W
23. Campos, D; Betalleluz, I; Chirinos, R; Aguilar, A; Noratto, G; Pedreschi, R. 2012. Prebiotic effects of yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry* 135(3):1592-1599.
24. Campos, D; Betalleluz, I; Tauquino, R; Chirinos, R; Pedreschi, R. 2009. Nutritional and functional characterisation of Andean chicuru (*Stangea rhizanta*). *Food Chemistry* 112(1):63-70.
25. Castellanos, O; Cruz, G; Gonzáles, G; Rentería, A. 2004. Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón. *Ingeniería e Investigación*. 24(2): 8-21.
26. Castro, A; Céspedes, G; Carballo, S; Bergenståhl, B; Tornberg, E. 2013. Dietary fiber, fructooligosaccharides, and physicochemical properties of homogenized aqueous

- suspensions of yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Research International* 50(1):392–400.
27. Chacón, A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 265-286.
 28. Chen, JC; Chou, CC. 1993. Cane sugar handbook. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12 th Ed. Wiley. Canada.
 29. Chirinos, R. 1999. Obtención de inulina y/o oligofructanos a partir del Yacón (*Smallanthus sonchifolia Poepp & Endl*). Tesis Ing. Ind. Lima, PE, Universidad Nacional Agraria La Molina.
 30. Choque, G; Silva, W; Tamashiro, C; Maróstica, R; Pastore, G. 2013. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods for Human Nutrition* Volume 68(3):222-228.
 31. Chou, C. 2000. Handbook of sugar refining. A manual for the design and operation of sugar refining facilities. Nueva Orleans, Estados Unidos. Wiley.
 32. Churms, C. 1996. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography* 720(1-2):151-166.
 33. Coussement, PA. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of nutrition* 129(7):1412S-1417S.
 34. Crittenden, R; Playne, M. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 7(11):353-361.
 35. Cummings, JH; Roberfroid, MB; Andersson, H; Barth, C; Ferro-Luzzi, A; Ghoos, Y; Gibney, M; Hermansen, K; James, WPT; Korver, O; Lairon, D; Pascal, G; Voragen, AG. 1997. A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. *European Journal of Clinical Nutrition* 51(7): 417-423.
 36. Dardel. 2013. Propiedades de las resinas. Consultado ene. 2015. Disponible en http://dardel.info/IX/resin_properties_ES.html
 37. De Moura, A; Caetano, F; Sivieri, K; Urbano, H; Cabello, C; Rodrigues, A; Barbisan, F. 2012. Protective effects of yacón (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 50(8):2902-2910.
 38. Diaion. 2008. Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent. Mitsubishi Chemical Corporation.
 39. Diaion. 2015. Catálogo de resinas. Consultado ene. 2015. Disponible en <http://www.diaion.com>

40. Doherty, W; Greenwood, J; Pilaski, D, Wright, PG. 2002. The effect of liming conditions in juice clarification. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.* 24:1-12.
41. Dow. 2014. Hoja de datos de Dowex 99Ca/320. Consultado ene. 2014. Disponible en <http://www.dow.com/>
42. Fassbender, HW. 1975. Química del suelo. IICA. Costa rica.
43. Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87(2): S287-S291.
44. Fritz, J; Gjerde, D. 2009. Ion Chromatography. 4th. Germany, Wiley. 37-68.
45. Genta, S; Cabrera, W; Habib, N; Pons, J; Carillo, M; Grau, A; Sánchez, S. 2009. Yacón syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28(2):182-187.
46. Genta, S; Cabrera, W; Grau, A; Sánchez, S. 2005. Subchronic 4 month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacón) roots as a diet supplement in rats. *Food and Chemical Toxicology* 43(11):1657–1665.
47. Gergova, K; Petrov, N; Eser, S. 1994. Adsorption properties and microstructure of activated carbons produced from by-products by stream pyrolysis. *Carbon* 32(4):693-702.
48. Gökmen, V; Serpen, A. 2002. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using adsorbent resin. *Journal of Food Engineering* 53(3):221–227.
49. Goto, K; Fukai, K; Hikida, J, Nanjo, F; Hara, Y. 1995. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59(12):2346-2347.
50. Goulding, RW. 1975. Liquid chromatography of sugars and related polyhydric alcohols on cation exchangers. *Journal of Chromatography A* 103(2):229-239.
51. Graefe, S; Hermann, M; Manrique, I; Golombek, S; Buerkert, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacón roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research* 86(2–3): 157-165.
52. Gramblička, M; Polakovič, M. 2007. Adsorption equilibria of glucose, fructose, sucrose, and fructooligosaccharides on cation exchange resin. *Journal of Chemical and Engineering Data* 52(2):345–350.
53. Hermann, M; Freire, I; Pazos, C. 1999. Compositional diversity of the yacón storage root. Impact on changing world: Program report 1997-1998. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 425-432.

54. Hernández, J; Solís, JA; Duran de Bazúa, C. 2003. Separación de fructosa de melaza de caña azúcar por acomplejamiento con hidróxido de calcio. *Tecnología, Ciencia, Educación* 18(1):16-24.
55. Hidaka, H; Hirayama, M; Sumi, N. 1988. A fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural and Biological Chemistry* 52(5):1181-1187.
56. Hung, Y; Lo, H; Wang, L; Taricska, J; Li, K. 2005. Physicochemical Treatment Processes. Granular Activated Carbon Adsorption. *Handbook of Environmental Engineering*, vol. 3 Totowa, New Jersey, Humana Press 573-633.
57. Ibarz, A; Barbosa, G. 2005. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. México. Mundi Prensa. 815-843 p.
58. Ibarz, A; Falguera, V; Salvador, G; Alfonso, G. 2012. Discoloration Kinetics of Clarified Apple Juice Treated with Lewatit® S 4528 Adsorbent Resin During Processing. *Food and Bioprocess Technology* 5(6):2132-2139.
59. Inglezakis, VJ; Pouloupoulos, SG. 2006. Adsorption, Ion Exchange and Catalysis, Design of Operations and Environmental Applications. 1er Ed. Netherlands, Elsevier. 243–353.
60. 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.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 982-988.
61. Juárez, S. 2015. Influencia del blanqueado y secado de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) en el contenido de azúcares y fructooligosacáridos. Tesis Ing. Ind. Lima, PE, Universidad Nacional Agraria La Molina.
62. Jupke, A; Epping, A; Schmidt-Traub, H. 2002. Optimal design of batch and simulated moving bed chromatographic separation processes. *Journal of Chromatography A* 944 (1-2):93–117.
63. Kaplan, H; Hutkins, RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2682-2684.
64. Kina, M. 2016. Optimización de los procesos de extracción de fructooligosacáridos y clarificación del extracto acuoso de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). Tesis Ing. Ind. Lima, PE, Universidad Nacional Agraria La Molina.
65. Kuhn, R; Filho, F. 2010. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New Biotechnology* 27(6): 862-869.

66. Kuhn, R; Mazutti, M; Albertini, LB; Filho, FM. 2014. Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *New Biotechnology* 31(3):237-241.
67. Lachman, J; Fernández, EC; Orsák, M. 2003. Yacón [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use –a review. *Plant Soil Environment*, 49(6):283–290
68. Lei, HJ; Bao, ZB; Xing, HB; Yang, YW; Ren, QL; Zhao, MM; Huang, HH. 2010. Adsorption Behavior of Glucose, Xylose, and Arabinose on Five Different Cation Exchange Resins. *Journal of Chemical and Engineering Data* 55(2):735-738.
69. Lewatit. 2014. Información de producto Lewatit Monoplus M600 y S108. Consultado ene. 2015. Disponible en www.lpt.lewatit.com
70. L'homme, C; Arbelot, M; Puigserver, A; Biagini, A. 2003. Kinetics of Hydrolysis of Fructooligosaccharides in Mineral-Buffered Aqueous Solutions: Influence of pH and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(1):224-228.
71. Lobo, A; Colli, C ; Alvares, E; Filisetti. 2007. Effects of fructans-containing yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. *British Journal of Nutrition* 97(4):776-785.
72. Losso, J; Hakai, S. 1997. Molecular size of garlic FOS by matrix assisted desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(11):4342-4346.
73. Luz, DA; Rodrigues, AK; Silva, FR; Torres, AE; Cavalcante, CL; Brito, ES; Azevedo, DC. 2008. Adsorptive separation of fructose and glucose from an agroindustrial waste of cashew industry. *Bioresource Technology* 99(7): 2455-2465.
74. Madrigal, L; Sangronis, E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos Funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4):387-396.
75. Manning, TS; Gibson, GR. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 18(2): 287-298.
76. Manrique, I; Hermann, H; Bernet, B. 2004. Yacón - Ficha Técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima, Perú. Consultado ene. 2014. Disponible en www.cipotato.org/artc/cipcrops/fichatecnicayacon.pdf
77. Matijašević, Lj; Vasić-Rački, D; Pavlović, N. 1997. Separation of glucose/fructose mixtures. Analysis of elution of profiles. *Chemical Engineering Journal* 65(3):209-212.

78. Matusek, A; Merész, P; Diem Le, TK; Orsi, F. 2009. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides. *European Food Research and Technology* 228(3):355–365.
79. Mc Cabe, W; Smith, J; Harriot, P. 2007. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. 7° Ed. México, Mc Graw Hill. 875-890 p.
80. Mejía, A. 2015. Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana. Tesis Ing. Ind. Lima, PE, Universidad Nacional Agraria La Molina.
81. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428.
82. Mohammad, S; Ansari, S; Mohammad, S. 2012. Removal of dark colored compounds from date syrup using activated carbon: A kinetic study. *Journal of Food Engineering* 111(3):490–495.
83. Morales, V; Sanz, M; Olano, A; Corzo, N. 2006. Rapid Separation on Activated Charcoal of High Oligosaccharides in Honey. *Chromatographia* 64(3): 233–238.
84. Moreno, C. 2004. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon* 42(1):83-94.
85. Mostafazadeh, KA; Sarshara, M; Javadiana, S; Zarefardc, MR; Haghighid, ZA. 2011. Separation of fructose and glucose from date syrup using resin chromatographic method: Experimental data and mathematical modeling. *Separation and Purification Technology* 79(1):72–78.
86. Neves, V; Da Silva, A. 2007. Polyphenol oxidase from Yacón roots (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(6): 2424-2430
87. Niness, K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World* 44(2): 79-81.
88. NMX (Norma Mexicana). 2000. Análisis de agua-Determinación de la conductividad electrolítica NMX-AA-093-SCFI. México.
89. NMX (Norma Mexicana). 2001. Análisis de agua-Determinación de turbiedad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. NMX-AA-038-SCFI. México.
90. Nobre, C; Santos, MJ; Dominguez, A; Torres, D; Rocha, O; Peres, AM; Rocha, I; Ferreira, EC; Teixeira, JA; Rodrigues, LR. 2009. Comparison of adsorption equilibrium of fructose, glucose and sucrose on potassium gel-type and macroporous sodium ion-exchange resins. *Analytica Chemical Acta* 654 (1):71-76.

91. Nobre, C. 2011. Fructo-oligosaccharides recovery from fermentation processes. Tesis Doctoral. Portugal, Universidad de Minho. Escuela de Ingeniería.
92. Nobre, C; Teixeira, J; Rodrigues, R. 2012. Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. *New Biotechnology* 29(3):395-401.
93. Nobre, C; Teixeira, J; Rodrigues, L. 2013. New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(10): 1-50.
94. Nobre, C; Suvarov, P; De Weireld, G. 2014. Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation. *New Biotechnology* 31(1): 55-63.
95. Nowak, J; Gedicke, K; Antos, D; Piatkowski, W; Seidel-Morgenstern, A. 2007. Synergistic effects in competitive adsorption of carbohydrates on an ion-exchange resin. *Journal of Chromatography A* 1164 (1-2):224–234.
96. Ohyama, T; Ito, O; Yasuyoshi, S; Ikarashi, T; Minamisawa, K; Kubota, M; Tsukihashi, T; Asami, T. 1990. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 36(1):167-171.
97. Ojansivu, I; Ferreira, C; Salminen, S. 2011. Yacón, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology* 22(1):40-46.
98. Pedreschi, R; Campos, D; Noratto, G; Chirinos, R; Cisneros, L. 2003. Andean yacón root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18):5278-5284.
99. Pedruzzi, I; Borges da Silva, EA; Rodrigues, AE. 2008. Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. *Separation and Purification Technology* 63(3):600–611.
100. Perrin, S; Warchol, M; Grill, J; Schneider, F. 2001. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology* 90(6):859-865.
101. Pinelo, M; Jonsson, G; Meyer, S. 2009. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separation and Purification Technology* 70(1):1-11.

102. Pollard, SJ; Fowler, GD; Sollars, CG; Perry, R.1992. Low-cost adsorbents for waste and wastewater treatment: a review. *Science of The Total Environment* 116(1-2):31-52.
103. Popovici, ST; Kok, WT; Schoenmakers, PJ. 2004. Band broadening in size-exclusion chromatography of polydisperse samples. *Journal of Chromatography A* 1060(1-2):237–252.
104. Prosky, L; Hoebregs, H. 1999. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition* 129(7):1418S–1423S.
105. Purolite. 2015. Ficha Técnica de resinas. Consultado ene. 2014. Disponible en <http://www.purolite.com>
106. Qiu, N; Guo, S; Chang, Y. 2007. Study upon kinetic process of apple juice adsorption decoloration by using adsorbent resin. *Journal of Food Engineering* 81(1):243–249.
107. Rastall, B; Gibson, G. 2006. Prebiotics: Development and application. Wiley.
108. Rein, P. 2012. Ingeniería de la Caña de Azúcar. Berlín, Bartens.
109. Roberfroid, MB. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87(2): S139-S143.
110. Roberfroid, MB; Delzenne, N. 1998. Dietary fructans. *Annual Review Nutrition* 18:117–143.
111. Rodríguez, F; Silvestre, J. 2016. Activated Carbon and Adsorption in Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Universidad de Alicante, Alicante, Spain.
112. Ruthven, D. 1984. Principles of adsorption and adsorption process. United States of America: Wiley – Interscience Publication 221–270.
113. Saari, P; Heikki, H; Hurme, M. 2010. Adsorption Equilibria of Arabinose, Fructose, Galactose, Glucose, Mannose, Rhamnose, Sucrose, and Xylose on Ion-Exchange Resins. *Journal of Chemical and Engineering Data* 55(9):3462–3467.
114. Saari, P. 2011. Industrial Scale Chromatographic Separation of Valuable Compounds from Biomass Hydrolysates and Side Streams. Doctoral dissertations. Department of Biotechnology and Chemical Technology.
115. Santana, I; Cardoso, M. 2008. Raíz tuberosa de yacón (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciencia Rural* 38(3): 898-905.

116. Sanz, M; Polemis, N; Morales, V; Corzo, N; Drakoularakou, A; Gibson, G; Rastall, R. 2005. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(8): 2914-2921.
117. Schieweck, H; Schwartz, T; Van der Poel, P; Beet Sugar Development Foundation. 1998. Sugar Technology, beet and cane sugar manufacture. Berlín.
118. 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.
119. Sherrington, DC. 1998. Preparation, structure and morphology of polymer supports. *Chemical Communications* (21): 2275-2286.
120. Sigel, A; Sigel, H; Sigel, R. 2012. Interplay Between Metal Ions and Nucleic Acids. Springer. New York. 124 p.
121. Simonovska, B; Vovk, I; Andrenšek, S; Valentová, K; Ulrichová, J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* 1016(1):89-98.
122. Skoog, DA; Holler, FJ; Crouch, SR. 2009. Principios de Análisis Instrumental. 6th. México DF, Cengage Learning.
123. Slavin, J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrients data bases. *Journal of Food Composition and Analysis* 16(3):287-291.
124. Stefansson, M; Westerlund, D. 1996. Ligand-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. *Journal of Chromatography A* 720(1-2):127-136.
125. Sundari, C; Balasubramanian, D. 1997. Hydrophobic surfaces in saccharide chains. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 67(2-3):183-216.
126. Takenaka, M; Yan, X; Ono, H; Yoshida, M; Nagata, T; Nakanishi, T. 2003. Caffeic acid derivatives in the roots of yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3):793-796.
127. Tan, IA; Ahmad, AL; Hameed, BH. 2008. Adsorption of basic dye using activated carbon prepared from oil palm shell: batch and fixed bed studies. *Desalination* 225(1-3):13-28.
128. Tiihonen, J; Laatikainen, M; Markkanen, I; Paatero, E; Jumppanen, J. 1999. Sorption of neutral components in ion exchange resins. 2. Sorption of D-xylose in sulfonated PS-DVB resins from water-ethanol mixtures. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 38(12):4843-4849.

129. Tiihonen, J; Markkanen, I; Paatero, E. 2002. Complex stability of sugars and sugar alcohols with Na⁺, Ca²⁺, and La³⁺ in chromatographic separations using poly(styreneco-divinylbenzene) resins and aqueous organic eluents. *Chemical Engineering Communications* 189(7):995-1008.
130. Vajda, J; Conze, W; Müller, E. 2015. Kinetic plots in aqueous size exclusion chromatography of monoclonal antibodies and virus particles. *Journal of Chromatography A* 1426:118–125.
131. Valcárcel, M; Gómez, A. 1988. Técnicas analíticas de separación. Barcelona, Reverte.
132. Van Loo, J; Cummings, J; Delzenne, N; Englyst, H; Franck, A; Hopkins, M; Kok, N; Macfarlane, G; Newton, D; Quigley, M; Roberfroid, M; Vliet, T; Heuvel, E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition* 81(2):121–132.
133. Vaňková, K; Gramblička, M; Polakovič, M. 2010a. Single-Component and Binary Adsorption Equilibria of Fructooligosaccharides, Glucose, Fructose, and Sucrose on a Ca-Form Cation Exchanger. *Journal of Chemical and Engineering Data* 55(1):405–410.
134. Vaňková, K; Polakovič, M. 2010b. Optimization of single-column chromatographic separation of fructooligosaccharides. *Process Biochemistry* 45 (8): 1325–1329
135. Vente, A; Bosch, H; De Haan, B; Bussmann, T. 2005. Comparison of sorption isotherms of mono- and disaccharides relevant to oligosaccharide separations for Na, K, and Ca loaded cation exchange resins. *Chemical Engineering Communications* 192(1):23-33.
136. Vente, J; Bosch, H; Haan, AB; Bussmann, P. 2003. Adsorptive separation of oligosaccharides: influence of crosslinking of cation exchange resins. Proc. Of the 3rd Pacific Basin Conf. on Adsorption Science and Technology, Ed. C. Lee. Singapore, World Scientific Publishing.
137. Walton, HF.1985. Counter-ion effects in partition chromatography. *Journal of chromatography A* 332:203-209.
138. Yan, X; Suzuki, M; Ohnishi-Kameyama, M; Sada, Y; Nakanishi, T; Nagata, T. 1999. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11):4711-4713.

139. Yano, Y; Tanaka, K; Doi, Y; Janado, M. 1988. The Polystyrene Affinity of Methylglycosides, Deoxysugars and Glucooligosaccharides. *Journal of Chemistry Solution* 17(4):347-358.
140. Yun, WJ; 1996. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* 19(2):107-117.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Determinación de azúcares reductores (Método Miller)

Preparación de reactivos

- Solución DNS: Disolver 5.5 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 300 ml de agua destilada y añadir 5 g de DNS disolver totalmente. Seguidamente, agregar 1 g de fenol y 0.25 g de bisulfito de sodio, luego enrasar a 500 ml con agua destilada y conservar en un frasco oscuro y en refrigeración.
- Sal de Rochelle: Preparar una solución al 40 por ciento (p/v) de tartrato de sodio y potasio. Almacenar en refrigeración.

Preparación de la curva estándar

- Solución madre: Pesar 0.3603 g de fructosa anhidra y enrasar a 100 ml con agua destilada. Tomar alícuotas de 3, 6, 9, 12 y 16 ml y enrasar en fioles de 25 ml.
- Tomar 500 μ l de cada nueva solución y colocarlo en un tubo de ensayo de tapa rosca, paralelo a esto realizar un blanco. A todos los tubos añadir 3 ml de solución de la solución de DNS. Realizar el análisis por triplicado. Llevar todos los tubos a baño maría en ebullición durante 5 min.
- Agregar 1 ml de sal Rochelle y 10 ml de agua destilada a cada tubo y agitar.
- Realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

Análisis de la muestra

- Tomar 500 μ l de muestra, y proceder de la misma manera que para la curva estándar.

Con los datos obtenidos de las absorbancias, se procedió a construir la curva de Fructosa como se observa en la Figura 1. Los resultados se expresan en gramos de Fructosa/ml.

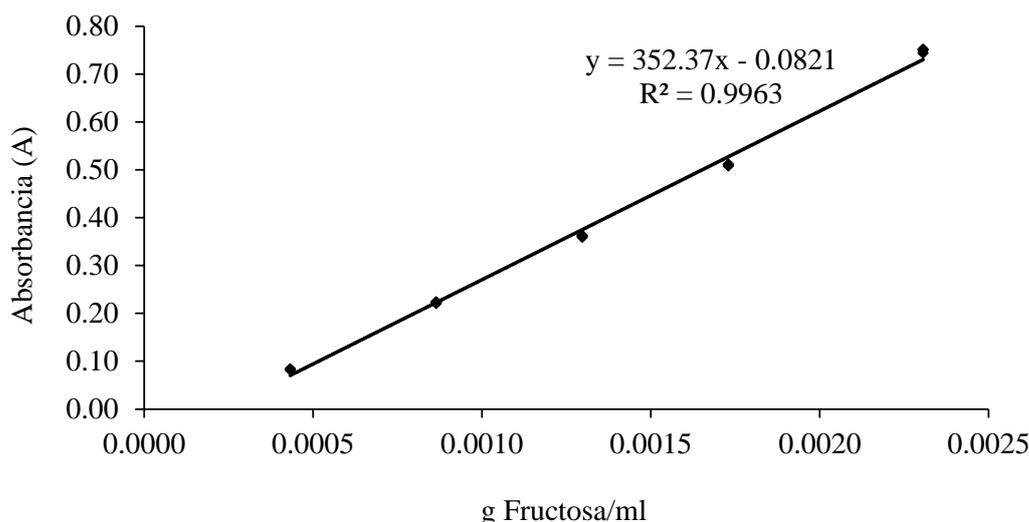


Figura 1. Curva estándar de azúcares reductores expresados como fructosa/ml

Anexo 2: Determinación de FOS por hidrólisis ácida

Este método permite conocer de manera rápida la presencia de FOS. Para ello, se considera la cantidad total e inicial de azúcares reductores en la muestra. Para determinar la cantidad total, se toma una alícuota diluida de la muestra y se somete a un medio ácido y caliente para hidrolizar a los FOS y sacarosa en fructosa y glucosa. Mediante la reacción con DNS (Anexo 1) se obtiene la cantidad total de azúcares reductores provenientes de los FOS y sacarosa más la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra inicial. Luego, a la misma muestra se le determina azúcares reductores iniciales (Anexo 1). El contenido aproximado de FOS y sacarosa se obtiene mediante una diferencia de azúcares reductores totales y azúcares reductores iniciales ($FOS + S = AR_{Hidrólisis} - AR_{Inicial}$).

Preparación de ácido clorhídrico 2N

Colocar alrededor de 80 ml de agua destilada en una fiola de 100 ml, luego añadir 16.6 ml de ácido clorhídrico y enrazar.

Análisis de la muestra

- Tomar 400 μ l de muestra, adicionar 100 μ l de ácido clorhídrico 2N y agitar. Llevar a baño maría a 100 °C por 5 min.
- Adicionar 3 ml de solución de DNS y agitar. Colocar en baño maría a 100 °C por 5 min.

- Adicionar 1 ml de sal de Rochelle seguido de 10 ml de agua destilada y agitar.
- Realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

Anexo 3: Características generales de las resinas de intercambio iónico utilizadas en la desmineralización

Descripción	Lewatit Monoplus M600	Lewatit Monoplus S108
Forma iónica	Cl ⁻	Na ⁺
Grupo funcional	Amina cuaternaria, tipo II	Ácido sulfónico
Matriz	Poliestireno reticulado	Poliestireno reticulado
Estructura, Aspecto	Gel, Blanco translúcido	Gel, Negro-pardo
Coefficiente de uniformidad	Máximo 1.1	Máximo 1.05 ± 0.05
Tamaño medio del grano	0.62 ± 0.05 mm	0.62 ± 0.05 mm
Capacidad total	Mínimo 1.3 eq/l	Mínimo 2.2 eq/l

Fuente: Lewatit (2014)

Anexo 4: Características generales del carbón activado granular

Característica	Valor
Tamaño de partícula > 12 mesh (1.7 mm)	Máximo 10%
Tamaño de partícula < 40 mesh (0.425 mm)	Máximo 5%
Humedad	Máximo 5%
Número de Iodo	975
Adsorción de azul de metileno	20 g/100g
Área superficial total (B.E.T)	1100 m ² /g
Densidad aparente	500 Kg/m ³
Dureza Ball-pan	97
Tamaño efectivo D ₁₀	0.6-0.7 mm
Coefficiente de uniformidad	1.7
Contenido de ceniza	12% de la masa
Ceniza soluble en agua	0.1% de la masa
pH	Alcalino

Fuente: Cabot-Norit (2014)

Anexo 5: Análisis Estadístico - Características físicas del extracto bruto y clarificado de yacón

Turbidez

Tabla ANOVA para Turbidez (NTU) por Tipo de Extracto

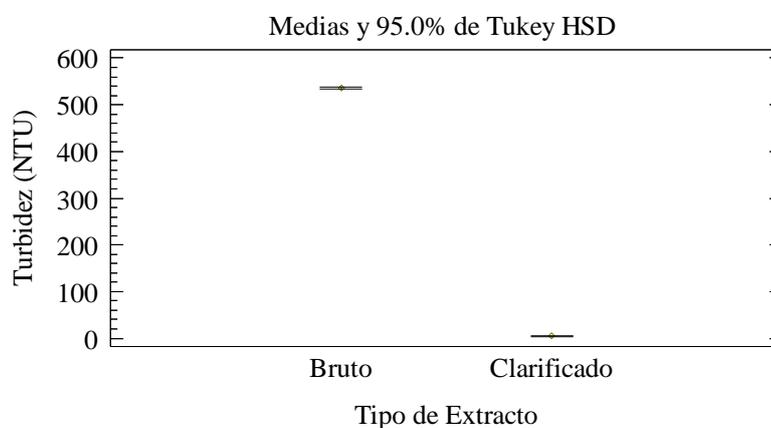
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	423954.00	1	423954.00	211504.90	0.00
Intra grupos	8.01	4	2.00		
Total (Corr.)	423962.00	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Turbidez (NTU) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Clarificado	3	4.56	X
Bruto	3	536.19	X

Gráfico de Medias



Color

Tabla ANOVA para Color (Delta E) por Tipo de Extracto

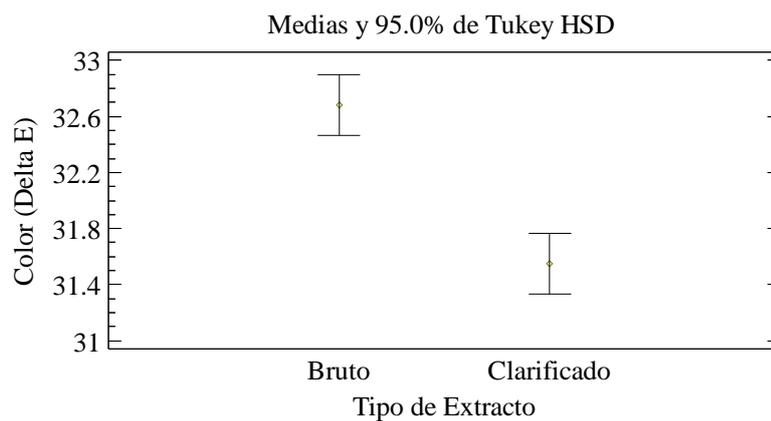
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.91	1	1.91	52.84	0.00
Intra grupos	0.14	4	0.03		
Total (Corr.)	2.06	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Color (Delta E) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Clarificado	3	31.55	X
Bruto	3	32.68	X

Gráfico de Medias



Conductividad

Tabla ANOVA para Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) por Tipo de Extracto

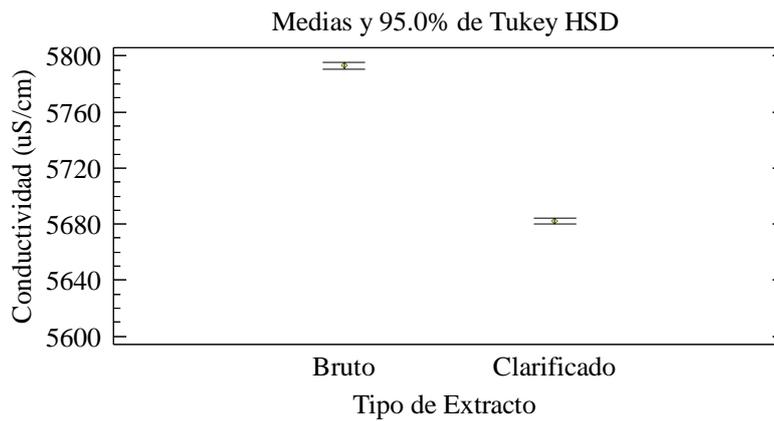
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18481.50	1	18481.50	4620.37	0.00
Intra grupos	16.00	4	4.00		
Total (Corr.)	18497.50	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Clarificado	3	5682.00	X
Bruto	3	5793.00	X

Gráfico de Medias



pH

Tabla ANOVA para pH por Tipo de Extracto

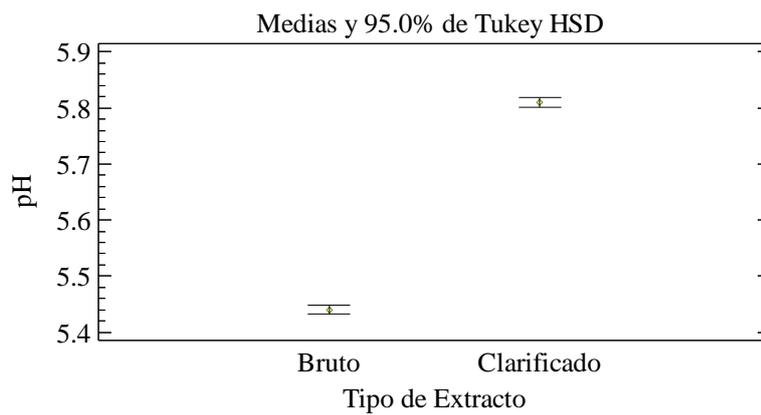
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.20	1	0.20	4107.00	0.00
Intra grupos	0.00	4	0.00		
Total (Corr.)	0.20	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Bruto	3	5.44	X
Clarificado	3	5.81	X

Gráfico de Medias



Brix

Tabla ANOVA para Brix por Tipo de Extracto

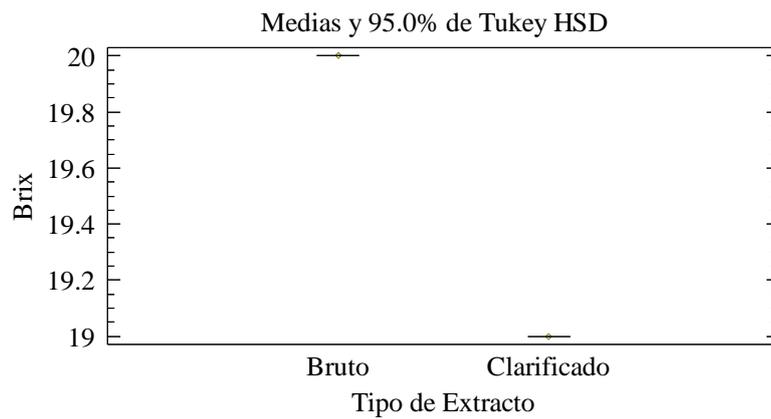
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.5	1	1.5		
Intra grupos	0	4	0		
Total (Corr.)	1.5	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Brix por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Clarificado	3	19.0	X
Bruto	3	20.0	X

Grafico de Medias



Anexo 6: Análisis Estadístico - Características físicas del extracto bruto, clarificado y desmineralizado o desionizado de yacón

Turbidez

Tabla ANOVA para Turbidez (NTU) por Tipo de Extracto

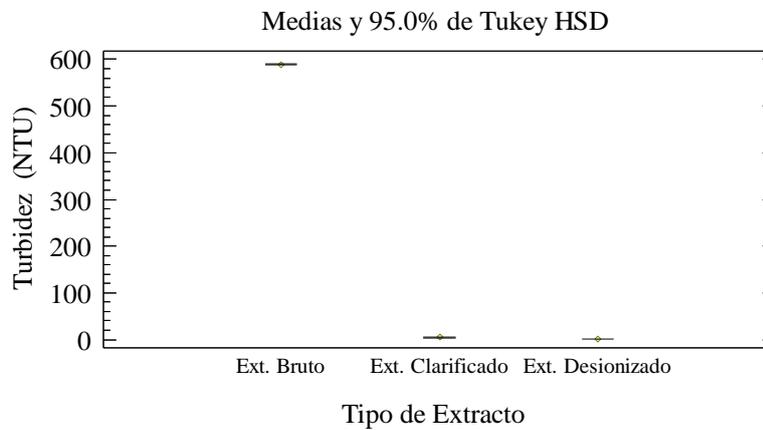
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	686294.00	2	343147.00	514617.88	0.00
Intra grupos	4.00	6	0.66		
Total (Corr.)	686298.00	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Turbidez (NTU) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Desionizado	3	0.40	X
Clarificado	3	4.85	X
Bruto	3	588.40	X

Gráfico de Medias



Conductividad

Tabla ANOVA para Conductividad (uS/cm) por Tipo de Extracto

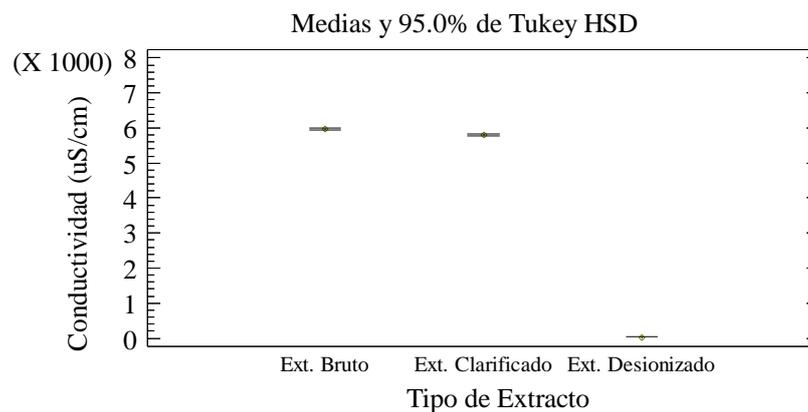
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.90E7	2	3.45E7	111993.48	0.00
Intra grupos	1850.02	6	308.33		
Total (Corr.)	6.90E7	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Conductividad (uS/cm) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Desionizado	3	17.87	X
Clarificado	3	5810.00	X
Bruto	3	5975.00	X

Gráfico de Medias



Color

Tabla ANOVA para Color (Delta E) por Tipo de Extracto

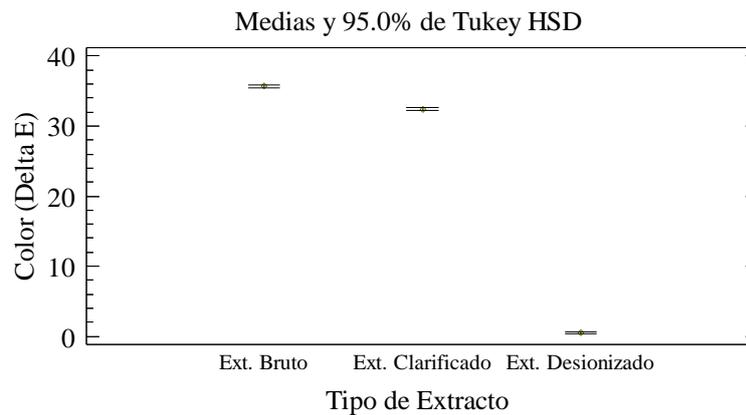
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2267.54	2	1133.77	42463.30	0.00
Intra grupos	0.16	6	0.02		
Total (Corr.)	2267.70	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Color (Delta E) por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Desionizado	3	0.50	X
Clarificado	3	32.40	X
Bruto	3	35.70	X

Gráfico de Medias



pH

Tabla ANOVA para pH por Tipo de Extracto

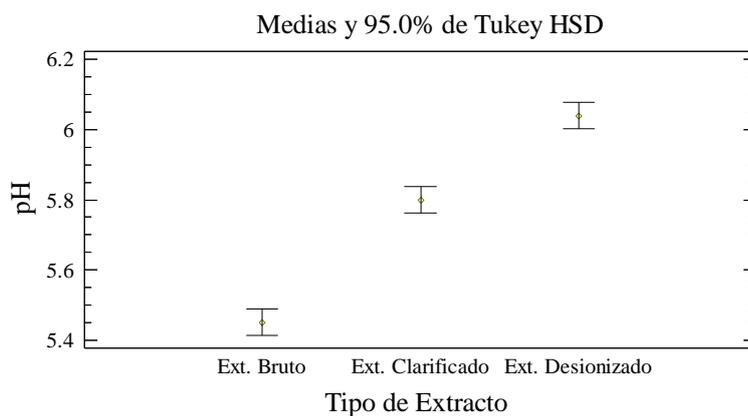
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.52	2	0.26	304.73	0.00
Intra grupos	0.00	6	0.00		
Total (Corr.)	0.53	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Bruto	3	5.45	X
Clarificado	3	5.80	X
Desionizado	3	6.04	X

Gráfico de Medias



Brix

Tabla ANOVA para °BRIX por Tipo de Extracto

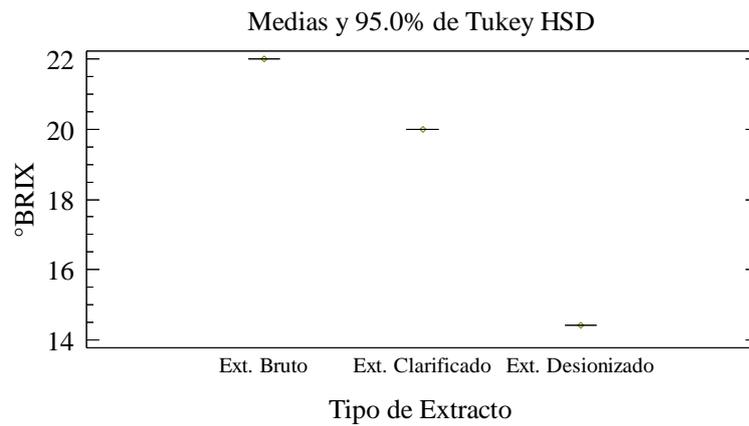
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	93.12	2	46.56		
Intra grupos	0	6	0		
Total (Corr.)	93.12	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para °BRIX por Tipo de Extracto

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ext. Desionizado	3	14.4	X
Ext. Clarificado	3	20.0	X
Ext. Bruto	3	22.0	X

Grafico de Medias



Anexo 7: Análisis Estadístico - Purificación de FOS con carbón- Efecto de la temperatura en el rendimiento y pureza de FOS

Rendimiento

Tabla ANOVA para Rendimiento (%) por Temperatura

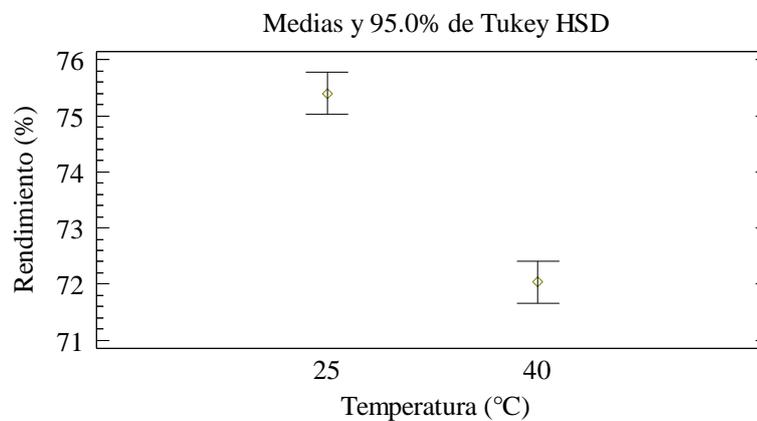
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17.00	1	17.00	152.25	0.00
Intra grupos	0.44	4	0.11		
Total (Corr.)	17.44	5			

Pruebas de Múltiple Rangos Rendimiento (%) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media	Grupos Homogéneos
40	3	72.03	X
25	3	75.40	X

Gráfico de Medias



Pureza

Tabla ANOVA para Pureza (%) por Temperatura

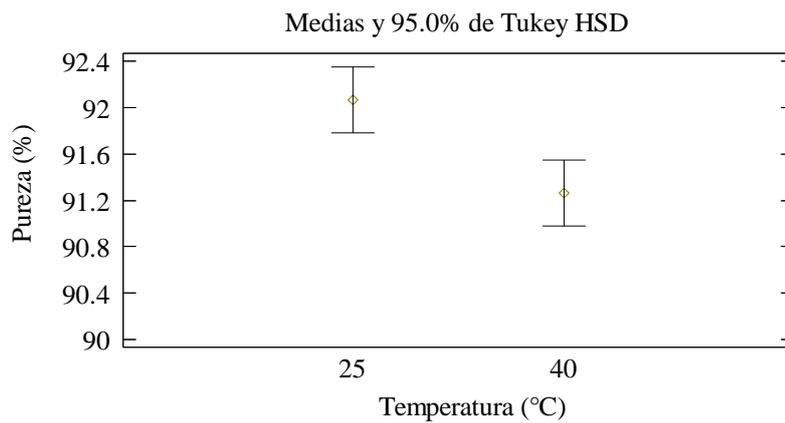
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.96	1	0.96	15.16	0.01
Intra grupos	0.25	4	0.06		
Total (Corr.)	1.21	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pureza (%) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media	Grupos Homogéneos
40	3	91.26	X
25	3	92.06	X

Gráfico de Medias



Anexo 8: Análisis Estadístico - Purificación de FOS con resinas - Efecto de la temperatura y tipo de resina sobre el rendimiento y pureza de FOS

Rendimiento

Análisis de Varianza para Rendimiento (%) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Temperatura	2437.07	1	2437.07	1136.90	0.00
B: Tipo de resina	306.70	5	61.34	28.62	0.00
Interacciones					
AB	146.35	5	29.27	13.66	0.00
Residuos	51.44	24	2.14		
Total (corregido)	2941.58	35			

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (%) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	18	79.67	0.34	X
60	18	96.12	0.34	X

Gráfico de Medias

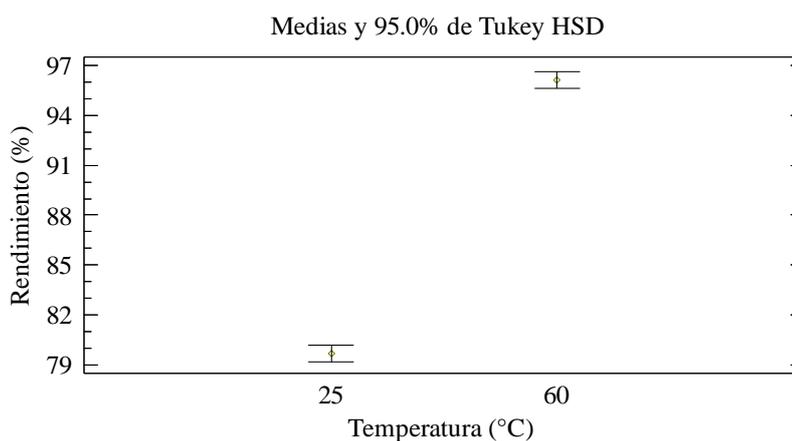
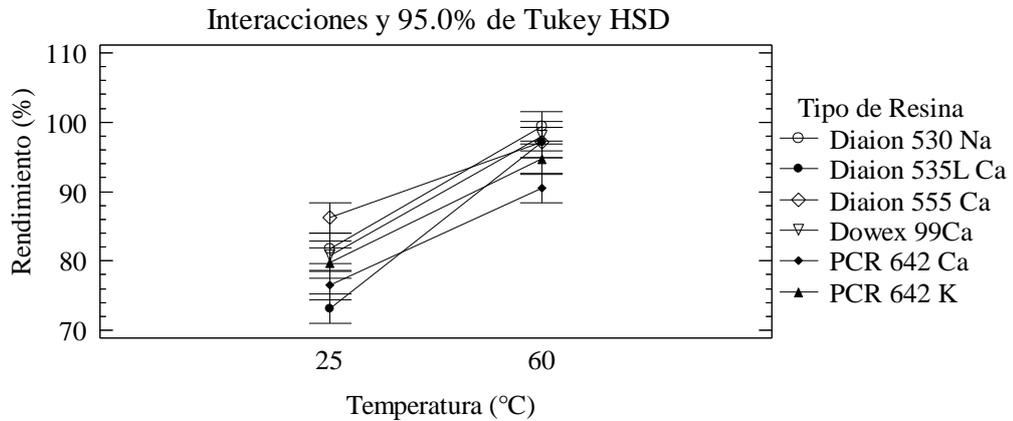


Gráfico de Interacción



Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (%) por Tipo de Resina

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tipo de Resina	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
PCR 642 Ca	6	83.5	0.59	X
DIAION 535L Ca	6	85.11	0.59	XX
PCR 642 K	6	87.18	0.59	XX
DOWEX 99Ca	6	89.33	0.59	XX
DIAION 530 Na	6	90.61	0.59	X
DIAION 555 Ca	6	91.65	0.59	X

Gráfico de Medias

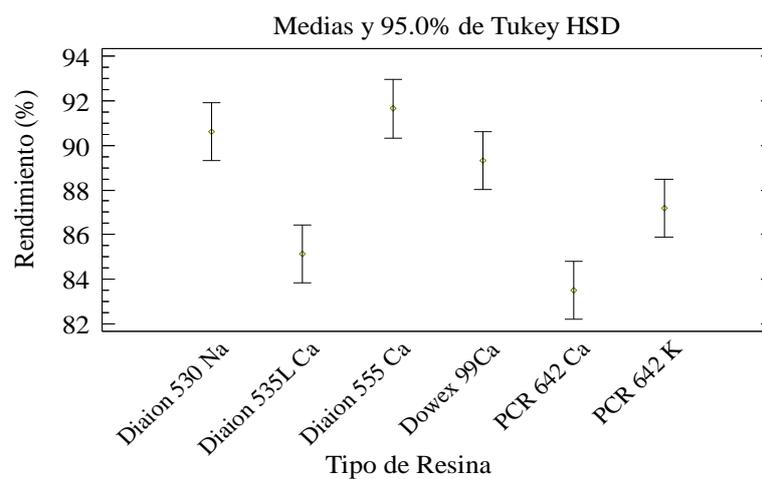
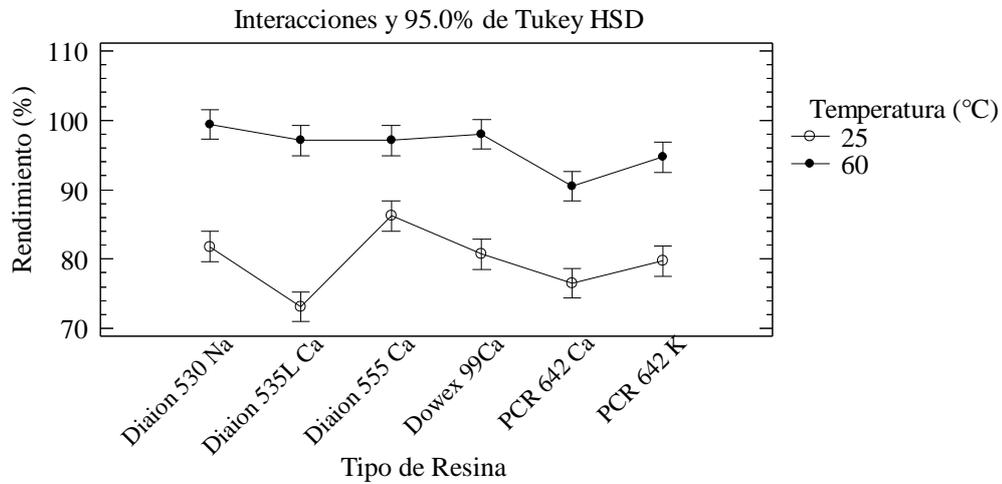


Gráfico de Interacción



Pureza

Análisis de Varianza para Pureza (%) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Temperatura	93.76	1	93.76	81.64	0.00
B: Tipo de Resina	575.87	5	115.17	100.27	0.00
Interacciones					
AB	27.27	5	5.45	4.75	0.00
Residuos	27.56	24	1.14		
Total (corregido)	724.48	35			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pureza (%) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	18	79.57	0.25	X
60	18	82.80	0.25	X

Gráfico de Medias

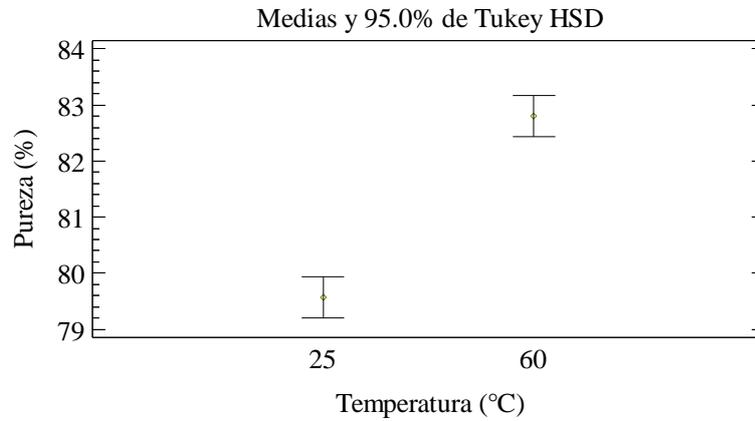
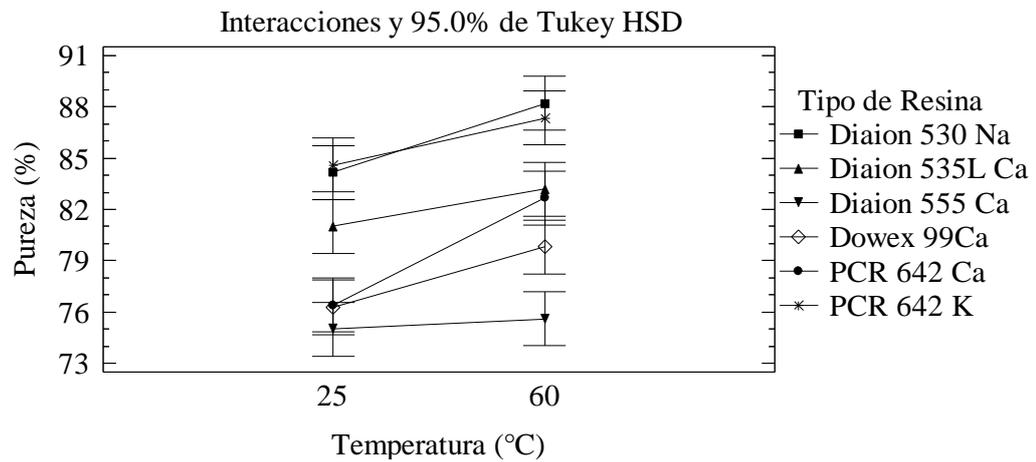


Gráfico de Interacción



Pruebas de Múltiple Rangos para Pureza (%) por Tipo de Resina

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tipo de Resina	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
DIAION 555 Ca	6	75.30	0.43	X
DOWEX 99Ca	6	78.03	0.43	X
PCR 642 Ca	6	79.53	0.43	X
DIAION 535L Ca	6	82.10	0.43	X
PCR 642 K	6	85.96	0.43	X
DIAION 530 Na	6	86.18	0.43	X

Gráfico de Medias

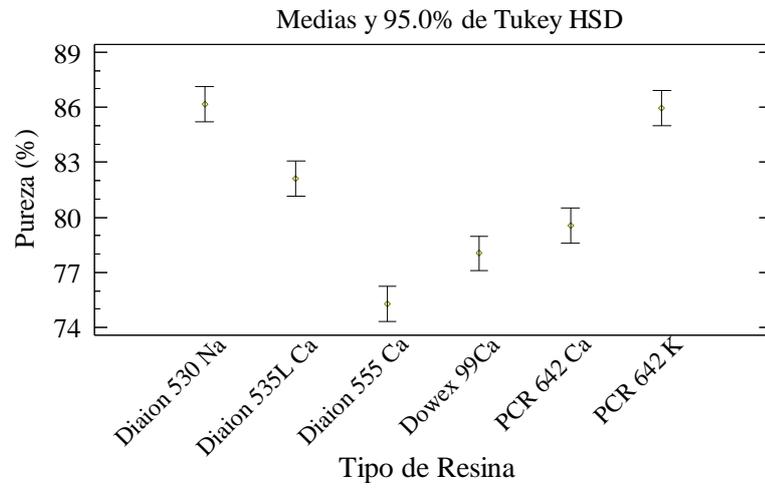
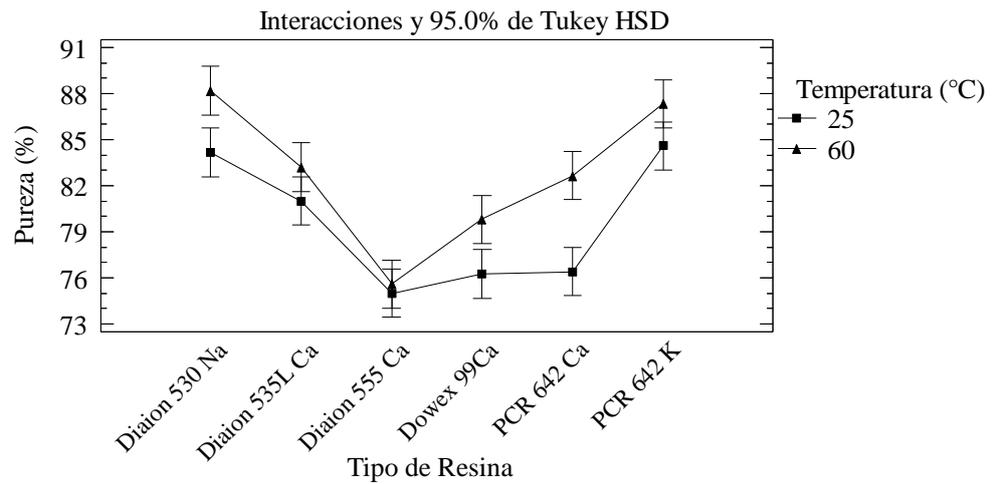


Gráfico de Interacción



Anexo 9: Análisis Estadístico - Efecto de la concentración del extracto o carga de la columna sobre el rendimiento y pureza de FOS

Rendimiento

Tabla ANOVA para Rendimiento (%) por Concentración

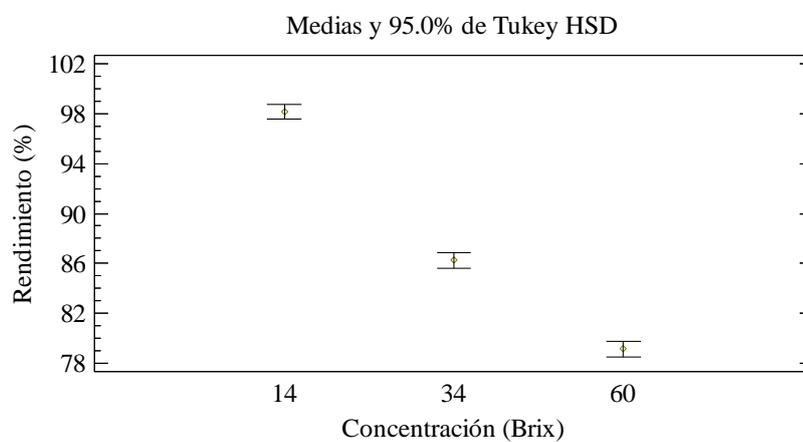
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	556.82	2	278.41	1149.41	0.00
Intra grupos	1.45	6	0.24		
Total (Corr.)	558.28	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (%) por Concentración

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
60	3	79.10	X
34	3	86.23	X
14	3	98.16	X

Gráfico de Medias



Pureza

Tabla ANOVA para Pureza (%) por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	32.67	2	16.33	474.32	0.00
Intra grupos	0.20	6	0.03		
Total (Corr.)	32.88	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Pureza (%) por Concentración

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
60	3	86.13	X
14	3	88.40	X
34	3	90.80	X

Gráfico de Medias

