

PRODUCCIÓN DE JARABE DE FRUCTOSA CON ENZIMAS INMOVILIZADAS EN UN PROCESO CONTINUO A PARTIR DE TIQUISQUE (*Xanthosoma sagittifolium*)

Melissa Quesada-Salazar² y Alicia Hernández-Peñaranda^{*1}

^{1 y 2} Centro de Investigaciones en Productos Naturales, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Recibido 10 de enero del 2012; aceptado 30 de noviembre del 2012

Abstract

High fructose corn syrups (HFCS) are mainly used by the food industry. They are produced by enzymatic hydrolysis from cornstarch. The main objective of this project was to produce fructose syrups using tiquisque starch (*Xanthosoma sagittifolium*) as new source. Conditions to produce tiquisque glucose syrup were obtained in a previous study. Fructose was produced using a column packed isomerase (*Sweetzyme IT*). The effect of flow rate (0.5 and 1.0 mL/min), glucose syrup concentration (40 and 45 °Brix) and hydrolysis temperature (55 and 60 °C) were studied using a 2³ factorial design. Response variables were fructose and glucose concentrations, fructose yield and conversion degree. All variables were statistically significant ($p < 0.05$), and flow rate presented the main effect on response variables. Higher conversion degree (99.16 %) was achieved using 40 °Brix glucose syrup and a flow rate of 0.5 mL/min at 60 °C. Fructose syrups obtained experimentally presented higher fructose content than commercial syrup (HFCS-42).

Resumen

Los jarabes de fructosa (HFCS) son utilizados principalmente por la industria de alimentos y se producen por vía enzimática a partir de almidón de maíz. El objetivo principal de esta investigación fue producir jarabe de fructosa partiendo de una fuente no tradicional de almidón: el tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). El jarabe de fructosa se produjo por tratamiento enzimático con una isomerasa (*Sweetzyme IT*) inmovilizada usando como sustrato jarabe de glucosa producido previamente. Se evaluó el efecto del flujo del jarabe a través de la enzima inmovilizada (0.5 y 1.0 mL/min), la concentración del jarabe de glucosa (40 y 45 °Brix) y la temperatura (55 y 60 °C), utilizando un diseño factorial 2³. Las variables respuesta fueron la concentración de glucosa y fructosa, el rendimiento de fructosa y el grado de conversión. El mayor grado de conversión (99.16 %) se logró usando una concentración de glucosa de 40 °Brix y un flujo de 0.5 mL/min a 60 °C. Los jarabes obtenidos experimentalmente presentaron un mayor contenido de fructosa que el jarabe comercial (HFCS-42).

Keywords: fructose syrup, tiquisque, glucose isomerase, immobilized enzymes, *Xanthosoma sagittifolium*.

Palabras clave: jarabe de fructosa, tiquisque, glucosa isomerasa, enzimas inmovilizadas, *Xanthosoma sagittifolium*.

*Autor para correspondencia: Alicia.hernandez@ucr.ac.cr

I. INTRODUCCIÓN

Los jarabes de fructosa son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y se obtienen generalmente a partir de almidón de maíz. En Costa Rica, no se producen pero su consumo aumenta día a día. La producción enzimática de jarabes de fructosa conlleva la hidrólisis del almidón en dextrinas en un proceso denominado licuefacción y la hidrólisis de estos compuestos en unidades de glucosa en la sacarificación [1]. Posteriormente, la glucosa es transformada en fructosa por medio de la enzima glucosa isomerasa.

En nuestro país se produce una gran variedad de productos agrícolas con alto contenido de almidón, entre ellos el tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). El tiquisque es un tubérculo que se exporta para su consumo en fresco y tiene una destacada participación en las exportaciones de raíces y tubérculos hacia Estados Unidos y Puerto Rico. Según datos suministrados por el Consejo Nacional de Producción, desde el 2007 la exportación de tiquisque viene en aumento y para el 2012 se reportan 8185437 kg de tiquisque exportado [2]. Aproximadamente de un 15 % a un 25 % del tiquisque no cumple con las normas de calidad especificadas por los países de destino. El producto de rechazo es utilizado como alimento para cerdos y abono orgánico; por lo que es importante evaluar otras opciones para el aprovechamiento de este valioso recurso [3].

Una opción para la utilización del tiquisque es la obtención de almidón y sus derivados. A nivel industrial, las fuentes más importantes de almidón son los cereales y los tubérculos; este carbohidrato constituye de un 65 % a un 85 % del peso seco de estos productos. La producción mundial de almidón se obtiene principalmente del maíz y la papa, y en menor proporción del trigo y sorgo, pero se han hecho esfuerzos por estudiar fuentes alternativas [4]. El contenido de almidón en el tiquisque ha sido estudiado previamente y se reporta que está en cantidades mayores al 60 % de su masa seca [5,6].

En un estudio previo a esta investigación se establecieron las condiciones enzimáticas para producir jarabe de glucosa a partir de esta materia prima [7]. El jarabe de glucosa producido experimentalmente se comparó con un jarabe comercial y los contenidos de glucosa fueron mayores en todos los casos, concluyéndose que el almidón de tiquisque puede ser una buena opción para la producción de este tipo de jarabes en el país. Con base en estos resultados se decidió continuar la investigación para buscar el aprovechamiento de este residuo agroindustrial y la elaboración de otro producto de alto valor agregado a partir de él. El objetivo de este proyecto fue obtener un jarabe con alto contenido de fructosa a partir de almidón de tiquisque, utilizando glucosa isomerasa inmovilizada en un proceso continuo. En esta investigación, se estudió el efecto del flujo del jarabe a través de la enzima inmovilizada (0.5 y 1.0 mL/min), la concentración del jarabe de glucosa (40 y 45 °Brix) y la temperatura de hidrólisis (55 y 60 °C).

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

El tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) se adquirió en la empresa empacadora El Burrito en San Francisco de Peñas Blancas, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

Para hacer la evaluación de la composición de la materia prima, el tiquisque sin cáscara se molió y se secó en una estufa de aire caliente a 40 °C por 24 horas. La harina se pasó por un tamiz con una malla 60 (0.251 mm de apertura) y se hicieron análisis de humedad, grasa, proteína, glucosa, almidón y cenizas siguiendo la metodología reportada [8].

Extracción y caracterización del almidón de tiquisque.

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica.

El proceso de extracción de almidón consistió de una serie de etapas según se enumeran: lavado y pelado del tiquisque, molido, tamizado, sedimentación, decantado, lavado del sedimentado y centrifugado. El residuo sólido se secó en un secador de aire caliente a 40 °C durante 24 horas. El producto obtenido se denomina “almidón nativo de tiquisque”.

La caracterización del material se hizo determinando su contenido de humedad, proteína, grasa, ceniza, almidón y glucosa con base en la metodología reportada [8].

Producción y purificación de jarabe de glucosa en mayor escala.

Para la producción del jarabe de fructosa se requería contar con un lote de jarabe de glucosa por lo que se ajustaron las condiciones de laboratorio para su producción en mayor escala (Se partió de 17.5 kg de suspensión de almidón de tiquisque al 30 %) [7].

La licuefacción se realizó en una marmita con un agitador mecánico incorporado utilizando las siguientes condiciones: 0.75 mL *Termamyl*[®] *Supra*/kg de almidón pH: 5.4, temperatura: 90 °C, velocidad de agitación de 136 rpm por 1 h [7, 9].

La sacarificación se llevó a cabo en un biorreactor New Brunswick modelo 110 (14L) bajo las siguientes condiciones: 0.90 mL del preparado enzimático AMG E /kg de almidón seco [7], pH de 4.4, temperatura de 60 °C, velocidad de agitación de 400 rpm por 20 h [10].

La purificación del jarabe de glucosa se llevó a cabo con el fin de que cumpliera con los parámetros de pureza y fuera apto como sustrato para la conversión a fructosa por la isomerasa inmovilizada. Se realizó en varias etapas: eliminación de sólidos insolubles, clarificación, filtración e intercambio iónico.

La separación de sólidos se evaluó inicialmente agregando un floculante (Magnafloc al 0.05 % m/v) en el jarabe de glucosa obtenido del almidón de tiquisque de acuerdo con las recomendaciones de la literatura [11] y se evaluó la utilización de una centrífuga semicontinua (Westfalia modelo d-LG205-1) para separar los sólidos. El jarabe fue alimentado a la centrífuga a temperatura ambiente y se ajustó su flujo de salida a aproximadamente 75 mL/min.

Después de haber eliminado la mayoría de los sólidos insolubles, el jarabe fue sometido a un tratamiento con carbón activado (1.5 g/ 100g) a pH de 4.0 (ajustado con HCl), temperatura de 60 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm por 30 minutos. Posteriormente, se filtró al vacío a través de una capa de celite [12].

El jarabe clarificado fue tratado con una resina catiónica Amberlite IR-120 y luego con una aniónica *Amberlite* IRA-400 con el fin de eliminar iones calcio, sodio y cloruros [11]. El jarabe de glucosa purificado fue llevado a las dos concentraciones de sólidos solubles evaluadas en el proceso de isomerización: 40 y 45 °Brix.

La concentración de glucosa se hizo por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), con metodología desarrollada en el CIPRONA. La densidad de los jarabes fue medida con un densímetro, manteniendo el líquido a la temperatura definida [13]. La viscosidad fue medida en un viscosímetro Brookfield modelo RV serie 88381 a la temperatura establecida. Los azúcares reductores se analizaron mediante el método de Nelson Somogyi detallado por Southgate[14]. Los equivalentes de dextrosa (DE) se refieren al total de azúcares reductores presentes en el jarabe, calculados como dextrosa (glucosa) y expresados como un porcentaje en peso (g/100g) del total de materia seca del jarabe [15].

Isomerización del jarabe de glucosa

Antes de realizar el estudio de la conversión de glucosa en fructosa, hubo que realizar pruebas preliminares para definir el tiempo en el que se alcanza el estado estacionario en la conversión. Al empacar la enzima, la conversión no es un proceso inmediato porque el sustrato debe entrar en contacto con la enzima y este proceso tarda dependiendo de la difusión del sustrato en la enzima inmovilizada. Por esta razón, se efectuaron dos corridas de prueba de 8 horas para observar en cuánto tiempo se alcanzaba el estado estacionario, utilizando como sustrato una disolución de glucosa al 40 %; a la cual le fueron añadidas 45 ppm de Mg^{+2} en forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y cuyo pH fue ajustado a 7.6 con Na_2CO_3 [4, 11, 16]. Posteriormente, el jarabe de glucosa fue alimentado de forma continua a la columna empacada con la enzima glucosa isomerasa, mediante una bomba peristáltica. Estos experimentos se realizaron a 55 °C y un flujo de 0.5 mL/min [16]. Se tomaron muestras de 5 mL de jarabe a la salida de la columna cada hora, durante 8 horas y se determinó la concentración de glucosa y de fructosa por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), con metodología desarrollada en el CIPRONA.

Una vez definido el tiempo de conversión se analizó el efecto del flujo, la concentración de sustrato y la temperatura del proceso de isomerización sobre la concentración de fructosa obtenida en el jarabe. Para esto se utilizó un diseño irrestricto con un arreglo factorial, el cual constó de tres factores con dos niveles. Los factores con sus niveles respectivos fueron: flujo de alimentación del jarabe de glucosa (0.5 y 1.0 mL/min), concentración de sustrato (40 °Brix y 45 °Brix) y temperatura (55 °C y 60 °C). Se hicieron tres repeticiones de cada uno de los ocho tratamientos. Al final de cada corrida, se tomó una muestra de 5 mL de jarabe a la salida de la columna de isomerización. A cada muestra se le determinó la concentración de glucosa y de fructosa por HPLC. Para el análisis de los datos se realizó un ANDEVA (análisis de varianza) al arreglo factorial planteado para cada una de las variables respuesta utilizadas: concentración de glucosa, concentración de fructosa, conversión y rendimiento con el paquete estadístico SAS. Posteriormente, se analizaron las interacciones gráficamente mediante un análisis de tendencia.

Se seleccionó la mejor condición para la producción del jarabe de fructosa y se produjo una mayor cantidad de jarabe, con el fin de evaluar su purificación. El jarabe se clarificó con carbón activado en un proceso similar al reportado previamente; posteriormente se filtró al vacío a través de una capa de celite. Luego el jarabe clarificado fue tratado con una resina catiónica y una aniónica hasta que tuviera una conductividad menor a 50 $\mu S/cm$. Después de la ionización, el pH del jarabe fue ajustado a 4.0 y se concentró al vacío en un rotavapor a 50 °C hasta obtener un contenido de sólidos de 71 g/100g (°Brix).

Comparación de las características del jarabe obtenido con las propiedades típicas reportadas para los jarabes HCFS-42

Se tomó una muestra del jarabe obtenido y se analizó para comparar algunas de sus propiedades con los valores típicos reportados para los jarabes HCFS-42 (jarabes con 42 % de fructosa) [17, 18]. Las características evaluadas fueron: glucosa, fructosa, materia seca, densidad a 20 °C y viscosidad a 27 °C, según se mencionó anteriormente.

Cada determinación se llevó a cabo por triplicado y se reportó el promedio con un intervalo de confianza del 95 %. Además, se determinó el recuento total aerobio mesófilo y el recuento de hongos y levaduras con el fin de evaluar la calidad del jarabe obtenido.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y caracterización del almidón de tiquisque

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos para la caracterización del tiquisque y su almidón. El contenido de almidón es similar o mayor que los reportados para las materias primas de las cuales se extrae almidón comúnmente. El contenido de almidón para el maíz y el trigo, es de 70 y 60 (g/100 g) respectivamente [19], siendo en este último caso, menor el contenido de almidón con respecto a la fuente estudiada. La yuca tiene 80 g/100 g de almidón en base seca [20] lo cual representa un 3% más que el tiquisque, pero tiene un mayor contenido de humedad. La literatura [21] reporta un mayor contenido de humedad (79.38 g/100g) y un menor contenido de almidón (62.27 g/100g) para el tiquisque. Las diferencias pueden ser debidas a factores tales como la variedad, el clima, el tipo de suelo, la fertilización y la época de cosecha. Estos resultados indican la potencialidad de explotación de este tubérculo más allá de su consumo y exportación en fresco.

Cuadro 1. Composición proximal del tiquisque y su almidón (g/100 g).

	Tiquisque	Almidón de tiquisque
Humedad	67.0 ± 0.2	7.55 ± 0.03
Proteína	4.24 ± 0.05	0.34 ± 0.03
Grasa	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.02
Ceniza	5.6 ± 0.6	0.86 ± 0.05
Glucosa	0.22 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Almidón	77 ± 1	88.49 ± 0.07

Los valores son reportados en base seca.

Producción y purificación de jarabe de glucosa en mayor escala.

La producción del jarabe se hizo de acuerdo a lo indicado en la sección de materiales y métodos. El jarabe de glucosa previo a su purificación, presentaba gran cantidad de sólidos finos suspendidos y un color café.

Para la eliminación de sólidos solubles inicialmente se utilizó el floculante Magna Flocc con el objetivo de separar dichos sólidos. Se dejó reposar el jarabe con el floculante por 30 minutos a temperatura ambiente; sin embargo, no ocurrió ninguna floculación. Por esta razón, se evaluó la utilización de una centrífuga semicontinua para separar la mayor cantidad de sólidos suspendidos. Se ajustó el flujo de salida del jarabe al mínimo (aproximadamente 75 mL/min) para tener un mayor tiempo de retención del mismo dentro de la centrífuga, y así lograr la mayor separación de sólidos posible. Este proceso fue eficaz, ya que gran parte de los sólidos del jarabe fueron retenidos en la centrífuga, obteniéndose un líquido más claro.

Posteriormente el jarabe se sometió al proceso de clarificación y filtración para luego ser tratado con las resinas de intercambio iónico con el fin de eliminar una serie de minerales que afectarían el proceso de isomerización. El jarabe de glucosa con aproximadamente 30 g/100g de sólidos debe tener una conductividad menor a 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, por lo que este fue el parámetro que se utilizó para establecer las condiciones en las que se realizaría el intercambio iónico [22]. El jarabe se pasó por las resinas dos veces y luego de este tratamiento se obtuvo una conductividad de 16.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C.

Caracterización física y química del jarabe de glucosa

En el cuadro 2 se muestran los valores obtenidos para las características físicas y químicas evaluadas en los jarabes de glucosa purificados de 40 y 45 °Brix, elaborados a partir de almidón de tiquisque.

De acuerdo con los valores que se muestran en el cuadro 2, la glucosa corresponde aproximadamente al 94 % del total de azúcares reductores en ambos jarabes. La literatura menciona que después de la sacarificación se obtiene un jarabe compuesto por 94 % de glucosa en base seca. El resto de azúcares reductores está compuesto por maltosa no hidrolizada, isomaltosa, otros disacáridos derivados de reacciones reversibles, y tetrasacáridos y azúcares de mayor tamaño provenientes de dextrinas ramificadas que sólo fueron lentamente hidrolizadas por la glucoamilasa [23,24].

Cuadro 2. Características químicas y físicas de los jarabes de glucosa de 40 y 45 °Brix obtenidos a partir del almidón de tiquisque.

Característica	Jarabe de glucosa	
	40 °Brix	45 °Brix
Glucosa (g/100g)	38.4 ± 0.2	41.8 ± 0.2
Azúcares reductores (g/100g)	41 ± 2	44.7 ± 0.4
Materia seca (g/100g)	41.4 ± 0.2	45.0 ± 0.3
Equivalentes de dextrosa (DE)	98.7 ± 2	99.4 ± 0.4
Densidad a 19 °C (g/mL)	1.170 ± 0.003	1.196 ± 0.000
Viscosidad a 18 °C (cP)	14.6 ± 0.3	17.42 ± 0.07

Promedio de 3 muestras, Intervalo de confianza: 95%

El contenido de materia seca del jarabe coincidió con la concentración de azúcares reductores en ambos jarabes (40 y 45 °Brix). Esto indica que el total de sólidos está compuesto por azúcares reductores, comprobando que el jarabe se encuentra prácticamente libre de impurezas solubles e insolubles. El resultado concuerda con lo mencionado en la literatura [20] donde se explica que la desionización disminuye el contenido de cenizas, de manera que el jarabe purificado es una disolución que contiene prácticamente sólo carbohidratos.

Isomerización del jarabe de glucosa

La evaluación del tiempo necesario para que la conversión de glucosa en fructosa alcanzara el estado estacionario se llevó a cabo determinando la concentración de glucosa y fructosa a través del tiempo y el rendimiento en la conversión. Los resultados mostraron que a partir de las cuatro horas se alcanzaron las mayores tasas de conversión de glucosa a fructosa, y que a partir de ese momento la velocidad de conversión se mantuvo constante (rendimiento de conversión mayor al 95 %). Con este rendimiento se estaría obteniendo aproximadamente un 49% de fructosa en base seca, que es más del 42-45 % que normalmente se alcanza con esta enzima [22]. Esto concuerda con lo reportado en la literatura [25], donde el sistema alcanza el equilibrio dinámico entre glucosa y fructosa después de aproximadamente cuatro horas y a una concentración de 44 (g/100g) de fructosa, con la ventaja de que en este caso se está obteniendo mayor cantidad de fructosa. Además, se alcanzó este estado en la mitad del tiempo reportado [11], lo cual se puede deber a que el preparado enzimático *Sweetzyme*® IT posee características de flujo mejoradas, que pudieron ayudar a una mejor difusión del sustrato en la enzima [16]. Por otro lado, la mayor pureza del jarabe obtenido del almidón de tiquisque, en comparación con la reportada [11] pudo ser otro de los factores que ayudó a alcanzar el estado estacionario en un menor tiempo. Tomando en cuenta estos aspectos se estableció la toma de

muestra a las cinco horas en las corridas posteriores, dejando un margen de tiempo, pues según los datos obtenidos el sistema utilizado en la isomerización alcanza el estado estacionario en aproximadamente cuatro horas.

El análisis estadístico muestra que los efectos de la concentración de sustrato, el flujo y la temperatura de reacción fueron significativos para las cuatro variables respuesta analizadas ($p < 0.003$); es decir, que hubo diferencias significativas en la concentración de glucosa y fructosa, y en el porcentaje de conversión y el rendimiento, al pasar de un nivel al otro de los factores. Por ejemplo, la cantidad de glucosa que se isomericé será significativamente diferente si se varía la temperatura de reacción de 55 a 60 °C. No obstante, el efecto de estos factores no puede ser analizado por separado ya que no son independientes; se obtuvieron interacciones significativas dobles entre los tres factores para la mayor parte de las variables respuesta ($p < 0.05$). La interacción triple no fue significativa ($p > 0.05$).

Para las cuatro variables analizadas, la interacción más significativa fue la que se dio entre el flujo y la temperatura de reacción ($p < 0.0001$), seguida por la interacción entre la concentración de sustrato y el flujo ($p < 0.0007$). El aumento en el flujo tuvo un efecto negativo sobre el rendimiento en la conversión para ambas temperaturas, ya que al pasar del menor nivel al mayor se produjo una disminución en la conversión, aumentó la concentración de glucosa en el equilibrio y disminuyó la de fructosa. Este efecto fue más pronunciado a 60 °C, ya que a esta temperatura el aumento en el flujo produjo una disminución del 12 % en el rendimiento, mientras que a 55 °C fue sólo de un 5.3 %. Un aumento en el flujo es equivalente a una disminución en el tiempo de reacción, lo cual trae consigo una menor conversión de la glucosa.

Al evaluar el efecto doble entre la concentración de sustrato y el flujo, se observa que al pasar del nivel inferior de flujo al superior, se obtuvo una menor concentración de fructosa en el equilibrio (aumento de glucosa), y por lo tanto, un efecto negativo sobre el rendimiento en la conversión. Como se explicó con anterioridad, esto es consecuencia de que al aumentar el flujo disminuye el tiempo de reacción. Este efecto fue más marcado en el nivel superior de concentración de sólidos solubles (pendiente de la recta es mayor), ya que a 45 °Brix se dio una disminución de 10.8 % en el rendimiento, mientras que a 40 °Brix fue de 6.6 %. Del análisis de esta interacción se puede concluir que, de las condiciones estudiadas, para obtener un mayor rendimiento en la conversión hay que utilizar el nivel inferior en la concentración de sólidos solubles y el flujo.

En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de isomerización. Se puede observar que el tratamiento que proporcionó la mayor conversión de glucosa a fructosa, y consecuentemente un mayor rendimiento (99.2 %), fue el número cinco, cuyas condiciones fueron: 40 °Brix como concentración de sustrato, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 60 °C. No se logró el 100 % de rendimiento tomando como base un 52 % de fructosa como la concentración a la que se alcanza el equilibrio estándar de la reacción [26]; sin embargo, otros autores establecen que se puede alcanzar entre un 49 y un 51 % de fructosa bajo condiciones normales de operación [25, 27] por lo que sí se estaría logrando alcanzar el equilibrio de la reacción de acuerdo con esta referencia. La menor conversión se obtuvo con el tratamiento compuesto por los niveles superiores de los tres factores.

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados [11] es importante resaltar que la mayoría de los rendimientos obtenidos en esta investigación fueron más altos. Este autor utilizó almidón de banano verde como sustrato y el mayor rendimiento que obtuvo fue de 84 % cuando utilizó los niveles superiores de los factores evaluados. En esta investigación, el rendimiento del 84 % corresponde al menor obtenido y se logró con la corrida ocho, es decir cuando se utilizó un mayor flujo (menor tiempo de contacto enzima-sustrato), mayor temperatura y mayor concentración inicial de sustrato.

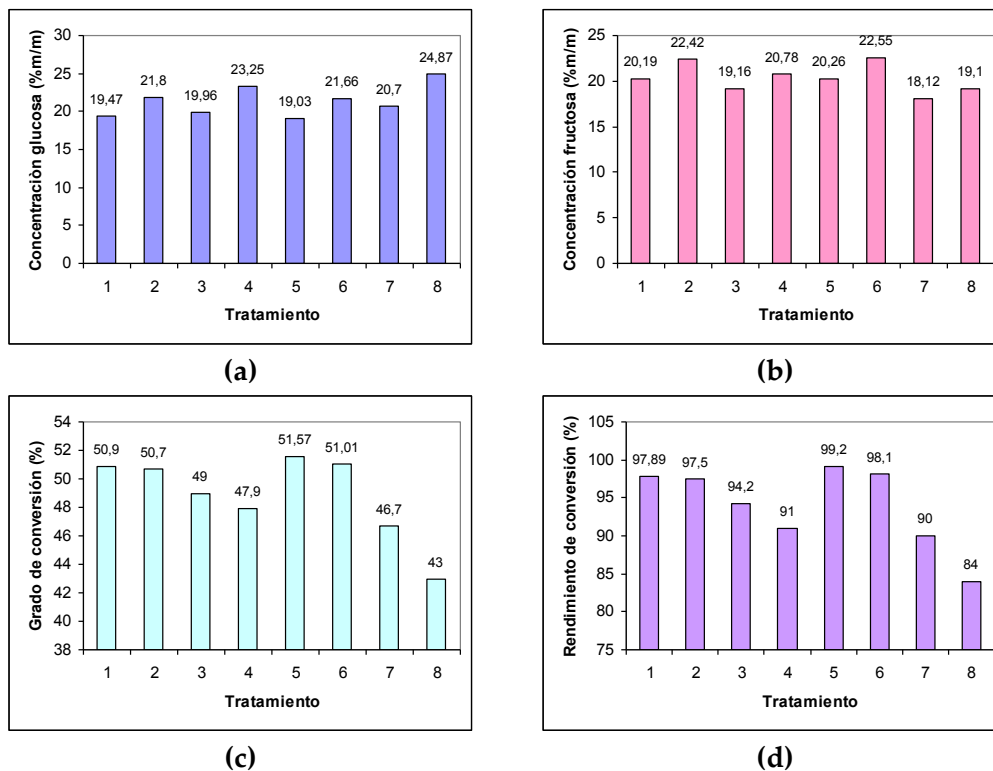


FIGURA 1. Comportamiento de las variables respuesta evaluadas en los tratamientos de isomerización (promedio de 3 repeticiones). La descripción de los tratamientos es: **1** (40°Brix, 0,5 mL/min, **2** (45°Brix, 0,5 mL/min, 55°C), **3** (40°Brix, 1,0 mL/min, 55°C), **4** (45°Brix, 1,0 mL/min, 55°C), **5** (40°Brix, 0,5 mL/min, 60°C), **6** (45°Brix, 0,5 mL/min, 60°C), **7** (40°Brix, 1,0 mL/min, 60°C), **8** (45°Brix, 1,0 mL/min, 60°C).

Los tiempos de residencia del jarabe en la columna fueron de 17.8 y 8.9 min para los flujos de 0.5 y 1.0 mL/min respectivamente, los cuales son mayores que los 15.6 min (1 mL/min) y 7.8 min (2 mL/min) reportados en la literatura [11]. Se obtuvo un menor tiempo de residencia (casi la mitad) para el mismo flujo de 1 mL/min, utilizando una columna con las mismas dimensiones. Esto se debe a que el espacio vacío logrado al empacar la columna (26.6 %) fue menor que el que se tuvo en la columna reportada en la literatura (46.7 %); las partículas de enzima quedaron más compactas y por lo tanto, hubo menos espacios para que fluyera el jarabe [11]. A pesar de esto, si se compara el único tratamiento que tiene las mismas condiciones de reacción en ambos estudios (40 °Brix, 1 mL/min y 60 °C) en esta investigación se obtuvo un mayor rendimiento a pesar de tener un menor tiempo de reacción. Una posible causa es que la actividad de la enzima empleada por los autores [11] fue menor (355 IGIU/g) a la declarada para la enzima utilizada en este estudio (400 IGIU/g).

Comparación de las características del jarabe obtenido con las propiedades típicas reportadas para los jarabes HCFS-42

El cuadro 3 presenta los valores obtenidos para las características evaluadas en el jarabe de fructosa a partir de almidón de tiquisque, así como los valores típicos reportados para otros tipos de jarabe, entre ellos los HFCS-42.

Cuadro 3. Propiedades típicas de los jarabes con alto contenido de fructosa (los números en itálica son especificaciones industriales).

Propiedad	Tipo de jarabe			
	Experimental ¹ .	HFCS-42*	HFCS-55*	HFCS-90*
Glucosa (g/100 g)	48.17 ± 0.11	53	41	9
Fructosa (g/100 g)	47.13 ± 0.06	42	55 (55-58)	90
Otros oligosacáridos (g/100g)	4.70 ± 0.07	5	4 (<5)	1
Materia seca (g/100 g)	73.89 ± 0.14	71	77 (76.5-77.5)	77
pH	---	4,0	4.0 (3.5-4.5)	3.5
Cenizas sulfatadas (ppm)	---	30	30 (<500)	30
Dulzor relativo a la sacarosa ²	---	90-100	100-110	120-160
Densidad a 20°C (g/mL)	1.433 ± 0.006	1.346	1.384	1.407

1. n = 3 muestras ± SD, resultados en base seca.

2. El dulzor de la sacarosa equivale a 100.

*Fuente: [17, 18]

El jarabe obtenido a partir de tiquisque contiene un 5 % más de fructosa, y por consiguiente, menos glucosa, que los jarabes HFCS-42; además de que el contenido de otros azúcares es ligeramente menor. Se obtuvo una mayor conversión con el proceso estudiado, con lo cual se evidencia que el almidón de tiquisque tiene gran potencial para la obtención de jarabes ricos en fructosa. El contenido de materia seca es ligeramente mayor debido a que se excedió un poco el proceso de concentración final. Esto influye en la obtención de un jarabe con una mayor densidad.

Las características microbiológicas del jarabe también son de suma importancia debido a que va a ser un producto para consumo humano (Cuadro 4).

Cuadro 4. Recuento total aerobio y recuento total de hongos y levaduras para el jarabe de fructosa a partir de almidón de tiquisque.

Análisis	Valor (UFC/mL)
Recuento total aerobio	4.04x10 ²
Recuento total de hongos y levaduras	5.05x10 ²

La literatura reporta que un jarabe con alto contenido de fructosa debe tener como máximo 1000 UFC/g en recuento total y 200 UFC/g de hongos y levaduras [28]. Transformando los datos del jarabe de tiquisque a UFC/g se tienen 2.82x10² y 3.52x10² respectivamente. A pesar de que el recuento total resultó menor al máximo gracias a la elevada concentración de azúcares del jarabe, el recuento de hongos y levaduras sí fue un poco más elevado que el valor reportado [11], lo cual se puede atribuir a la alta manipulación del jarabe a través de todas las etapas del proceso y a que no se trabajó bajo condiciones de total asepsia. Asimismo, el crecimiento de hongos y levaduras fue ligeramente mayor que el de bacterias aerobias. Según [27], elevadas concentraciones de azúcares producen plasmólisis de las células, fenómeno que da como resultado la inhibición del crecimiento y posiblemente su muerte. Sin embargo, los microorganismos responden de modo distinto a las concentraciones hipertónicas de azúcares, siendo las levaduras y los mohos menos sensibles que las bacterias, lo cual explica el resultado obtenido. Por ejemplo, algunas levaduras y mohos son capaces

de crecer en presencia de concentraciones de sacarosa tan elevadas como son las de 60 %, mientras que la mayoría de las bacterias son inhibidas por concentraciones mucho menores.

Fue posible adaptar las etapas de licuefacción y sacarificación, las cuales sólo se había llevado a cabo a nivel de laboratorio, para producir jarabe de glucosa a partir de almidón de tiquisque a nivel de planta piloto.

Las operaciones de purificación necesarias para obtener un jarabe de glucosa a partir del almidón de tiquisque, que cumpliera con las especificaciones de pureza para que pueda ser utilizado como sustrato de la isomerasa inmovilizada fueron:

- eliminación de sólidos insolubles con centrífuga.
- clarificación con 1.5 (g/100g) de carbón activado y pH 4.0, en un rotavapor a 60 °C con una velocidad de agitación de 150 rpm, por 30 min.
- filtración con celite.
- tratamiento de intercambio iónico, utilizando 2.5 % de resina catiónica y aniónica con respecto a la cantidad de jarabe, en un proceso batch.

Los jarabes purificados presentaron las condiciones de pureza deseables para poder ser sustrato de la Sweetzyme IT: concentración de calcio inferior a 1 ppm (0.72 ± 0.08 y 0.95 ± 0.08 ppm para las concentraciones de 40 y 45 °Brix respectivamente), una conductividad menor a 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (16.5 ± 0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y una absorbancia a 280 nm menor a 0.3 (0.17 ± 0.07). Estos dos últimos parámetros evaluados en el jarabe antes de su concentración.

La reacción con la glucosa isomerasa, bajo las condiciones de reacción utilizadas, alcanzó el estado estacionario aproximadamente cuatro horas después de arrancado el sistema.

El tratamiento con el que se obtuvo el mayor rendimiento en la conversión de glucosa a fructosa (99.16 %) fue: 40 °Brix de concentración de sustrato, 0.5 mL/min como flujo de alimentación del jarabe a la columna y 60 °C de temperatura de reacción.

La concentración de glucosa, fructosa y otros azúcares, el contenido de materia seca y la densidad del jarabe rico en fructosa obtenido a partir de almidón de tiquisque fueron muy similares a los valores típicos reportados para los HFCS-42.

El almidón de tiquisque es una buena materia prima para la producción de jarabes con alto contenido de fructosa a nivel de laboratorio, ya que el jarabe obtenido cumplió con las características que presentan estos jarabes a nivel comercial, con la ventaja de haberse obtenido una mayor concentración del azúcar de interés, la fructosa.

IV. REFERENCIAS

1. Crabb, W.; Mitchinson, C., *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 349-352.
2. CNP. Exportaciones mensuales de raíces y tubérculos de Costa Rica. 2013. Fecha de consulta: 17 de junio, 2013, <http://web.cnp.go.cr/index.php/informacion-de-mercados/exportaciones/raices-y-tuberculos>.
3. Castro, M. Volúmenes de rechazo de tiquisque para exportación y su uso. Laboratorio de Postcosecha, Universidad de Costa Rica, San José. Comunicación Personal. 2004.
4. Guzmán, H.; Paredes, O., *Crit. Rev. Food Sci.* **1995**, 35(5), 373-403.
5. Duru, C.; Uma, N., *Afri. J. Biotech.* **2003**, 2(8), 228-232.
6. Tostes, G.; Machado, S.; Leone, R., *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1992**, 4(1), 7-10.
7. Hernández A.; Quesada M., *Aliment. Cienc. Ing.* **2007**, 16(3), 30-32

8. AOAC., *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14 ed, ed. AOAC. Inc., Virginia, 1984
9. Novozymes, Ficha técnica Termamyl® Supra. 2002a
10. Novozymes, Ficha técnica AMG E. 2002b.
11. Novozymes, Ficha técnica Sweetzyme® IT. 2002c.
12. Chaves, J., Producción de fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada *Sweetzyme T* en un proceso continuo, Tesis licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 1999.
13. Lees, R, *Análisis de los Alimentos: Métodos analíticos y de control de calidad*, 2 ed. Acribia: Zaragoza, 1982.
14. Misset, O.; Labout, J.; Wilms, J.; Quax, W.J.; van Eekelen, C.A.; Busnach. H.A.; High fructose corn syrups. In: van Dam-Mieras, M.C.; de Jeu, W.H.; de Vries, J.; Currell, B.R.; James, J.W.; Leach, C.K.; Patmore, R.A. (Eds.), *Biotechnological Innovations in Food Processing*. Butterworth-Heinemann Ltd, Londres. 1991.
15. Southgate, D., *Determination of food carbohydrates* ed. Applied Science Publishers: London, 1976.
16. Venegas, E., Obtención de jarabe rico en maltosa por vía enzimática a partir de harina de arroz pulido, Tesis licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 2003.
17. Angold, R.; Beech, G.; Taagart, J., *Food biotechnology*, ed. Cambridge University Press: New York, 1989.
18. International Starch Institute, Typical properties of high fructose syrups. Dinamarca. 1999.
19. Yúfera, E. En: *Química Agrícola III. Alimentos*, Alhambra: España, 1979.
20. Corbishley, D.; Miller, W. In: Whistler, R.; Beniller, J.; Paschall, E (Eds.), *Starch*, 2nd. ed., Academic Press Inc., USA, 1984.
21. Pereira F.; Molina M., *Trop. Sci.* 1991, 32: 203-206.
22. Novozymes. Application Sheet: Use of Sweetzyme® IT in the production of high fructose syrup. 2003.
23. Lloyd, N.; Nelson, W. In: Whistler, R., Bemiller, J.; Paschall, E. *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed., Academic Press Inc., Londres, 1984.
24. Gacesa, P.; Hubble, J., *Tecnología de las enzimas*, ed. Acribia: Zaragoza, 1990
25. Misset, O.; Labout, J.; Wilms, J.; Quax, W.J.; Van Eekelen, C.A; Busnach, H.A. In: van Dam-Mieras, M.C.E., de Jeu, W.H., de Vries, J., Currell, B.R., James, J.W., Leach, C.K.; Patmore, R.A.(Eds.) *Biotechnological Innovations in Food Processing*, Butterworth-Heinemann Ltd, Londres, 1991. p. 145-176.
26. Demerdash M.; Attia R., *Zbl. Mikrobiol.* **1992**, 147(5), 297-303.
27. Vielle, C.; Zeikus, G. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2001**, 65 (1), 1-36.
28. Chacón, A., Producción de fructosa vía enzimática, Tesis licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 1994.
29. Jay, J., *Microbiología moderna de los alimentos*, ed. Acribia: Zaragoza, 1994.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a: TRISAN, distribuidores de Novo en Costa Rica, por la donación de las enzimas utilizadas en esta investigación. A la Internacional Foundation for Science (IFS) y a la Universidad de Costa Rica por el financiamiento otorgado para los proyectos "Enzymatic production of high glucose

and high fructose syrups using starch from non traditional sources” y “Producción de jarabes glucosados a partir de almidón de tiquisque, N°809-A2-058”, respectivamente.