

00528  
82



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS HIDRÓLISIS QUÍMICA Y  
ENZIMÁTICA EN JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR PARA LA  
OBTENCIÓN DE MIELES FRUCTOSADAS

T E S I S

Que para obtener el título de :

**Química de Alimentos**

Presenta :

**Miriam Rubio Huacuz**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F. 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**




**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACION DISCONTINUA**

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS  
MIRIAM RUBIO HUACUZ  
12-NOV-2003  
FIRMA: 

**Jurado asignado**

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Presidente</b>       | Q. Ernestina Cervera Flores                    |
| <b>Vocal</b>            | Dra. Marfa del Carmen Durán Domínguez de Bazúa |
| <b>Secretario</b>       | Dra. Amelia Ma. de Guadalupe Farrés González   |
| <b>Primer suplente</b>  | QFB Bertha Julieta Sandoval Guillén            |
| <b>Segundo suplente</b> | QA Marfa Teresa Plata Jiménez                  |

**Lugares donde se realizó la investigación**

- (I) Laboratorios E-301 al 303 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQAYQA)
- (II) Laboratorio 4-A de la Facultad de Química de la UNAM

**Asesor del Tema**

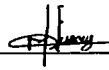
Dra. Marfa del Carmen Durán Domínguez de Bazúa



---

**Sustentante**

Miriam Rubio Huacuz



---

## **DEDICATORIA**

**A DIOS QUE ME HA REGALADO UNA VIDA LLENA DE AMOR AL LADO DE MIS PADRES Y HERMANO Y POR PERMITIRME REALIZAR UN LOGRO MÁS**

**A MI MADRE MARÍA LUISA POR SU GRAN AMOR, COMPRENSIÓN Y APOYO. POR CREER EN MI Y ENSEÑARME A TENER FORTALEZA PARA CONTINUAR HACIA ADELANTE SIN IMPORTAR LAS CIRCUNSTANCIAS QUE LA VIDA NOS PRESENTA**

**A MI PADRE FERNANDO, PORQUE A PESAR DE QUE HA SIDO POCO EL TIEMPO QUE HEMOS CAMINADO JUNTOS SIEMPRE ME HA DADO SU AMOR, CARIÑO Y APOYO**

**A MI HERMANO LUIS FERNANDO POR SU CARIÑO INCONDICIONAL**

**A MI TÍA MARÍA ELENA QUE FUE PARTE IMPORTANTE EN MI FORMACIÓN**

**A MICHELLE POR SER UNA NUEVA ILUSIÓN EN MI VIDA Y POR DARME FUERZAS PARA SEGUIR ADELANTE Y SER MEJOR CADA DÍA**

**A TODAS LAS PERSONAS QUE HAN CREÍDO EN MI**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AGRADEZCO PROFUNDAMENTE A LA DOCTORA MA. DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA, POR SU PACIENCIA, APOYO, DIRECCIÓN Y ENTREGA**

**A TODOS LOS MAESTROS QUE ME REGALARON SUS CONOCIMIENTOS**

**A LA M. EN C. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ POR SU VALIOSO APOYO PARA LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS CON EL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**AL ING. MANUEL ENRÍQUEZ POY DEL INGENIO CENTRAL MOTZORONGO, LA DISPONIBILIDAD DEL USO DE SU MÁQUINA A ESCALA PROTOTIPO DE PENSADO DE CAÑA PARA LA OBTENCIÓN DE JUGO ("GUARAPO")**

**AL PERSONAL DE LOS LABORATORIOS E - 301 DEL PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y DE QUÍMICA AMBIENTAL (PIQAYQA) Y 4-A DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, GRACIAS POR SUS ATENCIONES Y AYUDA.**

ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2.0 OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	3
<b>3.0 MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
3.1 LA INDUSTRIA AZUCARERA	4
3.2 PROBLEMÁTICA DE LA INDUSTRIA AZUCARERA POR LA INTRODUCCIÓN AL MERCADO DE EDULCORANTES SUSTITUTOS	6
3.3 LA INDUSTRIA AZUCARERA EN MÉXICO	8
3.4 LA CAÑA DE AZÚCAR	9
3.4.1 Sistema de cultivo	10
3.4.2 Fabricación de azúcar	11
3.4.3 Clarificación del jugo de caña	11
3.5 COMPOSICIÓN DE LA CAÑA Y DEL GUARAPO	12
3.5.1 Su importancia para la fabricación de azúcar	12
3.5.2 Azúcares	12
3.6 SACAROSA	14
3.6.1 Síntesis de la sacarosa	15
3.6.2 Reacciones de la sacarosa	15
3.6.2.1 Inversión	15
3.6.2.2 Poder inversor de los ácidos	16
3.6.2.3 Descomposición alcalina de las soluciones de sacarosa	17
3.7 GLUCOSA (DEXTROSA)	18
3.8 FRUCTOSA (LEVULOSA)	19
3.9 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS AZÚCARES REDUCTORES (DEXTROSA Y LEVULOSA)	20
3.10 ASPECTOS GENERALES DE LOS JARABES DE ALTO CONTENIDO EN FRUCTOSA	20
3.10.1 Jarabes de maíz de alta fructosa, JMAF (HFCS) al 42%	22
3.10.2 Jarabes de maíz de alta fructosa, JMAF (HFCS) al 55%	22
3.10.3 Propiedades de los jarabes de alto contenido en fructosa	24
3.11 MANUFACTURA DE JARABES DE MAÍZ	24
3.11.1 Conversión ácida	25
3.11.2 Conversión ácido – enzima	26
3.11.3 Conversión enzima – enzima	27
3.11.4 Uso de la enzima glucosa isomerasa para la obtención de jarabes altos en fructosa	27

		Página
3.12	<b>ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO</b>	31
3.12.1	Determinación de carbohidratos por cromatografía de líquidos de alta resolución	31
3.12.2	Columnas analíticas y sistemas de cromatografía de líquidos de alta resolución	32
3.12.2.1	Columna de sílice amino-ligada ("sílice amino - bonded")	32
3.12.3	Detectores de índice de refracción	33
<b>4.0</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	DIAGRAMA EXPERIMENTAL	35
4.2	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	35
4.3	CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	37
4.3.1	Calibración del cromatógrafo de líquidos de alta resolución	37
4.3.2	Reactivos y material	37
4.3.3	Procedimiento	37
4.4	CLARIFICACIÓN DEL JUGO DE CAÑA	38
4.4.1	Reactivos y material	38
4.4.2	Procedimiento	39
4.4.2.1	Mediciones turbidimétricas	39
4.4.2.2	Mediciones gravimétricas	39
4.5	DETERMINACIÓN DE pH EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA Y EN SOLUCIONES ESTÁNDAR DE SACAROSA	40
4.5.1	Calibración del equipo	40
4.5.2	Determinación del pH de las muestras	41
4.6	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL JUGO DE CAÑA CLARIFICADO	42
4.6.1	Reactivos y material	42
4.6.2	Procedimiento	42
4.7	HIDRÓLISIS ÁCIDA	43
4.7.1	Hidrólisis ácida en soluciones estándar de sacarosa	43
4.7.1.1	Reactivos y material	43
4.7.1.2	Procedimiento	43
4.7.1.3	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ESTÁNDARES DE SACAROSA	44
4.7.1.3.1	Reactivos y material	44
4.7.1.3.2	Procedimiento	44
4.7.2	Hidrólisis ácida en muestras de jugo de caña clarificado	45
4.7.2.1	Reactivos y material	45
4.7.2.2	Procedimiento	45
4.7.2.3	Análisis cromatográfico de las muestras de jugo de caña clarificado e hidrolizado	46
4.7.2.3.1	Reactivos y material	46
4.7.2.3.2	Procedimiento	46



		Página
4.8	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	47
4.8.1	Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa	47
4.8.1.1	Reactivos y material	47
4.8.1.2	Procedimiento	47
4.8.1.3	Análisis cromatográfico de los estándares de sacarosa	49
4.8.1.3.1	Reactivos y material	49
4.8.1.3.2	Procedimiento	50
4.8.2	Hidrólisis enzimática en muestras de jugo de caña clarificado	50
4.8.2.1	Reactivos y material	50
4.8.2.2	Procedimiento	51
4.8.2.3	Análisis cromatográfico de las muestras de jugo de caña clarificado e hidrolizado	52
4.8.2.3.1	Reactivos y material	52
4.8.2.3.2	Procedimiento	52
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
5.1	CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL	53
5.1.1	Mediciones turbidimétricas	53
5.1.2	Mediciones gravimétricas	55
5.2	HIDRÓLISIS QUÍMICA	57
5.2.1	Hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa	57
5.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	64
5.3.1	Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa	64
5.4	ANÁLISIS CROMATográfico DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO	71
5.5	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO	72
5.6	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO	73
5.7	EVAPORACIÓN	73
<b>6.0</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
6.1	CONCLUSIONES	75
6.2	RECOMENDACIONES	76
<b>7.0</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
<b>8.0</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>80</b>
ANEXO 1	CURVAS DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS PARA GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	80
ANEXO 2	DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS	81
8.2.1	DATOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN	81
8.2.2	CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL	82
8.2.3	HIDRÓLISIS QUÍMICA	82

		Página
8.2.3.1	Hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa	82
8.2.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	85
8.2.4.1	Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa	85
<b>ANEXO 3</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS [Utilizando el programa Statistic Program Social Science (SPSS)]</b>	<b>89</b>
8.3.1	Análisis estadístico de la clarificación de jugo de caña con etanol (mediciones turbidimétricas)	89
8.3.2	Análisis estadístico de la clarificación de jugo de caña con etanol (mediciones gravimétricas)	91
8.3.3	Ejemplo del análisis estadístico aplicado para determinar si hay o no diferencia significativa en el uso de ácido sulfúrico al 90% y 98% para la hidrólisis química del estándar de sacarosa	94
8.3.4	Análisis estadístico de la hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa con ácido sulfúrico con 90% de pureza para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis	96
8.3.5	Ejemplo del análisis estadístico aplicado para determinar si hay o no diferencia significativa en el uso de la relación E/S = 1.68% y 3.36% para la hidrólisis enzimática de sacarosa con invertasa	98
8.3.6	Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática en estándares de sacarosa a una relación E/S de 3.36% para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis	101
<b>ANEXO 4</b>	<b>EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN EL SEGUIMIENTO DE LAS REACCIONES DE HIDRÓLISIS</b>	<b>104</b>

**LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>FIGURAS</b>	<b>Página</b>
FIGURA 3.1	7
FIGURA 3.2	14
FIGURA 3.3	18
FIGURA 3.4	30
FIGURA 4.1	36
FIGURA 5.1	53
FIGURA 5.2	55
FIGURA 5.3	58
FIGURA 5.4	58
FIGURA 5.5	58
FIGURA 5.6	65
FIGURA 5.7	65
FIGURA 5.8	65
FIGURA 8.1	80
FIGURA 8.2	80
FIGURA 8.3	80
FIGURA 8.4	104
FIGURA 8.5	104
FIGURA 8.6	105

<b>TABLAS</b>		Página
TABLA 3.1	PODER EDULCORANTE DE DIFERENTES COMPUESTOS (SACAROSA = 1)	5
TABLA 3.2	PRODUCCIÓN MUNDIAL DE JARABES DE MAÍZ DE ALTA FRUCTOSA (HFCS)	8
TABLA 3.3	COMPOSICIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR Y DE LOS SÓLIDOS DEL GUARAPO	13
TABLA 3.4	PODER INVERSOR DE LOS ÁCIDOS	17
TABLA 3.5	COMPOSICIÓN TÍPICA DE LOS JARABES DE MAÍZ DE ALTA FRUCTOSA	23
TABLA 3.6	DULZURA RELATIVA DE EDULCORANTES NUTRITIVOS	24
TABLA 3.7	CARACTERÍSTICAS DE SISTEMAS DE ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	34
TABLA 5.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES (MEDICIONES TURBIDIMÉTRICAS)	54
TABLA 5.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES (MEDICIONES GRAVIMÉTRICAS)	56
TABLA 5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 90 Y 98%	60
TABLA 5.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 49 Y 90%	61
TABLA 5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 49 Y 98%	62
TABLA 5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA (CON ÁCIDO SULFÚRICO AL 90%) EN ESTÁNDARES DE SACAROSA PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE HIDRÓLISIS	64
TABLA 5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 0.84% Y 1.68%	67
TABLA 5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 0.84% Y 3.36%	68
TABLA 5.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 1.68% Y 3.36%	69
TABLA 5.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA A UNA RELACIÓN E/S DE 3.36% PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE HIDRÓLISIS	71

	Página	
TABLA 5.11	CONCENTRACIONES DE FRUCTOSA, GLUCOSA Y SACAROSA OBTENIDAS POR CLAR (HPLC) PARA LAS MUESTRAS DE JUGO CLARIFICADO	72
TABLA 5.12	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO E HIDROLIZADO CON ÁCIDO SULFÚRICO	72
TABLA 5.13	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO E HIDROLIZADO ENZIMÁTICAMENTE (RELACIÓN E/S = 3.36)	73
TABLA 5.14	RESULTADOS DE LA CANTIDAD DE FRUCTOSA OBTENIDA EN LA MEZCLA DE REACCIÓN DESPUÉS DE EVAPORAR	74
TABLA 8.1	CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA	81
TABLA 8.2	CURVA DE CALIBRACIÓN DE FRUCTOSA	81
TABLA 8.3	CURVA DE CALIBRACIÓN DE SACAROSA	81
TABLA 8.4	DATOS OBTENIDOS PARA MEDICIONES TURBIDIMÉTRICAS	82
TABLA 8.5	DATOS OBTENIDOS PARA MEDICIONES GRAVIMÉTRICAS	82
TABLA 8.6	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 49%)	83
TABLA 8.7	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 49%) VALORES PARA FRUCTOSA	83
TABLA 8.8	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 49%) VALORES PARA GLUCOSA	84
TABLA 8.9	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 49%) VALORES PARA SACAROSA	84
TABLA 8.10	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 90%)	84
TABLA 8.11	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA (Ácido sulfúrico 98%)	85
TABLA 8.12	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 0.84%)	85
TABLA 8.13	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA FRUCTOSA	86
TABLA 8.14	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA GLUCOSA	86
TABLA 8.15	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA SACAROSA	87
TABLA 8.16	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 1.68%)	87
TABLA 8.17	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA (Relación E/S = 3.36%)	88

**GLOSARIO DE TÉRMINOS**

Andeva	Análisis de varianza
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)
DAP	Detector amperométrico pulsado (PAD, "pulsed amperometric detection")
DE	Dextrosa equivalente
DEAE	Cloruro de dietilaminoetil
DO	Densidad óptica
"Dumping"	Del inglés "dump", vender en grandes cantidades sin importar el precio (práctica desleal en comercio vendiendo por debajo de los precios de costo)
E/S	Enzima/Sustrato
°G.L.	Grados Gay Lussac (Por ciento en volumen)
GP	Grado de polimerización (DP, "Degree of Polymerization")
HFCS	Siglas en inglés de JMAF (High fructose corn syrup)
IR	Índice de refracción
JMAF	Jarabes de maíz de alta fructosa
"Rango"	Intervalo (barbarismo muy empleado por "range", intervalo, equivocadamente traducido como "rango" que, en inglés es "rank")
"Rotavapor"	Evaporador rotatorio al vacío para laboratorio
Letras griegas	
$\alpha$	Significancia (Análisis de Fisher)

**RESUMEN**

En el presente trabajo se realizó la clarificación del jugo de caña, así como su hidrólisis química y enzimática para la obtención de un jarabe fructosado con un 42% (p/v). Los componentes de interés en este estudio son sacarosa, fructosa y glucosa, los cuales se evaluaron en cada una de las etapas de los procesos aplicados con ayuda de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR). Los resultados obtenidos indican que el uso de etanol como agente clarificante elimina en gran proporción las dextranas y material de peso molecular mayor a 10 kD cuando éste se emplea en concentraciones desde 70%, concentración a la cual se observó una disminución notoria de la coloración inicial del jugo y no se presenta una pérdida significativa de sacarosa, glucosa y fructosa. Con la hidrólisis química realizada al jugo de caña clarificado, se llegó a la obtención de un jarabe con una concentración de hasta un 12% de fructosa (p/v), con lo cual fue necesario realizar una evaporación con ayuda de un "rotavapor" para lograr la obtención de un jarabe con 42% de fructosa (p/v). Los cambios presentados en el jugo de caña clarificado e hidrolizado químicamente con ácido sulfúrico fueron la adquisición de una tonalidad amarilla (se presentó únicamente al emplear concentraciones del 98% de pureza del ácido), la cual se elimina fácilmente si se mantiene un pH neutro o ligeramente ácido, así como la formación de la sal correspondiente a la neutralización para detener la reacción (sulfato de sodio), lo cual afecta el sabor del jarabe obtenido. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo, tras determinar la actividad de la enzima invertasa (Sigma-Aldrich®) sobre una solución estándar de sacarosa al 22%. Una vez obtenida la relación enzima sustrato (E/S) óptima se procedió a emplear el jugo de caña clarificado como sustrato. Las condiciones con las cuales se obtuvieron los mejores parámetros de hidrólisis (en muestras estándar de sacarosa) fueron: uso de la relación E/S = 3.36% durante 3 minutos de reacción a 55°C y a un pH de 4.5. Bajo estas condiciones aplicadas al jugo de caña clarificado, fue posible la obtención de hasta 13.45% de fructosa (p/v). También se evaporó en un "rotavapor" para obtener un jarabe con 42% de fructosa (p/v). En la hidrólisis enzimática no se observaron cambios de coloración como los que se presentaron en la hidrólisis química. Para la obtención de jarabes fructosados de 55 y hasta 90% (p/p) deben realizarse métodos de separación que permitan alcanzar esas concentraciones de fructosa. Esto, a su vez, permite emplear la glucosa para seguir obteniendo fructosa por isomerización o bien adquirir subproductos elaborados a partir de glucosa.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

En los últimos años los nuevos edulcorantes aparecidos en el mercado internacional han propiciado un desplazamiento progresivo de la sacarosa como ingrediente en la fabricación de diversos alimentos procesados. En particular, se encuentran los jarabes de maíz de alta fructosa (JMAF), que son productos elaborados con base en la hidrólisis del almidón de maíz con la posterior isomerización de la glucosa en fructosa conteniendo aproximadamente un 42% de fructosa y no más de un 8% de otros sacáridos, los cuales han competido exitosamente en diversas aplicaciones, especialmente en la elaboración de refrescos y bebidas no alcohólicas y en otros productos que requieren un edulcorante en fase líquida o fluida tales como productos lácteos, confitería, panificación, etc. La competencia de los jarabes de maíz de alta fructosa con la sacarosa ha ocasionado grandes dificultades a la industria azucarera mexicana ya que es una competencia real para el azúcar que se consume en México cuyo precio es mayor que el de dichos jarabes, lo cual se debe a que los costos de producción de los jarabes de maíz de alta fructosa son relativamente bajos debido a que la materia prima (el maíz) es un producto subsidiado en los países productores, propiciando así que las cotizaciones de los jarabes sean hasta un 20% inferiores comparados con los precios del azúcar de caña.

La realización de este proyecto está basada en una serie de investigaciones previas que han demostrado que la elaboración de jarabes de alta fructosa a partir de jugo de caña puede ser una buena opción dada la creciente demanda de estos edulcorantes en nuestro país, siempre y cuando se planteen las metodologías adecuadas del proceso que permita llegar a la obtención de dichos jarabes, los cuales deben contar con ciertas características fisicoquímicas para que sean capaces de competir con un jarabe comercial de maíz de alta fructosa.

En el presente trabajo se plantea la posibilidad de instaurar una vía alterna para la obtención de jarabes de alta fructosa a partir de jugo de caña, por lo cual se retomaría parte del proceso para la obtención de azúcar enfocándolo así posteriormente a la obtención de jarabe de alta fructosa.



## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Obtener soluciones ricas en fructosa a partir de la sacarosa presente en el jugo de caña previamente clarificado con etanol mediante procesos de hidrólisis química y enzimática.

### **2.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la clarificación en jugo de caña con diferentes concentraciones de etanol para así determinar cual es la concentración óptima en la que se obtenga la máxima eliminación de la coloración inicial del jugo, sin que exista pérdida de sacarosa, glucosa y fructosa presentes en el jugo.
- Determinar las mejores condiciones en las que deben realizarse las hidrólisis química y enzimática para la obtención de un jarabe rico en fructosa.
- Llevar a cabo una evaporación en "rotavapor" después de la reacción de hidrólisis para obtener un jarabe fructosado de hasta 42% de peso en fructosa.
- Realizar una comparación de los resultados obtenidos en las reacciones de hidrólisis química y enzimática.

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 LA INDUSTRIA AZUCARERA

Actualmente en el mercado se pueden encontrar una serie de edulcorantes naturales y sintéticos que se distinguen entre sí principalmente por dos factores: su potencia endulzante y los costos que implican su producción. De estos edulcorantes, el más importante a nivel mundial es el azúcar (*sacarosa*), el cual se produce principalmente a partir de la caña (especie *Saccharum officinarum*) pero, además, también puede obtenerse a partir de la remolacha azucarera.

El azúcar se consume en todo el mundo, puesto que es una de las principales fuentes de calorías en las dietas de todos los países. Se obtiene a través de un largo proceso, el cual incluye desde que la "semilla" de caña germina hasta que el azúcar se comercializa como producto terminado.

La producción de azúcar en el mundo es de poco más de 100 millones de toneladas anuales. De este volumen total, el 60% aproximadamente se obtiene de la caña de azúcar en 110 países de todos los países, situados en las zonas tropicales [Anónimo, 1988].

Debido a la ampliación de investigaciones y desarrollos en la ciencia, se han llegado a obtener nuevos productos edulcorantes que están ganando terreno en el mercado del azúcar de manera considerable. Los sustitutos del azúcar se pueden dividir en edulcorantes naturales calóricos (como el jarabe de maíz de alta fructosa, que es el principal sustituto del azúcar), y los sintéticos no calóricos y de gran intensidad que tienen un menor uso (tales como el "aspartame", "taumatín", etc.) [Hernández, 2001] (Tabla 3.1).

En varios países, sobre todo en los desarrollados, la presencia de edulcorantes como jarabes fructosados y sustitutos no calóricos hace que el mercado azucarero internacional sea más estable y que los precios del azúcar disminuyan, pues los costos de producción de dichos jarabes son inferiores a los de la producción de azúcar.

**TABLA 3.1**

PODER EDULCORANTE DE DIFERENTES COMPUESTOS (SACAROSA = 1)

COMPUESTO	PODER EDULCORANTE RELATIVO
Dulcitol	0.4
Fructosa	0.8 – 1.7
Galactosa	0.3 – 0.6
Glucosa	0.7
Jarabe de azúcar invertido	1.0 – 1.6
Jarabe de maíz de alta fructosa (42%)	0.9
Jarabe de maíz de alta fructosa (55%)	0.99
Lactosa	0.4
Maltosa	0.3 – 0.6
Manitol	0.4 – 0.7
Sorbitol	0.5
Xilitol	1.0
Sacarina sódica*	300
Ciclamatos*	30 - 80
Aspartame*	150 - 200
Acesulfame K*	150
Taomatina*	1600 – 3000
Monelín*	2,360

\* Edulcorantes de alta intensidad

[FUENTES: Hernández, 2001; Hui, 1991]

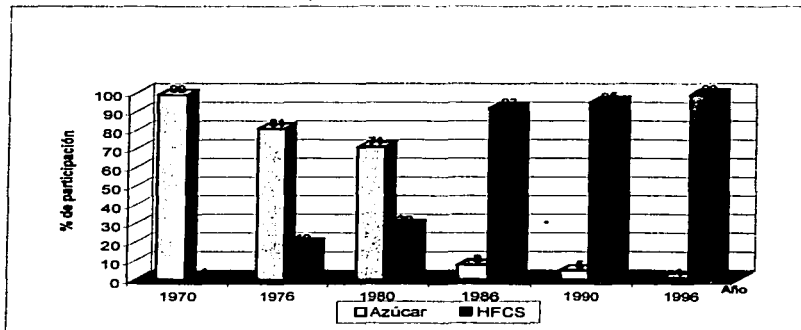
Los Estados Unidos de América es un país que ha logrado un gran avance en la obtención de edulcorantes a partir del almidón del maíz, lo mismo sucede con países como Canadá y Argentina, ya que estos tres países son productores netos de maíz, y aún países como Taiwán y Japón, que no poseen cultivos de productos agrícolas en cantidades suficientes han logrado ocupar un lugar importante en la producción mundial de sustitutos del azúcar.

En los Estados Unidos de América, el desarrollo de la industria de los edulcorantes a partir de maíz ha obedecido, en lo fundamental, al hecho, de que los agricultores están subsidiados por el gobierno federal, lo que ocasiona que los precios del jarabe sean muy bajos y que los productos provenientes de cultivos no subsidiados no puedan competir, con los bajos costos y la abundancia de la producción del grano.

### **3.2 PROBLEMÁTICA DE LA INDUSTRIA AZUCARERA POR LA INTRODUCCIÓN AL MERCADO DE EDULCORANTES SUSTITUTOS**

Actualmente la industria azucarera está en riesgo de perder su capacidad de crecimiento y de permanencia causados por el ingreso masivo de jarabes de maíz de alta fructosa, los cuales son un producto que presenta diversas ventajas sobre el azúcar, entre las que se pueden mencionar, además de los costos en el mercado, la facilidad en su manejo para la elaboración de productos tales como chocolates, productos lácteos, así como en confitería y panificación, pero su principal uso se encuentra en la elaboración de bebidas gaseosas, conocidas en México como "refrescos" y en bebidas no alcohólicas.

Debido a las ventajas que representa el uso de jarabes de maíz de alta fructosa sobre el azúcar, el consumo de los primeros ha ido en aumento, lo que ha provocado un desplazamiento paulatino en el consumo del azúcar. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América, la participación del azúcar en la industria de bebidas carbonatadas ha disminuido (Figura 3.1). Esto obedeció, en principio, a motivos políticos, ya que el suministro de azúcar (de caña) provenía de Cuba. En aquel entonces Cuba ocupaba el primer lugar en la producción de azúcar con casi 10 millones de toneladas anuales. Al romperse las relaciones diplomáticas y establecer los EEUU un bloqueo económico contra Cuba, trataron de cultivar caña de azúcar en las islas Hawai, país que invadieron también en 1898, como lo hicieron con Cuba y las Filipinas, pero el rendimiento agronómico nunca pudo alcanzar los niveles de Cuba.



**FIGURA 3.1**

**PARTICIPACIÓN DEL AZÚCAR/JARABES DE MAÍZ DE ALTA CONCENTRACIÓN DE FRUCTOSA, EN LA INDUSTRIA DE LAS BEBIDAS CARBONATADAS EN EEUUA [Fuente: Sánchez-de-Cima, 1997]**

Debido a la alta demanda que ha tenido el uso de los jarabes de maíz de alta fructosa, la producción de éstos a escala mundial ha ido en aumento, tal como lo muestra la Tabla 3.2.

Como ya se ha mencionado, uno de los principales factores que ha propiciado el desplazamiento del azúcar por los JMAF es el bajo costo que presentan estos últimos. En nuestro país por varios años los precios del azúcar se mantuvieron artificialmente bajos, mediante subsidios pero, al liberarse estos sin que en los países productores de los JMAF se eliminen los subsidios correspondientes a sus materias primas, ha causado que los edulcorantes sustitutos se estén tomando competitivos (con una política denominada a nivel mundial "dumping").

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN.**

**TABLA 3.2**  
**PRODUCCIÓN MUNDIAL DE JARABES DE MAÍZ DE ALTA FRUCTOSA (HFCS)**  
 (Millones de toneladas métricas en base seca)

Año	Estados Unidos de América	Canadá	Argentina	Japón	Mundial
1980	1,978	42	6	353	2,639
1985	4,782	210	156	680	6,417
1990	5,670	240	157	764	7,657
1991	5,842	250	154	778	7,874
1992	6,036	250	150	761	8,067
1993	6,453	255	153	760	8,549
1994	6,814	260	158	760	8,935
1995	7,153	260	160	760	9,295

[Fuente: Sánchez-de-Cima, 1997]

Las posibilidades de que aumente la participación de los jarabes de maíz de alta fructosa en el mercado de edulcorantes mexicano dependen de diversos factores como:

- 1) El desarrollo de la industria de los edulcorantes se relaciona con una oferta suficiente de almidón, cuya fuente más importante es el maíz que, en México, se destina fundamentalmente a la alimentación humana; sin embargo, ya se importan granos para satisfacer la demanda de las industrias productoras de jarabes fructosados lo cual plantea competencia desleal por la política "dumping", y
- 2) Para usar los jarabes fructosados se requiere de infraestructura en la industria de alimentos, capital para invertir en investigaciones y políticas públicas que atraigan las inversiones que ese sector necesita [García-Chávez, 1997].

### 3.3 LA INDUSTRIA AZUCARERA EN MÉXICO

La industria azucarera de México es una de las agroindustrias más importantes del país y enfrenta una creciente problemática [Bautista-Zúñiga y col., 2000]. Una recomendación hallada con frecuencia es la de que esta industria debe modernizarse tecnológicamente

para poder competir con mayores posibilidades de éxito con aquellos productores de sustitutos de azúcar de caña [Castillo-Urueta y col., 2003].

La agroindustria azucarera se desarrolla en quince estados de la República, donde se ubican los 61 ingenios azucareros que la conforman, los cuales producen más de 4.7 millones de toneladas métricas de azúcar. Según datos proporcionados por la Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica (CNIYA) esta industria genera empleos para 133,000 productores, 80,000 cortadores de caña, 20,000 jornaleros, 20,000 transportistas, 40,000 obreros de planta, 5,000 trabajadores eventuales y 8,000 empleados administrativos [Hernández, 2001].

En los últimos 13 años se ha observado un incremento en la superficie cosechada de caña. En 1985, ésta fue de 579,894 hectáreas, mientras que para la zafra 97/98, ésta se incrementó en 11.2%, es decir, el campo cañero se extendió en 653,155 hectáreas. Y para la zafra 98/99 se cosecharon 635,593 hectáreas [Hernández, 2001].

A partir de 1988, la industria azucarera atraviesa por un proceso de modernización caracterizado por la reprivatización de los ingenios azucareros, aunque en los últimos meses varios de ellos han sido expropiados.

### **3.4 LA CAÑA DE AZÚCAR**

La caña de azúcar es una hierba gigante que pertenece al género *Saccharum officinarum*. Las amplias variaciones en el tamaño, el color y el aspecto son resultado de las diversas condiciones de terreno, del clima, de los métodos del cultivo y de la selección local (*S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum* y *S. robustum*).

La caña de azúcar es considerada la planta que más perfeccionados tiene los mecanismos fisiológicos para la producción de sacarosa, pues sus vías fotosintéticas para producirla a partir de los azúcares simples, son mecanismos altamente eficientes, que el hombre a través de un proceso largo y continuado de mejoramiento ha mejorado y perfeccionado

hasta alcanzar variedades comerciales con alto contenido de sacarosa y resistentes a enfermedades.

El fruto agrícola de la caña de azúcar es el tallo, en el que se acumula sacarosa en el periodo de maduración.

Durante la temporada del año en que prevalecen temperaturas altas y es máxima la actividad pluvial, la caña alcanza un gran crecimiento vegetativo. Al cesar las lluvias y disminuir la temperatura, adquiere niveles máximos la síntesis de sacarosa que se almacena en el tallo [Spencer y Meade, 1967].

#### **3.4.1 Sistema de cultivo**

La caña de azúcar comercial se propaga por medio de estacas o de tallos enteros de semillero que se plantan en surcos y después se cubren con una ligera capa de tierra. Cada yema es capaz de producir una planta, y de cada una de estas plantas nacen varios tallos o renuevos que forman una cepa de caña. En los trópicos se plantan trozos de tallos que contienen dos o tres yemas cada uno, pero en los lugares subtropicales, se plantan cañas enteras, de dos en dos y traslapadas, ya que sólo el 25% aproximadamente de las yemas producen vástago después de yacer en la tierra todo el invierno; así se utiliza unas cuatro veces más cantidad de caña (de 4,48 a 6,72 toneladas por hectáreas) que en los países tropicales. La maduración de la caña se controla mediante la regulación de la cantidad de agua de riego. En sitios donde no hay riego, la planta madura a medida que se aproxima la época seca o fría, y los rendimientos más elevados de azúcar se encuentran en países donde se da una larga temporada de sequía. A medida que la planta se aproxima a la madurez, aumenta el contenido de sacarosa de los tallos y distribuye el de azúcares reductores. Es frecuente que se evalúe el grado de madurez por la sacarosa o los azúcares reductores que contienen las cañas en el campo. Plantas nuevas llamadas retoños nacen de la cepa después que la caña se corta, produciendo así una segunda cosecha, que a su vez puede producir una tercera y una cuarta y así sucesivamente. En la



mayor parte de las zonas cañeras se tiende actualmente hacia un ciclo más restringido de cosechas [Spencer y Meade, 1967].

### **3.4.2 Fabricación de azúcar**

Aunque el proceso de elaboración de sacarosa se puede describir a grandes rasgos como una concentración por medio de evaporación del jugo de la caña de azúcar y la separación de los cristales formados por centrifugación es, en realidad, un poco más complejo. Éste se inicia con la recepción de la caña de azúcar, que en algunos casos es lavada antes de entrar a los molinos que se encargan de extraer la mayor cantidad de jugo de caña. Una vez separado el bagazo del jugo, el jugo de caña o guarapo se envía a tanques de sedimentación y clarificación. Una vez que se obtiene un jugo lo suficientemente limpio, se envía a evaporadores para retirar el agua y provocar la cristalización de la sacarosa presente.

### **3.4.3 Clarificación del jugo de caña**

Los reactivos más usados en la actualidad para la clarificación de mieles y otros productos y subproductos de la industria azucarera son el hidróxido de calcio, las sales de aluminio, el cloruro de bismuto, las sales de zinc, las sales de estaño, las resinas de intercambio iónico con carbón activado y los agentes floculantes. Los criterios para elegir un agente clarificante se basan en que no sean reactivos con la sacarosa, que sean estables químicamente a las condiciones climáticas de los laboratorios de campo, que los sólidos que generen no sean tóxicos, que sean fácilmente precipitables y estables, que tengan fácil disponibilidad y que sean baratos.

Recientemente se ha introducido el uso de etanol como agente clarificante; el empleo de etanol esta basado en su habilidad de precipitar polímeros de alto peso molecular (mayor a 10,000 daltons). Los reportes del uso de etanol indican que éste disminuye notablemente la coloración inicial del jugo de caña.

### **3.5 COMPOSICIÓN DE LA CAÑA Y DEL GUARAPO**

#### **3.5.1 Su importancia para la fabricación de azúcar**

El conocimiento de la composición del jugo y la comprensión de sus propiedades químicas y de las reacciones de sus componentes son esenciales para el control y mejoramiento efectivo de los procesos de extracción y refinación del azúcar de caña. La composición total de la caña es de menor importancia que la composición del jugo que se extrae durante la molienda, ya que este jugo o "guarapo" constituye la verdadera materia prima para producir azúcar.

Es necesario reconocer la composición del guarapo, tanto respecto a sus constituyentes minerales como a sus constituyentes orgánicos; ello es cierto aún en guarapos procedentes de una sola localidad. Las diferencias de clima, en los terrenos y de otros factores ambientales, hacen que exista una variación más amplia de los porcentajes de constituyentes individuales presentes en guarapos de cañas procedentes de diferentes zonas de producción; sin embargo, estas variaciones son más bien cualitativas y todos los jugos contienen aproximadamente los mismos constituyentes, pero en proporciones variables. En la Tabla 3.3 se indican los límites dentro de los cuales varían los porcentajes de las principales clases de sustancias, y también los de constituyentes individuales que se pueden encontrar en guarapos de diferentes cualidades, extraídos de cañas comerciales.

#### **3.5.2 Azúcares**

El valor comercial de la caña de azúcar deriva de la preponderancia de la sacarosa como constituyente del jugo de la planta madura. Los otros azúcares importantes que se encuentran presentes en concentraciones sustanciales son la glucosa y la fructosa. Los azúcares están clasificados químicamente como carbohidratos, grupo numeroso y ampliamente diseminado de sustancias naturales que se caracterizan por ser compuestos de carbono combinado con oxígeno e hidrógeno en las proporciones que se requieren para formar agua.

TABLA 3.3

COMPOSICIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR Y DE LOS SÓLIDOS DEL GUARAPO  
(Intervalos aproximados de concentración de los principales componentes en los sólidos extraídos del guarapo)

COMPONENTES	PORCENTAJE	
AGUA	73 - 76	
SÓLIDOS	24 - 27	
FIBRA (SECA)	11 - 16	
SÓLIDOS SOLUBLES	10 - 16	
Componentes del guarapo		<b>Porcentaje de sólidos solubles</b>
AZÚCARES	75 - 92	
SACAROSA		78 - 88
GLUCOSA		2 - 4
FRUCTOSA		2 - 4
SALES	3.0 - 7.5	
DE ÁCIDOS ORGÁNICOS		1.5 - 4.5
DE ÁCIDOS INORGÁNICOS		1.0 - 3.0
ÁCIDOS ORGÁNICOS LIBRES	0.5 - 2.5	
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS		0.1 - 0.5
AMINOÁCIDOS		0.5 - 2.0
OTROS NO AZÚCARES ORGÁNICOS		
PROTEÍNAS		0.5 - 0.6
ALMIDÓN		0.001 - 0.050
GOMAS		0.30 - 0.60
CERA, GRASAS FOSFÁTIDOS		0.05 - 0.15
NO AZÚCARES NO IDENTIFICADOS		3.0 - 5.0

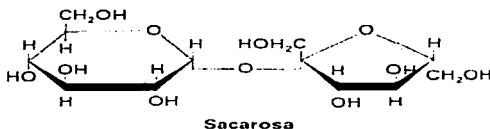
[Fuente: Spencer y Meade, 1967]

Los monosacáridos son los más simples de estos compuestos y comprenden sustancias tales como las pentosas y las hexosas, formadas por cadenas de 5 y 6 carbonos, respectivamente. Las triosas (tres carbonos) las tetrasas (cuatro carbonos), y las heptosas (siete carbonos) se encuentran en la naturaleza con mucha menos frecuencia. La condensación de dos de estos compuestos simples origina los disacáridos y la de tres monosacáridos forma trisacáridos. Los productos de más de tres monosacáridos no poseen las propiedades que se consideran más características de los azúcares. Los que se forman con una cantidad relativamente pequeña de unidades simples de azúcares, en número superior a tres, se llaman oligosacáridos, mientras que los carbohidratos muy

polimerizados tales como el almidón y la celulosa se llaman polisacáridos. Las configuraciones de los grupos hidroxilo y los átomos de hidrógeno en los azúcares son las que determinan la propiedad de los azúcares de ocasionar la rotación del plano de la luz polarizada; en esta propiedad se han bastado los métodos más ampliamente empleados para la determinación de la presencia de azúcares en los jugos y los productos de la fabricación de azúcar [Severiano, 1997].

### 3.6 SACAROSA

La sacarosa es un disacárido producido por la condensación de glucosa y fructosa y tiene la fórmula empírica  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (peso molecular 342.30 g/mol) [Badu, 1993]. Se ha determinado que su estructura y configuración estereoquímica (cuya representación espacial puede verse en la Figura 3.2) son las de  $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-fructofuranosido.



**FIGURA 3.2**  
FÓRMULA ESTRUCTURAL DE LA SACAROSA

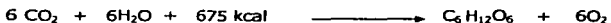
Los componentes monosacáridos se condensan en grupos glicosídicos. Estos dos grupos que en los monosacáridos libres muestran un equilibrio de configuración  $\alpha$  y  $\beta$ , se fijan en la molécula de sacarosa en una configuración  $\alpha$  del componente de fructosa. Mientras que el componente de glucosa está ligado en su forma piranosídica normal, los componentes de fructosa muestran en la molécula de sacarosa una forma anormal furanosídica que no se observa en la fructosa libre. Los cristales tienen una densidad de 1.5879 g/mL a 15°C y muestran actividad óptica  $\alpha$  lo largo de dos de sus tres ejes. La sacarosa pura funde a 188°C. En solución, este azúcar es dextrógiro, con una rotación específica de

$[\alpha]_D^{20} + 66.53^\circ$  a una concentración de 26 gramos por 100 mL de agua. Esta propiedad es de gran importancia, por constituir la base de los métodos polarimétricos de análisis.

La sacarosa es muy soluble en agua, como lo son casi todos los azúcares; una solución saturada a 20°C contiene el 67.09% por peso. No reduce los iones de cobre o de otros metales en soluciones alcalinas tales como la de Fehling, ya que ni el grupo reductor de aldosa ni el de cetosa está libre en la molécula del disacárido [Spencer y Meade, 1967].

### 3.6.1 Síntesis de la sacarosa

En las plantas, los carbohidratos (azúcares, almidón, celulosa) se forman por un proceso fotosintético de asimilación:



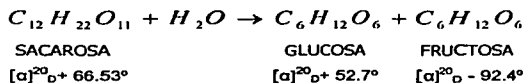
La sacarosa es, con mucho, el más extendido y frecuentemente el más abundante de los azúcares presentes en la savia de las plantas. En la savia de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, etc.) se encuentra más de 17% de sacarosa, lo mismo que en la savia de remolacha (*Beta vulgaris*).

### 3.6.2 Reacciones de la sacarosa

#### 3.6.2.1 Inversión

La hidrólisis de glicósidos, oligosacáridos y polisacáridos de los alimentos está influenciada por numerosos factores, tales como pH, temperatura y configuración anomérica [Fennema, 1993].

La sacarosa se hidroliza con facilidad en soluciones ácidas a velocidades que aumentan notablemente según el aumento de la temperatura y la disminución del pH, con liberación de los monosacáridos constituyentes según la reacción:



A esta reacción hidrolítica se aplica generalmente el nombre de inversión, ya que produce un cambio de la actividad óptica dextrógira propia de la sacarosa a una actividad neta levógira, equivalente a [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> - 39.7° de los productos de la reacción. Esta reacción es sumamente importante en la fabricación de azúcar, ya que se pierde sacarosa cuando los guarapos o jugos no se mantienen a un pH de 7 o ligeramente superior, especialmente durante las múltiples operaciones para las cuales se requieren altas temperaturas. La magnitud de las pérdidas posibles se puede estimar sobre los porcentajes de sacarosa invertida por hora a diferentes pH y temperaturas. La mezcla equimolecular de glucosa y fructosa que se forma es conocida generalmente como "azúcar invertido", por extensión de la terminología que se aplica a la reacción de hidrólisis. Ha sido procedimiento común la expresión de los resultados de las determinaciones del poder reductor, por métodos aplicables en igual proporción a estos azúcares, como invertido. La inversión produce cantidades precisamente iguales de los dos monosacáridos.

### 3.6.2.2 Poder inversor de los ácidos

Los ácidos varían en su habilidad de invertir la sacarosa casi en el orden de su grado de ionización. La Tabla 3.4 se ha desarrollado considerando el ácido clorhídrico (HCl) como 100. En la selección de un ácido para invertir la sacarosa se debe considerar la compatibilidad del ácido con el producto terminado. Por ejemplo, los ácidos cítrico y fosfórico frecuentemente son componentes de bebidas y ellos podrían usarse para invertir la sacarosa para la producción de la bebida.

El ácido clorhídrico normalmente se usa debido a su alto poder de inversión y, cuando el ácido se neutraliza con hidróxido de sodio, rinde 1 molécula de agua y 1 molécula de cloruro de sodio. En la mayoría de las formulaciones esta cantidad pequeña de sal es insignificante [Pancoast y Junk, 1973].

**TABLA 3.4**  
**PODER INVERSOR DE LOS ÁCIDOS**

ÁCIDO	PODER INVERSOR RELATIVO
HBr	111.4
HCl	100.0
HNO <sub>3</sub>	100.0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	53.6
Oxálico	18.57
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6.21
Tartárico	3.00
Cítrico	1.72
Láctico	1.07
Acético	0.40

[Fuente: Pancoast y Junk, 1973]

### 3.6.2.3 Descomposición alcalina de las soluciones de sacarosa

Cuando las soluciones de la sacarosa se calienta en presencia de iones OH, ésta se descompone. Puede observarse la formación de furfural, de 5-hidroxy-metil-2-furfural, de metil glicoxilo, gliceraldehído, dioxiacetona, acetona, ácido láctico, ácido trioxiglutárico, ácido trioxibutírico, ácido fórmico, bióxido de carbono y otras sustancias. Primeramente, se forma el ácido láctico, bajo ciertas circunstancias, hasta llegar al 75% del peso de la sacarosa descompuesta (el rendimiento teórico sería del 100%). En circunstancias normales en el proceso de evaporación o de cristalización de la tecnología del azúcar, se forman aproximadamente 3 g-equivalentes de ácidos por una mol de sacarosa descompuesta.

La descomposición de la sacarosa se acompaña con la formación de mezclas indefinidas de sustancias en pequeñas cantidades, pero de un color café muy intenso (polifenoles).

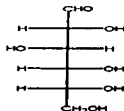
Debido a la formación de ácidos la alcalinidad de la solución disminuye la descomposición alcalina. Como consecuencia de la disminución de pH se hace menor la formación de ácidos y de color. Sin embargo, más allá del punto neutro, comienzan las pérdidas de azúcar causadas por la inversión. La descomposición mínima de sacarosa toma lugar

aproximadamente a un pH de 9 cuando la concentración de  $H^+$  (que causa la inversión), y la concentración  $OH^-$  (que causa la formación de ácidos y color) son pequeñas [Honig, 1969].

### 3.7 GLUCOSA (DEXTROSA)

Este monosacárido tiene la fórmula empírica  $C_6H_{12}O_6$  (peso molecular 180.16 g/mol), y su estructura recibe la designación química de D-glucopiranososa, quedando el anillo formado por el oxígeno en la posición que se muestra en la estructura de la sacarosa. Es una aldohexosa y se puede cristalizar del agua tanto en la configuración  $\alpha$  como en  $\beta$ , y estas dos formas están en equilibrio en solución a temperaturas inferiores a  $50^\circ C$ , la  $\alpha$ -D-glucosa, que es la forma más estable, cristaliza en forma de monohidrato,  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ , la glucosa anhidra forma cristales romboides que tienen un punto de fusión de  $146^\circ C$ , mientras que el hidrato funde a  $83^\circ C$  (Figura 3.3).

Es menos soluble en agua que la sacarosa; las soluciones saturadas contienen 49.4% a  $23^\circ C$  y 54.6% a  $30^\circ C$ , de azúcar anhidro, por peso. Es típico de los azúcares reductores, el tener un grupo aldehído libre oxidable por la acción de soluciones alcalinas de sales de cobre, el yodo, y otros agentes oxidantes [Whalley, 1971]. Estas reacciones constituyen la base de muchos métodos para la determinación analítica de la glucosa [Kir y col., 2000]. Se ha descrito un método para la determinación por separado del contenido de glucosa de mezclas que contienen otros azúcares; este método emplea la enzima glucosa oxidasa que la oxida específica y cuantitativamente, formando ácido glucónico.



**FIGURA 3.3**

ESTRUCTURA QUÍMICA LINEAL DE LA GLUCOSA



Son fácilmente interconvertibles las formas  $\alpha$  y  $\beta$  de la glucosa, y sus soluciones muestran el mismo fenómeno de mutarrotación que muestran las de la mayoría de las hexosas y pentosas simples. Cuando se disuelve primero, la  $\alpha$ -D-glucosa tiene una rotación específica de  $[\alpha]^{20}_D + 112.2^\circ$  mientras que la  $\beta$ -D-glucosa es de  $[\alpha]^{20}_D + 18.7^\circ$ . Cuando se establece un equilibrio con presencia de aproximadamente 40% de la forma  $\alpha$  y 60% de la forma  $\beta$  la rotación es de  $[\alpha]^{20}_D + 52.7^\circ$  y este valor es el que se usa para la determinación del azúcar en la sacarimetría.

### 3.8 FRUCTOSA (LEVULOSA)

La fructosa tiene la misma fórmula empírica que la glucosa,  $C_6H_{12}O_6$  (peso molecular 180.16), pero es una cetohehexosa, con el oxígeno fijado en el carbono 2, en lugar de estar en el carbono 1. Su designación de levulosa surgió de la actividad levógira de sus soluciones; pero la configuración de este monosacárido es la de una forma D y en la nomenclatura química precisa este azúcar cristalizado corresponde a la forma  $\alpha$  o la forma  $\beta$ -D-fructopiranososa. Es más soluble en agua que la glucosa y que la sacarosa; una solución saturada a 20°C contiene un 78.9% de este azúcar y la cristalización de formas particulares es más difícil que en el caso de la glucosa. La oxidan la mayoría de los reactivos que se utilizan para la determinación de la glucosa y de otros azúcares reductores, aunque reacciona mucho más lentamente con soluciones alcalinas de yodo bajo condiciones específicas.

La fructosa funde de 102 a 104°C. Su configuración de fructopiranososa, con un anillo de 5 átomos, uno de ellos de oxígeno, es diferente de la furanósica, con anillo de 4 átomos, que existe en la molécula de sacarosa. La mutarrotación en soluciones acuosas es más compleja que en el caso de la glucosa, ya que se establece equilibrio entre la estructura anular furanósica y la piranósica, y también entre sus formas  $\alpha$  y  $\beta$ .

### **3.9 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS AZÚCARES REDUCTORES (DEXTROSA Y LEVULOSA)**

Los azúcares reductores se caracterizan por su capacidad para reducir los iones metálicos como los del cobre que está contenido en la solución de Fehling. Todos los monosacáridos pertenecen a este grupo. En la hidrólisis los azúcares se convierten a sus constituyentes monosacáridos. La hidrólisis ácida o enzimática de la sacarosa resulta en la formación de cantidades iguales de glucosa y de fructosa. La glucosa existe en abundancia en la naturaleza como azúcar libre, así como en formas combinadas. Estas últimas incluyen productos de polcondensación como el glicógeno, el almidón y la celulosa; disacáridos como la maltosa, la lactosa y la sacarosa.

La fructosa que está presente en muchas frutas como azúcar libre se encuentra también en la naturaleza, con combinaciones químicas. Ejemplos de estas combinaciones con la sacarosa compuesta de fructosa y dextrosa e inulina, la polifruetosana que se encuentra en muchas plantas de la familia *Compositae*.

Los azúcares reductores contienen grupos alcohólicos primarios y secundarios. Junto con éstos están presentes, ya sea un aldehído o un residuo de cetonas que existe en grandes cantidades en la forma de un hemiacetal interior. El hemiacetal o anillo de formación, resulta de la reacción de un aldehído o de un grupo de cetonas con un grupo de alcohol de la misma molécula. Cada una de las posibles estructuras de anillo es capaz de existir como los isómeros conocidos como anómeros. El carbón hemiacetal es responsable de la acción reductora de estas moléculas de azúcar y por lo tanto se le llama carbón reductor [Honig, 1969].

### **3.10 ASPECTOS GENERALES DE LOS JARABES DE ALTO CONTENIDO EN FRUCTOSA**

Los jarabes de maíz de alta fructosa, JMAF (HFCS, por sus siglas en inglés, high fructose corn syrup) son soluciones concentradas que contienen básicamente fructosa y glucosa

(dextrosa) con cantidades menores de sacáridos de alto peso molecular. El jarabe es producido a partir de una isomerización enzimática de un hidrolizado de dextrosa, seguido de un proceso de refinación y concentración. Los productos comerciales pueden llegar a contener 42, 55 o 90% de fructosa en base seca.

La fructosa (también llamada levulosa o azúcar de frutas) se encuentra naturalmente en muchas frutas y vegetales. La miel contiene hasta un 50% en peso de fructosa en base seca. Cada unidad de sacarosa se compone de una molécula de fructosa y una molécula de dextrosa que en conjunto forman al disacárido ya mencionado. La fructosa también se encuentra en forma de polímero como inulina en plantas como las dalias, chicoria, alcachofas de Jerusalén, amargones, etc., y se libera mediante tratamientos químicos o enzimáticos.

La fructosa fue aislada por primera vez en 1847. En 1874 se reconoció que la fructosa presentaba ventajas sobre la sacarosa tales como ser un endulzante para diabéticos. Siguiendo el descubrimiento de la conversión alcalina de la dextrosa en fructosa, en 1895, un número considerable de investigaciones se dirigía en un esfuerzo para desarrollar un proceso comercial. Sin embargo, debido a problemas asociados con color o con sabor, el bajo rendimiento de fructosa y la degradación del producto el proceso nunca fue comercializado. La conversión enzimática de dextrosa a fructosa con la enzima glucosa isomerasa se reportó por primera vez en 1957 y se patentó en 1960. La investigación en esta área continuó por varios años en Japón dando como resultado su producción comercial en 1960 y se patentó en Estados Unidos de América en 1971.

La tecnología japonesa fue autorizada por Standard Brands y su producción fue iniciada en los Estados Unidos de América en 1967 mediante un proceso por lotes. Inicialmente se fabricaban jarabes de fructosa de 15% en peso seguida en 1968 por la producción de jarabe de fructosa de 42% en peso de fructosa. En 1972, se inició un sistema continuo utilizando para ello la enzima inmovilizada durante el proceso [Inglett, 1974].

El éxito comercial de jarabes de maíz de alta fructosa ha sido notable. El primer embarque en los Estados Unidos del producto se realizó en 1968 y por 1988 los embarques excedieron 5,000 millones de kilogramos o 5 millones de toneladas (11 mil millones de libras) como sólidos secos. Hay dos productos importantes: El jarabe de fructosa al 42% y el jarabe de fructosa al 55%. Estos edulcorantes pueden reemplazar a la sacarosa en la elaboración de alimentos. Las plantas industriales para la fabricación de los HFCS son controladas por un sistema moderno de computadoras. Esto permite a la industria obtener un producto de alta calidad.

### **3.10.1 Jarabes de maíz de alta fructosa, JMAF (HFCS) al 42%**

En los Estados Unidos de América, los JMAF se elaboran a partir de almidón de maíz. El almidón se licua a temperaturas altas con una  $\alpha$ -amilasa hasta la obtención de equivalentes de dextrosa. En la segunda etapa una glucoamilasa transforma el almidón hasta un 94–96% de dextrosa. Lo obtenido de este paso es refinado y filtrado con carbono y un tratamiento de intercambio iónico. El hidrolizado de dextrosa refinado se bombea entonces a través de una columna con glucosa isomerasa inmovilizada que convierte aproximadamente un 45% de glucosa en fructosa. El jarabe con 42% de fructosa es de nuevo refinado con carbono y sometido a un tratamiento de intercambio iónico y después es evaporado para obtener así el JMAF (HFCS) al 42% comercial [O'Brien y Gelardi, 1991].

### **3.10.2 Jarabes de maíz de alta fructosa, JMAF (HFCS) al 55%**

Se produce a partir del proceso para la obtención de jarabes al 42%. El jarabe se bombea en la unidad de fraccionamiento donde hay sitios de calcio que retienen la fructosa mientras la glucosa y los sacáridos de peso molecular alto la atraviesan. La dextrosa y los sacáridos son recirculados para la producción de jarabe al 42%. Posteriormente se bombea agua a través de la unidad de fraccionamiento para liberar a la fructosa. Lo que se obtiene generalmente es un jarabe con 80-95% fructosa, el cual es refinado y entonces

se mezcla una parte de éstos con los HFCS al 42% para obtener así un producto al 55% [O'Brien y Gelardi, 1991].

**TABLA 3.5**

COMPOSICIÓN TÍPICA DE LOS JARABES DE MAÍZ DE ALTA FRUCTOSA\*

	<b>JMAF 42 (HFCS 42)</b>	<b>JMAF 55 (HFCS 55)</b>	<b>JMAF 80-95 (HFCS 80-95)</b>
% Fructosa	42	55	80 - 95
% Sacarosa	52	40	4 - 19
% Altos sacáridos	6	5	1 - 3
% Sólidos secos	71.0	77.0	77.0

\* Sólidos en base seca

[Fuente: O'Brien y Gelardi, 1991]

El JMAF (HFCS) es un líquido claro, descolorido. Tiende a desarrollar un color paja ligero después de un tiempo prolongado y/o a temperaturas altas. Sin embargo, el producto puede ser utilizable durante muchos meses si se almacena bajo las temperaturas prescritas.

Los JMAF (HFCS) al 42% pueden cristalizar debido a que los niveles de glucosa son más altos. El jarabe al 55% raramente cristaliza. Si cualquier producto cristaliza, el material puede ser calentado para solubilizar a la glucosa.

La característica más importante de los JMAF (HFCS) es su dulzura (Tabla 3.6). En dulzura los JMAF (HFCS) al 42% son casi iguales a la sacarosa. Los valores de dulzura varían con la temperatura, pH, y sólidos. En general, los jarabes de la fructosa son más dulces en sistemas que están fríos a valores de pH bajos.

Desde que los JMAF (HFCS) reemplazaron a la sacarosa, se necesita tomar en cuenta la química de los dos sistemas. La sacarosa en alimentos ácidos o en el cuerpo se invertirá a cantidades aproximadamente iguales de glucosa y fructosa:



**TABLA 3.6**

DULZURA RELATIVA DE EDULCORANTES NUTRITIVOS

EDULCORANTE	DULZURA RELATIVA CON RESPECTO A LA SACAROSA
Sacarosa	1.0
Fructosa cristalina	1.2 - 1.8
JMAF (HFCS) 90%	1.2 - 1.6
JMAF (HFCS) 55%	1.0 +
JMAF (HFCS) 42%	1.0
Glucosa	0.7

[Fuente: O'Brien y Gelardi, 1991]

**3.10.3 Propiedades de los jarabes de alto contenido en fructosa**

Los jarabes de maíz de alta fructosa son más dulces que los jarabes de maíz convencionales debido a la presencia de fructosa, aunque la intensidad de dulzura depende de muchos factores tales como la temperatura, el pH y la concentración. En general, el jarabe de maíz de alta fructosa con 42% (p/p) presenta la misma dulzura que la sacarosa, el de 55% (p/p) es un poco más dulce que la sacarosa y, finalmente, el de 90% (p/p) es de un 20 a un 60% más dulce que la sacarosa. Otras propiedades del jarabe con alto contenido de fructosa es que presenta una alta solubilidad, reduciendo así la posibilidad de la cristalización; sus propiedades humectantes permiten que se alargue la vida de anaquel en productos de panadería; la fácil descomposición de la fructosa durante el cocimiento da como resultado una mejora en el sabor y en color y su alta presión osmótica inhibe el crecimiento microbiano.

**3.11 MANUFACTURA DE JARABES DE MAÍZ**

Los jarabes de maíz y azúcares son producidos por la hidrólisis química o enzimática del almidón. La hidrólisis de almidón para la producción de jarabes de maíz se puede llevar a cabo por tres métodos diferentes.

En la terminología industrial, los nombres "conversión" o "conversión de almidón" son usados para denotar estos tres procesos. La selección del tipo de método de la conversión depende del tipo de jarabe de maíz que será producido. El grado de conversión es normalmente medido en términos de dextrosa equivalente (DE). Este término se define como el porcentaje de azúcares reductores en un jarabe de maíz, calculado como dextrosa, en una base de peso seco.

Los tres procesos de hidrólisis de almidón son la conversión ácida, la conversión ácido-enzima y la conversión enzima-enzima. En el primero de estos métodos, como su nombre lo indica, los únicos agentes empleados para hidrolizar el almidón son ácidos. Los dos de estos últimos procedimientos son los llamados de conversión dual. Los sistemas de conversión duales tienen dos propósitos. En primer lugar, la conversión ácida produce jarabes que tienen limitaciones en la aceptabilidad cuando la hidrólisis se lleva más allá de 55 DE. En segundo lugar, los métodos de conversión dual hacen posible la producción de jarabes que tienen una amplia diferencia en las propiedades físicas y químicas.

### **3.11.1 Conversión ácida**

Cuando el almidón es hidrolizado con ácido como catalizador, ocurren rupturas en las uniones -C-O-C- con lo cual se lleva a cabo la producción de glucosa y de muchos de sus polímeros. Al continuar la hidrólisis hay un aumento en el número de los azúcares de peso molecular bajo. Si el proceso continúa, varios de los polímeros son hidrolizados hasta llegar sólo a remanentes de glucosa. Así, cualquier proceso de conversión, realizado ya sea por vía ácida o por un tratamiento dual, debe controlarse rígidamente para producir un jarabe con el valor DE deseado.

La producción de los jarabes de maíz por conversión ácida se lleva a cabo en un tanque de presión denominado "conversor". El almidón es mezclado con agua hasta formar una suspensión, que contiene de un 30-40% de almidón seco. La cantidad requerida de ácido diluido, la cual se basa en el peso de almidón y normalmente es de 0.12% de HCl, es agregada y la temperatura se eleva con vapor hasta obtener los grados requeridos. Esta

temperatura es aproximadamente de 140-160°C. La calefacción continúa durante un intervalo de 15-20 minutos. La cocción o gelatinización del almidón convierte primero a los polisacáridos más grandes. Conforme el proceso avanza se van produciendo otros azúcares. La conversión se puede continuar hasta llegar al grado de conversión deseado. En ese momento, se debe detener el calentamiento y la hidrólisis debe ser detenida rápidamente por la introducción de cantidades equivalentes de un agente neutralizante. El pH debe ajustarse a un intervalo de 4.0 a 5.5.

Después de la neutralización, el material suspendido, que consiste en sustancias grasas y partículas sólidas, es eliminado por medio de centrifugación y el uso de filtros. El filtrado se evapora parcialmente hasta obtener aproximadamente 60% de sólidos y se hace pasar por filtros de carbón para clarificar y blanquear el producto. Finalmente, el jarabe de maíz se bombea a través de un filtro de poro muy fino. Después de la clarificación, el jarabe se concentra en los tanques hasta obtener la densidad final.

Uno de los desarrollos para la producción de jarabes por hidrólisis ácida es el uso de un sistema continuo. Este desarrollo ha hecho posible la producción de jarabes de maíz refinados con propiedades uniformes. El tiempo de proceso para este sistema es de aproximadamente 4 horas. Y, para el sistema de producción de jarabe por lotes, se requiere un tiempo de 14 a 16 horas [Pancoast y Junk, 1973].

### **3.11.2 Conversión ácido-enzima**

La producción de jarabes de maíz por medio de una conversión ácido-enzima se lleva a cabo en dos etapas de hidrólisis. La primera etapa se lleva a cabo con el ácido como se ha descrito en el punto anterior. Esta etapa se puede realizar por un sistema por lotes o con el uso del sistema continuo. La magnitud de la conversión ácida va a estar determinada por el valor que se desee de DE y por la composición de carbohidratos del jarabe final.



La segunda etapa en este tipo de conversión se lleva a cabo por medio de enzimas que escinden el almidón.

Las enzimas que escinden al almidón, o amilasas son de tres tipos: Alfa amilasa, beta amilasa y glucoamilasa. Las primeras dos son utilizadas en la producción de jarabes de maíz y la tercera para la obtención de glucosa a partir de almidón [Pancoast y Junk, 1973].

### **3.11.3 Conversión enzima—enzima**

La producción de jarabes de maíz por conversión dual que usan dos enzimas en serie está bastante limitada. Esto puede ser debido al costo más elevado que el proceso ácido-enzima. Se han descrito ventajas de la producción de jarabes de maíz por este método sobre el sistema convencional.

En el primer paso de la hidrólisis, se debe emplear una alfa amilasa termoestable debido a las temperaturas de gelatinización que se utilizan. La segunda etapa de la hidrólisis se lleva a cabo con una amilasa fúngica [Pancoast y Junk, 1973].

### **3.11.4 Uso de la enzima glucosa isomerasa para la obtención de jarabes altos en fructosa**

El jarabe de maíz de alta fructosa que contiene 42% en peso es producido comercialmente por isomerización continua de glucosa con la enzima glucosa isomerasa inmovilizada.

El jarabe enriquecido que contiene 90% de fructosa en peso, que se prepara por separación cromatográfica, es mezclado con el jarabe de maíz alto en fructosa al 42% en peso para obtener un jarabe de 55% en peso de fructosa.

Durante el desarrollo inicial de la glucosa isomerasa, fue indiscutible que la reacción en lote no sería comercialmente factible debido a varios factores. Los largos tiempos de

residencia con la enzima soluble causaban la producción de color, eliminación del sabor, así como la formación de derivados de azúcar no metabolizables, formadas bajo condiciones alcalinas. Además, el costo de la enzima era alto y se hizo necesario desarrollar un sistema de la reacción en forma continua. Como resultado de estos estudios, se desarrollaron dos tipos de procesos de inmovilización para su uso comercial: los procesos de células enteras y los procesos de enzimas solubles.

En el proceso de células enteras la célula microbiana que contiene enzimas intracelulares se recupera del caldo de fermentación y se trata de conservar su actividad enzimática y mantener la integridad de la partícula. En un proceso, el caldo del cultivo se centrifuga y el concentrado de células lisadas se homogeneizan y se mezclan con glutaraldehído. El material se diluye y se flocula con un floculante catiónico y el producto final, se seca y se criba. El otro método involucra el arreglo de las células en gelatina y se mezcla con glutaraldehído, seguido de un lavado, realizando posteriormente una clasificación de partículas por tamaño y por último un secado.

En el proceso de enzima soluble la enzima es separada de las células y purificada antes de la inmovilización. Debido a que la glucosa isomerasa es una enzima intracelular, se rompe primeramente la pared de la célula por métodos físicos (sonicación y homogeneización) o enzimáticos.

La glucosa isomerasa es solubilizada, separada por centrifugación y/o filtración y concentrada por ultrafiltración. En uno de los métodos de inmovilización se va ligando a la enzima soluble simplemente a partículas que contiene una combinación de celulosa con DEAE (cloruro de dietilaminoetil), dióxido de titanio y poliestireno: otros soportes para la glucosa isomerasa incluyen resinas de intercambio aniónico, celulosa de intercambio aniónico, cerámica porosa y alúmina porosa.

La glucosa isomerasa se ha inmovilizado por distintos métodos y a diferentes soportes como por ejemplo la inmovilización por enlaces covalentes a esferas de vidrio poroso, a

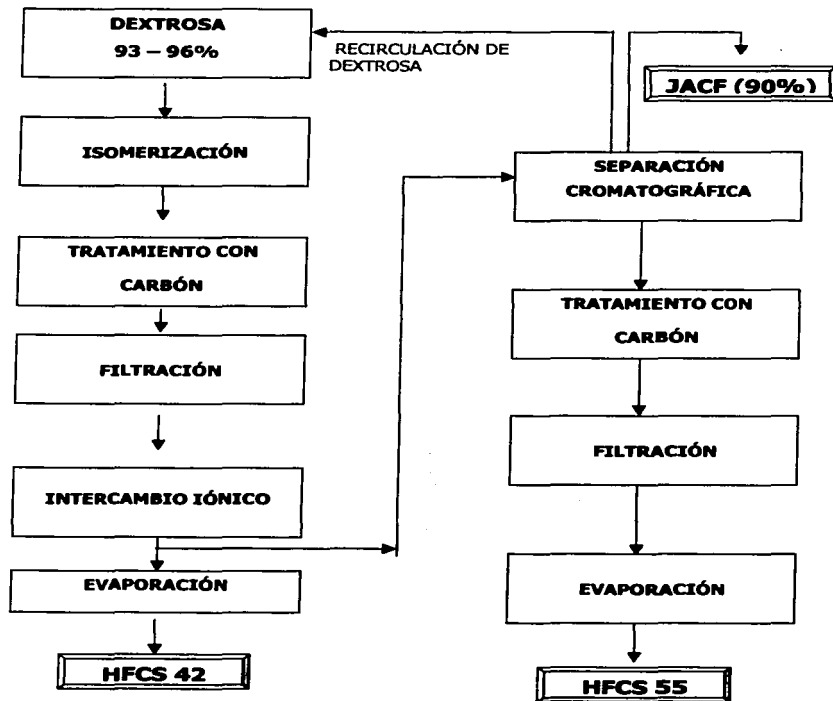
esferas de vidrio recubiertas con zirconio, por "atrapamiento" en polímeros de acrilamida y por adsorción a DEAE-Celulosa.

Se han aislado enzimas de glucosa isomerasa de una variedad de fuentes microbianas. Sin embargo, sólo unos cuantos organismos bacterianos se han usado para producir la glucosa isomerasa de uso comercial. Éstos incluyen *Streptomyces olivochromogenes*, *S. murinus*, *S. rubiginosus*, *Bacillus coagulans*, *Actinoplanes missouriensis* y *Microbacterium arborescens*.

Los jarabes de maíz altos en fructosa se producen a partir de un hidrolizado de glucosa el cual ha sido clarificado, tratado con carbón, y evaporado hasta un 40 – 50% de peso en base seca (Figura 3.4). Se adiciona magnesio como un cofactor para mantener la estabilidad de la glucosa isomerasa y prevenir la inhibición por cantidades traza de calcio residual. Si el nivel del calcio está por debajo de 1 ppm, un nivel del magnesio (agregado como  $MgSO_4$ ) de 0.4 mM es suficiente. El hidrolizado se pasa a través de una cama fija de glucosa isomerasa inmovilizada a una proporción de flujo controlada. Las condiciones del proceso dependen del uso del sistema de enzima pero generalmente son de 55-65 °C, a un pH de 7.5-8.5, y un tiempo de reacción de 1 hora o menos.

La máxima cantidad de fructosa contenida en el equilibrio es de 50 a 55% en peso en base seca; sin embargo, el tiempo de residencia se ajusta para lograr de 42-45 % en peso de fructosa ya que sólo con tiempos aumentados considerablemente se logran los porcentajes más altos. La enzima puede ser utilizada por varios meses y para compensar la pérdida de actividad enzimática se regulan los tiempos de residencia, para lo cual se modifica el flujo a través de la columna.

Los reactores de la enzima pueden operar en paralelo o en serie hasta que la actividad se reduzca a un 10% del nivel inicial. El hidrolizado isomerizado que contiene hasta 42 % en peso de fructosa se ajusta a un pH de 4-5, se realiza un tratamiento con carbón para eliminar el color, se realiza un intercambio iónico para quitar las sales, y se hace una evaporación hasta un 71 % en peso de sólidos.



**FIGURA 3.4**  
PROCESO DE LA PRODUCCIÓN DE JARABES CON ALTO CONTENIDO DE FRUCTOSA

[Fuente: Hui, 1991]

Cuando el contenido de glucosa en el jarabe de maíz es de 50 – 52% en peso el almacenamiento debe de ser de 30 – 32°C para prevenir la cristalización. Si la cristalización llega a ocurrir, el jarabe se debe calentar a 38°C para disolver los cristales formados [Macrae, 1993].

### **3.12 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada para la cuantificación de azúcares [Snyder, 1976].

Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general [Skoog, 1994].

#### **3.12.1 Determinación de carbohidratos por cromatografía de líquidos de alta resolución**

Los hidratos de carbono no poseen grupos cromóforos lo que evita su detección por absorción en la región de UV y visible o por fluorescencia. La mayoría de los hidratos de carbono absorbe en el intervalo de UV cercano, 180-220 nm, pero a esta longitud de onda, hay normalmente interferencia de otros componentes de la muestra.

El grado de pureza de la muestra y del solvente hace que la medición de absorbancia a longitudes de onda debajo de 200 nm sea difícil y cara. El detector del índice de refracción es el que comúnmente se utiliza para el análisis de carbohidratos en alimentos. El detector de índice de refracción es sensible a la temperatura y se ve afectado por la composición de los solventes, lo cual no permite el uso de elusión por gradiente [Scott, 1992].

La cromatografía de gases no está sujeta a estas dificultades pero presenta otros problemas tales como la preparación de derivados volátiles ya que los carbohidratos no

son volátiles, es así que se forman derivados químicos volátiles en los que han sido intercambiados los grupos hidroxilo (OH) por grupos éster o éter [Bradbury, 1976].

A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos ofrece a menudo la preparación de la muestra con un pre-tratamiento pequeño, y normalmente se observan solo los picos cromatográficos para cada azúcar [Scott, 1992].

### **3.12.2 Columnas analíticas para cromatografía de líquidos de alta resolución**

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes.

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ .

#### **3.12.2.1 Columna de sílice amino-ligada ("sílice amino-bonded")**

Los reportes de separación de carbohidratos por cromatografía de líquidos tales como la fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa indican el uso de columnas aminadas desde 1974. La desventaja de estas columnas es la degradación gradual de los grupos aminados y la deterioración de la propia sílice, llevando particularmente en el futuro a la pérdida de resolución entre la glucosa y fructosa. La formación de bases de Schiff entre los grupos aminados y los azúcares reductores puede producir pérdidas, particularmente a temperaturas elevadas.

Las características generales de un sistema de análisis de carbohidratos por cromatografía de líquidos de alta resolución se muestran en la Tabla 3.7.

### 3.12.3 Detectores de índice de refracción

En este tipo de detector, el disolvente en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la celda y el efluente de la columna pasa por la otra mitad. Los dos compartimentos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo tal que si las dos diluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación del haz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma.

Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además, son fiables y no dependen del caudal. Sin embargo, son dependientes de los cambios de temperatura y se deben mantener a una temperatura constante, con unas pocas milésimas de grado centígrado de variación. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores y, por lo general, no se pueden utilizar en la elución con gradiente [Skoog, 1994].

TABLA 3.7

CARACTERÍSTICAS DE SISTEMAS DE ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

	Sílice amino- ligada (Amino- bonda silica)	Sílice amino- modificada "in situ"	Resinas de iones "fijados"	Resinas de intercambio aniónico
Eluyente (desgasificado)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (80:20)	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (75:25) + modificador de poliamina	H <sub>2</sub> O desionizada (a veces + modificadores orgánicos)	NaOH + CH <sub>3</sub> COONa para eluir oligo- y polisacáridos
Cromatografía	Partición	Partición	Intercambio iónico, exclusión por tamaño, complejos ligandos	Intercambio iónico
Detector	IR	IR	IR	Detector amperométrico pulsado (PAD, "pulsed amperometric detection")
Límites de detección (aproximados)	10 µg	10 µg	1 µg	0.01 µg
Línea base	Varía debido a ligeros cambios en la composición de la fase móvil	Como el anterior	Buena estabilidad, mejor que la fase móvil mezclada	El uso de post- columnas estabiliza la línea base
Temperatura de la columna	Usualmente temperatura ambiente	Usualmente temperatura ambiente	85°C, los anómeros se separan a temperatura ambiente	20-45°C
Estabilidad de la columna	La fase estacionaria amino reacciona con los aldehídos y cetonas para formar bases de Schiff con lo cual la vida de la columna se reduce	La sílice sola más una regeneración continua del grupo amino, da como resultado un sistema más "robusto"	Es buena, si la presión no aumenta más de 103 bar (1500 psi), se deben evitar las sales, ácidos orgánicos y metanol	Presenta buena estabilidad mecánica (> 275 bar o 4000 psi). Evitar el CO <sub>2</sub> ; la deposición de carbonatos requiere de eliminación del uso de NaOH concentrada
Gradiente de elución	No	No	No	Si, gradientes iónicos
Mutarrotación	La separación de anómeros no causa problemas, el grupo amino cataliza la reacción	Como el anterior	Altas temperaturas catalizan la reacción de mutarrotación, los anómeros se pueden observar a temperaturas más bajas	Valores altos de pH incrementan la reacción de mutarrotación
Problemas de separación	Glucosa/galactosa Glucosa/manitol Glucosa/sorbitol Fructosa/xilitol (tiempos de retención más largos para rafiinosa y estaquiosa, pueden usarse para oligosacáridos)	Como en el anterior, excepto glucosa/galactosa separadas	Sacarosa/maltosa Xilitol/sorbitol Sacarosa/lactosa (La última pareja tiene más "resolución" con formas orgánicas de plomo y algunos otros pares con plata)	Sorbitol/dulcitol

[Fuente: Scott, 1992]



## **4.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

En general, la metodología de esta investigación consistió en realizar la clarificación del jugo de caña con etanol y en preparar las soluciones estándar de sacarosa para llevar a cabo el estudio de optimización de las hidrólisis química y enzimática.

Las determinaciones de glucosa, fructosa y sacarosa, presentes en cada una de las muestras analizadas a diferentes tiempos de las etapas de la metodología, se realizaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida de las soluciones estándar de sacarosa y de las muestras de jugo de caña clarificado se empleó ácido sulfúrico como agente hidrolizante a diferentes concentraciones para determinar la concentración óptima.

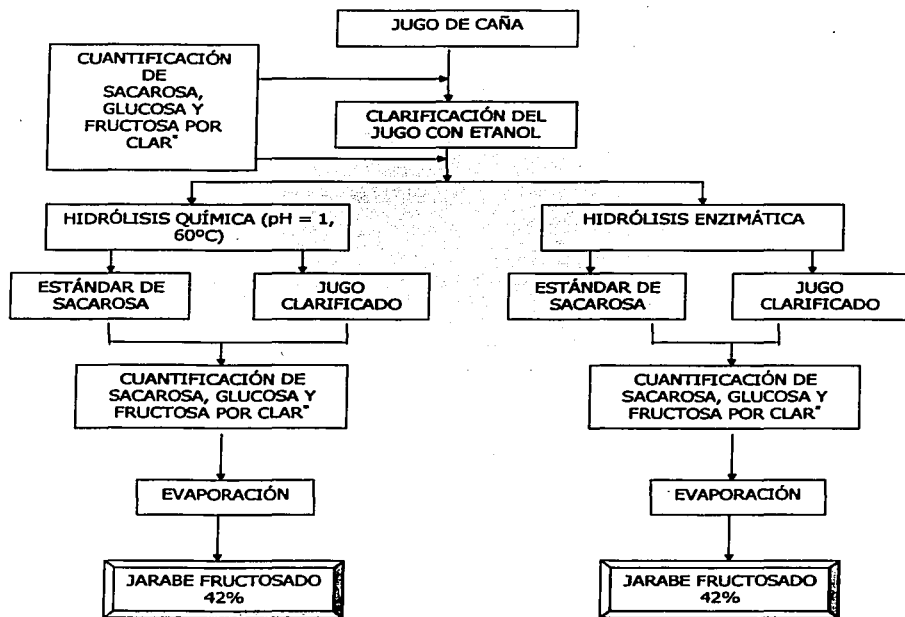
La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con la enzima invertasa, con la cual se probaron diferentes relaciones E/S para determinar la relación óptima.

### **4.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL**

En el siguiente diagrama (Figura 4.1), se indica de manera general, los pasos de la metodología realizada.

### **4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras se obtuvieron directamente en el laboratorio extrayendo el jugo de caña mediante un prensado para lo cual se empleó un molino de caña manual. Algunas de las muestras de jugo de caña se obtuvieron en "juguerías" del centro de la ciudad de México, (con la finalidad de tener diferentes muestras y compararlas), las cuales se transportaron al laboratorio para su análisis en recipientes de plástico cerrados y en hieleras para evitar su descomposición. Posteriormente se almacenaron a 4°C hasta el momento de su análisis.



\*CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

**FIGURA 4.1**  
DIAGRAMA GENERAL

### 4.3 CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

#### 4.3.1 Calibración del cromatógrafo de líquidos de alta resolución [AOAC, 1995]

El procedimiento para la calibración del CLAR consiste en preparar los estándares de cada uno de los azúcares a cuantificar (glucosa, fructosa y sacarosa) con el fin de detectar los tiempos de retención de cada uno de los azúcares, así como el área bajo la curva para concentraciones específicas.

#### 4.3.2 Reactivos y material

Los materiales y reactivos usados fueron:

---

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Perkin Elmer  
 Bomba Binaria modelo 200 Perkin Elmer  
 Interfase Serie 900 Perkin Elmer  
 Detector de Índice de Refracción Perkin Elmer  
 Estándares de Glucosa, Fructosa y Sacarosa grado reactivo analítico  
 Acetonitrilo grado CLAR (HPLC)  
 Agua desionizada  
 Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
 Filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC)

---

#### 4.3.3 Procedimiento

Los estándares de fructosa, glucosa y sacarosa se elaboraron en las siguientes concentraciones para cada azúcar:

AZÚCAR	CONCENTRACIÓN (g/mL)					
	FRUCTOSA	0.052835	0.042270	0.036985	0.026415	0.013210
GLUCOSA	0.050910	0.040730	0.035640	0.025450	0.012730	0.006363
SACAROSA	0.050001	0.040001	0.035000	0.025000	0.012500	0.006250

Las condiciones experimentales que se manejaron para el cromatógrafo de líquidos fueron:

---

Columna	Termo "Hypersil" 250 x 4.6 mm Sílice amino-lligada ("Sílice Aminobonded")
Fase móvil	Acetonitrilo:Agua (80:20)
Flujo de la fase móvil	1 mL/min
Detector	Índice de refracción
Volumen de inyección	20 µL

---

Las inyecciones al cromatógrafo de líquidos de cada uno de los estándares se realizaron por triplicado para la obtención de las curvas de calibración.

Cada una de las muestras inyectadas al cromatógrafo, deben ser filtradas a través de filtros de "nylon" para CLAR (HPLC) de 0.2 µm.

El acetonitrilo y el agua que se emplean como fase móvil, deben ser filtrados a vacío a través de una membrana de "nylon" de 0.45 µm y desgasificadas en el baño ultrasónico por un intervalo de tiempo de 30 minutos.

#### **4.4 CLARIFICACIÓN DEL JUGO DE CAÑA**

El método de clarificación con alcohol etílico, tiene como fundamento el hecho de que el etanol posee la capacidad de precipitar material con un peso molecular mayor a 10,000 daltones [Castillo-Guajardo, 1996; Castillo-Guajardo y col.,2002; Guillén-Villegas y col. 2002].

##### **4.4.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Jugo de caña  
Etanol 99.90 °G.L.  
Agua destilada  
Filtros Whatman N° 540 a peso constante

---

#### 4.4.2 Procedimiento

Se prepararon soluciones de etanol a diferentes concentraciones con jugo de caña de la siguiente manera:

% de Etanol	Jugo de caña (mL)	Etanol (mL)	Agua (mL)
0%	5	0	25
20%	5	5	20
40%	5	10	15
50%	5	12.5	12.5
60%	5	15	10
70%	5	17.5	7.5
80%	5	20	5
90%	5	22.5	2.5
99.90%	5	25	0

##### 4.4.2.1 Medidas turbidimétricas

Se prepararon las soluciones de etanol con jugo de caña como ya se indicó, por triplicado y las muestras se dejaron reposar durante 24 horas. Después de este tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm de cada una de las soluciones (se utilizó como blanco la mezcla de etanol-agua correspondiente a cada porcentaje de etanol a evaluar sin la adición de la muestra de jugo de caña), con la final de obtener la densidad óptica,  $DO$ , de cada muestra.

##### 4.4.2.2 Medidas gravimétricas

Se prepararon las soluciones de etanol con el jugo de caña por triplicado y se dejaron reposar durante 24 horas, después de este tiempo se filtraron las soluciones en papel filtro Whatman Nº 540, el cual se puso previamente en una estufa a 100–110°C durante dos horas aproximadamente (hasta peso constante). Posteriormente se colocaron los papeles filtro con el precipitado en una estufa a 100°C hasta peso constante.

#### **4.5. DETERMINACIÓN DE pH EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA Y EN SOLUCIONES ESTÁNDAR DE SACAROSA**

Esta prueba se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades usando un electrodo indicador al ión hidrógeno como electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, tal como el de calomel o el de cloruro de plata-plata. El aparato debe detectar el potencial en milivoltios y en unidades de pH a través del par de electrodos.

Para las mediciones de pH se utiliza ampliamente el electrodo de vidrio, porque da una respuesta inmediata a los cambios rápidos de las concentraciones de iones hidrógeno aún en soluciones poco reguladas.

Los valores de pH dependen de la temperatura, por lo cual las mediciones se deben efectuar a determinadas temperaturas.

##### **4.5.1 Calibración del equipo**

Se deben seguir las instrucciones dadas por el fabricante del equipo.

Examinar los electrodos antes de usarlos observando si presentan el puente salino, previo a su uso, si es necesario, abastecer de solución salina el puente y observar las precauciones indicadas por el fabricante para el instrumento y el electrodo.

Encender el aparato y dejarlo calentar lo suficiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Seleccionar dos soluciones reguladoras ("buffer"), patrón de referencia certificadas para calibración cuya diferencia en pH no exceda de cuatro unidades.

Llenar el recipiente con una de las soluciones reguladoras para calibración teniendo en cuenta la temperatura a la cual el material de prueba debe ser medido.

Colocar el control de temperatura a la de la solución y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores de pH observados coincidan con las soluciones amortiguadoras ("buffer") certificadas para calibración.

Enjuagar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución reguladora seleccionada para la calibración.

Llenar los recipientes a la misma temperatura a la que el material debe ser medido. El pH de la segunda solución reguladora debe estar dentro de  $\pm 0.07$  unidades de pH del valor indicado. Si se observa mayor desviación revisar los electrodos y si están afectados, reemplazarlos. Ajustar el control de calibración para hacer que el valor de pH observado sea igual al valor de pH reportado.

Repetir la calibración hasta que las dos soluciones reguladoras den valores observados de pH dentro de 0.05 unidades de los reportados, sin más ajuste de los controles. Evitar frotar los electrodos durante las mediciones, ya que se pueden cargar electrostáticamente y provocar alteraciones en la lectura.

#### **4.5.2 Determinación del pH de las muestras**

Efectuar las determinaciones a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Calibrar el aparato como ya se mencionó, a continuación lavar los electrodos y recipientes varias veces con agua destilada, dejando que los electrodos escurran el agua y secar el recipiente con papel absorbente.

Ajustar la temperatura con el control, a la que tiene la solución de prueba. Enjuagar los electrodos y el recipiente con la solución de prueba,

Posteriormente, llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH. Repetir el procedimiento con una segunda muestra (duplicado). La diferencia no deberá ser mayor a 0.05.

#### **4.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL JUGO DE CAÑA CLARIFICADO**

##### **4.6.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

"Rotavapor" Büchi modelo 461  
Micropipetas de 1 mL  
Filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC)  
Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
Agua desionizada  
Alcohol etílico 99.90°GL

---

##### **4.6.2 Procedimiento**

Una vez obtenida la concentración óptima de etanol para realizar la clarificación, se realizó una evaporación del jugo de caña clarificado en un "rotavapor" a una temperatura de 65°C y a 145 rpm con la finalidad de eliminar todo el etanol presente y poder realizar las hidrólisis química y enzimática.

Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en la muestra de jugo clarificado, una vez que se ha evaporado todo el etanol y que la muestra está a 25°C, se debe ajustar el pH a un valor de 7 a 7.5.

Se tomaron 5 mL del jugo y se adicionaron 5 mL de agua desionizada y 5 mL de alcohol etílico la mezcla resultante se hizo pasar por filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC). Posteriormente, se tomó 1mL de la solución filtrada y se le adicionó 1mL más de



alcohol etílico. Esta muestra se desgasificó en el sonicador durante 5 minutos y se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L (por triplicado) en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Para la cuantificación de cada uno de los azúcares en las muestras de jugo clarificado, se emplean las ecuaciones de las curvas de calibración realizadas para cada azúcar.

#### **4.7 HIDRÓLISIS ÁCIDA**

Este proceso se fundamenta en que los enlaces glucosídicos son más rápidamente descompuestos en medio ácido que en medio alcalino, en los que poseen bastante estabilidad. El aumento de temperatura incrementa en gran medida la velocidad de hidrólisis de glucósidos.

##### **4.7.1 Hidrólisis ácida en soluciones estándar de sacarosa**

###### **4.7.1.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Soluciones de  $H_2SO_4$  de 98%, 90% y 49% de pureza  
Hidróxido de sodio 10%  
Soluciones de sacarosa 22%  
Termómetro  
Hielo  
Baño de agua a 60°C con agitación  
Micropipetas de 1 y 5 mL  
Potenciómetro Orión modelo 720 A  
Parrilla de agitación magnética  
Bureta  
Vasos de precipitado de 50 y 100 mL

---

###### **4.7.1.2 Procedimiento**

En el baño de agua, se colocan 55 mL de la solución de sacarosa en un vaso de precipitados de 100 mL tapado con "parafilm" (para evitar el efecto de la evaporación en

la solución), hasta que se alcance en la muestra una temperatura constante de 60°C. Una vez alcanzada la temperatura, se toman 5 mL de la solución para su análisis cromatográfico. Este punto se considera como cero. Posteriormente, se adiciona el ácido sulfúrico a la pureza a la cual se va a llevar a cabo la hidrólisis (98, 90 y 49% de pureza), hasta llegar a un valor de pH de 1; a partir de la adición del ácido, se comienzan a tomar alícuotas de 5 mL cada una a diferentes tiempos para su análisis cromatográfico. Para detener la reacción de hidrólisis, las muestras se colocan inmediatamente en hielo y el pH se ajusta a un valor de 7-7.5 con NaOH al 10%; posteriormente, se mide el volumen final obtenido para cada una de las alícuotas (para la realización de los cálculos) y se almacenan a una temperatura de 4°C para su análisis cromatográfico. Cada una de las hidrólisis se realizó por triplicado.

#### **4.7.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ESTÁNDARES DE SACAROSA**

##### **4.7.1.3.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Micropipetas de 1 mL  
Filtros de 0,2 µm de "nylon" para CLAR (HPLC)  
Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
Mezcla Agua - Alcohol etílico (50:50)  
Alcohol etílico 99.90°GL

---

##### **4.7.1.3.2 Procedimiento**

Para el análisis cromatográfico de cada una de las muestras de sacarosa hidrolizadas por vía ácida se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en los estándares de sacarosa, se toman 2 mL de las muestras a temperatura ambiente y se adicionan 2 mL de la mezcla agua-alcohol etílico (50:50); posteriormente, las muestras se hacen pasar a través de filtros de 0.2 µm de "nylon" para CLAR (HPLC, por sus siglas en inglés). La

muestra obtenida se desgasifica en el sonicador durante 5 minutos y se inyecta un volumen de 20  $\mu$ L (por triplicado) en el cromatógrafo de líquidos para su análisis. Para la cuantificación de cada uno de los azúcares en las muestras estándar de sacarosa, se emplean las ecuaciones de las curvas de calibración realizadas para cada azúcar.

#### **4.7.2 Hidrólisis ácida en muestras de jugo clarificado**

##### **4.7.2.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Soluciones de  $H_2SO_4$  de 98, 90, y 49% de pureza  
Hidróxido de sodio 10%  
Jugo clarificado  
Termómetro  
Hielo  
Baño de agua a 60°C con agitación  
Micropipetas de 1 y 5 mL  
Potenciómetro Orión modelo 720 A  
Parrilla de agitación magnética  
Bureta  
Vasos de precipitado de 50 y 100 mL

---

##### **4.7.2.2 Procedimiento**

En el baño de agua, se colocan 55 mL del jugo de caña clarificado en un vaso de precipitados de 100 mL tapado con "parafilm" (para evitar el efecto de la evaporación en la solución) hasta que se alcance en la muestra una temperatura constante de 60°C. Una vez alcanzada la temperatura, se toman 5 mL de la solución para su análisis cromatográfico, (determinación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en la muestra a 60°C antes de la hidrólisis). Posteriormente, se adiciona el ácido sulfúrico a la pureza a la cual se determinó como óptima, de acuerdo a los resultados obtenidos de los experimentos realizados en los estándares de sacarosa, hasta llegar a un pH de 1; a partir de la adición del ácido, se deja seguir la reacción de hidrólisis hasta el tiempo considerado como óptimo, tomando en cuenta el comportamiento de la reacción de hidrólisis en los

estándares de sacarosa. Para detener la reacción de hidrólisis, las muestras se colocan inmediatamente en hielo y el pH se ajusta a un valor de 7-7.5 con NaOH al 10%. Posteriormente, se mide el volumen final obtenido (para la realización de los cálculos) y se almacenan a una temperatura de 4°C para su análisis cromatográfico. Se realizaron hidrólisis en tres muestras de jugos diferentes y cada una se realizó por triplicado.

#### **4.7.2.3 Análisis cromatográfico de las muestras de jugo de caña clarificado e hidrolizado**

##### **4.7.2.3.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Micropipetas de 1 mL  
Filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC)  
Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
Mezcla Agua-Alcohol etílico (50:50)  
Alcohol etílico

---

##### **4.7.2.3.2 Procedimiento**

Para el análisis cromatográfico de las muestras de jugo hidrolizadas por vía ácida se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en los estándares de sacarosa, se toma 2 mL de las muestras a temperatura ambiente y se adicionan 2 mL de la mezcla agua-alcohol etílico (50:50), posteriormente las muestras se hacen pasar a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC). La muestra obtenida se desgasifica en el sonicador durante 5 minutos y se inyecta un volumen de 20  $\mu\text{L}$  (por triplicado) en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Para la cuantificación de cada uno de los azúcares en las muestras de jugo, se emplean las ecuaciones de las curvas de calibración realizadas para cada azúcar.

#### **4.8 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Este proceso se basa en la capacidad de la enzima invertasa para lograr la hidrólisis de la sacarosa bajo condiciones específicas de pH y temperatura [Sigma-Aldrich, 2001].

##### **4.8.1 Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa**

###### **4.8.1.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Enzima invertasa  
Solución de NaOH 1M  
Ácido sulfúrico 1M  
Soluciones de sacarosa 22%  
Buffer de acetatos pH = 4.5, Concentración 0.1 M  
Termómetro  
Hielo  
Baño de agua a 55°C con agitación  
Micropipetas de 1 y 5 ml.  
Potenciómetro Orión modelo 720 A  
Parrilla de agitación magnética  
Bureta  
Vasos de precipitado de 50 y 100 mL

---

###### **4.8.1.2 Procedimiento**

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando la enzima invertasa (EC 3.2.1.26, Sigma-Aldrich®) con la finalidad de evaluar los parámetros de la actividad enzimática sobre un sustrato conocido.

El parámetro que se estudio en los estándares de sacarosa fue la relación de la cantidad de enzima óptima con respecto a la cantidad de sustrato. Se consideró parte de la metodología propuesta por el fabricante para realizar la hidrólisis.

Para la hidrólisis enzimática de sacarosa, se estudiaron dos variables, que fueron:

- a) Porcentaje de enzima
- b) Tiempo de reacción

Estas variables se estudiaron utilizando soluciones estándar de sacarosa a una concentración constante (22%).

Las relaciones E/S a estudiar fueron:

Relación E/S	g de enzima/10 mL
0.84%	0.01848
1.68%	0.03696
3.36%	0.07392

Para cada experimento se siguieron los siguientes pasos:

En el baño de agua, se colocan 10 mL de la solución de sacarosa en un vaso de precipitados de 50 mL tapado con "parafilm" (para evitar el efecto de la evaporación en la solución) hasta que se alcance en la muestra una temperatura constante de 55°C. A su vez, la solución reguladora de fosfatos ("buffer") (para pH = 4.5, 0.1 M), se coloca en el baño de agua hasta que se alcance una temperatura de 55°C.

En balanza analítica se pesa la cantidad de enzima requerida para cada experimento. Esta cantidad de enzima corresponde a un porcentaje en peso con respecto a la cantidad de sacarosa presente en la muestra.

Una vez alcanzada la temperatura, tanto en la solución amortiguadora ("buffer") como en la solución de sacarosa, se disuelve la cantidad correspondiente de enzima en 10 mL de la solución amortiguadora ("buffer") a 55°C y se adiciona a los 10 mL de sacarosa que se encuentran a 55°C. Inmediatamente después de la adición de la enzima al estándar de sacarosa, se toma una alícuota de 2mL, el cual se considera como el tiempo cero. Después se siguen tomando alícuotas de 2mL a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.5 y 10 minutos.

Para detener la reacción, una vez que se toma la alícuota, ésta se pone inmediatamente en un baño de agua a 80°C para inactivar la enzima. A su vez, se adiciona NaOH 1.0 M con la finalidad de aumentar el valor de pH a un valor de 7.0–7.5. Se mide el volumen final obtenido en cada muestra para que se considere la dilución en los cálculos. Después se pasa cada una de las alícuotas a un baño de hielo y las muestras se almacenan a una temperatura de 4°C para su análisis cromatográfico.

Cada una de las hidrólisis con diferente porcentaje de enzima se realizó por triplicado.

#### **4.8.1.3 Análisis cromatográfico de los estándares de sacarosa**

##### **4.8.1.3.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Micropipetas de 1 mL  
Filtros de 0.2 µm de "nylon" para CLAR (HPLC)  
Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
Mezcla Agua – Alcohol etílico (50:50)  
Alcohol etílico

---

#### **4.8.1.3.2 Procedimiento**

Para el análisis cromatográfico de cada una de las muestras de sacarosa hidrolizadas por vía enzimática se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en los estándares de sacarosa, se toman 2 mL de las muestras a temperatura ambiente y se adicionan 4 mL de la mezcla agua-álcohol etílico (50:50), de esta mezcla de reacción se toma 1 mL y se le adiciona 1 mL de alcohol etílico, estos dos mL resultantes se hacen pasar a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC). La muestra obtenida se desgasifica en el sonicador durante 5 minutos y se inyecta un volumen de 20  $\mu\text{L}$  (por triplicado) en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Para la cuantificación de cada uno de los azúcares en las muestras estándar de sacarosa, se emplean las ecuaciones de las curvas de calibración realizadas para cada azúcar.

#### **4.8.2 Hidrólisis enzimática en muestras de jugo de caña clarificado**

##### **4.8.2.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Enzima invertasa  
Solución de NaOH 1M  
Ácido sulfúrico 1M  
Soluciones de sacarosa 22%  
Solución reguladora ("Buffer") de acetatos pH = 4.5, Concentración 0.1 M  
Termómetro  
Hielo  
Baño de agua a 55°C con agitación  
Micropipetas de 1 y 5 mL  
Potenciómetro Orion modelo 720 A  
Parrilla de agitación magnética  
Bureta  
Vasos de precipitado de 50 y 100 mL

---



#### 4.8.2.2 Procedimiento

Una vez determinado el porcentaje de enzima óptimo y el tiempo de reacción al cual se realizará la hidrólisis enzimática en el jugo de caña clarificado, en el baño de agua, se colocan 10 mL del jugo clarificado en un vaso de precipitados de 50 mL tapado con "parafilm" (para evitar el efecto de la evaporación en la solución) hasta que se alcance en la muestra una temperatura constante de 55°C. A su vez, la solución reguladora de fosfatos (pH = 4.5, 0.1M) se coloca en el baño de agua hasta que se alcance una temperatura de 55°C.

En balanza analítica se pesa la cantidad de enzima determinada como óptima para la hidrólisis enzimática.

Una vez alcanzada la temperatura tanto en la solución reguladora como en la solución de sacarosa, se disuelve la cantidad de enzima en 10 mL de la primera a 55°C y se adiciona a los 10 mL del jugo que se encuentran a 55°C. Inmediatamente después de la adición de la enzima a la muestra de jugo de caña, se toma una alícuota de 2mL para determinar así la cantidad inicial de glucosa, fructosa y sacarosa en el jugo de caña a 55°C. Después de transcurrido el tiempo determinado como óptimo, se toma una alícuota de 2 mL de la mezcla de reacción.

Para detener la reacción, una vez que se toma la alícuota, ésta se pone inmediatamente en un baño de agua a 80°C para inactivar la enzima; a su vez, se adiciona NaOH 1.0 M con la finalidad de aumentar el valor de pH a un valor de 7.0–7.5. Se mide el volumen final obtenido en cada muestra para que se considere la dilución en los cálculos. Después se pasa cada una de las alícuotas a un baño de hielo y las muestras se almacenan a una temperatura de 4°C para su análisis cromatográfico. Cada una de las hidrólisis con diferente porcentaje de enzima se realizó por triplicado.

### **4.8.2.3 Análisis cromatográfico de las muestras de jugo de caña clarificado e hidrolizado**

#### **4.8.2.3.1 Reactivos y material**

Los reactivos y material usados fueron:

---

Micropipetas de 1 mL  
Filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC)  
Baño ultrasónico modelo Branson 1210  
Mezcla Agua-Alcohol etílico (50:50)  
Alcohol etílico

---

#### **4.8.2.3.2 Procedimiento**

Para el análisis cromatográfico de cada una de las muestras de jugo de caña clarificado hidrolizadas por vía enzimática se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el jugo de caña, se toman 2 mL de las muestras a temperatura ambiente y se adicionan 4 mL de la mezcla agua-alcohol etílico (50:50), de esta mezcla de reacción se toma 1 mL y se le adiciona 1 mL de alcohol etílico, estos dos mL resultantes se hacen pasar a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de "nylon" para CLAR (HPLC). La muestra obtenida se desgasifica en el sonicador durante 5 minutos y se inyecta un volumen de 20  $\mu\text{L}$  (por triplicado) en el cromatógrafo de líquidos para su análisis. Para la cuantificación de cada uno de los azúcares en las muestras de jugo de caña clarificado, se emplean las ecuaciones de las curvas de calibración realizadas para cada azúcar.

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

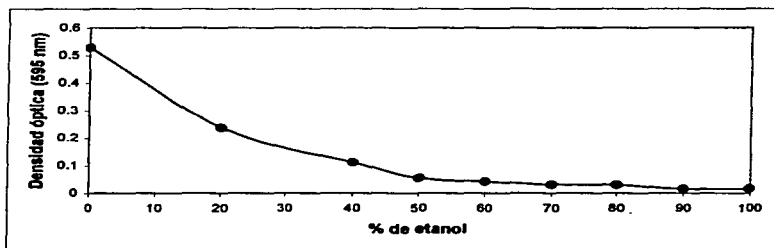
### 5.1 CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL

La clarificación del jugo de caña se realizó con etanol, tomando como base las investigaciones previas del uso de etanol como agente clarificante en el jugo de caña, en esta investigación se realizaron estudios para determinar la concentración óptima de etanol a la cual se obtiene la mejor clarificación.

Con la finalidad de conocer la concentración óptima de etanol para llevar a cabo la clarificación de jugo de caña, se realizaron dos pruebas en las cuales se determinó la densidad óptica, así como el material precipitado de peso molecular mayor a 10 kD, con diferentes concentraciones de etanol a experimentar.

#### 5.1.1 Mediciones turbidimétricas

La Figura 5.1 y la Tabla 5.1 presentan la curva de clarificación y el análisis estadístico realizado a las mediciones turbidimétricas. En la Figura 5.1 se observa cómo va disminuyendo la densidad óptica en las muestras de jugo de caña a medida que aumenta la concentración de etanol.



**FIGURA 5.1**  
CURVA DE CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES  
(mediciones turbidimétricas)

**TABLA 5.1**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL A**  
**DIFERENTES CONCENTRACIONES (MEDICIONES TURBIDIMÉTRICAS)**

Tratamientos	VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA		Duncan
JUGO DE CAÑA	% DE ETANOL		
	99.90 (A)	0.015666667 ± 0.001527255	
	90 (B)	0.014666667 ± 0.002081666	α 0.05
	80 (C)	0.029333333 ± 0.007571878	
	70 (D)	0.030333333 ± 0.004041452	
	60 (E)	0.042000000 ± 0.00781025	A, B, C, D, E
	50 (F)	0.055333333 ± 0.003055055	C, D, E, F
	40 (G)	0.111666667 ± 0.009291573	G
	20 (H)	0.237333333 ± 0.005507571	H
	0 (I)	0.529000000 ± 0.043000000	I

Estadísticas Andeva (SPSS)  
 Fisher  
 α 0.05

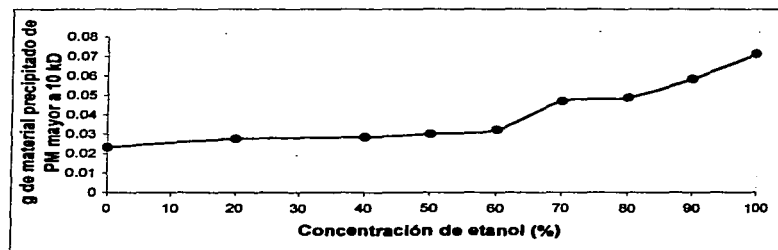
Análisis de significancia de Fisher. \* Diferencia significativa al 95.0% de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

En la Figura 5.1 se observa el comportamiento que presentan las muestras de jugo de caña clarificadas con etanol a diferentes concentraciones. En el punto marcado como 0% de etanol se tiene el valor de densidad óptica para el jugo de caña que se obtiene directamente de la molienda de la caña. Cuando se utiliza un 20% de etanol para clarificar el jugo de caña, se observa una disminución considerable de la densidad óptica (el valor de densidad óptica disminuye aproximadamente en un 60%) con respecto a la concentración de 0%; al utilizar 40% de etanol, el valor de densidad óptica disminuye aproximadamente hasta en un 80% y con el uso de etanol al 50% la disminución de la densidad óptica con respecto a la que no tiene es de aproximadamente de un 90%. A partir de esta concentración de etanol los valores de densidad óptica se mantienen casi constantes hasta llegar a la concentración de 99.90% de etanol, cuyo valor de densidad óptica se ve disminuido aproximadamente hasta en un 97% con respecto a la concentración inicial de etanol (0%).

Lo dicho anteriormente se puede apreciar también en los resultados obtenidos en el análisis estadístico aplicado, el cual agrupa las concentraciones de 99,90, 90, 80, 70, 60 y 50% de etanol sin encontrar diferencia significativa entre ellas pero, en las concentraciones de 0, 20 y 40% de etanol, ya hay una diferencia significativa con respecto a las concentraciones anteriores, este comportamiento es el que se aprecia en la Figura 5.1, en la cual la densidad óptica es muy elevada para las concentraciones de 0, 20 y 40% de etanol, con respecto a las otras concentraciones (99,90, 90, 80, 70, 60 y 50% de etanol), para estas últimas se puede notar que los valores de densidad óptica registrados se acercan a cero. Tomando en cuenta estos resultados se puede inferir que a las concentraciones de 20 y 40% de etanol es donde se lleva a cabo la mayor parte de la clarificación, y a partir de 50% de etanol el proceso de clarificación continúa aunque ya en una proporción menor que permite alcanzar valores de densidad óptica cercanos a cero.

### 5.1.2 Mediciones gravimétricas

La Figura 5.2 y la Tabla 5.2 presentan la curva de clarificación y el análisis estadístico realizado a las mediciones gravimétricas.



**FIGURA 5.2**  
CURVA DE CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL  
(material precipitado de PM mayor a 10 kD)

**TABLA 5.2**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL A**  
**DIFERENTES CONCENTRACIONES (MEDICIONES GRAVIMÉTRICAS)**

Tratamientos		GRAMOS DE MATERIAL PRECIPITADO DE PESO MOLECULAR > 10 kD	Duncan
JUGO DE CAÑA	% DE ETANOL		
	0 (A)	0.02330000 ± 0.00291376	
	20 (B)	0.02766667 ± 0.00072342	α 0.05
	40 (C)	0.02856667 ± 0.00145029	
	50 (D)	0.03013333 ± 0.00083267	
	60 (E)	0.03223333 ± 0.00374477	A, B, C, D
	70 (F)	0.04690000 ± 0.00266646	B, C, D, E
	80 (G)	0.04876667 ± 0.00670249	F, G
	90 (H)	0.05843333 ± 0.00427239	H
	99.90 (I)	0.07136667 ± 0.00508462	I
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05			

Análisis de significancia de Fisher. \* Diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

En la Figura 5.2 se observa el comportamiento que presentan las muestras de jugo de caña cuando se clarifican con etanol, en esta figura se puede notar como aumenta la concentración de material precipitado de peso molecular mayor a 10 kD conforme se incrementa la concentración de etanol, desde una concentración de etanol de 0% y hasta un 60% se observa que en la cantidad de material precipitado no hay una variación significativa, a partir de un 70% de etanol ya se observa un cambio considerable del material precipitado con respecto a la concentración inicial de etanol (0%), en cuanto a las concentraciones de 80, 90 y 99.90% de etanol se observa que la cantidad de material precipitado en el jugo de caña va aumentando, siendo en la concentración de 99.90% en la que se obtiene la mayor cantidad de material precipitado. Esto se puede apreciar también en los resultados obtenidos en el análisis estadístico aplicado (Tabla 5.2), en el cual se agrupan las concentraciones de 20, 40, 50 y 60% sin encontrar diferencia significativa entre ellas. La diferencia significativa se observa a partir del uso de una concentración de 70% de etanol. A su vez, estos resultados muestran que conforme aumenta la concentración de etanol, a partir de 70%, se obtiene una mejor clarificación,

así la máxima clarificación del jugo de caña ocurre cuando se usa una concentración de 99.90% de etanol.

Los análisis estadísticos aplicados a cada una de las pruebas mencionadas (Tabla 5.1 y 5.2) indican que sí hay diferencia significativa entre los productos obtenidos a las concentraciones de etanol utilizadas.

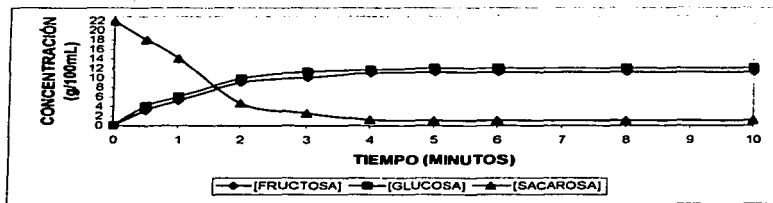
Tomando en cuenta los resultados de las dos pruebas, se puede apreciar que la concentración óptima de etanol para la clarificación de jugo de caña se obtiene a partir de una concentración del 70% de etanol en adelante. La concentración de etanol que se consideró en este trabajo como óptima para llevar a cabo la clarificación del jugo de caña fue de 70% de etanol, debido a que se pretende que esta metodología sea aplicada en los ingenios azucareros (en los cuales se obtiene alcohol como un subproducto de la caña), y en estos lugares sería costoso utilizar etanol con un 99.90% de pureza.

## **5.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA**

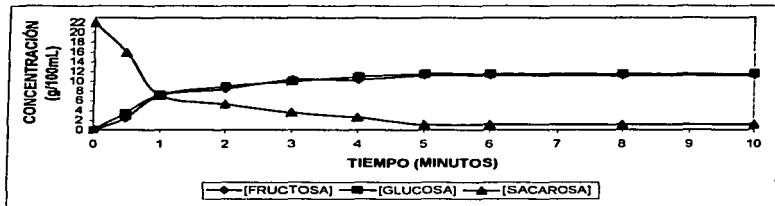
### **5.2.1 Hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa**

Para la determinación del comportamiento de la sacarosa en la hidrólisis química se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico en muestras estándares de sacarosa.

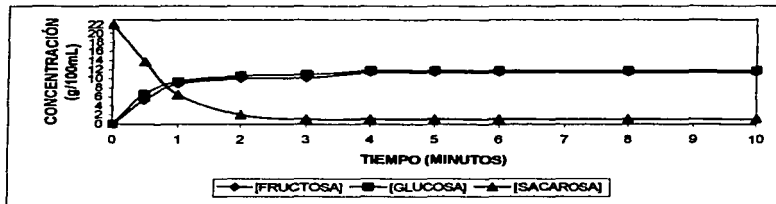
Las Figuras 5.3 a 5.5, presentan el comportamiento de las reacciones de hidrólisis química en los estándares de sacarosa empleando concentraciones de ácido sulfúrico de 49, 90 y 98%.



**FIGURA 5.3**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN SOLUCIONES ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO [49%]



**FIGURA 5.4**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN SOLUCIONES ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO [90%]



**FIGURA 5.5**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN SOLUCIONES ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO [98%]



En las Figuras 5.3 a 5.5, se representa el comportamiento que tiene la reacción de hidrólisis en las muestras de jugo de caña con ácido sulfúrico a diferentes concentraciones. En estas Figuras se observa como a medida que la sacarosa se hidroliza (la curva de la sacarosa comienza a disminuir), hay un aumento proporcional de las concentraciones de glucosa y fructosa, lo cual se nota como un crecimiento en las curvas de estos dos últimos componentes hasta llegar a valores de concentración constantes, los cuales indican que la reacción ha llegado al equilibrio.

Para poder determinar cual es la concentración de ácido sulfúrico a la cual se lleva a cabo la hidrólisis óptima del estándar de sacarosa se realizó un análisis estadístico, que se muestra en las Tablas 5.3 a 5.5, en el cual se comparan las tres concentraciones de ácido sulfúrico que se estudiaron para determinar si hay o no diferencia significativa entre ellas.

Es importante hacer notar que los análisis estadísticos aplicados únicamente fueron para la fructosa, la cual es el componente de interés de este trabajo de investigación y la razón es porque al aplicarlo para la glucosa la tendencia es semejante a la obtenida para la fructosa. Aunque con respecto a la sacarosa se tienen valores que van decreciendo por la reacción de hidrólisis el resultado del análisis estadístico es semejante al de la fructosa, ya que la degradación de la sacarosa durante la reacción de hidrólisis es proporcional a la formación de glucosa y fructosa.

**TABLA 5.3**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 90 Y 98%**

Tratamientos		g de Fructosa/100mL	Duncan
CONCENTRACIÓN	Tiempo (min)		
90%	0.5 (A)	2.420967 ± 0.3289	α 0.05 A B C, D, E E, F, G, H, I
	1.0 (B)	7.080433 ± 0.3651	
	2.0 (C)	8.445833 ± 0.7892	
	3.0 (D)	10.247267 ± 0.3031	
	4.0 (E)	10.340367 ± 0.2433	
	5.0 (F)	11.191233 ± 0.2715	
	6.0 (G)	11.191233 ± 0.2715	
	8.0 (H)	11.191233 ± 0.2715	
	10.0 (I)	11.191233 ± 0.2715	
98%	0.5 (A)	5.360767 ± 0.5963	
	1.0 (B)	8.876233 ± 0.5304	
	2.0 (C)	10.114500 ± 0.5597	
	3.0 (D)	10.240767 ± 0.8082	
	4.0 (E)	11.503500 ± 0.3162	
	5.0 (F)	11.503500 ± 0.3162	
	6.0 (G)	11.503500 ± 0.3162	
	8.0 (H)	11.503500 ± 0.3162	
	10.0 (I)	11.503500 ± 0.3162	
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05			

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

**TABLA 5.4**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA**  
**CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 49 Y 90%**

Tratamientos	g de Fructosa/100mL	Duncan
49%	0.5 (A)	α 0.05
	1.0 (B)	
	2.0 (C)	
	3.0 (D)	
	4.0 (E)	
	5.0 (F)	
	6.0 (G)	
	8.0 (H)	
	10.0 (I)	
	10.0 (I)	
90%	0.5 (A)	A B C D, E E, F, G, H, I
	1.0 (B)	
	2.0 (C)	
	3.0 (D)	
	4.0 (E)	
	5.0 (F)	
	6.0 (G)	
	8.0 (H)	
	10.0 (I)	
	10.0 (I)	
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05		

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

**TABLA 5.5**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA CON ÁCIDO SULFÚRICO A LAS CONCENTRACIONES DE 49 Y 98%**

Tratamientos		g de Fructosa/100mL		Duncan
CONCENTRACIÓN	Tiempo (min)			
49%	0.5 (A)	3.247500 ± 0.4547		
	1.0 (B)	5.221067 ± 0.4112		
	2.0 (C)	9.084267 ± 0.4500		
	3.0 (D)	10.092767 ± 0.4859		
	4.0 (E)	11.053567 ± 0.1727		
	5.0 (F)	11.297233 ± 0.2078		α 0.05
	6.0 (G)	11.297233 ± 0.2078		
	8.0 (H)	11.297233 ± 0.2078		
	10.0 (I)	11.297233 ± 0.2078		
	98%	0.5 (A)	5.360767 ± 0.5963	
1.0 (B)		8.876233 ± 0.5304		B
2.0 (C)		10.114500 ± 0.5597		C, D
3.0 (D)		10.240767 ± 0.8082		E, F, G, H, I
4.0 (E)		11.503500 ± 0.3162		
5.0 (F)		11.503500 ± 0.3162		
6.0 (G)		11.503500 ± 0.3162		
8.0 (H)		11.503500 ± 0.3162		
10.0 (I)		11.503500 ± 0.3162		
Estadísticas Andéva (SPSS) Fisher α 0.05				

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

En la Tabla 5.3 se analizan los resultados obtenidos para la hidrólisis con ácido sulfúrico al 90 y al 98%; en dicha tabla se puede observar que sí hay diferencia significativa entre estas dos concentraciones de ácido sulfúrico a los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 minutos después de este tiempo se observa que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra concentración. En la Tabla 5.4 se analizan los resultados obtenidos para la hidrólisis con ácido sulfúrico al 49 y 90%, en la cual se puede observar que sí hay diferencia significativa entre estas dos concentraciones de ácido sulfúrico, a los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 minutos. Después de este tiempo se observa que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra concentración. En la Tabla 5.5 se analizan

los datos para las concentraciones de 49 y 98% de ácido sulfúrico, en esta tabla se puede observar que sí hay diferencia significativa entre estas dos relaciones a los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 minutos después de este tiempo se observa que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra concentración.

Se debe tener en cuenta que a los tiempos en los que ya no se observa una diferencia significativa entre las concentraciones de ácido sulfúrico, son aquellos en los que la reacción ya ha llegado al equilibrio y ya no hay más hidrólisis de la sacarosa para la formación de fructosa y glucosa. Esto se puede apreciar mejor en las Figuras 5.3 a 5.5 en las cuales se muestra como se va llevando a cabo la reacción de hidrólisis de la sacarosa. En los primeros tiempos de la reacción se aprecia cómo la curva de sacarosa va decreciendo hasta llegar a valores constantes. En cuanto a las curvas para la fructosa y la glucosa, se observa cómo va aumentando su concentración en la mezcla de reacción a medida que la sacarosa se está hidrolizando hasta llegar a un valor constante.

Con base en estos resultados, la concentración de ácido sulfúrico que se considera como óptima para llevar a cabo la hidrólisis química es la de 98% de pureza, pero a esta concentración de ácido sulfúrico se observó experimentalmente (al realizar las hidrólisis en los estándares de sacarosa) que hay cambios de color en las muestras, lo cual no ocurrió cuando se utilizó ácido sulfúrico con 90% y 49% de pureza, tomando en cuenta que en estas últimas concentraciones sí hay diferencia significativa se tomó la concentración de 90% como óptima y fue a esta concentración a la que se realizaron las hidrólisis en jugo de caña clarificado.

Se aplicó un análisis estadístico a los resultados de la hidrólisis realizada con ácido sulfúrico al 90% para así determinar el tiempo de reacción óptimo el cual se muestra en la Tabla 5.6, en la cual se puede apreciar que en los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 4.0 y 5.0 minutos, sí hay diferencia significativa (a excepción de los tiempos de 3.0 y 4.0 minutos); después del minuto 5.0 y hasta 10 minutos ya no se observa diferencia significativa, por lo cual el tiempo óptimo de hidrólisis se considera que es de 5.0 minutos. Esto se puede observar en la Figura 5.4, en la cual a partir del tiempo de cinco minutos la curva se

mantiene constante en los valores de las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa, indicando así que la reacción de hidrólisis ha llegado al equilibrio.

**TABLA 5.6**  
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA (CON ÁCIDO SULFÚRICO AL 90%)  
EN ESTÁNDARES DE SACAROSA PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE  
HIDRÓLISIS

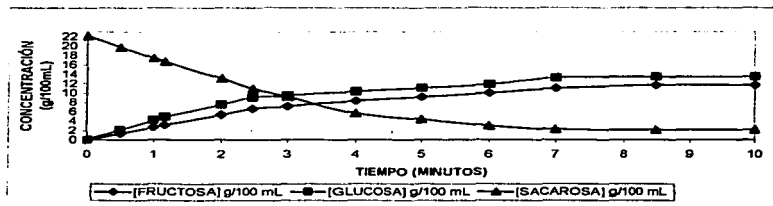
Tratamientos		g de Fructosa/100mL	Duncan
CONCENTRACIÓN	TIEMPO (MIN)		
90%	0.5 (A)	3.640225 ± 0.6186	α 0.05  A B C, D, E F, G, H, I
	1.0 (B)	4.384773 ± 0.6033	
	2.0 (C)	9.612521 ± 0.6165	
	3.0 (D)	11.533108 ± 0.8936	
	4.0 (E)	11.533108 ± 0.8936	
	5.0 (F)	11.533108 ± 0.8936	
	6.0 (G)	11.533108 ± 0.8936	
	8.0 (H)	11.533108 ± 0.8936	
	10.0 (I)	11.533108 ± 0.8936	
	Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05		

Análisis de significancia de Fisher. \* Diferencia significativa al 95.0% de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

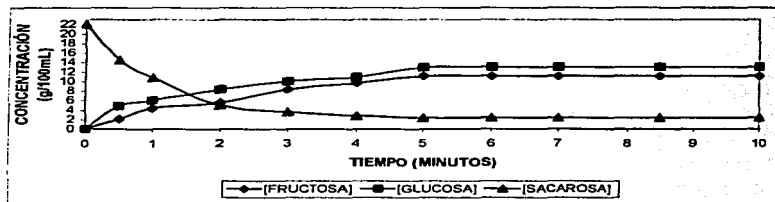
### 5.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

#### 5.3.1 Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa

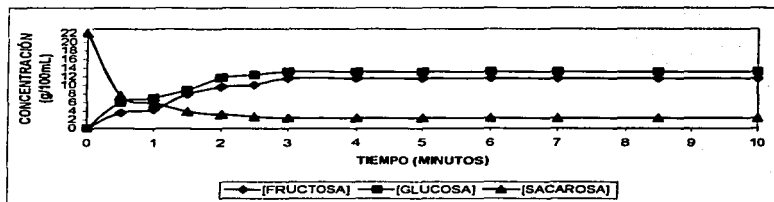
Para la determinación del comportamiento enzimático que presenta la enzima invertasa sobre la sacarosa, se realizaron ensayos previos para poder determinar los factores que intervienen en la reacción enzimática y para observar el comportamiento de dicha enzima. Con la finalidad de lograr este objetivo, se mantuvieron constantes los valores de pH y de temperatura [pH = 4.5, Temperatura = 55°C], los cuales son los recomendados por el fabricante. Los valores enzima/sustrato que se emplearon fueron 0.84%, 1.68% y 3.36%.



**FIGURA 5.6**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(REL. E/S = 0.84%)



**FIGURA 5.7**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(REL. E/S = 1.68%)



**FIGURA 5.8**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(REL. E/S = 3.36%)

Las Figuras 5.6 a 5.8, presentan el comportamiento de las reacciones de hidrólisis enzimática en estándares de sacarosa empleando las relaciones E/S de 0.84%, 1.68% y 3.36% respectivamente. En estas figuras se muestra cómo se va llevando a cabo la reacción de hidrólisis de la sacarosa. En los primeros tiempos de la reacción se aprecia cómo la curva de sacarosa va decreciendo hasta llegar a valores constantes. En cuanto a las curvas para la fructosa y la glucosa, se observa cómo va aumentando su concentración en la mezcla de reacción a medida que la sacarosa se está hidrolizando hasta llegar a un valor constante.

Para poder determinar cual es la relación E/S a la cual se lleva a cabo la hidrólisis óptima del estándar de sacarosa se realizó un análisis estadístico que se muestra en las Tablas 5.7 a 5.9, en las cuales se comparan las tres relaciones E/S que se estudiaron para determinar si hay o no diferencia significativa entre ellas.

Al igual que en la hidrólisis química, únicamente se aplicaron análisis estadísticos para los resultados de fructosa.



**TABLA 5.7**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 0.84% Y 1.68%**

Tratamientos		g de Fructosa/100mL	Duncan
E/S	Tiempo (min)		
0.84%	0.5 (A)	1.361955 ± 0.2692	α 0.05 A B C D E F, G G, H, I, J
	1.0 (B)	2.724141 ± 0.5380	
	2.0 (C)	5.345707 ± 0.2355	
	3.0 (D)	7.198389 ± 0.1845	
	4.0 (E)	8.302706 ± 0.4392	
	5.0 (F)	9.145446 ± 0.1485	
	6.0 (G)	9.988326 ± 0.7362	
	7.0 (H)	10.954082 ± 0.3568	
	8.5 (I)	11.647588 ± 0.1543	
	10.0 (J)	11.647588 ± 0.1543	
1.68%	0.5 (A)	2.113691 ± 0.4972	α 0.05 A B C D E F, G G, H, I, J
	1.0 (B)	4.329654 ± 0.2214	
	2.0 (C)	5.567681 ± 0.4907	
	3.0 (D)	8.324438 ± 0.3806	
	4.0 (E)	9.656294 ± 0.1987	
	5.0 (F)	11.137434 ± 0.3144	
	6.0 (G)	11.137434 ± 0.3144	
	7.0 (H)	11.137434 ± 0.3144	
	8.5 (I)	11.137434 ± 0.3144	
	10.0 (J)	11.137434 ± 0.3144	
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05			

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

**TABLA 5.8**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 0.84% Y 3.36%**

Tratamientos		g de Fructosa/100mL		Duncan
E/S	Tiempo (min)			
0.84%	0.5 (A)	1.361955 ± 0.2692		α 0.05  A, B C D, E, F, G, H E, F, G, H, I, J
	1.0 (B)	2.724141 ± 0.5380		
	2.0 (C)	5.345707 ± 0.2355		
	3.0 (D)	7.198389 ± 0.1845		
	4.0 (E)	8.302706 ± 0.4392		
	5.0 (F)	9.145446 ± 0.1485		
	6.0 (G)	9.968326 ± 0.7362		
	7.0 (H)	10.954082 ± 0.3568		
	8.5 (I)	11.647588 ± 0.1543		
	10.0 (J)	11.647588 ± 0.1543		
3.36%	0.5 (A)	3.640225 ± 0.6186		
	1.0 (B)	4.384773 ± 0.6033		
	2.0 (C)	9.612521 ± 0.6165		
	3.0 (D)	11.533108 ± 0.8936		
	4.0 (E)	11.533108 ± 0.8936		
	5.0 (F)	11.533108 ± 0.8936		
	6.0 (G)	11.533108 ± 0.8936		
	7.0 (H)	11.533108 ± 0.8936		
	8.5 (I)	11.533108 ± 0.8936		
	10.0 (J)	11.533108 ± 0.8936		
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05				

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

**TABLA 5.9**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA CON INVERTASA EN EL USO DE LA RELACIÓN E/S DE 1.68% Y 3.36%**

Tratamientos		g de Fructosa/100mL	Duncan
E/S	Tiempo (min)		
1.68%	0.5 (A)	2.113691 ± 0.4972	α 0.05 A B C D, E, F, G, H, I, J
	1.0 (B)	4.329654 ± 0.2214	
	2.0 (C)	5.567681 ± 0.4907	
	3.0 (D)	8.324438 ± 0.3806	
	4.0 (E)	9.656294 ± 0.1987	
	5.0 (F)	11.137434 ± 0.3144	
	6.0 (G)	11.137434 ± 0.3144	
	7.0 (H)	11.137434 ± 0.3144	
	8.5 (I)	11.137434 ± 0.3144	
	10.0 (J)	11.137434 ± 0.3144	
3.36%	0.5 (A)	3.640225 ± 0.6186	
	1.0 (B)	4.384773 ± 0.5033	
	2.0 (C)	9.612521 ± 0.6165	
	3.0 (D)	11.533108 ± 0.8936	
	4.0 (E)	11.533108 ± 0.8936	
	5.0 (F)	11.533108 ± 0.8936	
	6.0 (G)	11.533108 ± 0.8936	
	7.0 (H)	11.533108 ± 0.8936	
	8.5 (I)	11.533108 ± 0.8936	
	10.0 (J)	11.533108 ± 0.8936	
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05			

Análisis de significancia de Fisher, \* diferencia significativa al 95.0 % de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

En la Tabla 5.7 se analizan las relaciones E/S de 0.84 y 1.68%; en esta tabla se puede observar que sí hay diferencia significativa entre estas dos relaciones a los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 minutos. Después de este tiempo se observa que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra relación E/S.

En la Tabla 5.8 se analizan las relaciones E/S de 0.84 y 3.36%, en la cual se puede observar que no hay diferencia significativa entre estas dos relaciones a los tiempos de 0.5

y 1.0 minuto, pero en el tiempo de 2.0, 3.0 y 4.0 minutos sí hay diferencia significativa. A partir del minuto 5.0 en adelante se vuelve a observar nuevamente que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra relación E/S.

En la Tabla 5.9 se analizan las relaciones E/S de 1.68 y 3.36%. En dicha tabla se puede observar que sí hay diferencia significativa entre estas dos relaciones a los tiempos de 0.5, 1.0, 2.0, y 3.0 minutos. Después de este tiempo se observa que ya no hay diferencia significativa en el uso de una u otra relación E/S.

Se debe tener en cuenta que en los tiempos en donde ya no se observa una diferencia significativa en el uso de una u otra relación, son aquellos en que la reacción ha llegado al equilibrio y ya no hay más hidrólisis de la sacarosa para la formación de fructosa y glucosa. Esto se puede apreciar mejor en las Figuras 5.6 a 5.8.

Tomando en cuenta estos resultados, la relación E/S con la cual se realizó la hidrólisis enzimática del jugo de caña fue la de 3.36 en la cual la reacción de hidrólisis se lleva a cabo en un menor tiempo con respecto a las otras dos relaciones E/S (0.84 y 1.68%).

Considerando que la relación E/S óptima es la de 3.36 se aplicó un análisis estadístico a los resultados de esta relación E/S para determinar el tiempo de reacción óptimo, el cual se muestra en la Tabla 5.10, en la cual se puede apreciar que la hidrólisis enzimática para la relación E/S 3.36%, en los tiempos de 0.5 y 1.0 minuto no hay diferencia significativa, pero en los tiempos de 1.0, 2.0 y 3.0 minutos sí hay diferencia significativa entre ellos; después del minuto 3.0 y hasta 10 minutos ya no se observa diferencia significativa, por lo cual el tiempo óptimo de hidrólisis se considera que es de 3.0 minutos. Esto se puede observar en la Figura 5.8, en la cual a partir del tiempo de tres minutos la curva se mantiene constante en cuanto a las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa, indicando así que la reacción de hidrólisis ha llegado al equilibrio.

TABLA 5.10

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, EN ESTÁNDARES DE SACAROSA, A UNA RELACIÓN E/S DE 3.36% PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE HIDRÓLISIS

Tratamientos		g de Fructosa/100mL	Duncan
E/S	TIEMPO (MIN)		
	0.5 (A)	3.640225 ± 0.6186	α 0.05  A, B C D, E, F, G, H, I, J
	1.0 (B)	4.384773 ± 0.6033	
	2.0 (C)	9.612521 ± 0.6165	
	3.0 (D)	11.533108 ± 0.8936	
	4.0 (E)	11.533108 ± 0.8936	
	5.0 (F)	11.533108 ± 0.8936	
	6.0 (G)	11.533108 ± 0.8936	
	7.0 (H)	11.533108 ± 0.8936	
	8.5 (I)	11.533108 ± 0.8936	
	10.0 (J)	11.533108 ± 0.8936	
Estadísticas Andeva (SPSS) Fisher α 0.05			

Análisis de significancia de Fisher. \* Diferencia significativa al 95.0% de exigencia. Duncan prueba de rango múltiple, hace una comparación entre la media y las agrupa o no, de acuerdo al nivel de significancia

#### 5.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO

En la Tabla 5.11 se muestran los valores de la concentración inicial de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en tres muestras diferentes de jugo de caña clarificado antes de la hidrólisis. En esta tabla se puede observar que en las muestras de jugo de caña ya hay una cantidad inicial de fructosa y glucosa, la cual es muy similar en las tres muestras. En cuanto a la cantidad de sacarosa presente, se puede observar que la concentración es variable, principalmente en la muestra B, cuyo valor en la concentración inicial de sacarosa es un poco más alto en relación con las muestras A y C.

**TABLA 5.11**  
**CONCENTRACIONES DE FRUCTOSA, GLUCOSA Y SACAROSA OBTENIDAS POR CLAR**  
**(HPLC) PARA LAS MUESTRAS DE JUGO CLARIFICADO\***

MUESTRA DE JUGO CLARIFICADO	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
A	0.965211	1.845671	19.951363
B	2.033797	2.479457	25.423821
C	1.368741	2.003894	21.854022

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

### 5.5 HIDRÓLISIS QUÍMICA EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO

Para llevar a cabo la hidrólisis química del jugo de caña clarificado se utilizó la concentración de ácido sulfúrico de 90% considerada como la óptima de acuerdo a los resultados obtenidos de la hidrólisis química de los estándares de sacarosa y el tiempo al cual se llevó a cabo la hidrólisis fue de 5.0 minutos. La Tabla 5.12 muestra los resultados obtenidos de la hidrólisis química realizada a tres muestras de jugo de caña clarificado.

**TABLA 5.12**  
**ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO E**  
**HIDROLIZADO CON ÁCIDO SULFÚRICO**

MUESTRA DE JUGO CLARIFICADO E HIDROLIZADO	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
A	8.39764255 $\delta \pm 0.75166166$	9.28516446 $\delta \pm 0.45479740$	0.9428734 $\delta \pm 0.66422366$
B	12.0364446 $\delta \pm 0.51769781$	15.6851455 $\delta \pm 0.8146516$	1.4853742 $\delta \pm 0.15244482$
C	9.68763966 $\delta \pm 0.64247154$	10.6451126 $\delta \pm 0.1447047$	1.2972454 $\delta \pm 0.35412743$

**5.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO**

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del jugo de caña clarificado se utilizó la relación E/S = 3.36 considerada como la óptima de acuerdo a los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática de los estándares de sacarosa y el tiempo al cual se llevó a cabo la hidrólisis fue de 3.0 minutos. La Tabla 5.13 muestra los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática realizada a tres muestras de jugo de caña clarificado.

**TABLA 5.13**  
ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA CLARIFICADO E  
HIDROLIZADO ENZIMÁTICAMENTE (RELACIÓN E/S = 3.36)

MUESTRA DE JUGO CLARIFICADO E HIDROLIZADO	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
A	8.11364884 $\delta \pm 0.51078945$	8.87548791 $\delta \pm 0.03124578$	1.0630642 $\delta \pm 0.43200025$
B	13.4529642 $\delta \pm 0.35061245$	14.8695355 $\delta \pm 0.71230569$	0.9975187 $\delta \pm 0.14297004$
C	9.95407072 $\delta \pm 0.32213212$	9.27931911 $\delta \pm 0.36910077$	0.9146230 $\delta \pm 0.87451358$

En las Tablas 5.12 y 5.13 se observan los resultados obtenidos de las hidrólisis química y enzimática realizadas en jugo de caña clarificado. Para ambas hidrólisis se partió de las mismas muestras de jugo de caña, para las cuales en ambos tipos de hidrólisis se llegaron a obtener cantidades similares de los azúcares en estudio (fructosa y glucosa).

**5.7 EVAPORACIÓN**

Después de realizar las hidrólisis química y enzimática en el jugo de caña clarificado, se realizó una evaporación de las mezclas finales de reacción obtenidas en un "rotavapor", con la finalidad de eliminar agua y concentrar los sólidos totales, para así obtener una solución con 42% en peso de fructosa. En la Tabla 5.14 se observan los resultados obtenidos de la concentración de fructosa en la mezcla de reacción después de realizar la evaporación.

**TABLA 5.14**  
**RESULTADOS DE LA CANTIDAD DE FRUCTOSA OBTENIDA EN LA MEZCLA DE REACCIÓN**  
**DESPUÉS DE EVAPORAR**

MUESTRA DE JUGO	HIDRÓLISIS QUÍMICA [FRUCTOSA] g/100mL	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA [FRUCTOSA] g/100mL
A	40.2572 $\delta \pm 0.089151$	39.1851 $\delta \pm 0.5493231$
B	41.8414 $\delta \pm 0.042444$	39.9404 $\delta \pm 0.7837632$
C	39.1846 $\delta \pm 0.875855$	40.9145 $\delta \pm 0.3742455$

Tomando en cuenta los resultados de la Tabla 5.14, se puede observar que después de la evaporación realizada en las muestras de jugo de caña clarificado, es posible llegar a la obtención de jarabes de fructosa de 39 – 42% p/v, tanto para las muestras de jugo hidrolizadas con la enzima invertasa como con las muestras hidrolizadas con ácido sulfúrico al 90%.

Las concentraciones de fructosa obtenidas después de la evaporación, tanto para la hidrólisis química como para la enzimática, son muy similares, lo que indica la factibilidad de utilizar cualquiera de los métodos para llegar a la obtención de un jarabe fructosado de hasta 42% de fructosa, esto a su vez nos muestra que con los productos obtenidos a partir de la hidrólisis química o enzimática de jugo de caña clarificado es posible obtener un jarabe con un porcentaje de fructosa semejante al que se obtiene a partir de la hidrólisis del almidón de maíz (42% de fructosa).

Considerando la tecnología para la elaboración de jarabes de maíz altos en fructosa descrita en la literatura y comparándola con el esquema de trabajo, para la obtención de jarabes fructosados a partir de jugo de caña realizado en esta investigación, es posible que el jarabe fructosado obtenido a partir del jugo de caña clarificado sea más barato y más rápido, ya que si se parte de almidón, se debe realizar una hidrólisis de éste para la obtención de glucosa, a su vez la glucosa debe ser isomerizada a fructosa para llegar a un jarabe fructosado de 42%. En el caso de los jarabes obtenidos por hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de caña, únicamente hay que realizar una hidrólisis, sin necesidad de llevar a cabo una isomerización para obtener un jarabe fructosado de 42%.



## 6.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 6.1 CONCLUSIONES

1. El uso de alcohol etílico como agente clarificante del jugo de caña, proporciona buenos resultados cuando se emplea para tal fin a partir de una concentración de 70% (en una relación 1:1 con respecto al jugo de caña) concentración a partir de la cual se eliminan en gran proporción las dextranas presentes. El uso de alcohol etílico con 99.90% de concentración es la que proporciona mejores resultados de clarificación ya que es a esta concentración en la cual se da la máxima eliminación de dextranas.
2. Las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis química fueron: uso de ácido sulfúrico al 90%; tiempo de reacción de hidrólisis: 5 minutos, para una concentración de sacarosa promedio de 22% (p/v). Es importante hacer notar que el tiempo de hidrólisis se puede disminuir si se utiliza ácido sulfúrico al 98%, pero se presentan cambios importantes de coloración en la mezcla de reacción.
3. Las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis enzimática fueron: uso de la enzima invertasa en una relación E/S de 3.36%; tiempo de reacción de hidrólisis: 3 minutos, para una concentración de sacarosa promedio de 22% (p/v).
4. La obtención de azúcar invertido por hidrólisis con ácido presenta algunas desventajas tales como cambios de coloración de la mezcla de reacción, así como la formación de sales (resultado de la neutralización de la mezcla de reacción), lo cual afecta directamente en las características del producto final.
5. La hidrólisis enzimática presentó algunas ventajas sobre la hidrólisis por vía ácida en el jugo de caña, tales como: no hay cambios en la coloración del producto, esta reacción se lleva a cabo más rápido, es una reacción más específica, la concentración de sales formadas es más baja que la que se obtiene por vía ácida y se obtienen resultados similares en cuanto a la obtención de glucosa y fructosa. Con estos resultados se puede concluir que para la elaboración de un jarabe con

alto contenido en fructosa es más conveniente llevar a cabo el procedimiento por vía enzimática, el cual no presenta cambios que pudieran afectar las características del producto final, con lo cual podría obtenerse un producto capaz de competir con los jarabes de maíz altos en fructosa comerciales.

6. Esta tecnología se podría aplicar en los ingenios azucareros como una alternativa para la elaboración de jarabes altos en fructosa a partir del jugo de caña capaces de competir con los jarabes de maíz ya existentes.

## **6.2 RECOMENDACIONES:**

1. Se recomienda realizar un estudio, en el cual se utilice algún método de separación que permita quitar la glucosa de la mezcla de reacción de hidrólisis para así llegar a la obtención de jarabes con alto contenido en fructosa (de 55 y hasta 90% (p/v) de fructosa) que sean capaces de competir con los jarabes de maíz altos en fructosa existentes en el mercado.
2. Realizar un estudio que permita evaluar las ventajas y desventajas de utilizar jugo de caña como materia prima para la obtención de jarabes altos en fructosa, sobre el uso de almidón de maíz como materia prima.
3. Realizar un estudio en el que se evalúe principalmente el ahorro de energía para la cristalización de la sacarosa, el cual es un paso que se eliminaría en el caso de que la elaboración de estos jarabes fructosados a partir del jugo de caña sea viable.
4. Llevar a cabo una evaluación sensorial que permita comparar los jarabes altos en fructosa obtenidos a partir de jugo de caña con los jarabes de maíz altos en fructosa, con la finalidad de estudiar la aceptación de los primeros, por la posible interferencia de los productos químicos empleados en la percepción del sabor.

## 7.0 BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. "Manual de los derivados de la caña de azúcar", Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Colección GEPLACEA, Serie Diversificación, México 1988. Pp. 3-31.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Horwitz, W., Editor. 13a edición. Washington, D.C., EEUUA. 1995.
- Baduf-Dergal, S. "Hidratos de Carbono" en Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana, 3ª edición. México 1993. Pp. 379-385.
- Bautista-Zúñiga, F., Durán-de-Bazúa, M. C., Reina-Trujillo, T. And Villers-Ruiz, L. "AgroIndustrial organic residues, handling options in canesugar processing plants". Sugar y Azúcar 95 (6). Pp. 34-42. 2000.
- Birch, G. G. y Parker, K. J. "Sugar: Science and Technology", Applied Science Publishers Ltd, Londres, Inglaterra 1979. Pp. 354-357.
- Bradbury, A. "Gas chromatography of food carbohydrates in food", en Gas chromatography in food analysis. Butterworths, Londres, 1976.
- Castillo-Guajardo, H. "Estudio sobre la caracterización de sacáridos en mieles incristalizables de ingenios azucareros de caña de azúcar". Tesis de licenciatura, UNAM. Facultad de Química. México D.F. México, 1996.
- Castillo-Guajardo, H., Severiano-Pérez, P., Ramírez-Burgos, L. y Durán-de-Bazúa, M. C. "Validación de las metodologías analíticas para la medición de sacarosa en mieles incristalizables de ingenios azucareros usando dos tipos de polarímetro y un cromatógrafo de líquidos de alta resolución". Intl. Sugar J. 102(1223):612-616. 2000.
- Castillo-Urueta, P., García Gómez, R. y Durán-de-Bazúa, M. C. "El consumo de fructosa: riesgos para la salud y la economía". Ciencia. 54(2): 77 - 84. 2003.
- Castillo-Urueta, P., García Gómez, R. y Durán-de-Bazúa, M. C. "Salud pública y dieta, efecto de la fructosa obtenida de la hidrólisis de almidones de maíz amarillo". Asociación de Técnicos Azucareros de México. 10 (1): 4 - 12. 2003.
- Fennema, O. "Química de los alimentos". Ed. Acribia. Madrid, España, 1993. Pp. 102-106.
- García-Chávez, L. R. "La agroindustria azucarera de México en el marco de la apertura". Rev. Comercio Exterior (México), 12(Diciembre):2,5-8, 23-31. 1997.

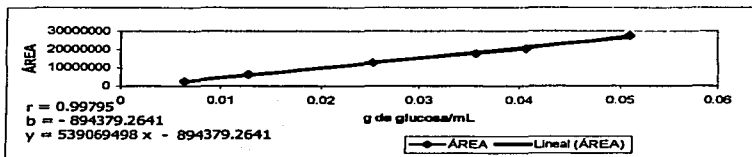
- Guillén-Villegas, R., Solís-Fuentes, J.A. y Durán-de-Bazúa, M. C. "Color removal in sugarcane juice using DEAE-bagasse: A surface response analysis. Remoción de color del jugo de caña con bagazo-DEAE, un análisis de superficie de respuesta". Intl. Sugar J. 104(1239):97-107,108-117. 2002.
- Hernández, J., Redes Internacionales. (Fecha: 5 Noviembre de 2001) <http://136.142.158.105/2000PDF/Hernandez&Barajas.PDF>
- Honig, P. "Principios de Tecnología azucarera". Volumen I. Ed. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, Holanda, 1969. Pp. 29-39, 89-105.
- Honig, P. "Principios de Tecnología azucarera". Volumen II. Ed. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, Holanda, 1969. Pp. 164-171.
- Honig, P. "Principios de Tecnología azucarera". Volumen III. Ed. Elsevier Pub. Co. Amsterdam, Holanda, 1969. Pp. 103-106.
- Hul, Y. H. "Encyclopedia of Food Science and Technology". Volumen 4. Ed. John Wiley & Sons. Inc. Nueva York, EEUUA, 1991. Pp. 4497-4503.
- Inglett, G. E. "Simposium: Sweeteners", The AVI Publishing Company Inc. Westport, EEUUA, 1974. Pp. 87-95.
- Kir, R., Sawyer, R. y Egan, H. "Composición y análisis de alimentos de Pearson". Ed. CECSA. Tercera edición, México D.F. México, 2000. Pp. 232-235.
- Macrae, R. "Encyclopaedia of Food Science, Food technology and Nutrition", Ed. Academic Press. Londres, Gran Bretaña, 1993. Pp. 2495-2502.
- O'Brien, N. L. y Gelardi, R. C. "Alternative Sweeteners", Ed. Marcel Dekker Inc. 2a. Ed., Nueva York, EEUUA, 1991. Pp. 247-258.
- Pancoast, H.M. y Junk, W.R. "Handbook of sugars for processors, chemists and technologists". Ed. The AVI Publishing Company Inc. Westport, EEUUA, 1973. Pp. 19-180, 256-308.
- Sánchez-de-Cima, F. "Alta fructosa versus azúcar de caña". En Suplemento comercial de la CNIIAyA (México), (Mayo):14. 1997.
- Scott, F. W. "HPLC Determination of Carbohydrates in Foods". En Food Analysis by HPLC. Leo M. L., Ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EEUUA, 1992. Pp. 259-273.
- Severiano-Pérez, P. "Dextranas, extracción e identificación a partir de mieles incristalizables". Tesis de licenciatura, UNAM. Facultad de Química. México D.F. México, 1997.

- Sigma-Aldrich®. Enzymatic assay of INVERTASE, EC 3.2.1.26, Servicio al cliente. México D.F. México, 2001.
- Skoog, D. A. "Análisis Instrumental". Ed. Mc Graw Hill. 4ª edición, Madrid, España, 1994. Pp. 730-746.
- Snyder, L. "Introduction to modern liquid chromatography". Ed. John Wiley & Sons. Nueva York, EEUUA, 1976. Pp. 126-130.
- Spencer, G. y Meade, P. "Manual del azúcar de caña", Ed. Montaner y Simón, Madrid, España, 1967. Pp. 13-40.
- Whalley, H. C. "Métodos ICUMSA de análisis de azúcar", Ed. CECSA. México D.F. México, 1971. Pp. 138-164.

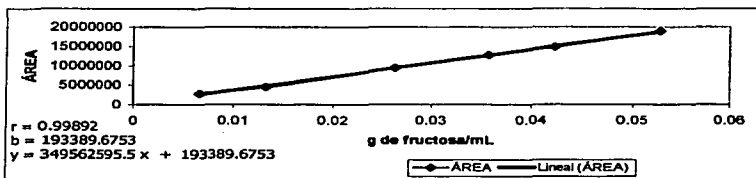
## 8.0 ANEXOS

## 8.1 ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS PARA GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

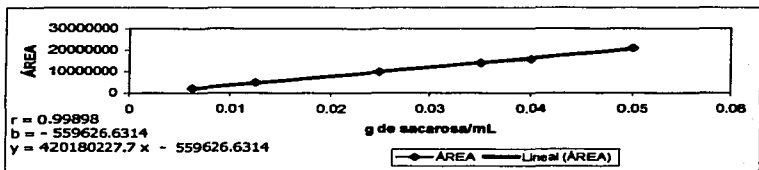
Las Figuras 8.1 a 8.3 muestran las curvas de calibración obtenidas del CLAR.



**FIGURA 8.1**  
CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA OBTENIDA POR CLAR



**FIGURA 8.2**  
CURVA DE CALIBRACIÓN DE FRUCTOSA OBTENIDA POR CLAR



**FIGURA 8.3**  
CURVA DE CALIBRACIÓN DE SACAROSA OBTENIDA POR CLAR

**8.2 ANEXO 2: DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS****8.2.1 DATOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN\***

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

**TABLA 8.1**CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA  
OBTENIDA POR CLAR\*

CONCENTRACIÓN (g de Glucosa/mL)	ÁREA
0.05091	27449642.85
0.04073	20399978.33
0.03564	17756570.37
0.02545	12658674.49
0.01273	6324364
0.006363	2669032.671

**TABLA 8.2**CURVA DE CALIBRACIÓN DE FRUCTOSA  
OBTENIDA POR CLAR\*

CONCENTRACIÓN (g de Fructosa/mL)	ÁREA
0.052835	18980732.35
0.04227	14856684.7
0.03564	12807036.6
0.026415	9461981.2
0.01321	4536471.175
0.006604	2851084.5

**TABLA 8.3**CURVA DE CALIBRACIÓN DE SACAROSA  
OBTENIDA POR CLAR\*

CONCENTRACIÓN (g de Sacarosa/mL)	ÁREA
0.050001	20914544
0.040001	15774853
0.035	14039541
0.025	9817167
0.0125	4870444
0.00625	2131945

\*CLAR: CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

## 8.2.2 CLARIFICACIÓN DE JUGO DE CAÑA CON ETANOL

**TABLA 8.4**  
DATOS OBTENIDOS PARA MEDICIONES TURBIDIMÉTRICAS

VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA			% DE ETANOL	D.O. PROMEDIO	DESV. ESTR.
REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3			
0.481	0.564	0.542	0	0.529000000	0.043000000
0.24	0.241	0.231	20	0.237333333	0.00550757
0.104	0.109	0.122	40	0.111666667	0.00929157
0.056	0.052	0.058	50	0.055333333	0.00305505
0.037	0.038	0.051	60	0.042000000	0.00781025
0.034	0.031	0.026	70	0.030333333	0.00404145
0.024	0.038	0.026	80	0.029333333	0.00757188
0.013	0.017	0.014	90	0.014666667	0.00208167
0.014	0.016	0.017	100	0.015666667	0.00152753

**TABLA 8.5**  
DATOS OBTENIDOS PARA MEDICIONES GRAVIMÉTRICAS

GRAMOS DE MATERIAL PRECIPITADO DE PM MAYOR A 10 kd			% DE ETANOL	PROMEDIO	DESV. ESTR.
REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3			
0.0703	0.0669	0.0769	100	0.07136667	0.00508462
0.0553	0.0633	0.0567	90	0.05843333	0.00427239
0.0426	0.0559	0.0478	80	0.04876667	0.00670249
0.0448	0.046	0.0499	70	0.0469	0.00266646
0.0354	0.0332	0.0281	60	0.03223333	0.00374477
0.0292	0.0304	0.0308	50	0.03013333	0.00083267
0.0271	0.03	0.0286	40	0.02856667	0.00145029
0.0273	0.0285	0.0272	20	0.02766667	0.00072342
0.0208	0.0265	0.0226	0	0.0233	0.00291376

## 8.2.3 HIDRÓLISIS QUÍMICA

### 8.2.3.1 Hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa

En las tablas 8.6, 8.10 y 8.11, se muestran los resultados promedio obtenidos de la reacción de hidrólisis química en estándares de sacarosa con ácido sulfúrico al 49, 90 y 98% respectivamente.



**TABLA 8.6**  
**HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA**  
**(Ácido sulfúrico 49%)\***

TIEMPO (MINUTOS)	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.00000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	0.00000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	21.956333 <sup>δ</sup> ± 0.5631
0.5	3.247500 <sup>δ</sup> ± 0.4547	4.137100 <sup>δ</sup> ± 0.5632	18.079267 <sup>δ</sup> ± 0.6789
1	5.221067 <sup>δ</sup> ± 0.4112	6.025267 <sup>δ</sup> ± 0.2186	14.109540 <sup>δ</sup> ± 0.6132
2	9.084267 <sup>δ</sup> ± 0.4500	9.893433 <sup>δ</sup> ± 0.3209	4.719633 <sup>δ</sup> ± 0.7138
3	10.092767 <sup>δ</sup> ± 0.4850	11.327433 <sup>δ</sup> ± 0.6195	2.596800 <sup>δ</sup> ± 0.4543
4	11.053567 <sup>δ</sup> ± 0.1727	11.732267 <sup>δ</sup> ± 0.3775	1.217900 <sup>δ</sup> ± 0.3632
5	11.297233 <sup>δ</sup> ± 0.2076	12.086633 <sup>δ</sup> ± 0.7419	1.078633 <sup>δ</sup> ± 0.1247
6	11.297233 <sup>δ</sup> ± 0.2076	12.086633 <sup>δ</sup> ± 0.7419	1.078633 <sup>δ</sup> ± 0.1247
8	11.297233 <sup>δ</sup> ± 0.2076	12.086633 <sup>δ</sup> ± 0.7419	1.078633 <sup>δ</sup> ± 0.1247
10	11.297233 <sup>δ</sup> ± 0.2076	12.086633 <sup>δ</sup> ± 0.7419	1.078633 <sup>δ</sup> ± 0.1247

\* Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

En las siguientes Tablas ( 8.7 a 8.9), se muestra un ejemplo de los datos obtenidos para la hidrólisis con ácido sulfúrico al 49% (las cuales también se obtuvieron para las hidrólisis con ácido sulfúrico al 90 y 98%)

**TABLA 8.7**  
**HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA**  
**(Ácido sulfúrico 48%) VALORES PARA FRUCTOSA**

TIEMPO (MINUTOS)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. ESTR.
STD. A 60°C	0	0	0	0	0
0.5	2.8756	3.1125	3.7544	3.2475	0.454687926
1	4.8655	5.1264	5.6713	5.221066667	0.411156592
2	8.6151	9.5123	9.1254	9.084266667	0.450012137
3	9.6954	10.6345	9.9484	10.09276667	0.485909975
4	10.8913	11.2351	11.0343	11.05356667	0.172707884
5	11.1584	11.1972	11.5361	11.29723333	0.207772287
6	11.1584	11.1972	11.5361	11.29723333	0.207772287
8	11.1584	11.1972	11.5361	11.29723333	0.207772287
10	11.1584	11.1972	11.5361	11.29723333	0.207772287

**TABLA 8.8**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA  
(Ácido sulfúrico 49%) VALORES PARA GLUCOSA

TIEMPO (MINUTOS)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. ESTR.
STD. A 60°C	0	0	0	0	0
0.5	3.4548	4.1354	4.8211	4.1371	0.683151586
1	5.7992	6.0411	6.2355	6.025266667	0.218580519
2	9.6412	9.7845	10.2546	9.893433333	0.320881198
3	10.6542	11.8735	11.4546	11.32743333	0.619517266
4	11.5646	11.4676	12.1646	11.73226667	0.377539843
5	12.4535	12.5736	11.2328	12.08663333	0.741875679
6	12.4535	12.5736	11.2328	12.08663333	0.741875679
8	12.4535	12.5736	11.2328	12.08663333	0.741875679
10	12.4535	12.5736	11.2328	12.08663333	0.741875679

**TABLA 8.9**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA  
(Ácido sulfúrico 49%) VALORES PARA SACAROSA

TIEMPO (MINUTOS)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. ESTR.
STD. A 60°C	22.0704	21.3449	22.4537	21.95633333	0.563132101
0.5	17.1639	18.1574	18.9165	18.07926667	0.878908586
1	13.2365	14.2467	14.84542	14.10954	0.813182354
2	4.3615	4.2558	5.5416	4.719633333	0.713803211
3	2.1597	2.5465	3.0842	2.5968	0.464297997
4	0.8216	1.5864	1.2457	1.2179	0.383157135
5	0.9467	1.1945	1.0947	1.078633333	0.124678841
6	0.9467	1.1945	1.0947	1.078633333	0.124678841
8	0.9467	1.1945	1.0947	1.078633333	0.124678841
10	0.9467	1.1945	1.0947	1.078633333	0.124678841

**TABLA 8.10**  
HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA  
(Ácido sulfúrico 90%)\*

TIEMPO (MINUTOS)	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	21.956333 <sup>δ</sup> ± 0.5631
0.5	2.420967 <sup>δ</sup> ± 0.3280	3.388667 <sup>δ</sup> ± 0.7300	15.899567 <sup>δ</sup> ± 0.6763
1	7.080433 <sup>δ</sup> ± 0.3651	7.244033 <sup>δ</sup> ± 0.4805	7.090767 <sup>δ</sup> ± 0.2672
2	8.445833 <sup>δ</sup> ± 0.7862	8.914467 <sup>δ</sup> ± 0.4257	5.273367 <sup>δ</sup> ± 0.4231
3	10.247267 <sup>δ</sup> ± 0.3631	9.973667 <sup>δ</sup> ± 0.1339	3.586733 <sup>δ</sup> ± 0.5883
4	10.340367 <sup>δ</sup> ± 0.2433	10.873433 <sup>δ</sup> ± 0.3154	2.557833 <sup>δ</sup> ± 0.4240
5	11.191233 <sup>δ</sup> ± 0.2715	11.485200 <sup>δ</sup> ± 0.4888	1.124200 <sup>δ</sup> ± 0.2865
6	11.191233 <sup>δ</sup> ± 0.2715	11.485200 <sup>δ</sup> ± 0.4888	1.124200 <sup>δ</sup> ± 0.2865
8	11.191233 <sup>δ</sup> ± 0.2715	11.485200 <sup>δ</sup> ± 0.4888	1.124200 <sup>δ</sup> ± 0.2865
10	11.191233 <sup>δ</sup> ± 0.2715	11.485200 <sup>δ</sup> ± 0.4888	1.124200 <sup>δ</sup> ± 0.2865

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

**TABLA 8.11**  
**HIDRÓLISIS QUÍMICA EN ESTÁNDARES DE SACAROSA**  
 (Ácido sulfúrico 98%)\*

TIEMPO (MINUTOS)	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	21.956333 <sup>δ</sup> ± 0.5631
0.5	5.360767 <sup>δ</sup> ± 0.5963	6.602967 <sup>δ</sup> ± 0.5967	13.765033 <sup>δ</sup> ± 0.3795
1	8.876233 <sup>δ</sup> ± 0.5304	9.366367 <sup>δ</sup> ± 0.6125	6.483133 <sup>δ</sup> ± 0.5174
2	10.114500 <sup>δ</sup> ± 0.5597	10.657867 <sup>δ</sup> ± 0.3622	2.109367 <sup>δ</sup> ± 0.3375
3	10.240767 <sup>δ</sup> ± 0.8092	10.942400 <sup>δ</sup> ± 0.8758	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717
4	11.503500 <sup>δ</sup> ± 0.3162	11.779433 <sup>δ</sup> ± 0.6667	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717
5	11.503500 <sup>δ</sup> ± 0.3162	11.779433 <sup>δ</sup> ± 0.6667	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717
6	11.503500 <sup>δ</sup> ± 0.3162	11.779433 <sup>δ</sup> ± 0.6667	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717
8	11.503500 <sup>δ</sup> ± 0.3162	11.779433 <sup>δ</sup> ± 0.6667	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717
10	11.503500 <sup>δ</sup> ± 0.3162	11.779433 <sup>δ</sup> ± 0.6667	1.135033 <sup>δ</sup> ± 0.1717

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

## 8.2.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

### 8.2.4.1 Hidrólisis enzimática en soluciones estándar de sacarosa

En las Tablas 8.12, 8.16 y 8.17, se muestran los resultados promedio obtenidos de la reacción de hidrólisis enzimática en estándares de sacarosa con la enzima invertasa usando las relaciones E/S = 0.84, 1.68 y 3.36 respectivamente.

**TABLA 8.12**  
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA**  
 (Relación E/S = 0.84%)\*

TIEMPO (MIN)	[FRUCTOSA] g/100 mL	[GLUCOSA] g/100 mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	0.000000 <sup>δ</sup> ± 0.0000	22.060950 <sup>δ</sup> ± 0.0000
0.5	1.361955 <sup>δ</sup> ± 0.2692	2.101934 <sup>δ</sup> ± 0.0732	19.733381 <sup>δ</sup> ± 0.2121
1	2.724141 <sup>δ</sup> ± 0.5380	4.203869 <sup>δ</sup> ± 0.1464	17.405863 <sup>δ</sup> ± 0.4242
1.1666	3.178241 <sup>δ</sup> ± 0.6280	4.904266 <sup>δ</sup> ± 0.1708	16.630580 <sup>δ</sup> ± 0.4948
2	5.345707 <sup>δ</sup> ± 0.2355	7.496669 <sup>δ</sup> ± 0.1187	13.059601 <sup>δ</sup> ± 0.3220
2.5	6.646298 <sup>δ</sup> ± 0.2174	9.052351 <sup>δ</sup> ± 0.1212	10.918115 <sup>δ</sup> ± 0.3411
3	7.198389 <sup>δ</sup> ± 0.1845	9.469378 <sup>δ</sup> ± 0.2098	9.171222 <sup>δ</sup> ± 0.3194
4	8.302706 <sup>δ</sup> ± 0.4392	10.304360 <sup>δ</sup> ± 0.4663	5.679383 <sup>δ</sup> ± 0.2836
5	9.145446 <sup>δ</sup> ± 0.1485	11.056217 <sup>δ</sup> ± 0.3238	4.353117 <sup>δ</sup> ± 0.1956
6	9.988326 <sup>δ</sup> ± 0.7362	11.808574 <sup>δ</sup> ± 0.4358	3.027792 <sup>δ</sup> ± 0.3391
7	10.954082 <sup>δ</sup> ± 0.3568	13.214377 <sup>δ</sup> ± 0.5705	2.293246 <sup>δ</sup> ± 0.0503
8.5	11.647588 <sup>δ</sup> ± 0.1543	13.435658 <sup>δ</sup> ± 0.5051	2.140713 <sup>δ</sup> ± 0.1197
10	11.647588 <sup>δ</sup> ± 0.1543	13.435658 <sup>δ</sup> ± 0.5051	2.140713 <sup>δ</sup> ± 0.1197

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

En las siguientes Tablas (8.13 a 8.15), se muestra un ejemplo de los datos obtenidos para la relación E/S = 0.84% (las cuales también se obtuvieron para las relaciones E/S 1.68 y 3.36%)

**TABLA 8.13**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA FUCAROSA

TIEMPO (MIN)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. STD.
STD. A 60°C	0	0	0	0	0
0.5	1.095062575	1.63337905	1.357422399	1.361954675	0.269186855
1	2.190853763	3.2667581	2.714812275	2.724141379	0.538012834
1.1666	2.555857523	3.811727018	3.167137942	3.178240828	0.628008362
2	5.228142688	5.616816649	5.192160747	5.345706695	0.235476391
2.5	6.831953477	6.699800321	6.40713956	6.646297786	0.217401948
3	7.185833333	7.388833333	7.0205	7.198388889	0.184487378
4	7.893794202	8.766927094	8.2473965	8.302705932	0.439186306
5	9.286045	8.990142	9.16015	9.145445667	0.148498517
6	10.67839591	9.213384473	10.07319622	9.988325534	0.736184014
7	10.96657262	10.59120122	11.30447308	10.95408231	0.356799931
8.5	11.79969895	11.65183873	11.49122672	11.64758813	0.154280035
10	11.79969895	11.65183873	11.49122672	11.64758813	0.154280035

**TABLA 8.14**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA GLUCOSA

TIEMPO (MIN)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. STD.
STD. A 60°C	0	0	0	0	0
0.5	2.057303274	2.186439225	2.062060689	2.101934396	0.073221977
1	4.114606549	4.37287845	4.124121378	4.203868792	0.146443953
1.1666	4.8001197	5.101431127	4.811247396	4.904266074	0.170840569
2	7.504493625	7.611236961	7.374276886	7.496669157	0.118673653
2.5	9.127320568	9.117264351	8.91246733	9.05235075	0.121246898
3	9.441666667	9.691666667	9.2748	9.469377778	0.209810352
4	10.07132167	10.8412851	10.0004732	10.30435999	0.466338191
5	10.704	11.34095	11.1237	11.05621667	0.323792875
6	11.33742224	11.84098106	12.24731969	11.80857433	0.455813545
7	12.58240754	13.36932686	13.69139713	13.21437717	0.57050112
8.5	12.96807767	13.36757272	13.97132447	13.43565829	0.505076996
10	12.96807767	13.36757272	13.97132447	13.43565829	0.505076996

**TABLA 8.15**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(Relación E/S = 0.84%) VALORES PARA SACAROSA

TIEMPO (MIN)	HIDRÓLISIS A	HIDRÓLISIS B	HIDRÓLISIS C	PROMEDIO	DESV. STD.
STD. A 60°C	22.06095029	22.06095029	22.06095029	22.06095029	0
0.5	19.48851015	19.85967422	19.85195949	19.73338129	0.212099704
1	16.9161203	17.65844843	17.64301898	17.40586257	0.424199405
1.1666	16.05930752	16.92511362	16.9073179	16.63057968	0.494816211
2	12.76515119	13.00863252	13.40501995	13.05960122	0.322964958
2.5	10.78969857	10.65990726	11.30473994	10.91811526	0.341057811
3	9.08	8.90733333	9.52633333	9.17122222	0.319423496
4	5.662376191	5.404449619	5.971324508	5.679383439	0.283819872
5	4.15635	4.3555	4.5475	4.353116667	0.195585891
6	2.650741746	3.307895679	3.124739688	3.027792371	0.339134058
7	2.264265537	2.264102694	2.351369132	2.293245788	0.050336359
8.5	2.163623038	2.011208247	2.247308242	2.140713176	0.119705673
10	2.163623038	2.011208247	2.247308242	2.140713176	0.119705673

**TABLA 8.16**  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA  
(Relación E/S = 1.68%)\*

TIEMPO (MIN)	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.000000 <sup>δ ± 0.0000</sup>	0.000000 <sup>δ ± 0.0000</sup>	22.060950 <sup>δ ± 0.0000</sup>
0.5	2.113691 <sup>δ ± 0.4972</sup>	4.850243 <sup>δ ± 0.6051</sup>	14.492646 <sup>δ ± 0.3023</sup>
1	4.329654 <sup>δ ± 0.2214</sup>	6.030435 <sup>δ ± 0.6853</sup>	10.806132 <sup>δ ± 0.3037</sup>
2	5.567681 <sup>δ ± 0.4907</sup>	8.340494 <sup>δ ± 0.3155</sup>	5.043161 <sup>δ ± 0.7184</sup>
3	8.324438 <sup>δ ± 0.3806</sup>	10.049004 <sup>δ ± 0.1186</sup>	3.601097 <sup>δ ± 0.7442</sup>
4	9.656294 <sup>δ ± 0.1987</sup>	10.926588 <sup>δ ± 0.5923</sup>	2.807329 <sup>δ ± 0.6069</sup>
5	11.137434 <sup>δ ± 0.3144</sup>	12.957281 <sup>δ ± 0.6833</sup>	2.366489 <sup>δ ± 0.4403</sup>
6	11.137434 <sup>δ ± 0.3144</sup>	12.984050 <sup>δ ± 0.6618</sup>	2.366489 <sup>δ ± 0.4403</sup>
7	11.137434 <sup>δ ± 0.3144</sup>	12.984050 <sup>δ ± 0.6618</sup>	2.366489 <sup>δ ± 0.4403</sup>
8.5	11.137434 <sup>δ ± 0.3144</sup>	12.984050 <sup>δ ± 0.6618</sup>	2.366489 <sup>δ ± 0.4403</sup>
10	11.137434 <sup>δ ± 0.3144</sup>	12.984050 <sup>δ ± 0.6618</sup>	2.366489 <sup>δ ± 0.4403</sup>

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

**TABLA 8.17**  
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ESTÁNDAR DE SACAROSA**  
 (Relación E/S = 3.36%)\*

TIEMPO (MIN)	[FRUCTOSA] g/100mL	[GLUCOSA] g/100mL	[SACAROSA] g/100 mL
0	0.000000 <sup>δ ± 0.0000</sup>	0.000000 <sup>δ ± 0.0000</sup>	22.060950 <sup>δ ± 0.0000</sup>
0.5	3.640225 <sup>δ ± 0.6186</sup>	5.991497 <sup>δ ± 0.6156</sup>	7.567264 <sup>δ ± 0.7623</sup>
1	4.384773 <sup>δ ± 0.6033</sup>	6.966446 <sup>δ ± 0.6478</sup>	5.817266 <sup>δ ± 0.4277</sup>
1.5	7.932578 <sup>δ ± 0.9106</sup>	8.900699 <sup>δ ± 0.8906</sup>	3.904695 <sup>δ ± 0.7688</sup>
2	9.612521 <sup>δ ± 0.6165</sup>	11.683603 <sup>δ ± 0.5749</sup>	3.229456 <sup>δ ± 0.4720</sup>
2.5	10.075626 <sup>δ ± 0.3591</sup>	12.412420 <sup>δ ± 0.6568</sup>	2.711692 <sup>δ ± 0.6326</sup>
3	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
4	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
5	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
6	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
7	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
8.5	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>
10	11.533108 <sup>δ ± 0.8936</sup>	13.097681 <sup>δ ± 0.1351</sup>	2.371223 <sup>δ ± 0.4366</sup>

\*Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones

### 8.3 ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS [Utilizando el programa Statistic Program Social Science (SPSS)]

#### 8.3.1 Análisis estadístico de la clarificación de jugo de caña con etanol (mediciones turbidimétricas)

```

SET/PRINTER ON.
TITLE 'CLARIFICACION'.
SUBTITLE 'ETANOL'.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.
FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'JUGO DE CAÑA '
                V2 '% DE ETANOL'
                V3 'REPETICIONES '
                V4 'DENSIDAD ÓPTICA'.

VALUE LABELS V1 '1/'
              V2 1 '99.90' 2 '90' 3 '80' 4 '70' 5 '60' 6 '50' 7 '40' 8 '20' 9 '0'/
              V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA.                                1 05 3 0.051
1 01 1 0.014                                1 06 1 0.056
1 01 2 0.016                                1 06 2 0.052
1 01 3 0.017                                1 06 3 0.058
1 02 1 0.013                                1 07 1 0.104
1 02 2 0.017                                1 07 2 0.109
1 02 3 0.014                                1 07 3 0.122
1 03 1 0.024                                1 08 1 0.240
1 03 2 0.038                                1 08 2 0.241
1 03 3 0.026                                1 08 3 0.231
1 04 1 0.034                                1 09 1 0.481
1 04 2 0.031                                1 09 2 0.564
1 04 3 0.026                                1 09 3 0.542
1 05 1 0.037                                END DATA.
1 05 2 0.038                                LIST

```

```

ONEWAY V4 BY V2 (1,09)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/
RANGES DUNCAN (0.05).
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).
ANOVA V4 BY V2 (1,09) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.
SET PRINTER OFF.

```

Number of cases read: 27    Number of cases listed: 27

**ONEWAY  
DESCRIPTIVES  
DENSIDAD ÓPTICA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between- Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
99.90	3	1.5667E-02	1.5275E-03	8.8192E-04	1.1872E-02	1.9461E-02	.014	.017	
90	3	1.4667E-02	2.0817E-03	1.2019E-03	9.4955E-03	1.9838E-02	.013	.017	
80	3	2.9333E-02	7.5719E-03	4.3716E-03	1.0524E-02	4.8143E-02	.024	.038	
70	3	3.0333E-02	4.0415E-03	2.3333E-03	2.0294E-02	4.0373E-02	.026	.034	
60	3	4.2000E-02	7.8102E-03	4.5092E-03	2.2598E-02	6.1402E-02	.037	.051	
50	3	5.5333E-02	3.0551E-03	1.7638E-03	4.7744E-02	6.2922E-02	.052	.058	
40	3	.11167	9.2916E-03	5.3645E-03	8.8585E-02	.13475	.104	.122	
20	3	.23733	5.5076E-03	3.1798E-03	.22365	.25101	.231	.241	
0	3	.52900	4.3000E-02	2.4826E-02	.42218	.63582	.481	.564	
Total	27	.11837	.16326	3.1420E-02	5.3785E-02	.18296	.013	.564	
Model	Fixed Effects		1.5335E-02	2.9511E-03	.11217	.12457			
	Random Effects			5.6470E-02	-1.18503E-02	.24859			2.8622E-02

**ANOVA  
DENSIDAD ÓPTICA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.689	8	8.610E-02	366.153	.000
Within Groups	4.233E-03	18	2.351E-04		
Total	.693	26			



**DUNCAN\***

N Subset for alpha = 0.05					
% DE ETANOL	1	2	3	4	5
90 3	1.4667E-02				
99.90 3	1.5667E-02				
80 3	2.9333E-02	2.9333E-02			
70 3	3.0333E-02	3.0333E-02			
60 3	4.2000E-02	4.2000E-02			
50 3		5.5333E-02			
40 3			.11167		
20 3				.23733	
0 3					.52900
Sig.	.063	.071	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.676E-04	2	3.338E-04	.012	.989
Within Groups	.692	24	2.885E-02		
Total	.693	26			

### 8.3.2 Análisis estadístico de la clarificación de jugo de caña con etanol (mediciones gravimétricas)

SET/PRINTER ON.  
 TITLE 'CLARIFICACION'.  
 SUBTITLE 'ETANOL'.  
 DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.  
 FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'JUGO DE CAÑA '  
 V2 '% DE ETANOL '  
 V3 'REPETICIONES '  
 V4 'GPPM>10KD'.

VALUE LABELS V1 '1'  
 V2 1 '99.90' 2 '90' 3 '80' 4 '70' 5 '60' 6 '50' 7 '40' 8 '20' 9 '0'  
 V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA.	1 03 2 0.056	1 06 1 0.029	1 08 3 0.027
1 01 1 0.070	1 03 3 0.048	1 06 2 0.030	1 09 1 0.021
1 01 2 0.067	1 04 1 0.045	1 06 3 0.031	1 09 2 0.026
1 01 3 0.077	1 04 2 0.046	1 07 1 0.027	1 09 3 0.023
1 02 1 0.055	1 04 3 0.050	1 07 2 0.030	END DATA.
1 02 2 0.063	1 05 1 0.035	1 07 3 0.029	LIST.
1 02 3 0.057	1 05 2 0.033	1 08 1 0.027	
1 03 1 0.043	1 05 3 0.028	1 08 2 0.028	

ONEWAY V4 BY V2 (1,09)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/  
RANGES DUNCAN (0.05).  
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).  
ANOVA V4 BY V2 (1,09) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.  
SET PRINTER OFF.

Number of cases read: 27 Number of cases listed: 27

**ONEWAY  
DESCRIPTIVES  
GRAMOS DE MATERIAL PRECIPITADO >10 Kd**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
99.90	3	7.1333E-02	5.1316E-03	2.9627E-03	5.8586E-02	8.4081E-02	.067	.077	
90	3	5.8333E-02	4.1633E-03	2.4037E-03	4.7991E-02	6.8676E-02	.055	.063	
80	3	4.9000E-02	6.5574E-03	3.7859E-03	3.2710E-02	6.5290E-02	.043	.056	
70	3	4.7000E-02	2.6458E-03	1.5275E-03	4.0428E-02	5.3572E-02	.045	.050	
60	3	3.2000E-02	3.6056E-03	2.0817E-03	2.3043E-02	4.0957E-02	.028	.035	
50	3	3.0000E-02	1.0000E-03	5.7735E-04	2.7516E-02	3.2484E-02	.029	.031	
40	3	2.8667E-02	1.5275E-03	8.8192E-04	2.4872E-02	3.2461E-02	.027	.030	
20	3	2.7333E-02	5.7735E-04	3.3333E-04	2.5899E-02	2.8768E-02	.027	.028	
0	3	2.3333E-02	2.5166E-03	1.4530E-03	1.7082E-02	2.9585E-02	.021	.026	
Total	27	4.0778E-02	1.6116E-02	3.1015E-03	3.4403E-02	4.7153E-02	.021	.077	
Model	Fixed Effects		3.6004E-03	6.9290E-04	3.9322E-02	4.2234E-02			
	Random Effects			5.4938E-03	2.8109E-02	5.3447E-02			2.6732E-04

**ANOVA**  
**GRAMOS DE MATERIAL PRECIPITADO >10 Kd**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.519E-03	8	8.149E-04	62.865	.000
Within Groups	2.333E-04	18	1.296E-05		
Total	6.753E-03	26			

**DUNCAN<sup>a</sup>**

% DE ETANOL	N Subset for alpha = 0.05					
	1	2	3	4	5	
0	3	2.3333E-02				
20	3	2.7333E-02	2.7333E-02			
40	3	2.8667E-02	2.8667E-02			
50	3	3.0000E-02	3.0000E-02			
60	3	3.2000E-02				
70	3		4.7000E-02			
80	3		4.9000E-02			
90	3			5.8333E-02		
99.90	3				7.1333E-02	
Sig.		.050	.161	.505	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.200E-05	2	2.100E-05	.075	.928
Within Groups	6.711E-03	24	2.796E-04		
Total	6.753E-03	26			

**8.3.3 Ejemplo del análisis estadístico aplicado para determinar si hay o no diferencia significativa en el uso de ácido sulfúrico al 90% y 98% para la hidrólisis química del estándar de sacarosa [se aplicó el mismo análisis para el uso de ácido sulfúrico 90% y 49%; 49% y 98%]**

```

SET/PRINTER ON.
TITLE 'ÁCIDO SULFÚRICO 98% Y 90%'.
SUBTITLE 'HIDRÓLISIS QUÍMICA'.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.
FORMAT V4 (F5.3).
VARIABLE LABELS V1 'CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO'
                V2 'TIEMPO MINUTOS'
                V3 'REPETICIONES'
                V4 'g FRUCTOSA/100mL'.
VALUE LABELS V1 1 '1' 2 '2'/
              V2 1 '0.5' 2 '1.0' 3 '2.0' 4 '3.0' 5 '4.0' 6 '5.0' 7 '6.0' 8 '8.0'
              9 '10'/
              V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA.
1 01 1 5.139      1 06 1 11.20      2 01 3 2.767      2 06 3 11.49
1 01 2 4.907      1 06 2 11.47      2 02 2 6.976      2 07 1 11.12
1 01 3 6.036      1 06 3 11.83      2 02 3 7.486      2 07 2 10.96
1 02 1 8.419      1 07 1 11.20      2 03 1 8.552      2 07 3 11.49
1 02 2 8.752      1 07 2 11.47      2 03 2 7.608      2 08 1 11.12
1 02 3 9.458      1 07 3 11.83      2 03 3 9.176      2 08 2 10.96
1 03 1 10.33      1 08 1 11.20      2 04 1 10.25      2 08 3 11.49
1 03 2 10.53      1 08 2 11.47      2 04 2 10.54      2 09 1 11.12
1 03 3 9.478      1 08 3 11.83      2 04 3 9.943      2 09 2 10.96
1 04 1 9.347      1 09 1 11.20      2 05 1 10.58      2 09 3 11.49
1 04 2 10.45      1 09 2 11.47      2 05 2 10.34      END DATA.
1 04 3 10.92      1 09 3 11.83      2 05 3 10.10      LIST.
1 05 1 11.20      2 01 1 2.113      2 06 1 11.12
1 05 2 11.47      2 01 2 2.382      2 06 2 10.96

ONEWAY V4 BY V1 (1,2)/STATISTICS ALL /.
ONEWAY V4 BY V2 (1,10)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/
RANGES DUNCAN (0.05).
ONEWAY V4 BY V3 (1,3).
ANOVA V4 BY V1 (1,2), V2 (1,10) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.
SET PRINTER OFF.

```

Number of cases read: 54    Number of cases listed: 54

**ONEWAY  
DESCRIPTIVES  
GRAMOS DE FRUCTOSA/100mL**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum	Between- Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound		
1	27	10.23207	2.01021	.38687	9.43686	11.02729	4.907	11.83
2	27	9.25448	2.84399	.54733	8.12944	10.37953	2.113	11.49
Total	54	9.74328	2.48870	.33867	9.06399	10.42256	2.113	11.83
Model			2.46264	.33512	9.07080	10.41575		
Fixed Effects								
Random Effects				.48880	3.53253	15.95402		.25323

**ANOVA  
g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.902	1	12.902	2.127	.151
Within Groups	315.360	52	6.065		
Total	328.262	53			

**ONEWAY  
DESCRIPTIVES  
GRAMOS DE FRUCTOSA/100mL**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum	Between- Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	6	3.89067	1.66688	.68050	2.14138	5.63996	2.113	6.036
1.0	6	7.97817	1.06490	.43474	6.86063	9.09571	6.778	9.458
2.0	6	9.27900	1.09914	.44872	8.12552	10.43248	7.608	10.53
3.0	6	10.24167	.54447	.22228	9.67028	10.81305	9.347	10.92
4.0	6	10.92000	.68314	.27889	10.20309	11.63691	10.10	11.83
5.0	6	11.34500	.31361	.12803	11.01589	11.67411	10.96	11.83
6.0	6	11.34500	.31361	.12803	11.01589	11.67411	10.96	11.83
8.0	6	11.34500	.31361	.12803	11.01589	11.67411	10.96	11.83
10	6	11.34500	.31361	.12803	11.01589	11.67411	10.96	11.83
Total	54	9.74328	2.48870	.33867	9.06399	10.42256	2.113	11.83
Model			.83514	.11365	9.51438	9.97218		
Fixed Effects								
Random Effects				.82898	7.83164	11.65491		6.06668

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	296.876	8	37.110	53.207	.000
Within Groups	31.386	45	.697		
Total	328.262	53			

**g FRUCTOSA/100mL**  
**DUNCAN**

TIEMPO MINUTOS	N Subset for alpha = 0.05				
	1	2	3	4	5
0.5 /6	3.89067				
1.0 /6		7.97817			
2.0 /6			9.27900		
3.0 /6			10.24167	10.24167	
4.0 /6				10.92000	10.92000
5.0 /6					11.34500
6.0 /6					11.34500
8.0 /6					11.34500
10 /6					11.34500
Sig.	1.000	1.000	.052	.166	.441

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.242	2	1.121	.175	.840
Within Groups	326.020	51	6.393		
Total	328.262	53			

**8.3.4 Análisis estadístico de la hidrólisis química en soluciones estándar de sacarosa con ácido sulfúrico con 90% de pureza para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis.**

SET/PRINTER ON.  
TITLE 'HIDRÓLISIS QUÍMICA'.  
SUBTITLE 'ÁCIDO SULFÚRICO 90%'.  
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.  
FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'CONCENTRACION DE ACIDO SULFURICO'  
 V2 'TIEMPO MINUTOS'  
 V3 'REPETICIONES'  
 V4 'g FRUCTOSA/100 mL'

VALUE LABELS V1 1 '1/  
 V2 1 '0.5' 2 '1.0' 3 '2.0' 4 '3.0' 5 '4.0' 6 '5.0' 7 '6.0' 8 '8.0' 9 '10/  
 V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA	1 03 2 7.609	1 06 1 11.12	1 08 3 11.49
1 01 1 2.113	1 03 3 9.176	1 06 2 10.96	1 09 1 11.12
1 01 2 2.382	1 04 1 10.25	1 06 3 11.49	1 09 2 10.96
1 01 3 2.767	1 04 2 10.55	1 07 1 11.12	1 09 3 11.49
1 02 1 6.778	1 04 3 9.943	1 07 2 10.96	END DATA.
1 02 2 6.976	1 05 1 10.58	1 07 3 11.49	LIST.
1 02 3 7.486	1 05 2 10.34	1 08 1 11.12	
1 03 1 8.552	1 05 3 10.10	1 08 2 10.96	

ONEWAY V4 BY V2 (1,10)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)  
 RANGES DUNCAN (0.05).  
 ONEWAY V4 BY V3 (1,3).  
 ANOVA V4 BY V2 (1,10) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.  
 SET PRINTER OFF.

**ONEWAY  
 DESCRIPTIVES  
 GRAMOS DE FRUCTOSA/100ml**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	3	2.42067	.32871	.18978	1.60411	3.23723	2.113	2.767
1.0	3	7.08000	.36528	.21089	6.17260	7.98740	6.778	7.486
2.0	3	8.44567	.78889	.45547	6.48595	10.40539	7.609	9.176
3.0	3	10.24767	.30351	.17523	9.49371	11.00162	9.943	10.55
4.0	3	10.34000	.24000	.13856	9.74381	10.93619	10.10	10.58
5.0	3	11.19000	.27185	.15695	10.51470	11.86530	10.96	11.49
6.0	3	11.19000	.27185	.15695	10.51470	11.86530	10.96	11.49
8.0	3	11.19000	.27185	.15695	10.51470	11.86530	10.96	11.49
10	3	11.19000	.27185	.15695	10.51470	11.86530	10.96	11.49
Total	27	9.25489	2.84414	.54736	8.12978	10.37999	2.113	11.49
Model	Fixed Effects		.38139	7.3399E-02	9.10068	9.40909		
	Random Effects			.98060	6.99363	11.51615		8.60567

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	207.700	8	25.962	178.484	.000
Within Groups	2.618	18	.145		
Total	210.318	26			

**g FRUCTOSA/100mL**  
**DUNCAN**

N Subset for alpha = 0.05					
TIEMPO MINUTOS	1	2	3	4	5
0.5 [3]	2.42067				
1.0 [3]		7.08000			
2.0 [3]			8.44567		
3.0 [3]				10.24767	
4.0 [3]				10.34000	
5.0 [3]					11.19000
6.0 [3]					11.19000
8.0 [3]					11.19000
10 [3]					11.19000
Sig.	1.000	1.000	1.000	.770	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.824	2	.412	.047	.954
Within Groups	209.494	24	8.729		
Total	210.318	26			

**8.3.5 Ejemplo del análisis estadístico aplicado para determinar si hay o no diferencia significativa en el uso de la relación E/S = 1.68% y 3.36% para la hidrólisis enzimática de sacarosa con invertasa [se aplicó el mismo análisis para las relaciones E/S = 0.84% y 1.68%; E/S = 0.84% y 3.36%]**

SET/P  
RINTER ON.  
TITLE 'RELACIÓN E/S 3.36% Y 1.68%'.  
SUBTITLE 'INVERTASA'.  
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.  
FORMAT V4 (F5.3).



VARIABLE LABELS V1 'RELACION ENZIMA SUSTRATO '  
 V2 'TIEMPO MINUTOS'  
 V3 'REPETICIONES '  
 V4 'g FRUCTOSA/100mL'.

VALUE LABELS V1 1 '1' 2 '2/'  
 V2 1 '0.5' 2 '1.0' 3 '2.0' 4 '3.0' 5 '4.0' 6 '5.0' 7 '6.0' 8 '7.0'  
 9 '8.5' 10 '10' /  
 V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA.	1 06 1 10.69	2 01 2 1.549	2 06 3 11.50
1 01 1 4.076	1 06 2 11.43	2 01 3 2.307	2 07 1 10.98
1 01 2 2.932	1 06 3 12.47	2 02 1 4.154	2 07 2 10.93
1 01 3 3.912	1 07 1 10.69	2 02 2 4.578	2 07 3 11.50
1 02 1 4.493	1 07 2 11.43	2 02 3 4.257	2 08 1 10.98
1 02 2 3.734	1 07 3 12.47	2 03 1 5.017	2 08 2 10.93
1 02 3 4.926	1 08 1 10.69	2 03 2 5.957	2 08 3 11.50
1 03 1 8.944	1 08 2 11.43	2 03 3 5.729	2 09 1 10.98
1 03 2 9.734	1 08 3 12.47	2 04 1 8.199	2 09 2 10.93
1 03 3 10.16	1 09 1 10.69	2 04 2 8.022	2 09 3 11.50
1 04 1 10.69	1 09 2 11.43	2 04 3 8.751	2 10 1 10.98
1 04 2 11.43	1 09 3 12.47	2 05 1 9.713	2 10 2 10.93
1 04 3 12.47	1 10 1 10.69	2 05 2 9.435	2 10 3 11.50
1 05 1 10.69	1 10 2 11.43	2 05 3 9.820	END DATA.
1 05 2 11.43	1 10 3 12.47	2 06 1 10.98	LIST.
1 05 3 12.47	2 01 1 2.485	2 06 2 10.93	

ONEWAY V4 BY V1 (1,2) /STATISTICS ALL /.  
 ONEWAY V4 BY V2 (1,10) /STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/  
 RANGES DUNCAN (0.05).  
 ONEWAY V4 BY V3 (1,3).  
 ANOVA V4 BY V1 (1,2), V2 (1,10) V3 (1,3) /OPTIONS 3 /.  
 SET PRINTER OFF.

Number of cases read: 60 Number of cases listed: 60

**ONEWAY  
 DESCRIPTIVES  
 GRAMOS DE FRUCTOSA /100mL**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between- Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	50	9.83470	3.09724	.56548	8.67817	10.99123	2.932	12.47	
2	50	8.56743	3.27482	.59790	7.34459	9.79027	1.549	11.50	
Total	60	9.20107	3.22410	.41623	8.36819	10.03394	1.549	12.47	
Model									
Fixed Effects			3.18727	.41147	8.37741	10.02472			
Random Effects				.63363	1.14999	17.25214			.46436

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.089	1	24.089	2.371	.129
Within Groups	589.204	58	10.159		
Total	613.293	59			

**ONEWAY**  
**DESCRIPTIVES**  
**GRAMOS DE FRUCTOSA/100mL**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
0.5	6	2.87683	.97509	.39808	1.85354	3.90013	1.549	4.076	
1.0	6	4.35700	.40754	.16638	3.92932	4.78468	3.734	4.926	
2.0	6	7.59017	2.27092	.92710	5.20699	9.97335	5.017	10.16	
3.0	6	9.92700	1.86043	.75952	7.97460	11.87940	8.022	12.47	
4.0	6	10.59300	1.17864	.48118	9.35609	11.82991	9.435	12.47	
5.0	6	11.33333	.63726	.26016	10.66456	12.00210	10.69	12.47	
6.0	6	11.33333	.63726	.26016	10.66456	12.00210	10.69	12.47	
7.0	6	11.33333	.63726	.26016	10.66456	12.00210	10.69	12.47	
8.5	6	11.33333	.63726	.26016	10.66456	12.00210	10.69	12.47	
10	6	11.33333	.63726	.26016	10.66456	12.00210	10.69	12.47	
Total	60	9.20107	3.22410	.41623	8.36819	10.03394	1.549	12.47	
Model	Fixed Effects		1.14695	.14807	8.90366	9.49847			
	Random Effects			1.00694	6.92322	11.47892			9.91999

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	547.519	9	60.835	46.246	.000
Within Groups	65.774	50	1.315		
Total	613.293	59			

**g FRUCTOSA/100mL  
DUNCAN**

TIEMPO MINUTOS	N Subset for alpha = 0.05			
	1	2	3	4
0.5	6	2.87683		
1.0	6		4.35700	
2.0	6			7.59017
3.0	6			9.92700
4.0	6			10.59300
5.0	6			11.33333
6.0	6			11.33333
7.0	6			11.33333
8.5	6			11.33333
10	6			11.33333
Sig.		1.000	1.000	1.000
				.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

**ANOVA  
g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.835	2	4.417	4.17	.1661
Within Groups	604.458	57	10.605		
Total	613.293	59			

**8.3.6 Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática en estándares de sacarosa a una relación E/S de 3.36% para la determinación del tiempo óptimo de hidrólisis.**

SET/PRINTER ON.  
TITLE 'Relación E/S 3.36%'.  
SUBTITLE 'INVERTASA'.  
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 6 V4 8-12.  
FORMAT V4 (F5.3).

VARIABLE LABELS V1 'RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO '  
V2 'TIEMPO MINUTOS'  
V3 'REPETICIONES '  
V4 'g FRUCTOSA/100 mL'.

## VALUE LABELS V1 1 '1/

V2 1 '0.5' 2 '1.0' 3 '2.0' 4 '3.0' 5 '4.0' 6 '5.0' 7 '6.0' 8 '7.0' 9 '8.5' 10 '10/'

V3 1 'R1' 2 'R2' 3 'R3'.

BEGIN DATA.	1 03 3 10.16	1 06 3 12.47	1 09 3 12.47
1 01 1 4.075	1 04 1 10.69	1 07 1 10.69	1 10 1 10.69
1 01 2 2.932	1 04 2 11.43	1 07 2 11.43	1 10 2 11.43
1 01 3 3.912	1 04 3 12.47	1 07 3 12.47	1 10 3 12.47
1 02 1 4.493	1 05 1 10.69	1 08 1 10.69	END DATA.
1 02 2 3.734	1 05 2 11.43	1 08 2 11.43	LIST.
1 02 3 4.926	1 05 3 12.47	1 08 3 12.47	
1 03 1 8.944	1 06 1 10.69	1 09 1 10.69	
1 03 2 9.734	1 06 2 11.43	1 09 2 11.43	

ONEWAY V4 BY V2 (1,10)/STATISTICS ALL/ RANGES DUNCAN (0.01)/

RANGES DUNCAN (0.05).

ONEWAY V4 BY V3 (1,3).

ANOVA V4 BY V2 (1,10) V3 (1,3)/OPTIONS 3 /.

SET PRINTER OFF.

**ONEWAY  
DESCRIPTIVES  
GRAMOS DE FRUCTOSA/100ML**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
0.5	3	3.64000	.61860	.35715	2.10330	5.17670	2.932	4.076	
1.0	3	4.38433	.60338	.34836	2.88544	5.88322	3.734	4.926	
2.0	3	9.61267	.61701	.35623	8.07992	11.14541	8.944	10.16	
3.0	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
4.0	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
5.0	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
6.0	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
7.0	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
8.5	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
10	3	11.53000	.89420	.51627	9.30868	13.75132	10.69	12.47	
Total	30	9.83470	3.09724	.56548	8.67817	10.99123	2.932	12.47	
Model	Fixed Effects		.82004	.14972	9.52239	10.14701			
	Random Effects			.99022	7.59467	12.07473			9.58122

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	264.745	9	29.416	43.744	.000
Within Groups	13.449	20	.672		
Total	278.194	29			

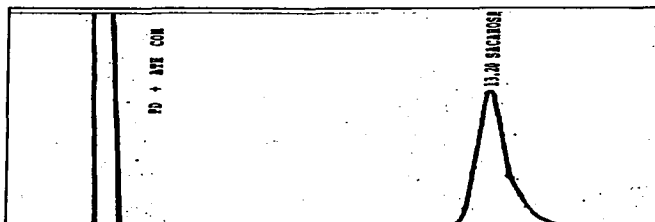
**g FRUCTOSA/100mL**  
**DUNCAN**

TIEMPO MINUTOS	N Subset for alpha = 0.05		
	1	2	3
0.5	3,64000		
1.0	4,38433		
2.0		9,61267	
3.0			11,53000
4.0			11,53000
5.0			11,53000
6.0			11,53000
7.0			11,53000
8.5			11,53000
10			11,53000
Sig.	.279	1,000	1,000

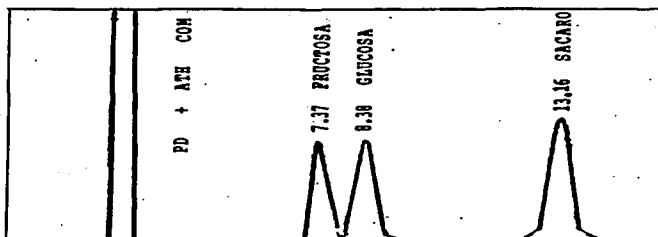
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ANOVA**  
**g FRUCTOSA/100mL**

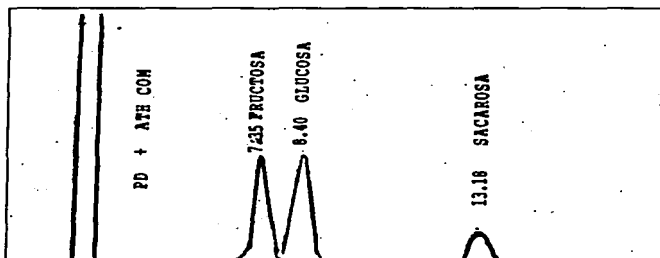
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.286	2	5.143	5.18	.061
Within Groups	267.909	27	9.923		
Total	278.194	29			

**8.4 ANEXO 4: EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN EL SEGUIMIENTO DE LAS REACCIONES DE HIDRÓLISIS****FIGURA 8.4**

CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE UN ESTÁNDAR DE SACAROSA ANTES DE REALIZAR LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS

**FIGURA 8.5**

CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE UN ESTÁNDAR DE SACAROSA AL REALIZAR LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS



**FIGURA 8.6**  
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE UNA MUESTRA DE JUGO DE CAÑA  
CLARIFICADO AL REALIZAR LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS