

## Estudio de la hidrólisis enzimática de inulina de agave en la producción de jarabe fructosado

GONZÁLEZ-PONCE, María del Refugio\*†, ROCHA-FLORES, Edson Roberto, RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Divanery y GARCÍA-GUZMÁN, José Miguel

*Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato*

Recibido 24 Enero, 2017; Aceptado 06 Marzo, 2017

### Resumen

Con el objetivo de evaluar las condiciones de operación de la etapa de hidrólisis enzimática de inulina de *Agave tequilana* Weber variedad *azul* en la producción de jarabe fructosado, se realizaron diversos ensayos de hidrólisis sobre una solución de inulina en la que se utilizó la enzima comercial inulinasa de *Aspergillus niger*. El diseño de experimentos de los ensayos consistió en un diseño factorial 3<sup>2</sup> empleando como factores la temperatura (45°C, 50°C y 55°C) y el pH (4.6, 5 y 5.5), y como variables respuesta el porcentaje de hidrólisis medido como contenido de azúcares reductores y la concentración de 5-Hidroximetilfurfural (HMF). Las condiciones de operación a las que se alcanzó mayor porcentaje de hidrólisis (71%) y bajo contenido de 5-HMF con valores muy por debajo de los parámetros de norma fueron trabajando a una temperatura de 50 °C y pH de 5.5.

***Agave tequilana* Weber var. Azul, inulinasa, jarabe fructosado, inulina de agave, hidrólisis enzimática, HMF**

### Abstract

In order to evaluate the operating conditions of the enzymatic hydrolysis step of *Agave tequilana* Weber var *azul* in the production of high fructose syrup, several hydrolysis tests were performed on an inulin solution in which the commercial enzyme inulinase from *Aspergillus niger*. The experiments design consisted of a factorial design 3<sup>2</sup> using as factors the temperature (45 °C, 50 °C and 55 °C) and pH (4.6, 5, and 5.5), and as response variables the percentage of hydrolysis measured as content of reducing sugars and the concentration of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). The resulting operating conditions for the highest hydrolysis percentage (71%) and values of 5-HMF below the standard parameters were reached at a temperature of 50 °C and pH of 5.5.

***Agave tequilana* Weber var. Azul, inulinase, high fructose syrup, agave inulin, enzymatic hydrolysis, HMF**

**Citación:** GONZÁLEZ-PONCE, María del Refugio, ROCHA-FLORES, Edson Roberto, RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Divanery y GARCÍA-GUZMÁN, José Miguel. Estudio de la hidrólisis enzimática de inulina de agave en la producción de jarabe fructosado. Revista de Simulación y Laboratorio. 2017, 4-10: 36-41.

\*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: refugio.gonzalez@itesi.edu.mx.)

†Investigador contribuyendo como primer autor

## 1. Introducción

La Agavaceae es una planta con nueve géneros y unas 293 especies. El género más importante es el de *Agave* con cerca de 166 especies (Cervantes, 2002) de las cuales el 75% se encuentran en México (Háuad *et al.*, 2010). Las plantas del género *Agave* almacenan fructanos (polímeros de fructosa) como principal carbohidrato de reserva (López *et al.*, 2003; Mancilla y López, 2006). Los fructanos son hidratos de carbono que consisten principalmente en unidades de fructosa unidas a través de enlaces fructosil-fructosa en forma lineal o ramificada. La presencia de unidades ramificadas hace que se comporten como fibra dietética, por lo que los fructanos son importantes en la industria alimentaria como sustitutos del azúcar o como prebióticos (Franck, 2002; Roberfroid, 2004; Kelly, 2008).

En México los fructanos se obtienen principalmente del *Agave tequilana* Weber var. *azul* debido a que este es considerado el centro de origen y biodiversidad de este género. (Espinoza y Urias, 2012) La inulina es el fructano más importante y se usa en una gran variedad de productos particularmente como fibra dietética (Roberfroid, 2000; Roberfroid, 2005; Wack y Blaschek, 2006) y para la producción de jarabes fructosados (Nakamura *et al.*, 1995, Wenling *et al.*, 1999, Cho *et al.*, 2001; Zhengyu *et al.*, 2005, Gonzalez *et al.*, 2006, Rocha *et al.*, 2006; Catana *et al.*, 2007; Ronkart *et al.*, 2007).

El jarabe de agave es la sustancia dulce natural Producida por la hidrólisis de los fructanos de agave (NMX-FF-110, 2008). En los últimos años este edulcorante ha tenido mucha importancia por los beneficios a la salud como lo son su capacidad prebiótica y su bajo índice glucémico lo que lo ha llevado a remplazar gradualmente al azúcar refinado empleándose como edulcorante de bajas calorías en alimentos y bebidas (Forshee *et al.*, 2007).

Aunado a lo anterior este edulcorante es muy empleado en alimentos por la transmisión de sus propiedades funcionales como sabor, color y solubilidad (Borges da Silva *et al.*, 2006; Tomotan y Vitolo, 2007).

Tradicionalmente la hidrólisis de los fructanos principalmente inulina se lleva a cabo por hidrólisis térmica que consiste en el cocimiento de las cabezas de agave por periodos de 36 a 48 h a temperaturas superiores a los 100°C; este proceso frecuentemente se complementa con la adición de ácidos (Waleckx *et al.*, 2008), lo que se llama hidrólisis ácido-térmica.

Sin embargo, en estos tipos de hidrólisis se a encontrado la formación de furanos durante la cocción, estos son derivados de la degradación térmica de las hexosas y pentosas, y el furano más abundante formado durante la cocción de las cabezas de agave es el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), compuesto considerado tóxico (Pérez *et al.*, 2016). Gonzalez *et al.*, 2016, encontraron que a mayor temperatura y concentración de ácido en la hidrólisis ácido térmica de inulina de agave existe mayor formación de 5-HMF. Por otra parte la Norma Oficial Mexicana sobre jarabe de agave requiere que la concentración de furfural sea inferior a 40 mg/kg (NMX-FF-110, 2008).

En cuanto a la hidrólisis enzimática una de sus principales ventajas es la alta especificidad de acción de las enzimas lo que hace que no se produzcan reacciones secundarias inesperadas (González *et al.*, 2016) El gran número de marcas comerciales y distribuidores de jarabe de agave azul reflejan el incremento de su producción y aceptación como edulcorante en México y otros países (NMX-FF-110, 2008; Phillips *et al.*, 2009).

No obstante su popularidad, la literatura disponible acerca del jarabe de agave azul está relacionada con producción (Partida *et al.*, 1998), diseño de estrategias biotecnológicas para ese fin (García *et al.*, 2009), capacidad antibacteriana (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983) y potencial como antioxidante (Phillips *et al.*, 2009). Existen también estudios sobre la producción de jarabes de fructosa a partir de inulina de chicoria y levanos por acción enzimática; pero hasta el momento no existen estudios sobre enzimas con especificidad sobre fructanos de agave. De ahí la importancia de realizar una evaluación de la capacidad de hidrólisis de la inulinasa de *Aspergillus niger* sobre la inulina de *Agave tequilana* Weber var. *Azul*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

En la hidrólisis enzimática se utilizó inulina soluble comercial marca Preventy® proveniente de *Agave tequilana* Weber variedad *azul*, la enzima empleada fue inulinasa de *Aspergillus niger* liofilizada de Sigma-Aldrich con una actividad comercial de 25 U/mg, los reactivos para determinar el grado de hidrólisis y contenido de HMF fueron fructosa e hidroximetilfurfural estándar, ácido 3,5-DNS, solución Carrez I y II, hidróxido de sodio, fenol, sulfito de sodio, sal de Rochelle, ácido cítrico monohidratado, fosfato disódico, carbonato de sodio todos grado analítico (Sigma-Aldrich). Se usó el equipo UV-vis Cary 50 (Varian, Inc) para las determinaciones de azúcares reductores (AR) y HMF-5.

### 2.2 Diseño de experimentos

En los ensayos de hidrólisis enzimática se empleó un diseño factorial  $3^2$  con los factores temperatura (45°C, 50°C y 55°C), y pH (4.6, 5 y 5.5) según se muestra en la Tabla 1.

Se determinaron como variables respuesta tanto el porcentaje de hidrólisis (contenido de AR) como la concentración de 5-HMF.

Tratamiento	Valor real		Valor codificado	
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>
1	45	4.6	-1	-1
2	45	5	-1	0
3	45	5.5	-1	1
4	50	4.6	0	-1
5	50	5	0	0
6	50	5.5	0	1
7	55	4.6	1	-1
8	55	5	1	0
9	55	5.5	1	1

**Tabla 1.** Diseño factorial  $3^2$  para la hidrólisis enzimática de inulina de agave. X<sub>1</sub>, x<sub>1</sub>: Valor real y codificado de la temperatura X<sub>2</sub>, x<sub>2</sub>: Valor real y codificado del pH

### 2.3 Hidrólisis enzimática

#### Actividad enzimática

La enzima liofilizada se restauró en agua destilada. Colocando el vial de 50 mg en 50 ml de agua destilada y se determinó la actividad de la misma empleando una solución de inulina de *Agave tequilana* Weber var. *azul* al 2% en buffer de fosfatos pH 4.6 a 45°C por 30 min.

#### Hidrólisis enzimática de la inulina

Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron de acuerdo al diseño de experimentos mencionado anteriormente (Tabla 1.), se varió la temperatura y el pH según cada uno de los tratamientos. Se colocaron 500 µL de solución de inulina al 5% en buffer de fosfatos en un tubo eppendorf de 600 µL, se le adicionó la solución de enzima (1:4) y se colocó en la incubadora por un tiempo de 1 h. Para determinar el contenido de AR y 5-HMF de las muestras hidrolizadas se utilizó el método DNS de Miller, 1959, y el método espectrofotométrico White (Zappalá, 2005) respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y completamente al azar.

### 3. Resultados

#### 3.1 Diseño de experimentos

En las Tabla 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos tanto para AR como para 5-HMF.

Trat.	Factor		Azúcares reductores g/L			s <sup>2</sup>	Grado de hidrólisis (%)
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		
1	45	4.6	25.59	24.87	24.44	0.58	49.93
2	45	5	31.94	33.55	34.15	1.14	66.43
3	45	5.5	29.98	29.04	31.23	1.10	60.16
4	50	4.6	16.48	15.85	23.37	4.17	37.13
5	50	5	31.22	30.18	30.49	0.53	61.25
6	50	5.5	33.82	34.12	37.75	2.19	70.46
7	55	4.6	33.18	38.13	34.18	2.62	70.33
8	55	5	34.33	34.18	34.39	0.11	68.60
9	55	5.5	36.24	35.83	34.94	0.66	71.34

**Tabla 2** Respuesta de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de inulina de agave. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Réplica 1, 2 y 3. s<sup>2</sup>: Desviación estándar. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>: Temperatura y pH.

Tratamiento	Factor		Hidroximetilfurfural (mg/kg)			s <sup>2</sup>
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
1	45	4.60	0.02	0.02	0.03	0.01
2	45	5.00	0.62	0.63	0.55	0.04
3	45	5.50	0.45	0.43	0.42	0.02
4	50	4.60	0.69	0.70	0.70	0.01
5	50	5.00	0.55	0.62	0.57	0.04
6	50	5.50	1.11	1.19	1.11	0.05
7	55	4.60	1.34	1.34	1.53	0.11
8	55	5.00	1.54	1.43	1.58	0.08
9	55	5.50	1.48	1.48	1.52	0.02

**Tabla 3.** Respuesta de hidroximetilfurfural en la hidrólisis enzimática de inulina de agave. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Réplica 1, 2 y 3. s<sup>2</sup>: Desviación estándar. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>: Temperatura y pH

En la tabla 2 se puede observar que los porcentajes de hidrólisis de inulina empleando inulinasa de *Aspergillus niger* van desde el 37% hasta 71%, siendo los tratamientos en los que hay mayor hidrólisis los 6, 7 y 9. Considerando como las mejores condiciones de operación de la enzima una temperatura de 50 °C y pH de 5.5.

Además con respecto a la formación de compuestos como el 5-HMF se observa en la tabla 3 que este componente se encuentra en concentraciones de 0.02-1.6 mg/kg concentración que se encuentra muy por debajo del parámetro permitido como límite máximo que es de 40 mg/kg. Estos valores son muy bajos comparados con los encontrados en el trabajo de González *et al.*, 2016, en el que en la hidrólisis ácida determinaron valores de 10-62 mg/kg.

### 4. Conclusiones

La inulinasa de *Aspergillus niger* mostró 71% de hidrólisis de la inulina de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, la cual se logró a condiciones de operación de 50°C y pH de 5.5 en buffer de fosfatos. Con la hidrólisis enzimática se observó poca formación de compuestos de reacciones secundarias como el 5-HMF, lo que impacta favorablemente en la calidad del jarabe. Se encontró que la formación de los furfurales como el 5-HMF se favoreció con la elevación de la temperatura, pasando de 0.02 mg/kg cuando se trabaja a 45°C hasta 1.58 mg/kg a temperaturas de 55°C. Sin embargo, los valores encontrados en el estudio están por debajo del parámetro permitido como límite máximo que es de 40 mg/kg.

### Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente proyecto con los fondos aprobados en La Convocatoria Institucional de Proyectos de Investigación y Desarrollo Tecnológico 2017.

### 5. Referencias

Borges da Silva E, Ulson de Souza AA, Ulson de Souza SG, Rodrigues AE. (2006). Analysis of the high-fructose syrup production using reactive SMB technology. *Chem. Eng. J.* 118, 167-181.

GONZÁLEZ-PONCE, María del Refugio, ROCHA-FLORES, Edson Roberto, RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Divanery y GARCÍA-GUZMÁN, José Miguel. Estudio de la hidrólisis enzimática de inulina de agave en la producción de jarabe fructosado. *Revista de Simulación y Laboratorio.* 2017.

- Catana R., E.; J. R. Rocha.; B. S. Ferreira.; J. M. Cabral; P. Fernandes. (2007). Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 101, 260-266.
- Cervantes, M. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México: UNAM, Instituto de Geografía. [Versión electrónica]. Recuperado de: URL (<https://books.google.com.mx>), pp. 63-66, 73.
- Cho Y. J.; Sinha, J.; Park, J. P.; J. W. Yun. (2001). Production of inulooligosaccharides from inulin by a dual endoinulinase system. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 428-433.
- Davidson, J. R., and B. R. Ortiz de Montellano. (1983). The bacterial properties of an Aztec wound remedy. *J. Ethnopharmacol.* 8: 149-161.
- Franck, A., (2002). Technological functionality and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, 287-291.
- Espinosa, A.H and Urias, S. (2012). Thermal properties of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Carbohydrate Polymers*. 87(4), 2671-2676.
- García-Aguirre, M., V. A. Sáenz-Álvaro, M. A. Rodríguez-Soto, F. J. Vicente-Magueyal, E. Botello-Álvarez, H. Jiménez- Islas, M. Cárdenas-Manríquez, R. Rico-Martínez, and J. L. Navarrete-Bolaños. (2009). Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10205-10210.
- González-Díaz E.; Catana, R.; Ferreira, B. S.; Luque, S.; Fernandes, P.; Cabral, J. M. (2006). Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis. *J. Membr. Sci.* 273, 152-158.
- González-Ponce M.R, Bernal-Arroyo B., González- González C., Segoviano-Garfias J.N. (2016). Evaluación de ácidos como catalizadores en la hidrólisis de inulina de *Agave Tequilana* Weber var. Azul. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias* Septiembre, Vol.3 No.8 33-38.
- Háuad-Marroquín L.A., A. Pérez-Liñán, D. Resendez-Pérez, C Moreno, S. Lara Vásquez, D. Lázaro López y C. una Rodríguez. (2010). Determinación química y estudio terapéutico de *agave tequilana* Weber. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial No. 5.
- Huerta Alcocer, S.A., Larralde Corona C.P., Narváez Zapata, J.A. (2014). *Revista Bio Ciencias* 3(1): 4-16.
- Kelly, G., (2008). Inulin-type prebiotics – a review. Part 1. *Altern.Med. Rev.* 14, 36-55.
- López, M. G., N. A. Mancilla-Margalli, and G. Mendoza-Díaz G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7835-7840.
- Mancilla, M. y M. López. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832-7839.
- Miller, G.L., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 420-428.
- Nakamura, T.; Ogata, Y.; Shitara, A.; Nakamura, A.; K. Ohta. (1995). Continuous production of fructosa syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. *Journal of Fermentation and bioengineering.* 80(2): 164-169.

- NMX-FF-110-SCFI-2008. (2008). Norma Mexicana. Alimentos-Jarabe de Agave 100%-Especificaciones y métodos de prueba.
- Partida, V., A. Camacho, and A. J. Martinez. (1998). Method of producing fructose syrup from agave plants. US patent 5 846 333.
- Pérez, H., Chávez, P., González, H. (2016). Revisión del agave y del mezcal. Rev. Colomb. Biotecnol., vol 18 (1), 148-164.
- Phillips, K. M., Carlsen, M. H., and Blomhoff, R. (2009). Total antioxidant content of alternatives to refined sugar. *Journal of the American Dietetic Association*, 109,64–71.
- R. A. Forshee, M. L. Storey, D. B. Allison, (2007). A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, no. 6, pp. 561–582.
- Roberfroid, M. B. (2000). Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*, 16 (7&8), 677-679.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. 93(1): S13-S25.
- Roberfroid, M.B. (2004). Inulin: A Fructan Inulin-Type Fructans; Functional Food Ingredients. *CRS Press*, Boca Raton, USA, pp.50.
- Rocha, J. R.; Catana, R.; Ferreira, B. S.; Cabral, J. M.; P. Fernandes. (2006). Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 95, 77-82
- Ronkart, S. N.; Blecker, C. S.; Fourmanoir, H.; Fougnes, C.; Deroanne, C.; Van Herck, J. C.; M. Paquot. (2007) Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604, 81-87.
- Tomotani EJ, Vitolo M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. (2007). *J. Food Eng.* 80, 662-667.
- Wack, M.; W. Blaschek. (2006). Determination of the structure and degree of polymerization of fructans from *Echinacea purpurea* roots. *Carbohydrate Research*, 341, 1147-1153.
- Wenling, W.; Wuguang, W.; W, Shiyuan. (1999). Continous production preparation of fructose syrups from *Jerusalem artichoke* tuber using immobilized intracellular inulinase from *kluuveromyces* sp. Y-85. *Process Biochemistry*, 34, 643-646.
- Zhengyu, J.; Jing, W.; Bo, J.; X. Xueming. (2005). Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Research International*, 38, 301-308.