

Estabilidad térmica del grado de polimerización y cuantificación parcial de azúcares en fructanos de agave tequilana, obtenidos por ultrafiltración

Rafael Espinosa & Rosa Ortiz

R. Espinosa & R. Ortiz
Universidad Tecnológica de la Costa, Carretera Santiago entronque internacional no. 15 km. 5, Santiago Ixcuintla, Nay.
Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Av. Tecnológico 2595
Tepic, Nayarit México
raphat_18@hotmail.com

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

Abstract

In the international market there is a growing demand for fructan, due to its properties as food additives, ultrafiltration meanwhile has proven to be an emerging technology with great potential for the separation of substances of interest in the food industry and different studies are done in fructans with favorable results. The aim of this study was to identify and quantify simple sugars such as glucose and fructose by anion exchange chromatography, besides evaluating the stability to heat treatment GP Weber tequilana fructans obtained by ultrafiltration. Through a chromatographic profile was validated that ultrafiltration reduces the concentration of simple sugars and the Weber tequilana GP ranged between 2 and 60, GP presents this partial hydrolysis 2.2% to bring fructans at 120 ° C for 5 minutes.

5 Introducción

Diferentes estudios en el jugo extraído de piñas de *Agaves tequilana Weber* demuestran la riqueza que presentan en carbohidratos, entre los que se encuentran los fructanos. Los fructanos son clasificados de acuerdo a su grado de polimerización (GP = número de monómeros de fructosa, presentes en la molécula) que varía entre 2 y 80 unidades. Los fructanos de bajo grado de polimerización (3 a 9) se conocen generalmente como fructoligosacáridos (FOS) independientemente del tipo de estructura que presenten. Los conocidos como inulina tienen un grado de polimerización mayor ≥ 9 , este tipo de carbohidratos son estudiados científicamente como aditivos alimentarios teniendo por objetivo el desarrollo e innovación de alimentos.

El consumo de fructanos diario en algunos países varía, de 1 a 4 g en los Estados Unidos y de 3 a 12 g, mientras que en Europa se recomienda no exceder 45 g por día. De acuerdo con todas estas aplicaciones que se les da a los fructanos, han surgido empresas en América que se dedican a crear subproductos de fructanos como Orafiti® creada en Chile el 2006. Esta planta tiene una producción anual de fructanos tipo inulina de 10.000 toneladas. En México la obtención de fructanos obtenidos a partir de *Agave tequilana Weber* var. azul es procesado por las siguientes empresas: Inulina y Miel de Agave S.A. de C.V, Agaviotica S.A. de C.V y Miel Campos Azules S.A. de C.V, con una producción de 2650 Ton anuales por la venta, el ingreso de Fructanos Nativos de *Agave* a mercados internacionales, ha estado limitado por la falta de opciones comerciales y conocimiento de las características que las fracciones de fructanos pueden otorgar como aditivos en alimentos. Existen diferentes métodos para el fraccionamiento de fructanos como lo es la concentración por ultrafiltración este mismo es un proceso de fraccionamiento selectivo utilizando presiones de hasta 145 psi (10 bar). La ultrafiltración se utiliza ampliamente en el fraccionamiento de concentración de sólidos en suspensión y solutos de peso molecular mayor a 200×10^5 Da.

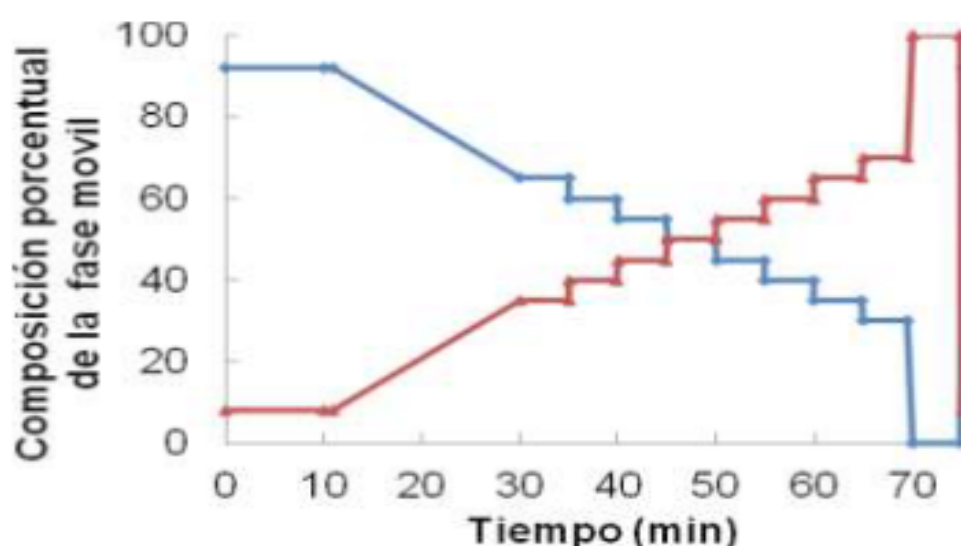
Por lo anteriormente descrito este estudio se enfoca sobre la estabilidad térmica del GP de los fructanos del *Agave tequilana*, tomando como ejemplo temperaturas y tiempos a los que son sometidos la infinidad de productos alimenticios en su etapa de pasterización y a su vez una caracterización parcial por cromatografía de azúcares presentes en los fructanos de *Agave tequila Weber*, obtenidos a partir de ultrafiltración. Es importante mencionar que hoy en día casi no hay campo de la química y biología de los alimentos que no utilice la cromatografía en alguna de sus formas, tanto en su vertiente preparativa como en la analítica; por otra parte el desarrollo sobre el uso conjunto de la cromatografía con otras técnicas analíticas, así como el desarrollo de otros tipos de cromatografía, como la de fluidos supercríticos, hace posible una extensión aun mayor de su uso.

5.1 Método

Perfil cromatografico

El perfil cromatográfico de los fructanos obtenidos a partir de ultrafiltración se determinó por medio de un cromatografo DIONEX, Modelo ICS 5000, USA, USA. La muestra de fructanos fue inyectada en una columna termostática DIONEX PA-100 (0.4 x 5 cm) a 35°C y la elución a una velocidad de 0.5 mL.min⁻¹. Se ajustó un gradiente escalonado en dos dimensiones definidas por los eluentes NaOH 100 mM y acetato de sodio 600mM descrito en la Figura 1. Los GP se estimaron en comparación grafica con un estándar de inulina de achicoria a través de cromatogramas.

Figura 5 Gradiente de composición porcentual de la fase móvil en dos dimensiones definidas por los eluentes NaOH 100 mM (—) y acetato de sodio 600mM (—).



Cuantificación de azúcares simples

La cuantificación de azúcares simples, tales como fructosa, glucosa y sacarosa se determinó por medio de cromatografía de intercambio anionico, mediante un cromatografo DIONEX, Modelo ICS 5000, USA, utilizando una columna DIONEX PA-1 y el gradiente antes descrito para lograr la cuantificación de azúcares mediante curvas de calibración con los estándares correspondientes. Se ajustó al gradiente mencionado en perfil de cromatografico.

Dispersión del Grado de Polimerización

A través del cromatografo DIONEX, Modelo ICS 5000, USA y con el gradiente establecido se indujo a la separación en base al GP de los fructanos en polvo. La definición del GP se realizó tomando como referencia el estándar de inulina.

Cuantificación de azúcares simples liberados por tratamiento térmico

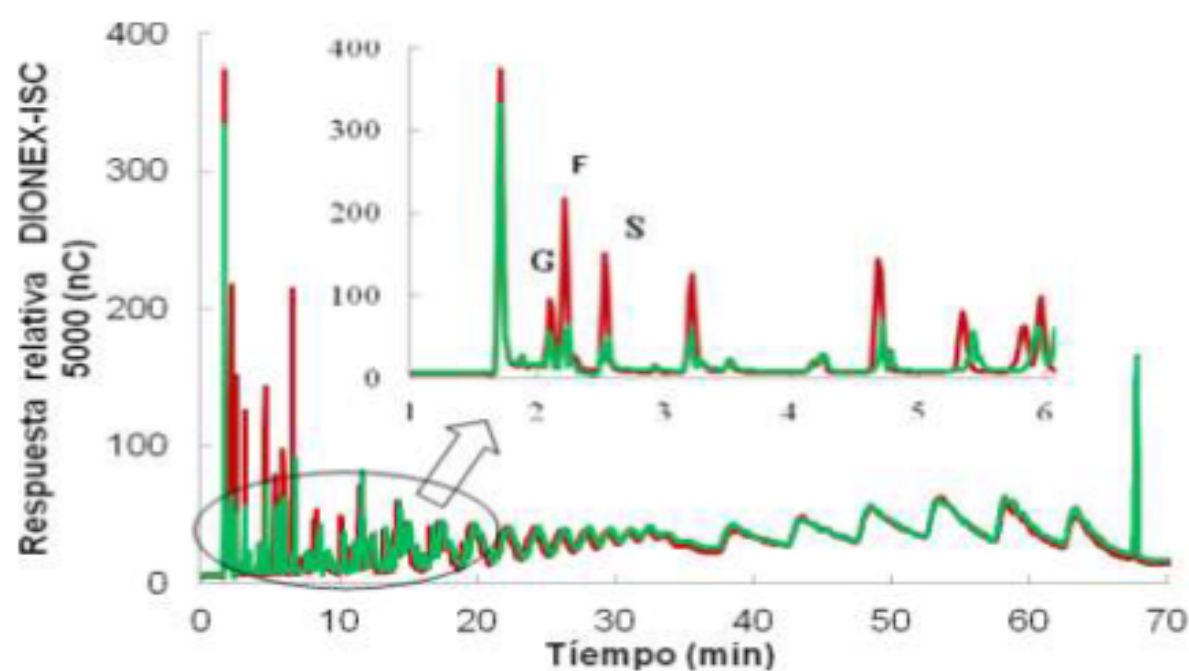
Se evaluó la estabilidad del grado del GP de los fructanos antes caracterizados de la siguiente manera: Se prepararon muestras a una concentración de 2 mg.mL⁻¹ de fructanos.

Los cuales se trataron a 60, 80, 100 y 120°C durante 5, 10,15 y 20 min respectivamente. Después de haber sido tratadas térmicamente las muestras se inyectaron al cromatografo utilizando las condiciones descritas anteriormente, la cuantificación de azúcares simples se llevó a cabo, mediante curvas de calibración de 5 niveles cuantificándose fructosa, glucosa y sacarosa, a las muestras de fructanos sometidas a tratamientos térmicos. Se utilizó un diseño factorial 4x4 (4 Temperatura y 4 tiempos). Los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y se usó una prueba de LSD con un $\alpha=0.05$ para la comparación de medias usando el paquete estadístico SAS System (Versión 9.0).

5.2 Resultados

Perfil cromatografico

Gráfica 5.1 Comparación de la solución de fructanos de *Agave tequilana Weber* var. azul usada como alimentación y de la solución de retenido 25 °C). Glucosa (G), Fructosa (F) y Sacarosa (S)

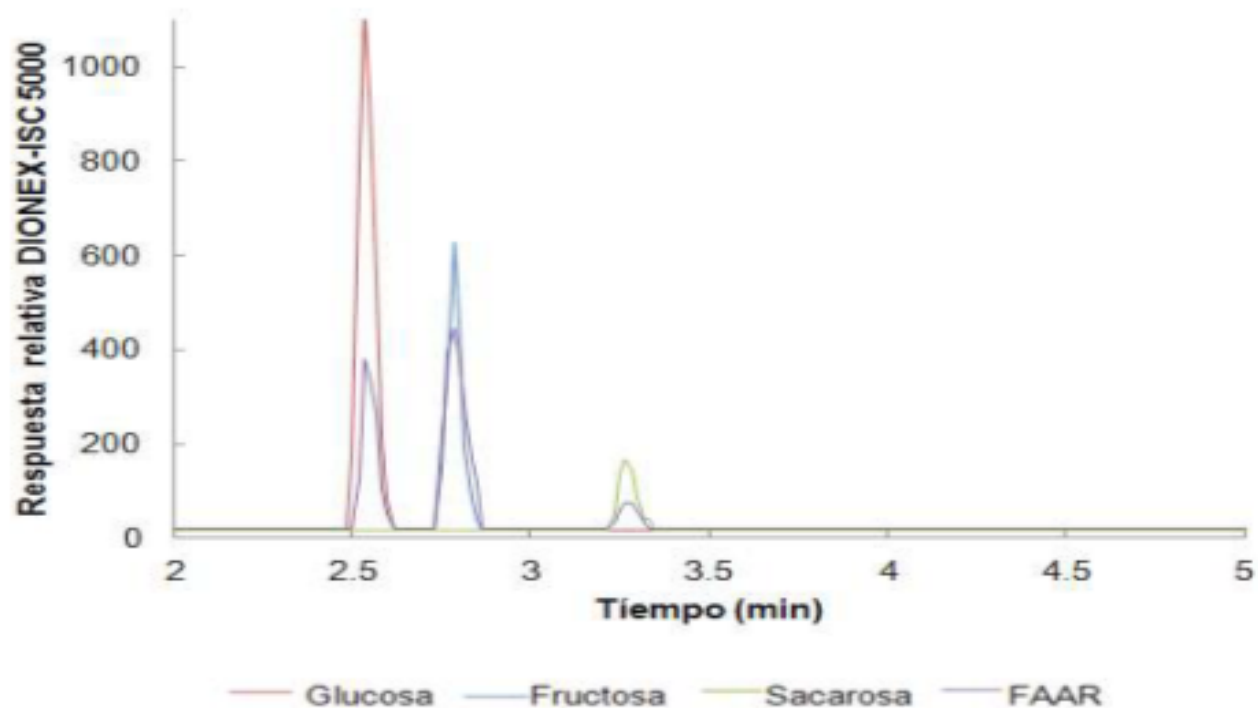


Cuantificación de azúcares simples

Tabla 5 Identificación y cuantificación de azúcares simples presentes en los fructanos separados por una membrana de ultrafiltración de 1kDa y secado por aspersion

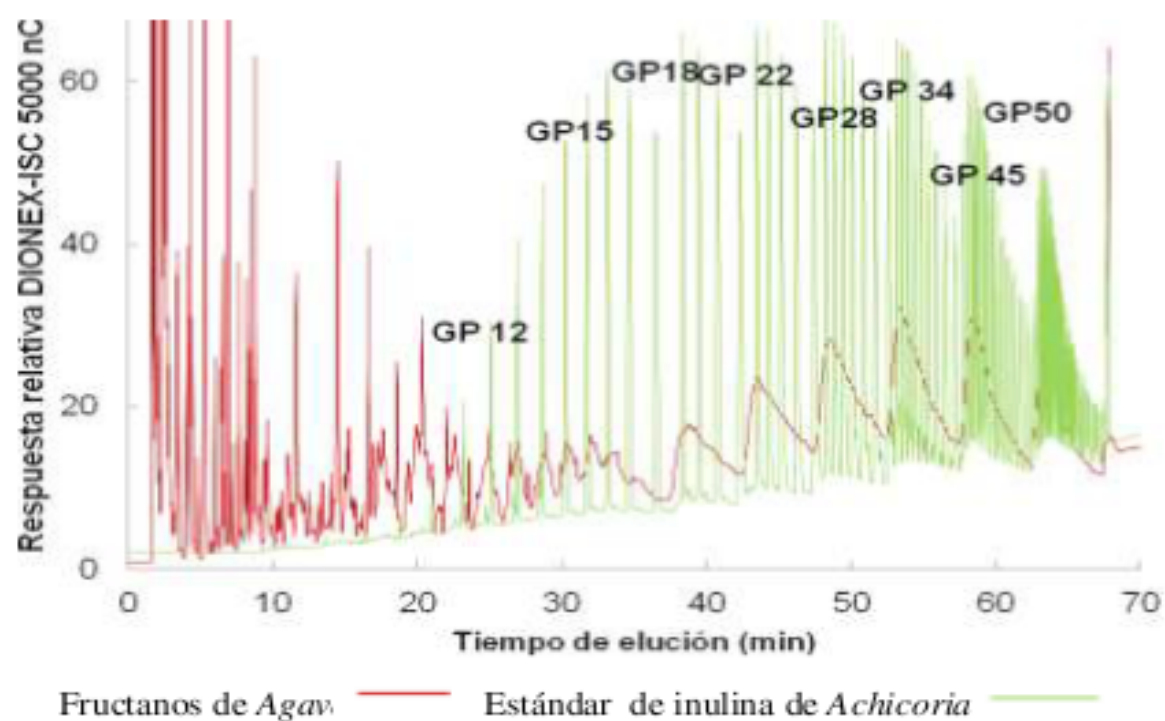
Cuantificación DIONEX-ISC5000	
Azúcar	g.100g ⁻¹ de muestra
Glucosa	0.055
Fructosa	1.77
Sacarosa	0.041

Gráfica 5.2 DIONEX, repuesta reactiva



Dispersión del Grado de Polimerización

Gráfica 5.3 Perfil de distribución por HPLC de fructanos de *Agave tequilina* purificados por una membrana de ultrafiltración de 1kDa e inulina de achicoria, usando las mismas condiciones de trabajo en el sistema DIONEX-ISC5000



Cuantificación de azúcares simples liberados por tratamiento térmico

Tabla 5.1 Concentración de azúcares simples: Glucosa+ fructosa+ sacarosa

Tiempo (Min)	Temperatura (°C)			
	60°C	80°C	100°C	120°C
5	1.7±0.2a	2.3±0.1b	2.8±0.1c	3.8±0.1d
10	1.7±0.1a	2.4±0.3b	3.2±0.2c	4.0±0.1d
15	1.7±0.1a	2.4±0.2b	3.3±0.2c	4.1±0.1d
20	1.8±0.2a	2.8±0.1b	3.5±0.2c	4.2±0.1d

Los valores son la media de $n=3 \pm D.S.$ Medias en la misma columna que no muestran la misma letra indican diferencia significativa ($p>0.05$)

5.3 Discusión

Perfil cromatografico

Se definió el perfil cromatografico a partir del gradiente utilizado por Ortiz-Basurto, (2008) en la separación de fructanos comerciales de *Agave* y se ajusto a la separación de un estándar de inulina de achicoria. En la Figura 2 se muestra un perfil cromatografico que se realizó a la muestra de jugo utilizada en la alimentación y el retenido, por su parte la muestra del retenido presentó menor respuesta electroquímica del cromatografo hasta los 10 min con respecto a la alimentación, indicando concentración más baja en retenido de azúcares simples: glucosa fructosa y sacarosa que fueron identificados antes de los 4 min.

Como resultado en el retenido se obtuvo una purificación de 99.3 % de fructanos reduciendo 6.8% la concentración de azúcares simples respecto a la solución de alimentación.

Lo anteriormente se explica porque el retenido es la solución concentrada y purificada por ultrafiltración, moléculas como fructosa, glucosa, sacarosa y compuestos con pesos moleculares menores de los 1000 Da no son retenidos y son eliminados en el permeado, se puede observar que después de 10 min, las respuestas electroquímicas para las líneas de alimentación y retenido mantienen el mismo comportamiento, lo cual indicó la presencia de concentraciones parcialmente iguales de moléculas más complejas que los azúcares simples, indicando que la solución en retenido fue enriquecida de constituyentes de pesos moleculares altos o con $GP>10$ y purificada en la concentración de mono y disacáridos.

Cuantificación de azucares simples

En la Figura 5.2 se observa la identificación y la cuantificación de los azúcares simples, presentes en los fructanos analizados. Los azúcares identificados fueron glucosa fructosa y sacarosa, su composición muestra un porcentaje total de 1.86, dicho resultado representa un 98.1% de pureza. Pureza que es mayor a la reportada por Waleckx y col, (2008), quien analizó fructanos extraídos del *Agave tequilana Weber*, que fueron obtenidos de forma convencional, sin haber pasado por ultrafiltración y al cuantificar por HPLC glucosa, fructosa y sacarosa, reportó porcentajes de 0.8, 3.8 y 2 % respectivamente, que en su totalidad representan un 6.6% de azúcares simples presentes en la muestra, indicando una pureza de 93.4 %.

Dispersión del Grado de Polimerización

En la Figura 4 se muestra la dispersión de los fructanos de *Agave tequilana* en comparación a un estándar de inulina de achicoria con GP mínimo de 10, ambos inyectados con el programa modificado de Ortiz-Basurto (2008).

Los resultados indican la presencia de fructanos con $GP < 10$ en los tiempos de 0 a 23 minutos, después de este tiempo se observa la presencia adicional de fructanos de IA con $GP < 10$. Ha falta de estándares de fructanos con GP específico, es posible tomar de referencia la presencia de cada pico eluido de un estándar de inulina para definir la dispersión y el GP de otros fructanos (Ortiz-Basurto 2008; Borromel y col 2009; Corradini et al 2012). En el caso de los fructanos de *Agave*, no se observa la definición de todos los picos, en los primeros minutos del cromatograma se remarcan los picos correspondientes a la elusión de Glucosa (2.5 min), Fructosa (2.72 min), sacarosa (3.35 min) y hasta el minuto 23 se observa la presencia de diversos picos superpuestos correspondientes a los FOS.

Se ha reportado que la separación de fructanos tipo inulina es posible al utilizar el detector de pulsos amperométricos, sin embargo para el caso de fructanos de *Agave* en donde existen además de fructanos tipo inulina, levanos, neoseries y particularmente fructanos ramificados con diferentes grados de polimerización (Mancilla y Margali 2006, Waleck y Col, 2008 y Arrizon 2010), no se ha reportado una definición completa de los fructanos presentes. Esta diversidad estructural crea dificultades para la resolución completa del polímero, Ortiz-Basurto (2008) reportó que es debido a la superposición de los fructanos con el mismo grado de polimerización que se forman pequeñas montañas en los cromatogramas. Sin embargo se manifiestan respuestas electroquímicas hasta los 68 minutos.

Los fructanos con $GP > 10$ de acuerdo al estándar utilizado se presentan en el intervalo del minuto 23 al 68, a partir del minuto 63 corresponde a los polímeros con $GP > 60$, teniendo como GP máximo de 80, estos GP aparentes no corresponden con los reportes de investigaciones realizadas para fructanos de *Agave tequilana* ejecutadas por López y col (2003) que reportó un GP de 3 a 29, Waleck y col (2008) indicaron un GP promedio de 14, Mancilla y col., (2006) señalan un GP promedio de 18, pero si corresponden con la dispersión que reporta Ortiz-Basurto (2008), en un intervalo de GP entre 2 a 80 para *Agave tequilana*.

Cuantificación de azúcares simples liberados por tratamiento térmico

A fin de identificar la estabilidad de la fracción de fructanos de *Agave* obtenida a los diferentes tratamientos térmicos que generalmente se aplican en la industria de alimentos.

Se partió del perfil de cromatografía de la fracción sin tratamiento térmico para calcular el área bajo la curva de cada grupo de fructanos y se comparó con la obtenida, después de cada tratamiento. Se determinó el área de cada grupo de fructanos en cada cromatograma obtenido, considerando que si el área de un grupo de fructanos disminuye, se debe a la hidrólisis de los fructanos.

En esta sección se trabajó con el área los picos de los aparentes GP indicando efecto de hidrólisis si las áreas disminuyen.

De acuerdo a los valores obtenidos de la disminución del área de los aparentes GP, el análisis estadístico indicó que si existe efecto de la temperatura y tiempo sobre la hidrólisis de los fructanos y diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las 4 temperaturas de las áreas de todos los aparentes GP. Este fenómeno de hidrólisis probablemente se debió a que el proceso térmico implicó la ruptura de enlaces glucosídicos internos β (2-1) y (2-6) del polisacárido (Cuello, 2012). En el Cuadro 1 se observa la concentración de los azúcares simples, valores que corresponden a la suma total de glucosa, fructosa y sacarosa, cuantificado por cromatografía.

Estos resultados indican que en un lapso de 20 minutos a 60, 80, 100 y 120°C ocurre un aumento de azúcares simples del 0.03, 1, 1.69 y 2.42 % respectivamente de acuerdo al análisis estadístico realizado, se determinó que la concentración de azúcares simples presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) para las cuatro temperaturas.

La menor hidrólisis se presentó en la combinación de temperatura de 60°C durante 5 min y la mayor hidrólisis se presentó a 120°C durante 20 min. Estos resultados coinciden con los reportados por Montañez-Soto (2009), que indica que en la extracción de fructanos con temperaturas de 60°C no se tiene un rendimiento del 100% debido a que existe hidrólisis de los fructanos y a su vez no coinciden con lo descrito por Suzuki y Charterton (1996) quienes afirman que los fructanos son estables hasta los 140°C, lo anterior.

Cabe señalar que los resultados obtenidos para esta investigación indican un porcentaje de hidrólisis de 2.2% debido a que las muestras fueron tratadas únicamente por calor. La mayoría de las investigaciones para la degradación de fructanos se centran en hidrólisis termo-enzimáticas.

5.4 Conclusiones

El perfil cromatográfico validó que la ultrafiltración reduce la concentración de azúcares simples de los fructanos de *Agave tequilana Weber*.

Se logró determinar por medio de cromatografía la presencia de glucosa fructosa y sacarosa en los fructanos de *Agave tequilana Weber* indicando un 98.1% de pureza.

Se identificó que los fructanos de *Agave tequilana Weber* presentan GP entre 2 y 60.

Se determinó que al someter los fructanos de *Agave tequilana Weber* a 120°C por 5 min presentan una hidrólisis parcial del 2.2% de su cadena estructural.

5.5 Referencias

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, 122(1), 123-130.

Cuello, C., M. (2012). *Caracterización fisicoquímica y estudio cinético de la hidrólisis enzimática de los fructanos de maguey mezcalero potosino (Agave Salmlana)*. Tesis de doctorado en ciencias ambientales, Universidad Autónoma de SLP. San Luis potosí .SLP., Mexico

Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840.

Mancilla-Margalli, N., López M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliroton* species, *J. Agric. Food and Chem.* 54: 7832-7839.

Montañez-Soto, J. L. (2009). Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*) Jiquilpan, Michoacán, Mex.

Ortiz-Basurto, R. I. (2008). *Caracterisation de l'Aguamiel Et fractionnement Des Fructanes de jus D'Agave Par Technologie Membranaire Jury*. Tesis de doctorado en Mompelie., Francia.

Suzuki, M. y Chatterton, N. (1996). Science and technology of fructans. *CRC Press*. synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (4), 1246-1253.

Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B. y Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*. 108 :40–48.

