

Optimización de los procesos de extracción y fraccionamiento por grado de polimerización de fructanos, obtenidos a partir de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, para la obtención de prebióticos

Optimization of process for extraction and fractionation by degree of polymerization of fructans, obtained from *Agave tequilana* Weber var. *azul*, for obtain prebiotics

NAHUM CASTELLANOS-PÉREZ¹, MARTHA ALICIA RODRÍGUEZ-MENDIOLA², PEDRO LUIS LÓPEZ DE ALBA³, LETICIA LÓPEZ MARTÍNEZ³, FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ-MICELI⁴ & CARLOS ARIAS-CASTRO^{5*}

¹Laboratorio de Bioquímica. Instituto Tecnológico de Jiquilpan. Carretera Nacional km 202, Jiquilpan Mich. CP 59510.

²Biotecnología Vegetal. DEPI del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de zuñiga, Jal. CP 45640. México.

³Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato. Cerro de la Venada s/n. Pueblito de Rocha, Guanajuato, Gto. CP 36040. México.

⁴Departamento de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Carretera Panamericana km 1080, C.P. 29050, Chiapas, México.

⁵Laboratorios de Análisis Instrumental Bioquímico. DEPI del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zuñiga, Jal. CP 45640. México.

*caminoareal8@gmail.com

RESUMEN

Se estudió el efecto de las condiciones de extracción de fructanos sobre el rendimiento y degradación del jugo de *Agave tequilana* Weber var. *azul*. Se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron empleando temperaturas menores de 80°C, relación sólido: líquido de 1:3 al pH natural del agave (mayor de 4,5). Por otra parte, los fructanos contenidos en el jugo de agave pudieron ser fraccionados, con base a su Grado de Polimerización (GP), utilizando gradientes de etanol y temperatura, comparándolos con un producto comercial proveniente de achicoria, se logró precipitar el 98% de los fructanos en 7 fracciones y 3 rangos de GP. Cada fracción se caracterizó por cuantificación de la cantidad de azúcares por HPLC-RI, además se determinaron los parámetros de transición de fase (temperatura del pico y entalpía de fusión) mediante calorimetría diferencial de barrido, de donde se estableció la diferencia entre los fructanos en cuanto a cristalinidad y estructura lineal/ramificada. Dos de las fracciones obtenidas a partir del jugo de agave representaron más del 90% del total de los fructanos, con GP de 31 y 25 respectivamente. También se estimaron las posibles aplicaciones de estas fracciones como prebióticos en la industria alimentaria.

PALABRAS CLAVE: Grado de polimerización (GP), calorimetría diferencial de barrido (CDB), inulina, HPLC-RI.

ABSTRACT

The effect of fructan extraction conditions on yield and juice degradation of *Agave tequilana* Weber var. *azul*. Finding that the best extraction conditions are employing temperatures below 80 °C, ratio solid: liquid 1-3, at natural pH Agave (over 4.5). Testing different fractionation systems fructans obtained by degree of polymerization GP, and compared with a commercial product from chicory, was able to precipitate 98% of the fructans in 7 fractions and 3 ranges of GP. Each fraction was characterized by quantifying the amount of sugars by HPLC-RI, also determined the phase transition parameters (peak temperature and melting enthalpy) using a differential scanning calorimeter, which established the difference between fructans in terms of crystallinity and structure Linear / branched. There were two dominant fractions in the juice of agave, which represent over 90% of total fructans with GP of 31 and 25. Also estimated the possible applications of these fractions as prebiotics in the food industry.

KEYWORDS: Degree of polymerization (DP), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Inulin, HPLC-RI.

INTRODUCCIÓN

Los fructanos, después del almidón y la sacarosa, son probablemente la más abundante fuente de carbohidratos metabolizables de reserva encontrados en plantas. Los fructanos se encuentran en cerca del 15% de las plantas que florecen, incluyendo cosechas importantes de cereales (trigo, cebada, centeno y avena), vegetales (achicoria, espárrago, cebolla, ajo, cebollines y puerro) y frutas (plátano y toronja), éstos son consumidos regularmente en la dieta (Franck & De Leenheer 2002, Kaur & Gupta 2002). Los fructanos están presentes en las plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas como el agave. En las células de las plantas, los fructanos se acumulan en la vacuola y son usualmente encontrados como una mezcla de cadenas de varias longitudes o grado de polimerización (GP). La inulina, frecuentemente llamada por el nombre genérico de oligofructosa, es una mezcla de polisacáridos compuesta por cadenas de fructosa unidas por enlaces β (2-1) con una unidad de glucosa terminal. La fórmula general puede ser representada como GF_n; G es la unidad de glucosa terminal, F representa el residuo de fructosa y n caracteriza el número de unidades de fructosa (Franck & De Leenheer 2002). Desde el punto de vista tecnológico, el promedio de distribución de las cadenas de fructanos es muy importante, porque ésta implica diferentes aplicaciones basadas principalmente en reducir la solubilidad e incrementar la firmeza del gel, con el incremento del grado de polimerización (GP) de los fructanos. El perfil por GP depende del tipo de planta, la edad de cosecha y también de los procesos de extracción de los fructanos. En la estructura de fructanos de *Agave tequilana* Weber se han obtenido mezclas de polímeros de fructosa que incluyen: oligosacáridos del tipo inulina, neoinulina y conforme incrementa el GP, graminanos y neofructanos ramificados (Mancilla-Margalli & López 2006).

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) es una técnica que permite detectar los cambios en el contenido de calor (entalpía) o el calor específico (C_p) de muestras con la temperatura, y mediante este procedimiento es posible estimar la cristalinidad de los carbohidratos así como su grado de polimerización (Blecker *et al.* 2003).

La mayor desventaja de la inulina producida a partir de achicoria (*Cichorium intybus* L.) es su bajo GP promedio, motivo por el cual los fructanos obtenidos a partir de agave representan una alternativa de interés, debido a su presumible alto GP. Otros esfuerzos se enfocan en la separación de los fructanos para producir fracciones con alto GP. El material podría ser usado en futuras modificaciones químicas para su utilización en productos alimenticios y no alimenticios (Silver 2003, Kaur & Gupta 2002).

Los fructanos son utilizados recientemente por la moderna industria alimentaria, por su alta funcionalidad y versatilidad. Los fructanos son fibra soluble dietética de sabor, color y olor neutro, bajos en calorías, con

excelentes cualidades de gelificación, alta capacidad de retención de agua, sinérgico con gomas, y la habilidad de estabilizar espumas y emulsiones. Estas propiedades únicas de los fructanos, los hacen el ingrediente ideal para remplazar la grasa en una gran variedad de alimentos como productos lácteos, cárnicos y horneados, bajando las calorías, adicionando fibra soluble dietética (prebiótico) y promoviendo el crecimiento de bifidobacterium.

La incorporación de los fructanos de bajo y alto GP como fibras alimentarias es relativamente sencillo, sin necesidad de modificar el proceso de producción. Especialmente en el sector lácteo en donde las fibras tradicionales llevarían a la precipitación, ambos productos permiten evitar estos problemas. Al mismo tiempo puede obtenerse un mejoramiento en las propiedades organolépticas, al incorporar dichas fibras alimentarias.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar el proceso de extracción de fructanos a partir de jugo de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, realizando la separación de los fructanos mediante gradiente de etanol y temperatura, para la obtención de fracciones con diferente grado de polimerización.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se utilizaron muestras de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, obtenidas de la región de los altos del Estado de Jalisco, en edad de jima. La cabeza del agave fue dividida en porciones y cubicadas (2x1x1cm de lado aproximadamente), homogeneizadas, y guardadas en recipientes cerrados e inmediatamente congeladas a -20 °C, hasta su utilización. A cada muestra se le realizaron los análisis proximales para caracterizar la materia prima inicial y establecer los rendimientos de extracción.

EXTRACCIÓN DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

EFECTO DEL pH, TEMPERATURA Y TIEMPO

Muestras de agave (previamente congeladas -20 °C), con un peso de 20 gr se trituraron en un mortero con 20 ml de agua a temperatura ambiente, la mezcla fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, ajustado el pH a las condiciones de prueba, de acuerdo al diseño experimental factorial, evaluándose tres factores y tres niveles (temperatura: 55, 75 y 95 °C; tiempo: 30, 60 y 90 min; pH: 3,5; 4,5 y 5,5). Una vez ajustado el pH, las muestras fueron colocadas en recipientes cerrados y en baño María a la temperatura indicada por el tiempo establecido en la prueba. Al concluir el tiempo de proceso, la muestra fue enfriada y filtrada para recuperar la torta (fibra) y el extracto acuoso, aforado a un volumen de 150 ml y determinado en este extracto los grados Brix (sólidos solubles) en un refractómetro de Abbe marca Atago a 20 °C. La hidrólisis de las muestras

se determinó mediante la cuantificación de la fructosa libre producida utilizando el método de Ting (1956), en un espectrofotómetro Cintra 10e. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La evaluación estadística de los resultados del diseño experimental se llevó con la ayuda de un software estadístico Minitab 16.

FRACCIONAMIENTO POR TEMPERATURA DEL JUGO DE AGAVE

Las muestras de *Agave tequilana* Weber var. *azul* mantenidas a -20 °C fueron escaldadas por 15 min a 95 °C en agua, molidas en caliente (80 °C) y filtradas para recuperar el jugo. Alícuotas por quintuplicado de 500 ml de jugo se colocaron en refrigeración (8 °C) y congelación (-15 °C y -20 °C), durante 24 h. Al concluir dicho período las muestras refrigeradas fueron decantadas (líquido, precipitado), en tanto que las congeladas se colocaron a temperatura ambiente, colectando por separado volúmenes de 50 ml de líquido conforme ocurría el descongelamiento de cada una de las muestras.

FRACCIONAMIENTO CON ETANOL DE LA INULINA COMERCIAL Y JUGO DE AGAVE

Una solución 10% (w/v) de inulina comercial de raíz de achicoria (*Cichorium intybus*) se preparó por calentamiento a 50 °C en baño María, posteriormente se enfrió a 20 °C y centrifugó a 6000 rpm por 30 min. La solución así preparada fue fraccionada, por triplicado, con gradiente de etanol (rango de 20 a 80% v/v), centrifugada a 5000 rpm por 15 min y separado el sobrenadante del precipitado. Los precipitados obtenidos fueron deshidratados usando tres sistemas: temperatura ambiente en un cristizador, liofilización (Labconco, Freeze dry system) y secado por aspersión (Buchi, mini spray dryer B-191). Cada una de las muestras así obtenidas fueron homogeneizadas en un mortero y analizadas en un Calorímetro Diferencial de Barrido (CDB) (Perkin-Elmer Pyris 1) y cuantificados los azúcares por HPLC-RI.

Este procedimiento de fraccionamiento también fue utilizado para las muestras de jugo de agave. Adicionalmente, se evaluó por triplicado el efecto combinado del disolvente (etanol: rango de 20 a 80% v/v) y la temperatura (8 °C) en la obtención de fracciones de los fructanos contenidos en las soluciones de achicoria comercial y jugo de agave.

DESHIDRATACIÓN POR ASPERSIÓN

Para la deshidratación de las dos fracciones predominantes en el jugo de agave a escala laboratorio, fue utilizado un mini "Spray dryer" marca Buche modelo B-191. La temperatura del aire de entrada de secado varió de 186°C/193°C, la temperatura del aire de salida varió de 71 °C a 119 °C. El producto en polvo recolectado fue almacenado en recipientes de vidrio herméticos y se determinó su actividad acuosa en un medidor de actividad acuosa marca rotronic.

ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (DSC)

El análisis térmico de las muestras de fructanos, obtenidas por fraccionamiento de la inulina comercial y las dos fracciones predominantes de Agave, fue realizado en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) marca Perkin-Elmer Pyris 1.

Las pruebas se realizaron usando nitrógeno como gas de purga (20 ml/min), calentamiento de las muestras de 20 a 210 °C, a seis diferentes velocidades de calentamiento: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 °C/min. El calorímetro se calibró usando un estándar de Indio para temperatura (156 °C) y para energía (28.496 J/g). Todas las muestras para los experimentos fueron colocadas en cápsulas herméticas de acero inoxidable y cápsulas no herméticas de aluminio. La masa de muestra analizada para el caso de la inulina comercial fraccionada y los fructanos de agave fue de 2,5+0,5 mg, y de hasta 15+0,5 mg para el resto de los azúcares analizados (Glucosa, fructosa y sacarosa). Una cápsula vacía fue usada como referencia.

ANÁLISIS POR HPLC-RI

La determinación de fructanos, sacarosa, glucosa y fructosa, para cada una de las fracciones obtenidas de inulina de achicoria comercial y fructanos de jugo de Agave, se realizó en un cromatógrafo Thermo Finnigan Spectra system AS3000, provisto de un módulo de bombas P2000, un detector de índice de refracción Spectras System RI-150. La columna empleada, Phenomenex Rezex RCM Monosaccharide Ca⁺ (8%) (300 x 7,8 mm) se mantuvo, junto con su pre-columna de protección, a 80 °C con un horno de columna. La fase móvil empleada fue agua desionizada calidad cromatográfica a una velocidad de 0,3 ml/min, el volumen inyectado de muestra fue de 10 µL.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN

La determinación de la distribución de masas moleculares en las muestras o grado de polimerización GP (Average Degree of Polymerization) fue calculado de acuerdo a lo propuesto por Arias & Rodríguez (2007), Franck & De Leenheer (2002) y Vizcaíno (2006). Las muestras de fructanos fueron hidrolizadas con H₂SO₄ 0,4N, en baño María por una hora a 80°C, y cuantificados los azúcares sencillos antes y después de la hidrólisis por HPLC-RI para estimar su DP promedio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó con la ayuda de un software estadístico Minitab 16.

RESULTADOS

ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS CABEZAS Y DEL JUGO DE AGAVE

Las cabezas de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, utilizadas en el estudio, presentaron un diámetro promedio de 50 a

60 cm por una altura de 40 a 47 cm, con pesos promedio de 80,8 kg (varianza 6,69, desviación estándar 2,59; C.V. 3,2%). Las hojas mostraron una anchura en la base de la cabeza de 5 a 8 cm y un largo de 65 a 95 cm, con un peso promedio de 360 g. Las espinas por hoja representaron un peso promedio de 10,7 gm.

La Tabla I muestra la composición porcentual promedio de las muestras de las diferentes partes del agave, donde puede apreciarse que los componentes mayoritarios son los carbohidratos (71,61% B.S.) y la fibra (19,38% B.S.) presentes en la piña. La molienda del agave permitió obtener del 45 al 55% en peso de jugo, con un pH de 4,71 a 5,18 y de 32 a 38° Brix.

Mediante el análisis por HPLC-RI se logró establecer que el jugo de agave extraído contenía 97% B.S. de fructanos con GP promedio de 22. La muestra de fructanos totalmente hidrolizada con ácido sulfúrico, está constituida por 95% de fructosa y 5% de glucosa.

EFFECTO DEL pH, TEMPERATURA Y TIEMPO

El tratamiento más drástico probado (95°C, 90 min, pH 3,5), de acuerdo al diseño factorial total, para la extracción de fructanos, mostró contenidos de fructosa elevados (12,54% en peso), mientras que el procesar en las condiciones más bajas (55°C, 30 min, pH 5,5), el contenido de fructosa libre fue de solo el 1,07% en peso.

El análisis de varianza ($p < 0.05$) del diseño experimental antes mencionado, mostró que los principales factores que influyen en la hidrólisis no deseada de los fructanos son: temperatura, pH, y su interacción temperatura-pH (Tabla II). El análisis de varianza para rendimiento de extracción de fructanos, mostrado en la Tabla III, estableció que el único factor que influyó es la temperatura de extracción. Las mejores condiciones para la extracción de los fructanos, incrementando el rendimiento y evitando la hidrólisis, son las de utilizar temperaturas entre 75 y 80°C, al pH natural del agave, con una relación sólido: líquido de 1:3.

Por otra parte, si lo que se desea es hidrolizar los fructanos de agave, es necesario utilizar temperaturas superiores a los 80°C, con pH por debajo de 3,5.

FRACCIONAMIENTO DE FRUCTANOS

La Figura 1 muestra los rendimientos en el fraccionamiento de la inulina comercial, lo cual permitió separar siete fracciones en un gradiente de etanol, logrando precipitar hasta el 98% de la inulina solubilizada. Existe una regresión lineal ($R^2 = 0,98$) entre el precipitado obtenido y la concentración final de etanol, debido a que el proceso probado es acumulativo y no diferencial, dando como consecuencia que a altas concentraciones de etanol y bajas temperaturas las moléculas de inulina se desestabilicen y precipiten.

TABLA I. Análisis porcentual de *Agave tequilana* Weber var. *azul*.

TABLE I. Percent analysis of *Agave tequilana* Weber var. *azul*.

| ANÁLISIS PORCENTUAL | CABEZA | | HOJA | |
|---------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | BASE HÚMEDA | BASE SECA | BASE HÚMEDA | BASE SECA |
| Humedad | 68,0 | --- | 70,0 | --- |
| Carbohidratos | 22,9 | 71,61 | 20,5 | 68,34 |
| Proteínas | 1,5 | 4,69 | 1,3 | 4,33 |
| Fibra | 6,2 | 19,38 | 7,0 | 23,33 |
| Cenizas | 1,4 | 4,32 | 1,2 | 4,00 |

TABLA II. Análisis de varianza para azúcares reductores libres con interacciones.

TABLE II. Analysis of variance for free reducing sugars with interactions.

| FUENTE | G.L. | S.C. | C.M. | F | P |
|---------------|------|---------|--------|-------|-------|
| Temperatura | 2 | 59.883 | 29.942 | 29.48 | 0.000 |
| Tiempo | 2 | 3.374 | 1.687 | 1.66 | 0.249 |
| pH | 2 | 61.068 | 30.534 | 30.06 | 0.000 |
| Temp * Tiempo | 4 | 5.917 | 1.479 | 1.46 | 0.301 |
| Temp * pH | 4 | 84.060 | 21.015 | 20.69 | 0.000 |
| Tiempo * pH | 4 | 4.220 | 1.055 | 1.04 | 0.444 |
| Error | 8 | 8.125 | 1.016 | | |
| Total | 26 | 226.648 | | | |

TABLA III. Análisis de varianza para rendimiento con interacciones.

TABLE III. Analysis of variance for yield with interactions.

| FUENTE | G.L. | S.C. | C.M. 8 | F | P |
|---------------|------|---------|---------|--------|-------|
| Temperatura | 2 | 905.696 | 452. 48 | 453.60 | 0.000 |
| Tiempo | 2 | 2.547 | 1.273 | 1.28 | 0.315 |
| pH | 2 | 1.515 | 0.757 | 0.76 | 0.490 |
| Temp * Tiempo | 4 | 5.518 | 1.379 | 1.38 | 0.298 |
| Temp * pH | 4 | 0.954 | 0.239 | 0.24 | 0.911 |
| Error | 12 | 11.980 | 0.998 | | |
| Total | 26 | 928.210 | | | |

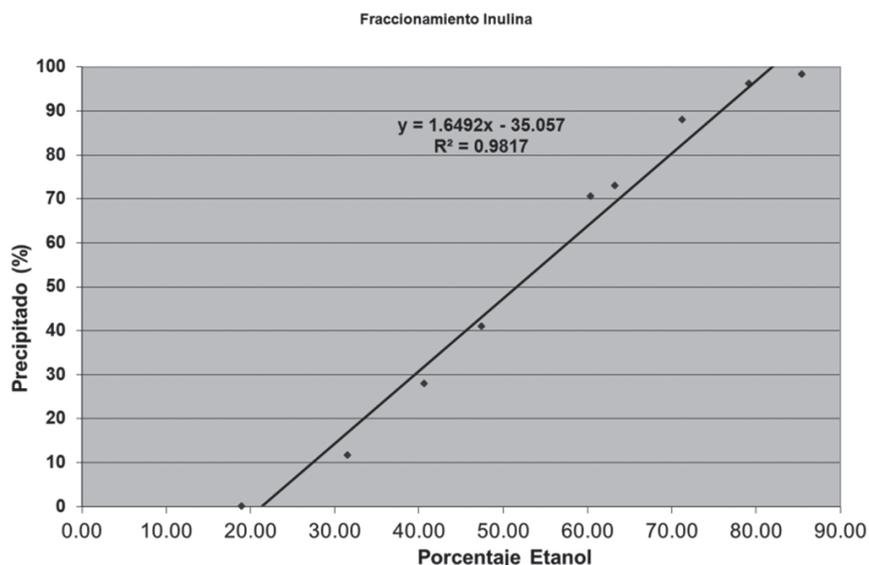


FIGURA 1. Fraccionamiento por gradiente de etanol de Inulina Comercial.

FIGURE 1. Fractionation by ethanol gradient of Commercial Inulin.

En la Figura 2 se observan los rendimientos obtenidos en el fraccionamiento de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, por medio de gradientes de etanol y temperatura, donde se pueden observar dos fracciones predominantes, las cuales dan características físicas diferentes, la fracción mayoritaria que representa más del 78% en peso, tiene un GP promedio de 31, mientras que la otra representa un GP promedio de 25, además de mantener condiciones físicas diferentes, ya que la fracción de bajo GP muestra características de un gel blanco muy viscoso, mientras que la de alto GP da una estructura más sólida y no tan higroscópica como la primera.

ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL

En la Figura 3 se presenta un termograma obtenido por CDB, mostrando un endoterma correspondiente a una transición de primer orden, como lo es la fusión de los cristales de

inulina, donde puede apreciarse la temperatura de inicio de la transición (187,714 °C), la temperatura del pico (190,309 °C) y la temperatura final de la transición (192,844 °C), así como su entalpía 10.001 J/g (delta H).

Una vez determinada esta transición de primer orden y el rango en el que ocurre para cada fracción, fue necesario establecer la velocidad de calentamiento en que podía ser observada de manera más adecuada, encontrándose que fue a la velocidad de 20°C/min en todas ellas (Figura 4). Existe una regresión lineal entre la velocidad de calentamiento (°C/min) y el punto de fusión (°C) de las muestras de inulina comercial (5 mg de muestra): P.F. = 0,306 x Velocidad + 177,06 (R² = 0,9458).

Además se establecieron las correlaciones necesarias para determinar el GP en muestras de inulina liofilizadas, secadas por aspersión, cristalizadas a temperatura ambiente y deshidratadas por calor, a las cuales se les determinó por medio de CDB su punto de fusión y entalpía, para

poder establecer su grado de polimerización promedio en número (GPn) y grado de polimerización en peso (GPw). Cabe aclarar que todas las muestras manipuladas mediante estos sistemas de eliminación de agua presentaron el pico característico para la inulina, difiriendo únicamente en el grado de cristalinidad dado por la entalpía.

En la Tabla II se observan los rangos del GP promedio de fructanos de achicoria, donde se establecieron tres rangos de GP (Alto: 21,6-27,0; Medio: 20,1-21,1; Bajo: 18,4-18,9) en función del pico de fusión en la transición de fase (168,5 °C-186,0 °C) y de acuerdo al fraccionamiento con diferente concentración de etanol (31,0-85,5% v/v).

La caracterización térmica de cada una de las fracciones obtenidas de achicoria, presentó un endoterma característico tal como lo muestran los termogramas de las

Figuras 3 y 4, permitiendo predecir de esta manera el grado de polimerización (GP) para cada uno de los picos (P.F.) con la ayuda de su entalpía ($GPn = 0,4860 \times P.F. - 63,607$ para entalpías iguales o menores de 10 J/g $R^2 0,9868$; $GPn = 1,3598 \times P.F. - 224,16$ para entalpías mayores de 10 J/g $R^2 0,9979$), ($GPw = 0,5008 \times P.F. - 60,02$ para entalpías iguales o menores de 10 J/g $R^2 0,9783$; $GPw = 0,9323 \times P.F. - 141,11$ para entalpías mayores de 10 J/g $R^2 0,9811$).

La Figura 5 presenta endotérmicos de una muestra fraccionada de agave, en donde se observan dos transiciones de fase a los 77°C y 130°C. Valores similares a los encontrados para cristales de glucosa (74 °C) y fructosa (130 °C), respectivamente (datos no mostrados). Este mismo comportamiento se observó en todas las fracciones de agave, donde sólo ocurrieron cambios en el calor específico.

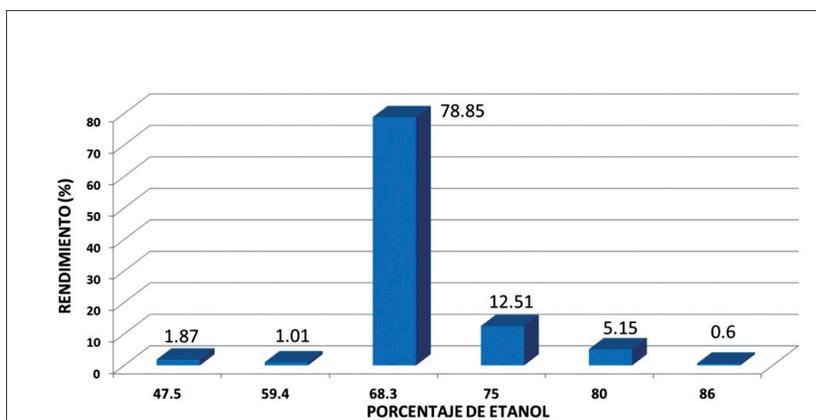


FIGURA 2. Porcentajes de las diferentes fracciones precipitadas por gradiente de etanol y temperatura en el jugo de *Agave tequilana* Weber var. azul.

FIGURE 2. Percentages of different fractions precipitated by ethanol and temperature gradient in the juice of *Agave tequilana* Weber var. azul.

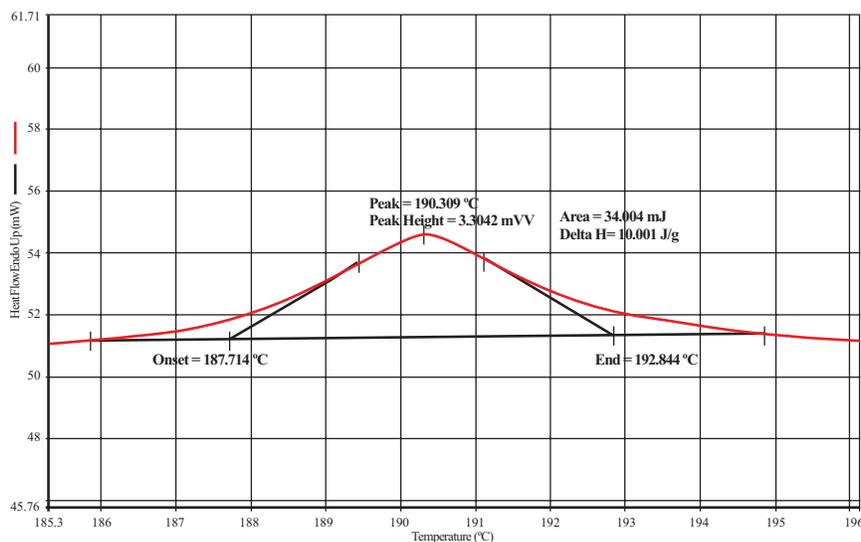


FIGURA 3. Termograma característico de inulina de achicoria.

FIGURE 3. Thermogram characteristic of chicory inulin.

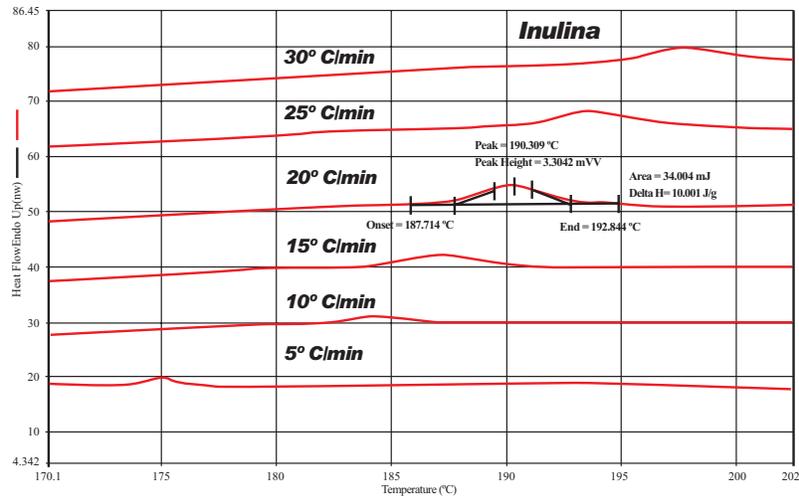


FIGURA 4. Termogramas de inulina a diferentes velocidades de calentamiento.

FIGURE 4. Inulin thermograms at different heating rates.

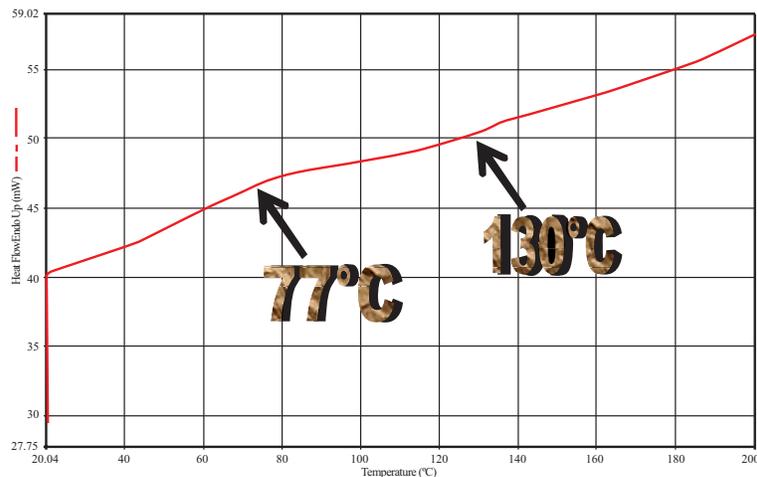


FIGURA 5. Termograma de un extracto acuoso precipitado con etanol obtenido de *Agave tequilana* Weber var. azul.

FIGURE 5. Thermogram of an aqueous extract precipitated with ethanol made from *Agave tequilana* Weber var. azul.

DISCUSIÓN

Los altos contenidos de fructanos existentes en el jugo de agave (mínimo 22%), permiten considerar esta fuente como una alternativa potencial de industrialización para obtener fructanos con diferente grado de polimerización.

El método de Ting (1956) permitió cuantificar de manera adecuada los contenidos de fructosa en las muestras de agave, pero no da resultados confiables para la glucosa, debido a la baja proporción existente comparativamente con la fructosa (proporción 95:5), lo cual muestra una alta relación fructosa/glucosa, que lo hace inoperante para cuantificar glucosa. Las proporciones de estos azúcares en las muestras de inulina de achicoria están del 85 al 90% para fructosa y del 10 al 15% para glucosa. Esto representa una ventaja

tecnológica al introducir este tipo de fructanos en alimentos destinados para personas con problemas de diabetes, debido al bajo contenido de glucosa en estos fructanos. El análisis por HPLC-RI resultó el más adecuado para establecer los contenidos de fructanos, sacarosa, glucosa y fructosa en muestras de agave hidrolizadas y sin hidrolizar, valores necesarios para establecer el GP promedio en las fracciones de fructanos de agave extraídos y precipitados.

El diseño experimental planteado permitió establecer las condiciones más adecuadas para la extracción de los fructanos, evitando su hidrólisis y maximizando el rendimiento, encontrando que es necesario extraer los fructanos a temperaturas cercanas a los 80°C y pH superior a 3,5.

Los fructanos de agave son carbohidratos cuya solubilidad depende de la temperatura del solvente, especialmente

cuando los fructanos presentan un alto GP, haciéndolos prácticamente insolubles en agua a bajas temperaturas, por ese motivo un extracto líquido de fructanos de agave, al ser enfriado, presenta una separación de fases, una más concentrada que precipita y otra más diluida, sobrenadante, de esta manera sólo por gradiente de temperatura es posible fraccionar los jugos de agave. Los resultados mostrados establecen que el fraccionamiento de los fructanos de agave ocurren debido a que las cadenas largas presentan una solubilidad menor que las cortas y por lo tanto precipitan más rápido.

Se estableció que los fructanos de agave son ligeramente solubles en agua a temperaturas menores a 50 °C. Para temperaturas más altas, esa solubilidad tiende a ser elevada sustancialmente, siendo, por lo tanto, preferible solubilizar los fructanos de agave a temperaturas entre 80 y 90 °C. El uso de altas temperaturas en el proceso de extracción resulta en menores cantidades de compuestos nitrogenados en el producto final, ya que las proteínas se desnaturalizan y precipitan.

Se estudió la hidrólisis del jugo de agave, sometiendo 50 ml de jugo a diferentes ciclos de calentamiento (121°C) en recipiente cerrado por 15 min, en cada ciclo, encontrando que la hidrólisis total de los fructanos de agave ocurre a los 4 ciclos. También se observó que la hidrólisis se dispara cuando el pH del sistema está por debajo de 3,5, a pH superior a 4,5, los fructanos de agave permanecieron prácticamente estables.

Basándonos en que los fructanos son solubles en agua, y que la solubilidad es función de la temperatura, es lógico pensar que es posible fraccionar y a la vez concentrar las fracciones de fructanos modificando la temperatura. Adicionalmente es sabido que sólo los polisacáridos de bajo peso molecular son solubles en soluciones de etanol al 80%, por lo tanto, el sistema de fraccionamiento propuesto en este trabajo es el de usar estas dos alternativas para separar fracciones de fructanos del agave. Los datos permiten establecer que es posible precipitar selectivamente usando concentración de etanol y temperatura, fracciones de fructanos presumiblemente con diferente GP, tal como es mostrado en la Tabla IV.

Se han reportado temperaturas de fusión de inulina de achicoria fraccionada en el rango de 151 a 186 °C (Blecker *et al.* 2003), mientras que las obtenidas en el presente trabajo fueron de 165 a 195 °C, debido a que sólo se analizaron por CDB los precipitados y no las fracciones solubles que presentan GP menores y por consiguiente temperaturas de fusión por debajo de los 150°C. Por otra parte la fusión de la inulina no es considerada como una fusión ascendente de cada polímero con diferente GP en la muestra, sino como la fusión de una estructura cristalina global, tal y como es apreciada en los termogramas de las Figuras 3 y 4. Esto es un aspecto muy importante al considerar muestras que contienen inulina de achicoria con otros carbohidratos, y que son caracterizadas por análisis calorimétrico, debido a que el pico de fusión tenderá a moverse dependiendo de los constituyentes mayoritarios y por consiguiente su grado de polimerización promedio. Así es que, para estimar de manera adecuada el grado de polimerización por medio de CDB, es necesario que la muestra esté libre de azúcares sencillos.

Las muestras de agave mantuvieron una inflexión o pico en la región de 50 a 80 °C (Fig. 5), concordando con datos reportados para geles de inulina que muestran un pico endotérmico a los 80 °C, o bien temperaturas de transición vítrea (Tg) de agave en el rango de 50° a 66 °C (Siow *et al.* 2005), mientras que la glucosa monohidratada da también un pico endotérmico a los 78,8 °C. En lo que respecta a la inflexión cercana a los 130 °C, ésta puede ser debida a la gran cantidad de fructosas presentes en el fructano ya que la fructosa presenta su P.F. en ese valor. También existen reportes para inulinas comerciales de achicoria que muestran Tg en el rango de 105° a 148 °C. Todas las fracciones de agave obtenidas y deshidratadas de diferentes maneras no presentaron el pico característico de fusión de la inulina, lo que supone una estructura conformacional diferente más ramificada y más amorfa, dando únicamente diferentes temperaturas de transición vítrea, indicando que el rango de ellas puede ser una función del GP y de lo ramificado de la estructura. El pico de fusión de la inulina de achicoria para índice de cristalinidad similar, se incrementa gradualmente a medida que aumenta el GP.

TABLA IV. Rangos de GP de muestras de inulina fraccionadas por gradiente de etanol.

TABLE IV. GP Ranges inulin samples fractionated by gradient ethanol.

| ETANOL (%) | PICO MÁXIMO (°C) | GPn | GPw |
|-------------|------------------|-------------|-------------|
| 31.0 – 47.5 | 175.0 – 186.0 | 21.6 – 27.0 | 27.6 – 33.2 |
| 60.4 – 63.4 | 172.0 – 174.0 | 20.1 – 21.1 | 26.1 – 27.1 |
| 71.2 – 85.5 | 168.5 – 169.5 | 18.4 – 18.9 | 24.4 – 24.9 |

El análisis por CDB permitió establecer la hipótesis de que el agave muestra una estructura diferente en sus fructanos al de la inulina. Hipótesis que es necesario probar por otros métodos y establecer una posible relación entre las transiciones de fase obtenidas para extractos de agave, así como su Tg y su grado de polimerización promedio en una estructura diferente a la inulina y presumiblemente más ramificada. Industrialmente el fructano más utilizado y estudiado es la inulina de achicoria (*Cichorium intybus*), pero los fructanos obtenidos de *Agave tequilana* var. *azul* pudiesen ser una excelente alternativa de uso como aditivos funcionales y prebióticos en la industria alimentaria en un futuro.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Educación Tecnológica (COSNET) y la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST).

BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, C.C. & M.A. RODRÍGUEZ. 2007. Informe técnico del proyecto: Determinación bioquímica de la madurez del *Agave tequilana* Weber var. *azul* en el laboratorio y su implementación en campo. México. C.R.T.
- BLECKER, C., P. CHEVALIER, C. FOUNGIES, C. VAN HERCK, C. DEROANNE & M. PAQUOT. 2003. Characterization of different inulin samples by DSC. Influence of polymerization degree on melting temperature. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (71): 215-224.
- FRANCK, A. & L. DE LEENHEER. 2002. Inulin. In: S. de Baets, E.J. Vandamme & A. Steinbüchel (eds.). *Biopolymers. Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*. Vol. 6. Wiley-VHC; Weinheim, Germany. pp. 439-479.
- KAUR, N. & A.K. GUPTA. 2002. Applications of inulin and oligofructosa in health and nutrition. *Journal of Bioscience* 27(7): 703-714.
- MANCILLA-MARGALLI, N.A. & M.G. LÓPEZ. 2006. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(20): 7832-7839.
- SILVER, B.S. 2003. Processes for making novel inulin products. US Patent 6,569,488 B2. May 27.
- SIOW, L.F., M.H. LIM, J.E. URIAS-SILVAS & M.G. LÓPEZ. 2005. Thermal properties of *Agave* fructans compared to commercial fructans. 2005 IFT Annual Meeting, July 15-20 - New Orleans, Louisiana.
- TING, S.V. 1956. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugars and fructose in citrus juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4 b(3): 263-266.
- VIZCAÍNO, R.L.A. 2006. Determinación del efecto de macronutrientes y reguladores de crecimiento en la producción de fructanos a partir de cultivos de células en suspensión de *Agave inaequidens* spp. *inaequidens* y *Agave tequilana* Weber var. *azul*. Tesis. Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco. México. 87 pp.

Recibido: 16.10.10
Aceptado: 11.12.10