

ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE INULINA DE AGAVE EN LA PRODUCCIÓN DE JARABE DE ALTA FRUCTOSA EMPLEANDO INULINASA COMERCIAL DE *ASPERGILLUS NIGER*

Rocha Flores Edson Roberto (1), González Ponce María del Refugio (2)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [edsonrocha394@gmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [refugio.gonzalez@itesi.edu.mx]

Resumen

En el siguiente trabajo se presenta un estudio de la etapa de hidrólisis enzimática de inulina de *Agave tequilana* Weber var. *azul* utilizando la enzima comercial inulinasa de *Aspergillus niger* con el fin de determinar las mejores condiciones de operación de esta etapa. Por lo que se llevó a cabo un diseño de experimentos factorial 3^2 , considerando como variables manipulables la temperatura (45°C, 50°C y 55°C) y el pH (4.6, 5 y 5.5), y como variables de respuesta el porcentaje de hidrólisis en base al contenido de azúcares reductores y la concentración de Hidroximetilfurfural (HMF). De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo apreciar el mayor porcentaje de hidrólisis (71 %) y un contenido de HMF (1.49 mg/Kg) con valores por debajo de los parámetros de norma trabajando a una temperatura de 55 °C y pH de 5.5 respectivamente.

Abstract

The following work a study of the enzymatic hydrolysis stage of inulin of *Agave tequilana* Weber var. *azul* using the commercial inulinase enzyme *Aspergillus niger* in order to determine the best operating conditions of this stage. Therefore, a factorial 3^2 design was used, considering temperature (45 ° C, 50 ° C and 55 ° C) and pH (4.6, 5 and 5.5) as manipulable variables, and as response variables percentage of hydrolysis based on the content of reducing sugars and the concentration of Hydroxymethylfurfural (HMF). According to the results, the highest percentage of hydrolysis (71%) and a HMF content (1.49 mg / kg) were observed with values below the standard parameters working at a temperature of 55 ° C and pH 5.5 respectively

Palabras Clave

Fructanos de agave; Inulinasa; Jarabe de alta fructosa; HMF; Hidrolisis enzimática.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* se considera originario de México, donde se encuentran 272 de las 310 especies reportadas, con 135 especies endémicas. Las plantas del género *Agave* almacenan fructanos (polímeros de fructosa) como principal carbohidrato de reserva [1]. Varias especies son económicamente importantes, entre ellas el *Agave tequilana* Weber azul, el cual constituye la materia prima para la producción de tequila, también se utiliza para hacer jarabe y fructooligosacáridos (FOS) en polvo como otra alternativa industrial debido a su alto contenido de fructanos y más recientemente, debido a la creciente demanda de los jarabes de alta fructosa de agave [2]. Cabe destacar que el polisacárido predominante en esta planta es la inulina, que representa entre un 85 y 90 % de los carbohidratos [3].

Los fructooligosacáridos son carbohidratos formados por monómeros de fructosa con muy pocos residuos de glucosa casi siempre al final de la cadena; también son conocidos como fructanos. Los fructanos de *Agave* disminuyen los niveles de glucosa y colesterol sérico e incrementan la absorción de calcio en los huesos [4]. Si las fructosas presentan una unión predominante o exclusiva a través del enlace β -(2-1)-fructosil-fructosa reciben el nombre genérico de inulina, derivado de la planta *Inula helanum* o bien si presentan enlaces β -(2-6) fructosil-fructosa reciben el nombre de levano [5]. La inulina se encuentra generalmente como un carbohidrato de almacenamiento en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas como la “tupinambo” (*Helianthus tuberosus*), la achicoria (*Cichorium intybus*) y la dalia (*Dahlia* spp.) [6].

La inulina es una fibra soluble que el cuerpo no es capaz de digerir y por tanto promueve los movimientos intestinales, favoreciendo la eliminación de toxinas; es un potente estimulador del crecimiento de la flora intestinal benéfica, ayuda en la correcta asimilación de nutrientes como calcio y magnesio, mantiene los niveles de colesterol bajos y evita la acumulación de triglicéridos, su aporte de energía y nutrientes es mínimo, y es por esta particularidad que es recomendable en las dietas [5].

Es comercializada como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual, tiene 10 % de dulzor de la sacarosa. Su viscosidad es alrededor de los 10 °C en una solución acuosa a 5% es la menor y es una característica para la formación de geles, además de su uso como sustituto de grasas [7].

Según la Norma Mexicana NMX, 2008 el jarabe de agave azul es la sustancia dulce natural producida por hidrólisis de sus fructanos y no debe contener aditivos alimentarios, almidones, melazas, glucosa, dextrinas, fructosa u otros azúcares de otro origen. La hidrólisis es el procedimiento, químico térmico, enzimático o la combinación de los anteriores, con el propósito de desdoblar los carbohidratos principalmente la inulina presente en el *Agave* [8].

La inulina puede ser hidrolizada de dos maneras: 1) mediante la hidrólisis química, y 2) la hidrólisis enzimática. La hidrólisis química se lleva a cabo por el proceso de hidrólisis ácida, aunque este método produce sustancias de color no deseado debido a la formación de difructosa anhídrida e hidroximetilfurfural (HMF), que causan sabores desagradables y aromas en el producto terminado, este compuesto carece de propiedades edulcorantes. Por esta razón, la producción de inulina por medio de la utilización de la enzima inulinasa es más recomendable, por su alta especificidad de acción de las enzimas lo que hace que no se produzcan reacciones secundarias inesperadas, además de alcanzar rendimientos de hasta 95 % de fructosa pura [9].

En la actualidad el jarabe de agave azul ha tenido un gran incremento de su producción y aceptación como endulzante en México y otros países [10]. Por tanto, es necesario conocer sus características físicas y químicas y los carbohidratos que contiene, lo que permitirá validar su autenticidad, calidad e impacto en la salud. Siendo las enzimas inulinasas las más eficientes para la producción de dicho jarabe, debido a su alto rendimiento hidrolítico y especificidad de la misma sobre los fructanos de agave. De ahí la importancia de realizar un estudio del proceso de la etapa de hidrólisis enzimática de la inulina comercial de *Agave tequilana* Weber var. azul utilizando la enzima comercial inulinasa de *Aspergillus niger* con el fin de determinar las mejores condiciones de operación de esta etapa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los ensayos de hidrólisis se hizo uso de inulina soluble comercial marca Preventy®, proveniente de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, la enzima empleada fue inulinasa de *Aspergillus niger* liofilizada de Sigma-Aldrich, los reactivos empleados para la determinación enzimática fueron fructosa estándar, ácido 3,5-DNS, hidróxido de sodio, sal de Rochelle, fenol, sulfito de sodio, ácido cítrico monohidratado, fosfato disódico, carbonato de sodio, solución Carrez I y II. Se usó el equipo UV-vis Cary 50 para realizar las determinaciones de azúcares reductores e HMF.

Posteriormente se propuso un diseño de experimentos factorial 3^2 , considerando como variables manipulables la temperatura (45°C, 50°C y 55°C) y el pH (4.6, 5 y 5.5), y como variables de respuesta el porcentaje de hidrólisis en base al contenido de azúcares reductores y la concentración de HMF. La enzima liofilizada se restauró 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.

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo con base en el diseño de experimentos antes mencionado. Donde en cada ensayo se colocaron 500 µL de solución de inulina al 5% en buffer de fosfatos en un tubo eppendorf de 600 µL, posteriormente se adicionó la solución de enzima (1:4) y se colocó en la incubadora por un tiempo de 1 h. Una vez finalizado el tiempo de hidrólisis se determinó el porcentaje de hidrólisis empleando el método de DNS, así como el contenido de HMF por el método de White.

Una vez obtenido los resultados de hidrólisis estos fueron analizados mediante un ANOVA factorial con un nivel de significancia $p < 0.05$ y prueba de interacción de efectos empleando el Software minitab®. Una vez determinadas las mejores condiciones de operación de la enzima se realizó una prueba de fructosa para determinar la cantidad neta hidrolizada mediante el uso de un kit de fructosa F-20 Sigma-Aldrich®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para cada ensayo de hidrólisis, donde se puede observar el mayor porcentaje de hidrólisis a una temperatura de 55°C y pH de 5.5 con valores de HMF por debajo de la norma.

Tabla 1: Porcentaje de hidrólisis y contenido de Hidroximetilfurfural en la hidrólisis enzimática de inulina de agave.

Tratamiento	Temperatura °C	pH	Grado de hidrólisis (%)	Contenido de HMF (mg/Kg)
1	45	4.6	49.9	0.02
2	45	5	66.4	0.60
3	45	5.5	60.1	0.43
4	50	4.6	37.1	0.69
5	50	5	61.2	0.58
6	50	5.5	70.4	1.13
7	55	4.6	70.3	1.40
8	55	5	68.6	1.51
9	55	5.5	71.3	1.49

Una vez obtenidos los valores de las variables de respuestas se procedió a realizar un análisis estadístico a los datos generados mediante un ANOVA factorial. Las pruebas de interacción de los efectos para las variables de respuesta concentración de azúcares reductores y contenido de HMF se muestran en la tabla 2 y tabla 3 respectivamente.

Tabla 2: Análisis de efectos en la variable de respuesta Concentración de azúcares reductores.

Fuente	Suma de cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	798.05	27.66	0.000
Lineal	541.30	37.52	0.000
Temperatura	243.77	33.80	0.000
pH	297.53	41.25	0.000
Interacciones de 2 términos	256.75	17.80	0.000
Temperatura * pH	256.75	17.80	0.000
Error	64.91		
Total	862.97		

Fuente	Suma de cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	6.76959	314.27	0.000
Lineal	6.15150	571.15	0.000
Temperatura	5.70259	1058.94	0.000
pH	0.44892	83.36	0.000
Interacciones de 2 términos	0.61808	57.39	0.000
Temperatura * pH	0.61808	57.39	0.000
Error	0.04847		
Total	6.81805		

Tabla 3: Análisis de efectos en la variable de respuesta Contenido de hidroximetilfurfural.

Como se puede apreciar en la tabla 2 los factores de temperatura y pH afectaron de manera significativa el porcentaje de hidrólisis en la inulina de agave, siendo la variable pH la que mostro un mayor efecto en el porcentaje hidrolizado con relación a la variable temperatura. Mientras que para el caso del contenido de HMF (tabla 3) se puede apreciar que también los factores de temperatura y pH afectaron significativamente la cantidad de HMF presente en la hidrólisis de inulina de agave, siendo para este caso la variable temperatura quien afecto más la formación de dicho compuesto.

CONCLUSIONES

Se logró probar la actividad enzimática de la enzima comercial inulinasa de *Aspergillus niger* sobre la hidrólisis de inulina de *Agave tequilana* Weber var. azul.

Se realizó el análisis de hidrólisis enzimática en base al diseño experimental establecido donde se pudo observar mayor formación de HMF al aumentar la temperatura comparado con el porcentaje de hidrólisis donde el pH causo mayor variabilidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos aseverar que la mejor condición de hidrólisis de inulina fue trabajando a una temperatura de 55 °C y pH de 5.5 obteniendo un valor de hidrolizado del

71% y una concentración de HMF de 1.49 mg/Kg parámetro dentro del límite permisible por la normatividad mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece 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.

REFERENCIAS

- [1] Mancilla-Margalli, N. A., and M. G. López. (2006). Watersoluble carbohydrates and fructan structures patterns from Agave and Dasyliion species. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7832-7839
- [2] Montañez Soto, J., Venegas González, J., Vivar Vera, M., y Ramos Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave Tequilana Weber Azul. *BIOAGRO*, 23(3), 199-206.
- [3] Ibarra-Hernández, E.B., Botero Gonzalez, J.F. and Cortez Amador, C. (2010). *Ingeniería de tequila 1° Edicion*. Bogota, Colombia. 12-37 pp.
- [4] García-Vieyra, M. I., and M. G. López. (2010). Agave fructans prevent bone loss by stimulating bone formation. In: Abstracts of 239 American Chemical Society (ACS) National Meeting. *Agric. Food Chem. Division*. San Francisco CA. EE.UU.
- [5] Castillo, A. and Chamy, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria* 1: 235-245.
- [6] Huerta Alcocer, S., Larralde Corona, C., y Narváez Zapata, J. (2014). Application of agave subproducts for production of microbial inulinases. *BIO CIENCIAS*, 3(1), 4-16.
- [7] Monroy Rodríguez, W. (2010). Determinación de Inulina en once especies vegetales. *Ingeniero en Ciencia y Tecnología de alimentos*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- [8] NMX-FF-110-SCFI-2008. (s.f.). Alimentos jarabe de agave 100% especificaciones y métodos de prueba.
- [9] 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.
- [10] Partida, V., A. Camacho, and A. J. Martinez. (1998). Method of producing fructose syrup from agave plants. US patent 5 846 333