

Evaluación de ácidos como catalizadores en la hidrólisis de inulina de *Agave Tequilana* Weber var. Azul

GONZÁLEZ-PONCE, María del Refugio*†, BERNAL-ARROYO, Beatriz, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Claudia Ernestina y SEGOVIANO-GARFÍAS, Nezahualcoyolt´

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). Irapuato, Gto 36821, México

Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca. México

Recibido Agosto 15, 2016; Aceptado Septiembre 17, 2016

Resumen

En este trabajo se muestra un estudio del efecto del ácido clorhídrico y sulfúrico sobre la hidrólisis de inulina de agave en la producción de miel. A fin de determinar las mejores condiciones de operación de esta etapa, se aplicó un diseño factorial 23 empleando como factores la temperatura, el tipo y la concentración del ácido, y como variables respuesta el porcentaje de hidrólisis medido como contenido de azúcares reductores (AR) con el método DNS y la concentración de 5-Hidroximetilfurfural (HMF) utilizando el método de White. Una vez realizado el análisis de varianza de los ensayos y la prueba de efectos se determinó que todos los factores e interacciones son estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$. Siendo el tipo de ácido el factor más significativo. Las condiciones de operación a las que se alcanzó mayor porcentaje de hidrólisis del 79% y contenido de HMF dentro de parámetros de norma fueron empleando ácido sulfúrico al 0.5% con una temperatura de 80 °C.

Hidrólisis ácida, agave, miel de agave, diseño factorial

Abstract

This paper presents a study of the effect of hydrochloric and sulfuric acid on the hydrolysis of inulin from agave in the production of syrup. In order to determine the best operating conditions of this stage, a factorial design 23 was applied using the temperature, type and concentration of acid as factors, whilst as response variables were used the percentage of hydrolysis measured as the content of reducing sugars (AR) with DNS method and the concentration of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) using the method of White. Once completed the analysis of variance of tests and test effects, it was determined that all factors and interactions are statistically significant at value of $p < 0.05$. It is must pointed out that the type of acid is the most significant factor. The operating conditions to which the greatest percentage of hydrolysis of 79% was reached and HMF content, within standard parameters, were using 0.5% sulfuric acid at a temperature of 80 °C.

Acid hydrolysis, agave, agave syrup, factorial design

Citación: GONZÁLEZ-PONCE, María del Refugio, BERNAL-ARROYO, Beatriz, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Claudia Ernestina y SEGOVIANO-GARFÍAS, Nezahualcoyolt. Evaluación de ácidos como catalizadores en la hidrólisis de inulina de *Agave Tequilana* Weber var. Azul. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2016. 3-8: 33-38.

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

† Investigador contribuyente como primer autor.

Introducción

El Agave es un cultivo importante en la industria en México debido a las numerosas bebidas fermentadas y destiladas obtenidas a partir de la gran variedad de especies disponibles (Ávila y col, 2011). El *Agave tequilana* Weber variedad azul, es una de las especies económicamente más importantes ya que constituye la materia prima para la producción de tequila (Montañez y col, 2011).

Esta industria demanda anualmente un millón de toneladas de cabezas de agave, lo que genera un volumen similar de hojas que no se utilizan, esto ha llevado a la búsqueda de productos alternativos, como son la miel de agave y la inulina, para aprovechar estos residuos.

La miel de agave se define como la sustancia dulce natural producida por la hidrólisis de los oligosacáridos del agave (NMX FF110-SCI-2008), en los últimos 10 años este edulcorante ha tenido mucha demanda como sustituto del azúcar debido a su bajo índice glucémico (Foster-Powell, y col, 2002), capacidad antioxidante (Phillips y col, 2009), y propiedades antibacteriales (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983). Existen diversos métodos para la hidrólisis del jugo de agave como son hidrólisis térmica, ácido-térmica y enzimática.

La hidrólisis térmica tiene la desventaja que durante el proceso pueden producirse algunos fenómenos desfavorables tales como las reacciones de Maillard que resultan en compuestos indeseables, tales como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que causa sabores desagradables y aromas en el producto terminado (Mancilla-Margalli y López, 2002 ; Waleckx y col, 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.

Sin embargo, este proceso tiende a ser más caro que el método tradicional debido a los gastos de las enzimas (agregar enzimática).

La hidrólisis ácida es el método más utilizado debido a su eficiencia y bajo costo (Kumar y col., 2009 y Saucedo y col, 2010) sin embargo, dependiendo de la intensidad de las condiciones de hidrólisis (temperatura, tiempo de reacción y concentración de ácido), se puede tener la formación de subproductos tóxicos como HMF (Saucedo -Luna y col., 2010).

Por lo tanto con el fin de aumentar el rendimiento de fructosa en la producción de miel, manteniendo los límites de generación de subproductos como el HMF es necesario hacer una evaluación de la hidrólisis ácido térmico a fin de determinar las mejores condiciones de operación para esta etapa.

Para el desarrollo de este trabajo primero se hizo una evaluación del porcentaje de hidrólisis utilizando diferentes condiciones (temperatura, tipo y concentración de ácido) mediante el empleo de un diseño factorial 3^2 , sin dejar de lado la concentración de HMF, posteriormente se hizo un análisis de varianza de factores para determinar si estos o sus interacciones tienen o no efecto significativo sobre ambas variables respuesta y con ello determinar las condiciones de operación más adecuadas.

Materiales y métodos

Materiales

Para los ensayos de hidrólisis se empleó inulina soluble comercial marca Preventy® proveniente de *Agave tequilana* Weber variedad azul, fructosa estándar, HCl, H₂SO₄, 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, todos grado analítico (Sigma-Aldrich). Se usó el equipo UV-vis Cary 50 para las determinaciones de azúcares reductores y HMF.

Diseño de experimentos

Se propuso un diseño factorial 2³ para evaluar el efecto de la temperatura (80°C y 95°C), el tipo de ácido (HCl y H₂SO₄) y la concentración del ácido (0.3 % y 0.5 %), en la hidrólisis de inulina de agave, considerando como variables respuesta el porcentaje de hidrólisis, medido como el contenido de azúcares reductores, y la concentración de HMF.

Hidrólisis ácido-térmica

Azúcares reductores en Inulina soluble.

Se preparó una solución al 30% p/v de inulina de agave.

Previo a someter la solución de inulina a la hidrólisis se evaluó el contenido inicial de azúcares reductores a 540nm utilizando el método DNS, para ello se empleó una curva de calibración de fructosa estándar.

Hidrólisis de inulina.

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo en base al diseño de experimentos propuesto.

Se colocaron 50 ml de solución de inulina al 30% en un matraz Erlenmeyer, se le adicionó la solución de ácido y se colocó en la parrilla eléctrica por un tiempo de 1h, la concentración de ácido y temperatura se varió según el tratamiento. Una vez finalizada la etapa de hidrólisis las muestras fueron neutralizadas con carbonato de sodio 2 M, posteriormente se determinaron tanto el contenido de azúcares reductores a 540 nm por el método DNS (Miller 1959), como el HMF por el método espectrofotométrico White (Zappalá, 2005).

Análisis de datos. Los resultados experimentales fueron analizados mediante un ANOVA factorial con un nivel de significancia $p < 0.05$ y prueba de interacción de efectos empleando el Software JMP statistical Discovery® de SAS. Cabe mencionar que todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y completamente al azar.

Resultados y discusión

Diseño de experimentos. En la tabla 1. Se muestra el diseño factorial empleado para los ensayos de hidrólisis de inulina de agave.

Tratamiento	Valor real			Valor codificado		
	X ₁	X ₂ (% w/v)	X ₃ (°C)	x ₁	x ₂	x ₃
1	HCl	0.3	80	-1	-1	-1
2	HCl	0.5	80	-1	1	-1
3	HCl	0.3	95	-1	-1	1
4	HCl	0.5	95	-1	1	1
5	H ₂ SO ₄	0.3	80	1	-1	-1
6	H ₂ SO ₄	0.5	80	1	1	-1
7	H ₂ SO ₄	0.3	95	1	-1	1
8	H ₂ SO ₄	0.5	95	1	1	1

Tabla 1 Diseño factorial 2³ para la hidrólisis de inulina de agave

X₁, x₁: Valor real y codificado del tipo de ácido

X₂, x₂: Valor real y codificado de concentración de ácido

X₃, x₃: Valor real y codificado de temperatura

Azúcares reductores en Inulina soluble.

Para la determinación de la concentración de los azúcares reductores se empleó una curva de calibración de fructosa estándar, mostrada en el Grafico 1.

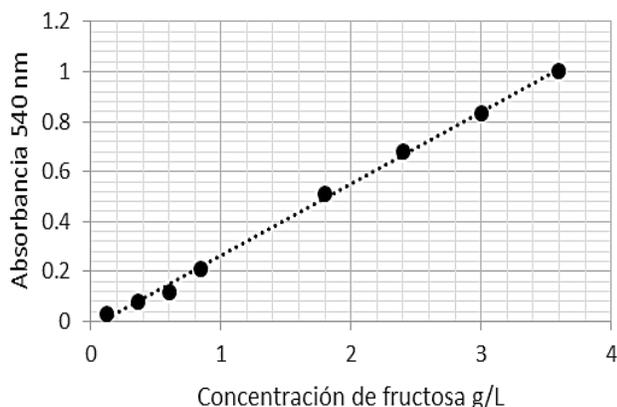


Grafico 1 Curva de calibración de fructosa medida a 540 nm

La ecuación de la recta empleada con un valor de ajuste R^2 de 0.99 fue:

$$y = 0.2876x - 0.0253 \quad (1)$$

Se encontró que la solución al 30% de inulina comercial contiene inicialmente 23 g/L de azúcares reductores, lo que equivale a 7.6% es decir no es inulina completamente pura. Este dato es importante para ser considerado en el resultado final de hidrólisis.

Hidrólisis de inulina.

Los resultados obtenidos de la concentración de azúcares reductores y contenido de hidroximetilfurfural en la hidrólisis ácido-térmica de la inulina de agave para cada uno de los tratamientos del diseño de experimentos se muestra en la Tabla 2 y 3 respectivamente.

Tratamiento	Valor codificado			Variable respuesta(Azúcares reductores g/L)			
	x ₁	x ₂	x ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	-1	-1	-1	106.83	113.49	108.95	117.4
2	-1	1	-1	136.16	135.01	140.65	147.49
3	-1	-1	1	161.05	175.32	173.13	178.06
4	-1	1	1	103.04	100.92	105.27	99.192
5	1	-1	-1	160.52	152.32	146.03	152.21
6	1	1	-1	204.24	216.8	239.8	219.93
7	1	-1	1	173.47	168.14	184.25	178.78
8	1	1	1	245.82	249.91	228.11	231.66

Tabla 2 Respuesta de azúcares reductores en la hidrólisis ácido-térmica de inulina de agave

R₁, R₂, R₃, R₄: Réplica 1, 2, 3 y 4 respectivamente

Tratamiento	Valor codificado			Variable respuesta (Hidroximetilfurfural mg/Kg)			
	x ₁	x ₂	x ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	-1	-1	-1	14.04	13.27	10.76	11.6
2	-1	1	-1	50.63	48.56	29.89	42.93
3	-1	-1	1	43.68	47.21	49.85	49.92
4	-1	1	1	73.2	68.74	62.66	67.52
5	1	-1	-1	44.32	45.68	48.51	46.82
6	1	1	-1	39.77	33.12	29.03	31.42
7	1	-1	1	31.03	31.07	33.08	33.29
8	1	1	1	48.98	50.27	53.89	52.185

Tabla 3 Respuesta de hidroximetilfurfural en la hidrólisis ácido térmica de inulina de agave

R₁, R₂, R₃, R₄: Réplica 1, 2, 3 y 4 respectivamente

En la tabla 2 se observa que los tratamientos con mayor concentración de azúcares reductores (mayor porcentaje de hidrólisis) son el 6 y 8 correspondientes a H₂SO₄ al 0.5 % con 80 y 95 °C respectivamente. Sin embargo con respecto al contenido de hidroximetilfurfural para estos mismos tratamientos se observa que para el tratamiento 8 este parámetro rebasa los 40 mg/kg que es el límite permitido en base a la norma NMX-FF-110-SCFI-2008.- Alimentos jarabe de agave 100% especificaciones y métodos de prueba-, y para el tratamiento 6 este parámetro es de 33 mg/kg.

Análisis de datos.

Se determinó mediante un ANOVA factorial que las medias de todos los tratamientos tienen una diferencia significativa, esto se afirma con una probabilidad del 96%.

En la tabla 4 se muestra la prueba de interacción de efectos para la variable respuesta concentración de azúcares reductores,

Fuente	Suma de cuadrados	Relación F	Prob>F
Tipo ácido	83.8683	9.3059	0.0055
Concentración	1929.6506	214.1120	<.0001
Temperatura	1745.9652	193.7304	<.0001
Tipo ácido*Concentración	1234.8055	137.0127	<.0001
Tipo ácido *Temperatura	1328.3501	147.3923	<.0001
Concentración*Temperatura	145.0844	16.0984	0.0005
Tipo ácido*Concentración *Temperatura	1122.7192	124.5757	<.0001

Tabla 4 Prueba de efectos de la variable respuesta “Concentración de azúcares reductores”

Donde se puede observar que los factores temperatura, concentración y tipo de ácido así como sus interacciones excepto la de tipo de ácido-temperatura afectaron de manera significativa la cantidad de inulina hidrolizada durante los tratamientos, siendo el factor tipo de ácido el que presenta mayor efecto seguido de la interacción entre tipo de ácido y concentración.

Así mismo se hizo el análisis estadístico de datos para la variable respuesta de la concentración de hidroximetilfurfural, encontrándose que si existen diferencias significativas de las medias de los tratamientos con un factor de correlación de 0.97. En la tabla 5 se muestra la prueba de interacción de efectos para esta variable respuesta.

Fuente	Suma de cuadrados	Relación F	Prob>F
Tipo ácido	36349.298	359.0862	<.0001
Concentración	3248.635	32.0925	<.0001
Temperatura	2518.463	24.8793	<.0001
Tipo ácido*Concentración	14477.572	143.0205	<.0001
Tipo ácido *Temperatura	193.617	1.9127	0.1790
Concentración *Temperatura	3832.085	37.8563	<.0001
Tipo ácido *Concentración *Temperatura	3581.391	35.3797	<.0001

Tabla 5 Prueba de efectos de la variable respuesta “Concentración de hidroximetilfurfural”

Donde se puede observar que todos los factores así como sus interacciones afectan de manera significativa la concentración de hidroximetilfurfural durante los tratamientos, siendo el factor concentración se ácido y temperatura los que presentan mayor efecto, ya que bajo condiciones ácidas y alta temperatura se favorece la formación de este compuesto.

Conclusiones

Se observó mayor formación de HMF y concentración de AR cuando se aplican condiciones de temperatura y concentraciones de ácido más drásticos.

Con el empleo de HCl se logró un menor porcentaje de hidrólisis que va del 36% - 62% comparado con el H₂SO₄ donde se obtuvieron porcentaje de hidrólisis de 65-86%.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos aseverar que la mejor condición de hidrólisis de inulina fue usando H₂SO₄ al 0.5% a una temperatura de 80°C ya que se obtuvo un buen porcentaje de hidrolizado de 79% y una concentración de 33 mg/kg de HMF parámetro dentro del límite permisible por la normatividad mexicana.

Referencias

Ávila Fernández, A., Galicia Lagunas, N., Rodríguez Alegría, M., Olvera, C., y López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380-386

Davidson, J. R., and Ortiz de Montellano, B. R. (1983). The bacterial properties of an Aztec wound remedy. *Journal of Ethnopharmacology*, 8, 149-161.

Foster-Powell, K., Holt, S. H. A., and Brand-Miller, J. C. (2002). International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 5–56.

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. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 420-428.

Montañez, J., Venegas, J., Vivar, M. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequiliana* Weber Azul. *Bioagro*. 23(3): 199-206.

NMX-FF-110-SCFI-2008. (2009) Alimentos jarabe de agave 100% especificaciones y métodos de prueba. Secretaría de Economía. Diario Oficial de la Federación (2009).

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.

Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Rico, J. L., & Campos-García, J. (2010). Optimization of acid hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. *Revista mexicana de ingeniería química*, 9(1), 91-97.

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

Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. (2005) Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control* 16: 273–277.