**APÉNDICE A**

**MÉTODO DE PRUEBA PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE CARBOHIDRATOS DEL JARABE DE AGAVE**

**1. Introducción.**

El método de prueba busca determinar los siguientes componentes característicos del jarabe de agave y evidenciar los marcadores que demuestren la adulteración del mismo en base a lo siguiente:

Perfil de carbohidratos, antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa.

Perfil de carbohidratos antes y fructosa después de hidrólisis con fructanasa.

Aumento de los niveles de glucosa y fructosa después del tratamiento con amiloglucosidasa y fructanasa como potencial marcador de adulteración con jarabe de maíz o fructooligosacáridos (FOS).

Determinación de fructosa, glucosa, difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol e hidroximetilfurfural (HMF).

Cuantificación de fructanos y determinación del DP promedio.

**2. Objetivo y campo de aplicación.**

El presente método es utilizado para la detección de adulterantes en jarabe de agave, así como para la cuantificación de los principales carbohidratos presentes en este mismo (fructosa, glucosa, sacarosa/difructosa, manitol, sorbitol) así como el hidroximetilfurfural.

De manera alterna, al poder cuantificar la fructosa y glucosa, el tratamiento con fructanasa permite determinar el contenido de fructanos y su DP promedio en una muestra.

**3. Principio/fundamento.**

**3.1** Componentes característicos del jarabe de agave y marcadores aptos para adulteración (difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol y HMF).

El análisis del perfil del jarabe de agave se debe llevar a cabo a concentraciones altas de glucosa y fructosa (10–15 µg de azúcar por inyección) para la determinación correcta de los niveles de estos azúcares; pues esas concentraciones están fuera del rango del detector. Sólo los polioles –sorbitol y manitol–así como la difructosa/sacarosa y el HMF los que pueden ser determinados al ser comparados con los mismos.

El jarabe de agave muestra perfiles característicos de sus componentes, antes y después de hidrolizarlo con fructanasa o amiloglucosidasa altamente purificadas, o una combinación de ambas enzimas. Los perfiles después de la hidrólisis con fructanasa de alta pureza, así como de la combinación de fructanasa y amiloglucosidasa son idénticos y muestran un perfil de compuestos característicos del proceso de producción.

En las pruebas de detección de adulteración con jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS 43%, HFCS 55% y/o HFCS 90%, por sus siglas en inglés), jarabe de maíz de glucosa pura, jarabe de maíz de glucosa con diferentes equivalentes de dextrosa (DE), azúcar invertido, fructosa pura y sacarosa no se observan los compuestos característicos en el perfil del jarabe de agave originados por las condiciones de proceso. La presencia de compuestos adicionales (ej. maltooligómeros) no es evidente en el análisis del perfil de carbohidratos, pues estos compuestos pueden esconderse al co-eluir con compuestos propios del agave. Sin embargo, la comparación de los perfiles antes y después del tratamiento con fructanasa o amiloglucosidasa, o una combinación de ambas, permite demostrar la adulteración de la muestra.

El contenido de glucosa en jarabe de agave puro y aumento de la misma después de hidrolizarlo con la enzima amiloglucosidasa originado por la posible adulteración con productos de jarabe de maíz. Para el análisis correcto del contenido de glucosa, la muestra tiene que ser diluida en proporción 1:5. Las soluciones estándar de glucosa aplicadas (por lo menos a 3 concentraciones diferentes) tienen que estar en el mismo rango.

El aumento en el contenido de glucosa y fructosa del jarabe de agave puro después de hidrolizarlo con la enzima fructanasa pueden ser originados al incluir fructooligómeros no procesados por completo o en caso de adulteración al añadir jarabe de fructanos (de agave u otras fuentes). Para el análisis correcto del contenido de fructosa, la muestra tiene que ser diluida 1:20. Las soluciones estándar de fructosa aplicadas (por lo menos a 3 concentraciones diferentes) tienen que estar en el mismo rango.

**3.2** Determinación de fructosa, glucosa, difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol e hidroximetilfurfural (HMF) en las muestras de jarabe y fructanos de agave.

El contenido de difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol y HMF pueden ser calculados a partir de las áreas obtenidas por el equipo después de su correcta calibración y utilizando la muestra directamente. El contenido de fructosa y glucosa sólo puede ser calculado al diluir el jarabe a niveles adecuados. En particular, el intervalo de linealidad, y donde hay una gran reproducibilidad en la cuantificación de la fructosa es muy limitado (entre 10 y 150 µg/ml).

**4. Equipos y materiales.**

Cromatógrafo de intercambio iónico (HPAEC): Bomba cuaternaria con gradiente para cromatografía de líquidos con módulo desgasificador de eluente, horno para columna, detector electroquímico de pulso funcionando en modo de detección de pulso amperométrico (PAD con amperometría integrada) y automuestreador. Con software para control del cromatógrafo, adquisición de datos y su análisis.

Columna para sistema capilar cuya fase estacionaria y dimensiones sea capaz de separar los componentes a cuantificar, con las siguientes características:

Columna cromatográfica (HPAEC): 250 X 4 mm d.i. con pre-columna (50 x 4 mm d.i.) con resina específica de intercambio aniónico, tal como una columna de sustrato de poliestireno com 2% de entrecruzamiento con divinilbenceno y aglomerado con microcuentas de 500 nanómetros de latex funcionalizado con grupos cuaternarios de amonio y 10 micrómetros de tamaño de partícula con, aproximadamente 100 microequivalentes por columna.

Balanza analítica. Sensibilidad de 0.01 mg.

Horno de vacío. Con capacidad de mantener 55 ± 3ºC.

Botellas de vidrio o plástico. De 100 a 150 ml de capacidad, con tapa roscada.

Desecador. Con SiO2, o desecante equivalente. Secar el desecante cada 2 semanas dejándolo 8 horas a 130ºC en el horno a vacío.

Matraces volumétricos. 1 y 2 L de capacidad.

Agitador magnético y barras de agitación de diferentes tamaños.

Tubos cónicos de plástico para reacción (Tubos Safe-Lock).- 2.0 ml (No. 0030 120.094 para microcentrífuga) o equivalentes.

Racks para tubos cónicos de plástico para reacción.

Calentador eléctrico con agitación.- Rango de temperatura de 4 a 99 °C para tubos cónicos de reacción de 2.0 ml (24x) o equivalente.

Baño ultrasónico.

Agitador tipo Vortex.

Micropipetas automáticas de volumen variable: incluyendo volúmenes de 500 a 5000 µL, 500 a 2500 µL, 200 a 1000 µL, 50 a 200 µL, 5 a 50 µL y 2 a 20 µL.

Filtro para jeringa. Tamaño del poro de 0.2 ó 0.45 µm, Nylon.

Jeringas. Punta Luer Lock, capacidad de 1 ml, de plástico.

Equipo de filtrado al vacío. - diámetro de 48 mm y capacidad del recipiente y embudo de 1 l.

Filtro de nylon o de acetato de celulosa. - 48 mm de diámetro.

Unidad de ultrafiltración por centrifugado.

**5. Preparación de la muestra y reactivos.**

Reactivos

Agua. Toda el agua debe de ser ASTM Tipo 1 o equivalente.

Solución de Hidróxido de sodio. NaOH a concentración del 50% (w/w), libre de carbonatos, densidad de 1.50 g/ml.

Acetato de sodio anhidro. Grado reactivo, ACS.

Sorbitol. Grado estándar cromatográfico.

Manitol. Grado estándar cromatográfico.

Glucosa. Grado estándar cromatográfico.

Fructosa. Cristalina, Grado estándar cromatográfico.

Sacarosa. Cristalina, Grado estándar cromatográfico.

Hidroximetilfurfural. Grado estándar cromatográfico.

Hidróxido de potasio: en granalla, grado ACS o equivalente.

Sulfato de calcio. Con indicador de humedad, malla # 6 (Drierite o similar).

Fructanasa. Mezcla liofilizada de fructanasas, (exo- inulinasa 20 000 U, endo-inulinasa 650 U en 36 mg). Almacene a -20°C cuando no se use.

Amiloglucosidasa. Amiloglucosidasa liofilizada con 36 000 U/g. Almacene a -20°C cuando no se use.

**6. Preparación de los reactivos.**

Eluentes

Fase móvil A:

Solución de NaOH 200 mM, libre de carbonatos. Preparar las soluciones libre de carbonatos como se indica a continuación: Desgasificar 2 L de H2O durante al menos 15 minutos con helio o argón en una botella de eluente del cromatógrafo (y/o con ayuda del baño ultrasónico). Agregar aproximadamente 800 mL de H2O desgasificada en un matraz aforado de 1 L. Con una pipeta automática adicionar 10.4 mL de solución de NaOH 50% w/w a la solución sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H2O. Continuar desgasificando la solución en el baño ultrasónico y burbujeando helio o argón durante 30 minutos más antes de utilizarla.

Fase móvil B:

 Solución 100 mN de NaOH + 700 mM de acetato de sodio, libre de carbonato. Desgasificar H2O como se indica para la fase móvil A. Agregar aproximadamente 800 mL de H2O desgasificada en un matraz aforado de 1 L y añadir lentamente 57.4 g de acetato de sodio anhidro evitando la formación de grumos. Una vez disuelto adicionar con una pipeta automática 5.2 mL de solución de NaOH 50% w/w sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H2O.

Fase móvil C:

Agua tipo 1.

Fase móvil D:

Solución 500 mM de NaOH, libre de carbonatos. Desgasificar H2O como se indica para la fase móvil A. Agregar aproximadamente 800 mL de H2O desgasificada en un matraz aforado de 1 L y con una pipeta automática adicionar 26.1 mL de solución de NaOH 50% w/w a la solución sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H2O. Continuar desgasificando la solución en el baño ultrasónico durante 30 minutos más antes de utilizarla.

Nota: Todas las soluciones móviles deberán de ser filtradas a través de un filtro de 0.22 µm después de ser aforadas.

Es de suma importancia evitar la carbonatación de las fases móviles por absorción del CO2 atmosférico. Para evitar esto, los eluentes se deben de mantener bajo atmosfera de helio, o de manera alternativa, se pueden aplicar filtros de descarbonización en la parte superior de las botellas de eluente. Preparación del filtro: tomar una jeringa de 30 ml y remover el pistón, rellenar la jeringa con capas de algodón o lana de vidrio, drierite (sulfato de calcio anhidro) o gel de sílice, hidróxido de potasio (sólido), drierite o gel de sílice, algodón o lana de vidrio, cerrar la boca ancha de la jeringa con parafilm y perforarlo para permitir la entrada de aire.

**7. Purificación y preparación de las enzimas.**

Fructanasa. Disuelver 5 mg (2750 U exo-inulinasa y 90 U endo-inulinasa) en 500 µL de H2O en un tubo de reacción de 2 ml y transferir a una unidad de ultrafiltración. Centrifugar durante 8 minutos a 13 000 rpm y remueva el filtrado, llene nuevamente la unidad de ultrafiltración con 500 µL de H2O, mezcle cuidadosamente la solución y centrifugue otra vez, repita el proceso de lavado cuatro veces. Una vez finalizado el lavado, mezcle la solución de enzima purificada con 500 µL de H2O, transfiérala a un tubo de reacción y llene hasta 2 mL (1400 U exo-inulinasa y 45 U endoinulinasa por mililitro). Alicuotar dependiendo de los volúmenes a utilizar y almacenar a -20 °C.

Amiloglucosidasa. Disuelva 15 mg (~550 U) en 500 µL de H2O (en un tubo de reacción de 2 mL) y transfiera a una unidad de ultrafiltración. Centrifugue durante 8 minutos a 13,000 rpm y remueva el filtrado de la parte inferior. Llene nuevamente la unidad de ultrafiltración con 500 µL de H2O, mezcle cuidadosamente la solución y centrifugue otra vez, repita el proceso de lavado cuatro veces. Una vez finalizado el lavado, mezcle la solución de la enzima purificada con 500 µL de H2O, transfiérala a un tubo de reacción y llene hasta 2 mL (270 U/mL). Alicuotar dependiendo de los volúmenes a utilizar y almacenar a -20 °C.

**8. Soluciones estándar de azúcares y alcoholes de azúcares.**

Secar la glucosa, fructosa y sacarosa en un horno al vacío durante 24 horas a 55 ± 3°C. (Nota: no seque el sorbitol y el manitol). Prepare series adecuadas de estándares en las concentraciones correctas para el análisis. Aplique diferentes rangos de concentraciones para glucosa y fructosa y compruebe la linealidad de la curva de calibración para ambos azúcares.

Nota: La fructosa diluida en una solución acuosa es más inestable que la glucosa. Controle las soluciones estándar y muestras para una eventual pérdida de concentración de fructosa. Almacenar todas las soluciones estándar y muestras a 4°C. Preparar soluciones diluidas frescas y evitar que las muestras permanezcan mucho tiempo en el automuestreador antes de ser analizadas.

Las soluciones estándar para la calibración pueden ser preparadas siguiendo estas instrucciones:

Preparación de la solución stock: Pesar en la relación correcta (composición aproximada del jarabe a analizar) la fructosa, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol y HMF. Disolver en aproximadamente 50 ml en un matraz aforado de 100 ml. Una vez disuelto, aforar a los 100 ml. En el ejemplo se pesaron exactamente: 5.8 mg de sorbitol, 6.7 mg de manitol, 16.4 mg de HMF, 20.0 mg de glucosa, 186.3 mg de fructosa y 5.7 mg de sacarosa en 100 mL.

Diluir la solución stock a varios niveles para obtener de 4 a 5 soluciones estándares para su análisis y construcción de la curva de calibración.

**9. Preparación de muestras de Jarabe de Agave.**

Tabla 1: Diluciones de Jarabe de Agave para hidrólisis enzimática.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A1 | Jarabe de agave | 600L solución stock | 1400 L H2O1 | puro |
| A2 | Jarabe de agave | 600L solución stock | 40 L Amiloglucosidasa +1360 µL H2O2 | AG |
| A3 | Jarabe de agave | 600L solución stock | 40 L Fructanasa + 1360 µL H2O2 | FN |
| A4 | Jarabe de agave | 600L solución stock | 40 L Amiloglucosidasa +40 L Fructanasa + 1320µL H2O2 | AG+ FN |
| B1 | Blanco amiloglucosidasa | 600L H2O | 40 L Amiloglucosidasa +1360 µL H2O2 | BA |
| B2 | Blanco fructanasa | 600L H2O | 40 L Fructanasa + 1360 L H2O2 | BF |

Se debe pesar con exactitud 250 mg de Jarabe de Agave (±0.01 mg) en una botella de plástico de 100 mL, añada 50 mL de H2O y disuelva completamente. A partir de esta solución stock prepare las siguientes muestras para hidrólisis enzimática en tubos de reacción de 2 mL utilizando el rack para tubos:

**A)** Sin tratamiento enzimático;

**B)** después del tratamiento enzimático

Cerrar los tubos de reacción y agite durante 15 segundos en el agitador tipo Vortex. Colocar los tubos de reacción A2, A3, A4, B1, B2 (el control de la enzima es necesario únicamente después de cada nueva preparación de la misma, la ausencia de azúcares en el perfil confirma la purificación óptima en la preparación de la enzima) en el calentador eléctrico con agitación (Eppendorf Thermo Mixer C o equivalente) y lleve a 45°C durante 30 minutos agitando a 300 rpm. A continuación aumentar la temperatura hasta 80°C y mantener por 20 minutos con agitación continua de 300 rpm (para detener la hidrólisis). Posteriormente enfriar los tubos a temperatura ambiente en el rack, abrir los tubos y llenar con H2O hasta 2 mL. cerrar los tubos nuevamente y mezclar en agitador tipo Vortex (15 segundos) para obtener una muestra que se encuentre en condiciones óptimas.

Posteriormente llenar para cada una de las muestras una jeringa de 1 mL con las soluciones de las muestras (A1, A2, A3, A4, B1, B2), colocar un filtro para jeringa (Tamaño de poro 0.45 µm, Millipore Millex HN, 13 mm o equivalente) y filtrar la solución en un vial adecuado para el automuestreador (1.5 mL), cerrar el vial y colocar en la posición adecuada de la bandeja del automuestreador para su análisis, filtrar el resto de las soluciones de las muestras en nuevos tubos de reacción de 2 mL para las diluciones adicionales. Utilizar para cada muestra una jeringa y filtro para jeringa nuevos.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A5 | Contenido de glucosa | 200L muestra A1 | 800 L H2O | Dilución 1:5 |
| A6 | Contenido de glucosa después de tratamiento con AG | 200L muestra A3 | 800 L H2O | Dilución 1:5 |
| A7\* | Contenido de fructosa y glucosa | 100L muestra A1 | 1900 L H2O | Dilución 1:20 |
| A8\* | Contenido de fructosa y glucosa después de tratamiento con FN | 100L muestra A2 | 1900 L H2O | Dilución 1:20 |

Tomar diferentes diluciones para el análisis del contenido de glucosa (glc) y fructosa (fru) en jarabe de agave puro y después de hidrólisis enzimática (con amiloglucosidasa y fructanasa)

Tabla 2: Diluciones para la determinación de glucosa y fructosa.

\* La concentración de la fructosa debe de estar entre 10 y 150 µg/ml

Llenar con las muestras A5 a A8 sus respectivos viales (1.5 mL) filtrando las soluciones, cerrar los viales y colocarlos en la posición adecuada de la bandeja del automuestreador para su análisis.

**10. Procedimiento.**

Método 1. Adulteración y cuantificación de azúcares.

Condiciones del cromatógrafo (HPAEC): temperatura de columna, 30 ± 0.5°C; velocidad de flujo, 1.0 mL/min; volumen de inyección, 10 L; sensibilidad del detector, rango análogo 1-3 C.

Tabla 3: Gradiente de concentración de eluentes para el análisis del perfil del jarabe de agave y determinación del contenido de sorbitol, manitol, glucosa, fructosa, difructosa y sacarosa por sistema Dionex con columnas CarboPac PA1 (columna y pre-columna).

|  |  |
| --- | --- |
| Tiempo, min | % fase móvil |
|  | A | B | C | D |
|  | 200 mM NaOH | 200 mM NaOH +700 mM NaAc | Agua | 500 mM NaOH |
| -20 | Equilibrio |
| -20 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| -10 | 50 |  | 50 |  |
| -9.9 | 50 | 1 | 49 | 0 |
| 0 | corrida |
| 6 | 50 | 1 | 49 | 0 |
| 12 | 50 | 4 | 46 | 0 |
| 30 | 50 | 20 | 30 | 0 |
| 40 | 50 | 40 | 10 | 0 |
| 40.1 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | Fin corrida |

NOTA: Ver Tabla 3 para el gradiente del eluente y Tabla 4 para el programa de tiempo del detector.

Tabla 4: Programa del tiempo del detector PAD para análisis de azúcares.

|  |  |
| --- | --- |
| Tiempo, s | Voltaje, V |
| 0.00 | 0.05 |
| 0.20 | 0.05 |
| 0.40 | 0.05 |
| 0.41 | 0.65 |
| 0.60 | 0.65 |
| 0.61 | -0.10 |
| 1.00 | -0.10 |

Método 2. Sólo cuantificación de azúcares/determinación de contenido de fructanos

De manera alternativa al método de gradiente presentado, se puede llevar a cabo la separación y cuantificación con un método isocrático utilizando NaOH 80 mM. El tiempo de corrida es de sólo 15 minutos, seguido de una limpieza por 17 minutos y un tiempo de equilibrado de 20 min, resultando en un tiempo de separación total de 52 minutos. Las curvas de calibración resultantes son similares a las del método de gradiente, y el análisis de glucosa y fructosa resulta excelente con este sistema. El tratamiento con fructanasa permite analizar el contenido de fructanos en la muestra (ver Tabla 3).

Tabla 5. Programa para el análisis de sorbitol, manitol, HMF, glucosa, fructosa y sacarosa/difructosa con columna Carbopac PA1 con NaOH 80 mM.

|  |  |
| --- | --- |
| Tiempo, min | % fase móvil |
|  | A | B | C | D |
|  | 200 mM NaOH | 200 mM NaOH +700 mM NaAc | agua | 500 mM NaOH |
| -20 | Equilibrio |
| -20 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| -10 | 50 |  | 50 |  |
| -9.9 | 40 | 0 | 60 | 0 |
| 0 | corrida |
| 15 | 40 |  | 60 | 0 |
| 15.1 | limpieza |
| 15.1 | 15 | 70 | 15 | 0 |
| 23 | 15 | 70 | 15 | 40 |
| 23.1 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 32 | Paro de corrida |

El programa del detector PAD es idéntico al del método de gradiente (ver tabla 4).

Análisis de estándares

Diferentes concentraciones de la solución stock fueron analizadas considerando la respuesta lineal del detector PAD. La figura 1 muestra el perfil de la solución estándar en dilución 1:10.

Para obtener resultados precisos de las concentraciones de los azúcares aplique las soluciones estándar de los mismos por lo menos a 3 diferentes concentraciones, y de ser posible por duplicado, en cada secuencia de corridas de muestras de jarabe de agave.

Nota: Las áreas de los picos de los azúcares son fuertemente influenciadas por las condiciones de la corrida durante la separación y son muy sensibles. En general, sólo la calibración externa con diferentes concentraciones de azúcares es recomendada. En este caso los factores de respuesta de los azúcares en las muestras se relacionan con la respuesta del compuesto estándar por sí mismo. El valor de coeficiente de correlación (R2) no debe de ser menor a 0.99.

Se debe asegurar que el mismo tipo de integración se utilice tanto para muestras como para estándares. Se debe elegir el mismo ancho para los picos, y las mismas configuraciones y parámetros de integración. Se debe controlar cuidadosamente la selección de la línea base. Utilice sólo el área del pico para cuantificarlo.

Fig.1 Perfil cromatográfico de soluciones estándar: glucosa (22 µg.mL-1; tret: 5.04 min), fructosa (186.3 µg.mL-1; tret: 5.75 min), sacarosa, ( 5.7 µg.mL-1; tret: 8.79 min), sorbitol (5.8 µg.mL-1; tret: 2.43 min), manitol (6.7 µg.mL-1; tret: 2.72 min), y HMF (16.4 µg.mL-1 tret: 4.03 min); volumen de inyección: 10 µL.



**11. Análisis de muestras.**

Para el análisis de una muestra de jarabe de agave se requieren 8 corridas de A1 a A8. Adicionalmente, 2 corridas para los blancos de las enzimas y entre 6 y 8 corridas para las soluciones estándar (sorbitol, manitol, HMF, sacarosa, glucosa y fructosa) son recomendables. Bajo estas condiciones, escriba la secuencia para el análisis y aplique el programa recomendado para la separación, ver Tabla 3. El tiempo de cada corrida es de 70 minutos y el flujo para la separación de 1 mL/min a 30°C.

Después de terminada la secuencia (alrededor de 50 corridas) limpie la columna y el detector con solución 0.5 M de NaOH durante 1 hora a un flujo de 1 mL/min. Para determinar el contenido de sorbitol, manitol, difructosa y sacarosa se pueden tomar las áreas de los picos del cromatograma del jarabe de agave puro. La calibración de estos componentes se realiza con las soluciones estándar de sorbitol, manitol HMF y difructosa/sacarosa. El contenido de difructosa puede ser calculado con la curva de calibración de sacarosa. El contenido de glucosa y fructosa es calculado correctamente sólo con el área de los picos después de sus respectivas diluciones.

**12. Evaluación de los resultados.**

Adulteración de jarabe de agave con jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) o jarabe de maíz:

El perfil del jarabe de agave cambia en el rango de los maltooligómeros al ser eliminados por medio de hidrólisis con amiloglucosidasa. Adicionalmente, el contenido de glucosa aumenta después de la hidrólisis con amiloglucosidasa.

Adulteración con otros suplementos o el jarabe de agave es mezclado con otros compuestos extraños:

El perfil del agave no incluye los picos característicos del proceso de producción.

Contenido de fructooligómeros:

El perfil del jarabe de agave incluye el perfil de los fructooligosacáridos (FOS) y puede ser removido después de hidrólisis con fructanasa.

Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, manitol sorbitol y HMF.

Los resultados son calculados a partir de la muestra original utilizada y sus subsecuentes diluciones después de comparar las áreas obtenidas en el análisis de la muestra contra la curva de calibración construida con las diferentes diluciones de los estándares.

Contenido de Fructanos.

Para determinar el contenido de fructanos, después de tratar con fructanasa la muestra, al contenido corregido de fructosa y glucosa (es decir, restando la fructosa, glucosa y sacarosa libre presente en el producto y aplicando el factor de corrección de 0.9 se obtiene el contenido de fructanos en la muestra

El DP promedio es calculado dividiendo el contenido de fructosa corregido entre el contenido de glucosa libre. Esto asume una molécula de glucosa por molécula de fructano.

Fig. 2 Perfil del jarabe de Agave sin ningún tratamiento (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; picos identificados: 1 – sorbitol, 2 – manitol, 3 – HMF (Hidroximetilfurfural), 4 – glucosa y fructosa, 5 – sacarosa/difructosa, 6 – picos sin identificar.



En este perfil, el contenido de sorbitol, manitol y HMF puede ser determinado con el área bajo el pico.

**A)** Jarabe antes y después de hidrólisis enzimática (muestras A1 – A4)

Fig. 3 Perfil de muestras de jarabe de Agave (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; a – jarabe puro (A1), b – jarabe después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – jarabe después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – jarabe después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4)



Los perfiles no muestran cambios antes y después de la hidrólisis enzimática. Este hecho permite concluir que esta muestra de jarabe de agave no incluye fructooligómeros o picos extraños ocasionados por series de maltooligómeros. Los picos característicos del perfil pueden ser únicamente debidos al proceso de producción o a componentes de la planta que no puedan ser removidos a través de la clarificación y purificación del jarabe.

**B)** Muestra de jarabe de Agave: antes y después de hidrólisis enzimática (muestra A1 – A4)

Fig. 4 Perfil de muestras de jarabe de Agave (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; a – jarabe puro (A1), b – jarabe después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – jarabe después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – jarabe después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4)



Los perfiles después de hidrólisis con fructanasa (b) así como fructanasa y amiloglucosidasa (d) pierden algunos picos que eran de fructooligómeros (picos significativos de difructosa, ver pico después de los 8 minutos, pico antes de los 12 minutos, pico entre los 18 y 19 minutos). Sólo la hidrólisis con amiloglucosidasa presenta el mismo perfil que el puro. Esto permite concluir que este jarabe de agave incluye fructooligómeros pero no picos extraños de maltooligómeros. El otro pico puede ser originado sólo por el proceso de producción o por componentes propios de la planta que no pueden ser removidos por clarificación y purificación del jarabe.

**C)** Jarabe de Agave Adulterado (WAS, 80% adulteración con jarabe de maíz), con la siguiente composición:

17.6 g HFCS 55% (incluye aproximadamente 0.35 (2% w/w) de maltooligómeros, principalmente isomaltotriosa e isomaltotetraosa)

+ 62.4 g HFCS 90% (sin maltooligómeros)

+ 20 g jarabe de agave oscuro

+ 300 mg FOS

La figura 5 muestra el perfil de separación del jarabe de maíz de alta fructosa 55% (HFCS 55%) con 0.15 mg de jarabe/mL antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa y fructanasa. Los picos de isomaltotriosa e isomaltotetraosa pueden ser eliminados con amiloglucosidasa. Este hecho indica la posible adulteración con jarabe de maíz.

Fig. 5 Perfil del jarabe de maíz de alta fructosa 55% (HFCS 55%) (0.15 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa. 1 – isomaltotriosa, 2 – isomaltotetraosa, 3 – glucosa, 4 – fructosa.



La figura 6 muestra el perfil de una imitación de jarabe de agave (WAS) con 1.5 mg de jarabe/mL. El jarabe WAS puro (7a) muestra un pequeño pico de sacarosa (pico 1) y dobles o triples picos en las posiciones 2 y 3. Después de hidrolizarlo con ambas enzimas (7d) el pico 1 desaparece y en las posiciones 2 y 3 sólo se encuentran unos picos muy pequeños. Este perfil no se ajusta al perfil del jarabe de agave certificado por lo que puede asumirse una posible adulteración con jarabe de maíz.

Esta suposición puede respaldarse con los resultados del perfil de separación después de hidrolizar sólo con fructanasa (7b) y con amiloglucosidasa (7c). Después de la hidrólisis con fructanasa, el pico 1 (sacarosa) desaparece, el pico 2 se reduce a un pico de menor tamaño (parte de este pico era FOS) y el pico 3 permanece sin cambios. Después de hidrolizar con amiloglucosidasa, el pico 1 no cambia, el pico 2 se reduce significativamente (parte del pico es un maltooligómero) y el pico 3 también es reducido a un pico de menor tamaño (parte del pico también es un maltooligómero).

Para una mejor apreciación de los picos 2 y 3 la figura 7 muestra estos picos en detalle.

Fig. 6 Perfil de la imitación de jarabe de Agave (WAS, 80% adulterado con jarabe de maíz) (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 L; a – WAS puro (A1), b – WAS después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – WAS después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – WAS después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4).



Fig. 7 Perfil de la imitación de jarabe de Agave (WAS, 80% adulterado con jarabe de maíz) (1.5 mg de jarabe/mL); rango entre 12 y 22 minutos de separación; volumen de inyección 10 L; a – WAS puro (A1), b – WAS después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – WAS después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – WAS después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4).



En la Figura 7 el detalle del pico 2 muestra un doble pico en la inyección con jarabe puro (8a), con fructanasa sólo se percibe un pico (8b), con amiloglucosidasa el pico dominante puede ser removido (8c) sólo queda presente la parte de FOS; con ambas enzimas sólo un pequeño pico se mantiene visible. El detalle del pico 3 muestra en la inyección de jarabe puro un pico triple, el cual no puede ser removido con fructanasa, sólo con amiloglucosidasa es posible remover el pico intermedio. Ambos picos, que pudieron ser removidos por la amiloglucosidasa eran los maltooligómeros provenientes del HFCS 55% y confirma la adulteración con el mismo.

**APÉNDICE B**

**MÉTODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN EL JARABE DE AGAVE.**

**1. Introducción.**

La humedad es un parámetro crítico de calidad agroalimentaria en el jarabe de agave.

El método estándar para la determinación de humedad en este producto es la titulación Karl Fisher, una reacción rápida y específica para la determinación de agua.

**2. Objetivo y campo de aplicación**

Jarabe de agave, tanto en polvo como en líquido

**3. Principio/fundamento.**

La muestra se debe disolver en una mezcla de metanol y formamida anhidros. La formamida ayuda a solubilizar los carbohidratos. La solución es titulada en un titulador volumétrico Karl Fisher, y el punto de vire es detectado eléctricamente.

**4. Equipos y materiales.**

Jeringas desechables de 1 ml

Probetas de vidrio, capacidad 20 y 50 ml

Balanza analítica, sensibilidad de 0.01 mg

Titulador Karl Fisher volumétrico con bureta de 5 ml

Horno de vacío. Con capacidad de mantener 55 ± 3ºC

**5. Preparación de la muestra y reactivos.**

Reactivos

Metanol anhidro (<0.01% H2O)

Formamida anhidra (<0.02% H2O)

Tartrato de sodio dihidratado. Secar por 12 horas en horno a vacío a 150°C y guardar en desecador

Reactivo Karl Fisher (RKF). Reactivo de un componente, con título de 5 mg H2O/ml reactivo

**6. Procedimiento.**

Se debe mezclar el metanol y la formamida en proporción 1:1. Añadir a la cámara de titulación y titular a sequedad con el reactivo KF. Típicamente se requieren 20 ml de mezcla, pero el volumen depende de la configuración e instrucciones de cada titulador en específico.

Se debe verificar el título del reactivo KF utilizando el tartrato de sodio dihidratado como estándar. Éste contiene exactamente 15.66% de humedad. Añadir la cantidad necesaria de tartrato para utilizar de 4 a 5 ml de titulante.

Se debe añadir la cantidad necesaria de muestra a analizar a la cámara y titular. Nota. En el caso de jarabes, la forma más sencilla es tomar una pequeña cantidad de muestra con la jeringa (aprox 0.2 ml), tarar la jeringa y añadir una pequeña gota del jarabe a la cámara. Volver a pesar la jeringa, y obtener el peso por diferencia. Añadir la cantidad de muestra necesaria para gastar entre 4 y 5 ml de titulante.

**7. Evaluación de los resultados.**

****

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_