

BIOREFINERÍA DE LOS SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ÑAME (*Dioscorea alata*): OBTENCIÓN DE FRUCTANAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Alejandro J. Aguilar Solano¹, Marianelly Esquivel Alfaro¹, María del Rosario Sibaja Ballester¹, Mary Lopretti³, José Roberto Vega–Baudrit^{1,2*}

- 1) Laboratorio de Polímeros POLIUNA, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: jvegab@gmail.com
- 2) Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC CeNAT, San José, Costa Rica.
- 3) Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Recibido: Agosto de 2020; Aceptado: Septiembre de 2020

RESUMEN

La actividad agrícola de *Costa Rica* es de vital importancia para el desarrollo económico del país. Recientemente, este sector ha incrementado su presencia con los cultivos no tradicionales, como las raíces y tubérculos, dentro de los que destaca el ñame. Todos estos productos, durante el proceso de comercialización, generan productos de rechazo o excedentes, que constituyen la biomasa residual. Esta situación constituye un problema ambiental y económico, que requiere de nuevas estrategias de remediación en las regiones dedicadas a este tipo de actividades.

Este trabajo propone la utilización de esa biomasa residual para la obtención de materiales con un valor agregado. Se plantea el uso del ñame *Dioscorea alata* de rechazo, proveniente de la región *Huetar Norte* de *Costa Rica*, para la extracción de fructanas. Las fructanas son polisacáridos de fructosa y forman parte del contenido de fibra dietética del tubérculo, que poseen aplicaciones alimenticias, por ejemplo, como sustitutos de azúcar.

El sustrato fue caracterizado, se realizaron análisis de humedad, ceniza, grasa, proteína, solubilidad en agua caliente y fría, así como determinaciones de carbohidratos, que demostraron porcentajes máximos de carbohidratos del 25% y contenido de fibra dietética total en un intervalo de 2,9 a 7,2%. Estos porcentajes están relacionados con el contenido de fructanas, por lo que son valores determinantes en el presente estudio.

La investigación permitió el desarrollo de un método de extracción y cuantificación de las fructanas en medio acuoso. Para las extracciones se evaluaron tres factores de extracción: lotes de obtención del sustrato, temperatura y tiempo, aplicando un diseño estadístico para su análisis.

Para separar los sólidos insolubles las muestras extraídas se filtraron en tres etapas; se determinó el contenido de inulina en los extractos, realizando una técnica de hidrólisis enzimática, donde primeramente se evaluaron los azúcares simples como la fructosa, glucosa y sacarosa libres en el extracto, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia. Posteriormente, se realizó un proceso de hidrólisis enzimática utilizando amiloglucosidasa e inulinasa de *Aspergillus niger*, para determinar por la misma técnica la cantidad de moléculas de fructosa y glucosa provenientes de las inulinas y así poder obtener mediante diferencia la concentración final de las fructanas presentes en cada uno de los ensayos. Los resultados mostraron porcentajes de fructanas para los 24 ensayos realizados en un intervalo de 0,22 a 3,8%.

Por último, se realizó una caracterización térmica de las fructanas, donde se determinó que la temperatura de descomposición de las inulinas obtenidas es de 330°C, por lo que es posible utilizar estos compuestos en procesos alimenticios en los que se utilicen temperaturas inferiores a este valor sin ver afectada la estabilidad térmica de las fructanas. Además, se determinó mediante la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño que las fructanas extraídas son de cadena corta, al poseer pesos moleculares de 1.500 Da e inferiores. Se concluyó que es posible extraer, cuantificar y caracterizar las inulinas obtenidas a partir del ñame de rechazo de la zona *Huetar Norte* de *Costa Rica*, de la especie *Dioscorea alata*; con el potencial de utilizarlas para posibles aplicaciones alimenticias gracias a las características prebióticas que poseen estos compuestos.

Palabras clave: desecho, fructana, biopolímeros, biorrefinería, ñame.

ABSTRACT

The agricultural activity of *Costa Rica* is very important for the economic development of the country. Recently, this sector has increased its presence with non-traditional crops, such as roots and tubers, among which yams stand out. All these products, during the marketing process, generate rejection

or surplus products, which constitute the residual biomass. This situation constitutes an environmental and economic problem, which requires new remediation strategies in the regions dedicated to this type of activity.

This work proposes the use of this residual biomass to obtain materials with added value. The use of the rejection *Dioscorea alata* yam, from the Huetar Norte region of Costa Rica, is proposed for the extraction of fructans. Fructans are fructose polysaccharides and are part of the dietary fiber content of the tuber, which have food applications, for example, as sugar substitutes.

The substrate was characterized, analysis of moisture, ash, fat, protein, solubility in hot and cold water, as well as carbohydrate determinations, which showed maximum percentages of carbohydrates of 25% and total dietary fiber content in a range of 2.9 to 7.2%. These percentages are related to the fructan content, so they are determining values in the present study.

The research allowed the development of a method for the extraction and quantification of fructans in aqueous medium. For the extractions, three extraction factors were evaluated: batches for obtaining the substrate, temperature and time, applying a statistical design for their analysis.

To separate insoluble solids, the extracted samples were filtered in three stages. The inulin content in the extracts was determined, using an enzymatic hydrolysis technique, where the simple sugars such as fructose, glucose and sucrose free in the extract were first evaluated by means of the high-efficiency liquid chromatography technique. Subsequently, an enzymatic hydrolysis process was carried out using amyloglucosidase and inulinase from *Aspergillus niger*, to determine by the same technique the amount of fructose and glucose molecules from inulins and thus be able to obtain by difference the final concentration of fructans present in each one of the essays. The results showed percentages of fructans for the 24 tests carried out in a range of 0.22 to 3.8%.

Finally, a thermal characterization of the fructans was carried out, where it was determined that the decomposition temperature of the inulins obtained is 330°C, so it is possible to use these compounds in food processes in which temperatures lower than this value are used. without affecting the thermal stability of the fructans. Furthermore, it was determined by the size exclusion chromatography technique that the extracted fructans are short chain, having molecular weights of 1,500 Da and lower. It was concluded that it is possible to extract, quantify and characterize the inulins obtained from the rejected yams from the *Huetar Norte zone of Costa Rica*, of the *Dioscorea alata* species; with the potential to use them for possible food applications thanks to the prebiotic characteristics that these compounds possess.

Keywords: waste, fructan, biopolymers, biorefinery, yams.

INTRODUCCIÓN

El sector agrícola costarricense se ha caracterizado por la diversidad de especies cultivadas en todas las regiones del territorio, lo que ha permitido el desarrollo de las mismas. Con el paso de los años, con el fin de aumentar la producción y ser más competitivo en los mercados internacionales, se ha especializado no solo en el cultivo de productos tradicionales (cacao, café, banano), sino también en los no tradicionales como cítricos, raíces y tubérculos. El ñame es un tipo de tubérculo (Figura 1), con alto valor nutricional que se produce principalmente en las regiones *Norte y Atlántica de Costa Rica*. Datos de la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica PROCOMER muestran que para el año 2014 las exportaciones de ñame costarricense alcanzaron la cantidad de 16.253 toneladas métricas, similar a la cantidad exportada para los años del 2009 al 2013, lo que implica que la cantidad de ñame que exporta *Costa Rica* se ha mantenido constante durante los últimos años, mostrando un crecimiento a partir del año 2010. Las exportaciones de ñame en el 2014 llegaron a ser de 14,9 millones de dólares, las cuales han sido dirigidas a más de 12 países, donde los principales destinos son *Estados Unidos* y países del *Caribe* como *Puerto Rico* [1–7].

Las actividades agroindustriales generan gran cantidad de residuos, aquellos que son biodegradables, corresponden a las hojas y los productos de rechazo, además generan otros desechos del tipo ordinario, que en su mayoría son perjudiciales para el medio ambiente. En *Costa Rica*, la empresa *Productos Agropecuarios VISA S.A.*, la cual es una de las principales exportadoras de ñame en el país, reporta que el porcentaje de producto de rechazo se encuentra alrededor del 20 y 30% del total de la producción, el cual corresponde aproximadamente a 10.000 toneladas métricas anuales para los años más recientes. Este tipo de desechos son ricos en biopolímeros naturales como la celulosa y las macromoléculas como la lignina [1–5], así como almidones, y azúcares como la glucosa y la fructuosa. De este último puede ser obtenido las fructanas.

Fructanas. Por definición, fructana es el nombre general para los polisacáridos de fructosa, los cuales forman parte de la fibra y de los polisacáridos no amiláceos de las plantas. Estos compuestos son llamados también polifruetosilfructosas [9, 15,16]. Las fructanas son, además, cualquier compuesto que está constituido por uno o más enlaces fructosil–fructosa [17]. Si bien el almidón es la forma más común en la que los cereales como el maíz, el trigo y algunos tubérculos como la papa y la yuca, almacenan glucosa como fuente de energía, un amplio número de plantas (15% de las plantas superiores) son productoras de fructanos en cantidades significativas, mediante la síntesis de inulina o de levana, los cuales son los dos tipos de fructanas más abundantes en la naturaleza [15, 16]. La inulina fue aislada por primera vez a partir de *Inula helenium* por *Rose*, un científico alemán en 1804 [19].



Figura 1. Tubérculo de ñame (*Dioscorea alata*).

En las plantas, las fructanas se presentan mayoritariamente en las partes aéreas de los sembradíos de *Gramineae* o *Poaceae*, familia a la cual pertenece la cebada y el trigo; además son encontradas en la familia de la *Amaryllidaceae* (puerro, cebolla y ajo) y *Asteraceae* (achicoria, diente de león, alcachofa y yacón) entre otras [19]. Otros estudios han demostrado que las inulinas

están presentes en agaves (*Agave tequilana* weber variedad azul) [20], y en algunos otros tubérculos y raíces dentro los cuales se encuentra el ñame (*Dioscorea spp.*) [21]. En la Tabla 1 se presenta el contenido aproximado de inulina en algunas plantas comestibles [22].

Las polifruetosilfructosas son de origen vegetal principalmente; no obstante, se encuentran también en hongos, donde son sintetizadas por *Aureobasidium pullulans* y varias especies de *Aspergillus*, entre las cuales se encuentran *A. niger* y *A. sydowi*, generadoras de inulinas a partir de sacarosa que poseen pesos moleculares mayores a los presentes en las plantas [16,18].

Por otro lado, una gran variedad de microorganismos son capaces de sintetizar fructanas, incluyendo bacterias típicas de la flora bucal e intestinal de los mamíferos. La función de las fructanas de origen bacteriano se asocia a la protección de las células contra la deshidratación y como auxiliar en los procesos de adhesión celular. Entre los microorganismos productores de polímeros de fructosa se destacan varias especies de bacterias Gram-positivas, entre las que se encuentran *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc citreum* y *Streptococcus mutans*. Las fructanas también son generadas por Gram-negativas, como *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas syringae* y *Acetobacter diazotrophicus* [15, 18].

Tabla 1. Contenido de inulina en algunas especies vegetales [19, 21, 22].

<i>Especie vegetal</i>	<i>Inulina g/100g</i>
Raíz de Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	35,7 – 47,6
Alcachofa de Jerusalem (<i>Helianthus tuberosus</i>)	16,0 – 20,0
Alcachofa (<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>)	3,0 – 19,0
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	10,0 – 12,0
Agave (<i>Agave spp.</i>)	16,0 – 25,0
Ñame (<i>Dioscorea spp.</i>)	2,0 – 5,0
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	9,0 – 16,0
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	1,1 – 7,5
Puerros (<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>)	3,0 – 10,0
Espárragos (<i>Asparagus officinalis</i>)	2,0 – 3,0
Trigo (<i>Triticum spp.</i>)	1,0 – 4,0

Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	0,5 – 1,0
Banano (<i>Musa spp.</i>)	0,3 – 0,7

Estructura química de las fructanas. Químicamente las macromoléculas de fructanas pueden ser descritas de una manera sencilla mediante las fórmulas GpyFn (α -D-glucopiranosil-[β -D-fructofuranosil]_(n-1)-D-fructofuranósido) y FpyFn (β -D-fructopiranosil-[D-fructofuranosil]_(n-1)-D-fructofuranósido), donde G es la unidad de glicosil, F la unidad de fructosil, y n es el número de unidades de fructosil enlazadas, la cual debe poseer un valor de $n \geq 2$ [16, 19]. En la Figura 2 se describen las formaciones existentes en este tipo de compuestos [17].

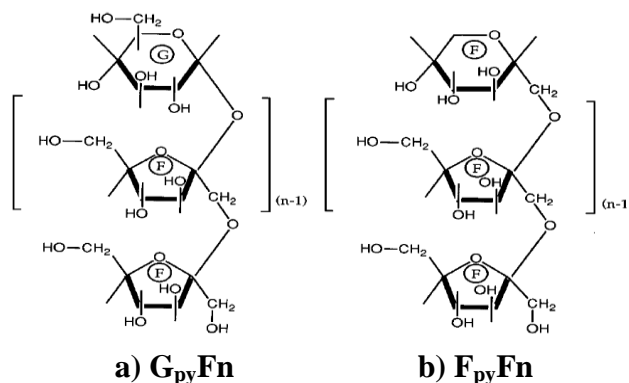


Figura 2. Estructura química de las moléculas de GpyFn y FpyFn en las fructanas [17].

En términos generales, en lo que al tipo de unión se refiere, las fructanas presentan enlaces fructosil-glucosa del tipo β -(2→1) al igual que los enlaces que exhibe la sacarosa, pero para las uniones entre los monómeros de fructosa llamados fructosil-fructosa, el tipo de unión puede ser β -(2→6) o β -(2→1), clasificadas como levanas o inulinas respectivamente, dependiendo de esta unión atómica [15, 16]. Los polímeros de fructosa, además, pueden presentar conformaciones lineales, ramificadas o cíclicas en lo que a la morfología se refiere [16].

Las levanas son compuestos que en su mayoría poseen enlaces del tipo β -(2→6) fructosil-fructosa, que son la unión del segundo carbono de una fructosa con el sexto de la siguiente y así sucesivamente. Se encuentran principalmente en bacterias presentando pesos moleculares altos; no obstante, también pueden estar presentes en plantas, donde *Olvera et al.* [15] mencionan que en organismos vegetales de orden taxonómico *Poales* como el trigo y la cebada, se hallan levanas lineales con 95% de enlaces β -(2→6); ocasionalmente presentado ramificaciones con enlaces β -(2→1). En la Figura 3 se presenta la estructura general para las fructanas del tipo levana.

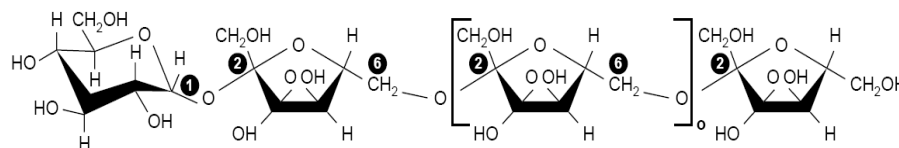


Figura 3. Estructura general de las fructanas del tipo levana [23].

Por otro lado, las inulinas son materiales que en su mayoría poseen enlaces β -(2 \rightarrow 1) fructosil-fructosa y que pueden tener también glucosas terminales en la cadena, con enlaces del mismo tipo fructosil-glucosa [16]. Tradicionalmente, la inulina es considerada como una macromolécula con enlaces que generan una estructura lineal. *Ritsema y Smeekens* [23], y *Olvera et al.* [15] hacen referencia a que se han encontrado inulinas lineales en plantas como la raíz de achicoria, la alcachofa común, la alcachofa de *Jerusalén*, el diente de león, el yacón y la dahlia pertenecientes al orden taxonómico *Asterales*. La alcachofa común produce la inulina más larga de origen vegetal, fructanas con más de 100 unidades de fructosas unidas linealmente. Análisis recientes optimizados, han demostrado que existen inulinas con pequeños grados de ramificación obtenidas a partir de estas mismas fuentes, como los realizados por *Stevens et al.* [24] que demuestran que las inulinas obtenidas a partir de achicoria y dahlia poseen porcentajes de ramificación de 1–2 y 4–5% respectivamente. La inulina existe también en forma cíclica donde contiene 6, 7 u hasta 8 anillos de fructofuranosa [16]. En la Figura 4 se muestra la estructura de las inulinas del tipo lineal.

A partir de especies de plantas superiores pertenecientes a otros órdenes taxonómicos como *Asparagales* (ajo, cebolla, puerro y espárrago) y *Liliales*, al cual pertenece el agave y el ñame, fuente de obtención de las fructanas en esta investigación, se pueden extraer fructanas de origen vegetal con una alta variabilidad estructural [15, 23], donde se ha demostrado que se obtienen inulinas con altos porcentajes de ramificación. Las ramificaciones presentes en este tipo de compuestos son del tipo β – (2 \rightarrow 6). En la Figura 5 se puede observar la estructura de una inulina mixta o ramificada [23, 25].

Peso molecular de las fructanas. En términos generales, las fructanas presentan importantes diferencias en sus propiedades dependiendo de su origen (vegetal, microbiano o pertenecientes al reino *fungi*), así como la presencia de ramificaciones y el grado de polimerización (DP) que poseen [15]. Las fructanas del mundo vegetal pueden alcanzar un grado de polimerización máximo (DP_{max}) de 200, mientras que para las fructanas de origen bacteriano el DP_{max} puede llegar a alcanzar hasta

un valor de $n = 100.000$ [16].

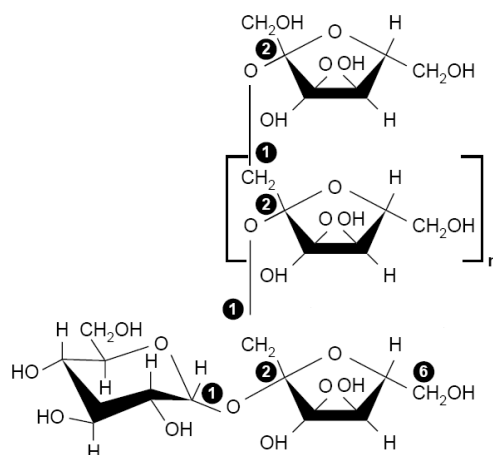


Figura 4. Estructura general de las fructanas del tipo inulina [23].

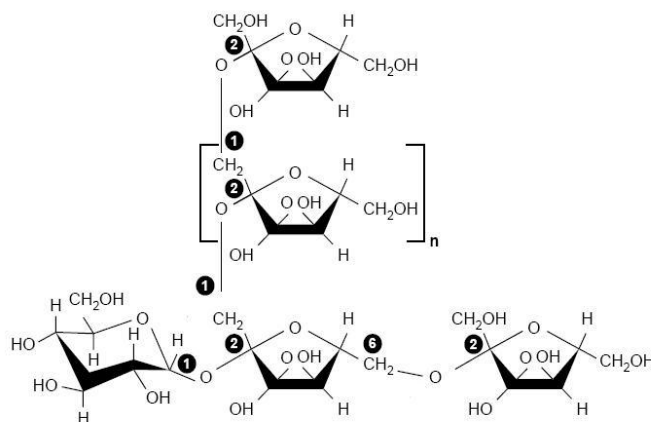


Figura 5. Estructura química de las inulinas mixtas o ramificadas [23].

Las fructanas se pueden clasificar según su grado de polimerización, donde las más ampliamente estudiadas y utilizadas por la industria alimenticia son los fructooligosacáridos también llamados FOS, las oligofruktosas y las inulinas, estándar y de alta pureza conocidas como inulina HP [26, 27]. Algunas de las características de estos compuestos se muestran en la Tabla 2.

Los fructooligosacáridos son compuestos que poseen un rango de grado de polimerización de 2 a 4 en sus unidades, el cual es utilizado para describir los fructanos de cadena corta sintetizados a partir de sacarosa. El término oligofruktosa es referente a las mezclas de fructanas con un $DP_{max} < 10$, que ha sido producido a partir de la hidrólisis parcial de la inulina, y ha sufrido una separación física para remover los compuestos de inulina de cadena larga ($DP \geq 10$) [28, 29]. Tanto los FOS como las oligofruktosas son muy parecidos con base en sus propiedades, ya que presentan un

contenido de azúcares similar de 5%, el cual les confiere una moderada dulzura y pueden ser utilizados como sustituto del azúcar; pero la diferencia radica en el origen de su obtención [26, 27].

Tabla 2. Características de las fructanas según sus variaciones de grado de polimerización [26, 27].

<i>Característica</i>	<i>FOS</i>	<i>Oligofructosa</i>	<i>Inulina estándar</i>	<i>Inulina HP</i>
Grado de polimerización (DP)	2 – 4	2 – 9	2 – 60	10 – 60
DP _{prom}	3,7	4,5	12	25
Origen	Transfructosilación de las sacarosa	Hidrólisis enzimática de la inulina	Extracción en plantas	Extracción de plantas y purificación
Contenido de azúcares (%)	5	5	8	0,5
Sabor	Moderadamente dulce	Moderadamente dulce	Neutro	Neutro
Solubilidad en agua a 25°C (g/L)	> 750	> 750	120	25
Funcionalidad en alimentos	Sustituto de azúcar	Sustituto de azúcar	Sustituto de grasas	Sustituto de grasas

El principal término a ser usado en esta investigación es el de inulina, el cual es utilizado para describir los fructanos resultantes de las extracciones en agua caliente que no han sido sometidos a procesos de separación por peso molecular. Por otro lado, la inulina HP o de alto desempeño por sus siglas en inglés es utilizado para representar exclusivamente a las fructanas del tipo inulina de cadena larga, que presentan altos pesos moleculares, con grados de polimerización mayores o iguales a 10, obtenidas por la remoción física de las fructanas con DP < 10 [28, 29].

La Inulina desde el punto de vista funcional. Las fructanas están directamente asociadas con diversas aplicaciones alimenticias y nutricionales, debido a las características que presentan estos compuestos. Primeramente, como se ha mencionado, las fructanas son fibra dietética soluble con un bajo contenido calórico de 3,9 kcal·g⁻¹ [30]. La fibra juega un papel importante en la prevención de algunas enfermedades, y las dietas con un alto contenido de fibra (cereales, frutas, verduras) tienen un efecto positivo en la salud, ya que según *Rodríguez et al.* [11], su consumo se ha relacionado con una disminución en la incidencia de algunos tipos de cáncer, por ejemplo, el de colon.

Los prebióticos estimulan selectivamente el crecimiento y actividad de especies de bacterias específicas en el colon, usualmente de género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, con beneficios en la salud [31]. Un prebiótico es por definición según *Gibson y Roberfroid* [32] un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped, mediante la estimulación selectiva del crecimiento o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por tanto mejora la salud del huésped.

La inulina y la oligofruktosa poseen efectos prebióticos, los cuales estimulan el sistema inmunológico de los seres humanos al fomentar el crecimiento de la microflora intestinal benéfica [33]. Este tipo de carbohidratos con efectos prebióticos son resistentes a la hidrólisis enzimática en el tracto gastrointestinal superior y llegan casi intactos al intestino grueso, donde son completamente fermentados. Esta fermentación convierte la inulina en biomasa, ácidos grasos de cadena corta, lactato y gases [34].

Estudios como los realizados por *Cummings et al.* [31], *Li et al.* [34], y *Bouhnik et al.* [35], demuestran que las fructanas incrementan específicamente el contenido de bifidobacterias. Se ha demostrado un incremento hasta de un 50% [32], que a su vez reprime el crecimiento de patógenos como las bacterias del género *Clostridium*, presentes en el intestino. Otro estudio ejecutado por *Bouhnik et al.* [36] en el año de 2006, determinó que las fructanas de cadena corta en una dosis que se encuentra en un rango de 2,5 a 10 g/día incrementan el contenido de este tipo de bacterias benéficas para el organismo. Este incremento es conocido como efecto bifidogénico, con lo cual se mejora la absorción de nutrientes, se acelera el tracto intestinal y se refuerzan las defensas del sistema inmune [33]. El incremento de la microflora intestinal ayuda a mitigar el estreñimiento, por lo que se han realizado estudios que han demostrado que, el consumo de 1 a 2 g por día de inulinas, mejora el tracto intestinal por el efecto prebiótico que poseen este tipo de compuestos, disminuyendo el estreñimiento y el malestar abdominal, aumentando a su vez significativamente la frecuencia de las deposiciones [36]. Así mismo, se ha demostrado que la inulina y las oligofruktosas reducen las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas [38].

Por otro lado, la inulina y los fructooligosacáridos al ser carbohidratos no digeribles, llegan directamente al intestino grueso, donde se convierten en ácidos, los cuales disminuyen el pH del intestino, aumentando la superficie del área intestinal, y con esto favoreciendo la biodisponibilidad o absorción de minerales esenciales como el calcio en el tejido óseo, mostrando de esta manera un potencial para prevenir o posponer la osteoporosis [33, 39]. Estudios como los realizados por *Van den Heuvel et al.* [40] han demostrado que 15 gramos al día de inulina favorecen la mineralización de los huesos.

Otros estudios como los realizados por *Davidson y Maki* [41], y *Rault-Nania et al.* [42] han demostrado que el consumo diario de inulina reduce el desarrollo de la arterosclerosis, debido a que la inulina actúa reduciendo la acumulación de triglicéridos en el hígado y la concentración de colesterol en el plasma, actuando como modulador en el metabolismo de los lípidos. Asimismo, estudios posteriores efectuados por *Dahech et al.* [43] demostraron que las fructanas poseen potenciales efectos antioxidantes y podrían ser protectores del estrés oxidativo, generando un decrecimiento en la peroxidación de lípidos que conduce a la reducción en el riesgo de la enfermedad y a trastornos crónicos del corazón, asociados a altas concentraciones de colesterol de baja densidad.

En cuanto a la diabetes, a través de la ingesta de las fructanas se favorece la producción de la hormona conocida como GLP1, responsable de la producción de insulina, con lo cual se ayuda a regular la enfermedad, controlando los niveles de glucosa en la sangre [33, 44].

Como se mencionó anteriormente, la fermentación de la inulina en el intestino grueso produce ácidos grasos de cadena corta, dentro de los cuales se encuentra el ácido butírico. Este compuesto juega un papel fundamental, ya que mantiene las células presentes en el colon protegidas de la adhesión de bacterias patógenas, evitando el desarrollo del cáncer de colon al modular la actividad enzimática, regulando además las lesiones precancerígenas y los tumores en el intestino grueso [45, 46].

Aplicaciones de las fructanas en la industria alimenticia. La inulina y los fructooligosacáridos se reconocen como ingredientes de alimentos que promueven la salud de los seres humanos como se ha mencionado en párrafos anteriores, debido a su efecto prebiótico y ser compuestos pertenecientes a la clasificación de fibra dietética con propiedades funcionales. La variedad de conformaciones químicas y estructurales, así como el grado de polimerización que caracterizan a este tipo de compuestos, los convierte en ingredientes flexibles y atractivos para diferentes aplicaciones alimentarias [47].

La inulina estándar con un grado de polimerización de 2–60 presenta un sabor neutral, y una solubilidad moderada en agua, como se mostró en la Tabla 2, por lo que se puede combinar fácilmente con otros ingredientes en una formulación alimenticia. Al combinarse con el agua o la leche forman microcristales de inulina, los cuales son discretamente perceptibles en la boca, pero que interactúan para formar una textura suave y cremosa, proporcionando una similitud a productos que contienen grasas. Por esta razón, la inulina ha sido utilizada como un sustituto de las grasas ya que mejora la sensación y sabor del producto, así como provee un bajo contenido calórico [33].

En alimentos de contenido de humedad elevado, especialmente en heladería y derivados lácteos, así como en embutidos, las fructanas son utilizadas como sustitutas de grasas, adoptando las características antes mencionadas. Por lo general, la tasa de reemplazo es de 0,25 g de inulina para emular 1 g de grasa [48]. Estudios realizados por *Mendoza et al.* [49] determinaron que se pueden producir salchichas con 40–50% menos de grasa y con un 30% menos de calorías que las salchichas convencionales adicionando inulina en polvo. La inulina proporcionó una textura más suave, así como una elasticidad y adhesividad muy similares al de las salchichas que se encuentran mayoritariamente en el mercado. Por otra parte, al enriquecer con fibra dietética soluble se mejoraron sus propiedades nutricionales.

Los fructooligosacáridos y la oligofructosa, fructanas de cadena corta con grados de polimerización de 2–10 son más solubles en agua, y poseen un sabor moderadamente dulce, alrededor de un 30–50% de la percepción de dulzura que el azúcar de mesa [33]. Estas características hacen que este tipo de compuestos sean adecuados para utilizarlos como sustitutos del azúcar en alimentos y bebidas tales como caramelos, productos de confitería, de panadería, productos fermentados, jugos de frutas, jaleas y postres [48, 50]. La oligofructosa se utiliza a menudo en combinación con edulcorantes de alta intensidad para reemplazar los azúcares y proporcionar un perfil de edulcorante bien equilibrado nutricionalmente [33].

En este trabajo se pretende aprovechar el residuo generado del ñame (*Dioscorea alata*) a partir del rechazo de exportación del producto, para la extracción de fructanas, debido a la riqueza natural del ñame en este compuesto. Las fructanas poseen usos potenciales en la industria alimenticia, ya sea como edulcorante o fibra dietética.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Obtención de la materia prima. El producto de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo utilizado en esta investigación se obtuvo a partir de la realización de un muestreo no probabilístico por conveniencia, en la zona Huetar Norte de Costa Rica, donde se seleccionaron tres localidades de la zona (*Los Chiles, Upala y Guatuso*), y se visitaron dos fincas en cada uno de estos sitios de interés. En total se visitaron seis lotes en toda la región. En la Tabla 3 se muestran las especificaciones de ubicación y altura de cada uno de los lotes. La visita se realizó en época lluviosa, durante el mes de noviembre, donde se recolectaron en cada uno de los puntos de 7 a 8 kg de ñame de rechazo (5 – 6 tubérculos).

Tabla 3. Especificaciones de los lotes en estudio de la zona *Huetar Norte de Costa Rica*.

<i>Lotes en</i>	<i>Región</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Altura</i>
-----------------	---------------	----------------	-----------------	---------------

<i>estudio</i>				<i>m</i>
L1	Los Chiles (1)	10°47'44.40"N	84°35'30.51"O	122 ± 6
L2	Los Chiles (1)	10°47'49.10"N	84°35'46.90"O	120 ± 5
L3	Upala (2)	11° 1'54.50"N	85° 8'58.00"O	79 ± 5
L4	Upala (2)	11° 1'15.30"N	85° 8'35.90"O	61 ± 7
L5	Guatuso (3)	10°41'21.10"N	84°52'50.90"O	98 ± 8
L6	Guatuso (3)	10°43'10.60"N	84°50'46.50"O	57 ± 7

Tratamiento de la muestra. Se lavaron los tubérculos para eliminar la suciedad y se cortaron en trozos de aproximadamente 2 – 3 cm de lado. Se incluyeron cáscara y pulpa de los tubérculos. El 40% de la masa total de los tubérculos de cada lote se secó y se caracterizó según los análisis que requieren que la muestra se encuentre libre de humedad. El restante 60% se licuó, almacenó en recipientes adecuados y debidamente etiquetados para conservarse a –20°C en un *biofreezer*, y ser utilizado en el proceso de extracción.

Tabla 4. Métodos de caracterización de los lotes de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo.

<i>Análisis</i>	<i>Metodología y referencia</i>
Preparación de la muestra seca	ASTM D1757–013 [51].
Determinación del porcentaje de humedad	ASTM D4442–92 [52].
Determinación del porcentaje de cenizas	ASTM E1755–01 [53].
Determinación del porcentaje de solubilidad en agua fría	ASTM D1110–84 [54].
Determinación del porcentaje de solubilidad en agua caliente	ASTM D1110–84 [54].
Determinación del porcentaje de grasa.	Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist AOAC 920.39 [55]
Determinación del porcentaje de nitrógeno orgánico y proteína	<i>Standard Methods Committe</i> en 1997 [56], <i>Sánchez et al.</i> [57]
Determinación del porcentaje de fibra dietética total	Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist (AOAC) [58]
Determinación del porcentaje de carbohidratos totales	<i>Bender</i> [9], <i>Blanco–Metzler et al.</i> [13], <i>Ramírez</i> [59]
Determinación de la concentración de minerales de importancia alimenticia	Espectroscopia de Absorción Atómica, mediante la Metodología de la AOAC [58].

Caracterización de los lotes de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo. Se realizó una caracterización al sustrato en estudio según se muestra en la Tabla 4. Cada uno de los análisis fue realizado a los seis lotes en estudio, donde las determinaciones se efectuaron por triplicado o cuadruplicado. Adicionalmente, se realizó un estudio de minerales a uno de los lotes en estudio.

OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE FRUCTANAS

Material experimental. Las muestras previamente licuadas y almacenadas a -20°C de temperatura en un *biofreezer* se descongelaron en un baño de agua hasta alcanzar la temperatura ambiente para ser utilizadas en esta etapa

Diseño experimental. El diseño del experimento se llevó a cabo con la utilización del paquete estadístico *Minitab*® versión 16.1.0. Se utilizó un estudio factorial para la determinación de la mejor combinación de factores en la obtención de una mayor concentración de fructanas en base seca, la cual es la variable de respuesta en el experimento realizado. Los factores en estudio son la temperatura en dos niveles (70 y 90°C), el tiempo en dos niveles (30 y 90 minutos de extracción), así como los lotes de obtención de la materia prima a 6 niveles (L1, L2, L3, L4, L5 y L6, denominados de esta manera en la sección 3.1). La utilización del software determinó todas las posibles 24 combinaciones de los tratamientos, con el cual se utilizó el criterio de aleatoriedad y se denominó a cada combinación como ensayos del 1 al 24, se utilizó una réplica para cada uno.

Extracción de las fructanas y filtración de los extractos. El desarrollo del proceso de extracción de las fructanas se llevó a cabo tomando como base las metodologías propuestas por Zubaidah y Akhadiana [60], Judprasong et al. [61], Winarti et al. [21], así como de la utilización de la patente número 5.846.333 elaborada por Partida et al. [62].

Se determinó la masa de 30 gramos de muestra por diferencia y se colocó en un balón de fondo redondo de tres bocas, al cual se le añadieron 120 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50°C . El matraz se colocó en un sistema de extracción, compuesto por un agitador-calentador, baño de agua, condensador y termómetro. La temperatura y el tiempo de extracción se controlaron según los tratamientos de cada uno de los ensayos, con agitación constante y condensación para evitar pérdida de volumen. Al finalizar el tiempo de extracción se dejó enfriar la disolución a temperatura ambiente. Una vez que se dejó reposar la solución obtenida luego del proceso, se decantó el extracto líquido y se pasó por una malla de nylon de 1 cm de poro. Luego, se filtró al vacío utilizando crisoles de vidrio poroso de 30–40 μm con una capa de *Celite*® 545 como medio filtrante. Por último, el líquido obtenido se hizo pasar por filtros de jeringa de 0,80 y 0,45 μm de acetato de celulosa respectivamente hasta la obtención del extracto final

Determinación del porcentaje de fructanas en los extractos. La cuantificación de las inulinas presentes en los extractos se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, utilizando un detector de índice de refracción y una columna del tipo amino; donde, se

evaluaron primeramente los azúcares libres presentes y se realizó una posterior hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa e inulinasa de *Aspergillus niger* para la obtención de las concentraciones finales del compuesto de interés presente en la muestra.

Optimización de la separación cromatográfica de los azúcares en estudio. La cuantificación de los azúcares se realizó mediante la técnica de separación cromatográfica, de los tres azúcares de interés: fructosa, glucosa y sacarosa. La correcta separación de los picos se logró mediante la ejecución de un procedimiento con las condiciones descritas en la Tabla 5, elaborado a partir de la realización de un estudio de artículos científicos como los escritos por *Judprasong et al.* [61], *Król y Grzelak* [18], *Vendrell–Pascuas et al.* [63] y *Xiaoli et al.* [64], así como el seguimiento del método de la *Comisión Internacional de la Miel* [65], y el procedimiento descrito por la norma ASTM E1758–01 de cuantificación de azúcares, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia [65].

Tabla 5. Condiciones instrumentales utilizadas en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Dionex UltiMate3000* para el desarrollo del método de cuantificación.

<i>Módulo del equipo</i>	<i>Condiciones cromatográficas</i>
UltiMate 3000 Pump	Flujo: 0,500 mL/min. Fase Móvil: 92% Acetonitrilo, 8% Agua.
UltiMate 3000 Autosampler Column Compartment	Columna SUPELCOSIL™ LC–NH ₂ , 5 µm, de 25 cm 4,6 mm Temperatura en el compartimento de columna: 22°C Temperatura en el compartimento de muestra: 15°C Volumen de Inyección: 200 µL
RI Detector, Shodex RI–101	Temperatura: Off (ambiente, 22°C) Polaridad: Positiva

En cada análisis cromatográfico se cuantificaron los contenidos de los carbohidratos, para lo que se prepararon curvas de calibración con concentraciones que van de 0,600 a 6,000 mg/mL de cada compuesto, preparados mediante la medición directa de la masa en balones aforados de 50 mL, utilizando agua destilada tipo I. Cada una de las disoluciones patrón se filtró utilizando filtros de jeringa de 0,45 µm de acetato de celulosa y se inyectaron en el cromatógrafo bajo las condiciones descritas en la tabla anterior. Además, como control de calidad para verificar la estabilidad y reproducibilidad de los datos se analizó una muestra control de una concentración de 2,400 mg/mL.

Para la cuantificación de los azúcares y la determinación de las áreas y las concentraciones tanto de los patrones como de las muestras se utilizó el software *Chromeleon Server Version 6.80 SRIO Build 2818*, *Dionex Corporation*.

Cuantificación de las muestras y proceso de hidrólisis enzimática. El procedimiento de cuantificación de las inulinas presentes se realizó mediante la metodología propuesta por *Prosky y Hoebregs* [67], en la cual las muestras son tratadas con amilogucosidasa e inulinasa, y los azúcares son determinados mediante la técnica de cromatografía líquida. La concentración de los fructanos presentes en las muestras se calculó por la diferencia de azúcares presentes en los dos tratamientos enzimáticos y en la muestra inicial. Metodologías descritas por *Wang et al.* [68], *Liu et al.* [69] y *Andersen y Sorensen* [70] respaldan el procedimiento ejecutado.

Purificación con carbón activado. La purificación con carbón activado consiste en la eliminación de sustancias que son las causantes de producir turbidez, color y alteraciones en el sabor y olor de un producto utilizado a nivel de industria alimenticia, como es el caso de los extractos de fructanas, es por esta razón que se procedió a realizar esta etapa adaptando la metodología descrita por *Partida et al.* [62].

Separación de las fructanas. La separación de las fructanas presentes en los extractos en estudio se basó en el método de producción de jarabe de fructosa a partir de inulina mediante ultrafiltración descrito en la patente número 4,421,852 elaborado por *Hoehn et al.* [71] y en la metodología descrita por *Alvarado et al.* [72]. La ultrafiltración es un proceso de separación de compuestos por pesos molecular mediante la utilización de una membrana semipermeable [9], proceso implementado a escala de laboratorio para la realización de una distribución de pesos moleculares de las fructanas presentes en los extractos en estudio, mediante la utilización de unidades de ultrafiltración de 10 y 50 kDa (*Advantec MFS, Inc. Modelos USY-1, USY-5*).

Obtención final de las fructanas. Existen diversas formas de obtener las fructanas según sus pesos moleculares, dichos compuestos de altos pesos moleculares se pueden desarrollar mediante la técnica de secado de aspersion o *Spray Dryer* y liofilización. Mientras que las fructanas de cadenas cortas como las oligofructosas y los fructooligosacáridos son obtenidos mediante la concentración o eliminación del agua presente en el extracto, generando jarabes con características prebióticas como producto final. Para el desarrollo de un jarabe rico en fructanas de cadena corta, se procedió a calentar a 60°C el extracto final obtenido posterior a la ultrafiltración, utilizando la unidad de 10 kDa. El proceso fue realizado hasta alcanzar aproximadamente el 10% del volumen inicial de extracto.

Caracterización de las fructanas presentes en el producto de ñame de rechazo. Como parte de la caracterización de las fructanas obtenidas, se realizó un análisis térmico mediante la técnica de termogravimetría. Además, se evaluó el peso molecular de las fructanas obtenidas con

base en la técnica de cromatografía líquida con su variación de exclusión por tamaño.

Caracterización térmica por Análisis Termogravimétrico (TGA). El análisis de termogravimetría (TGA) de las fructanas se realizó mediante la utilización de la norma ASTM E1131–98 [73]. El análisis termogravimétrico determina los cambios de masa de una muestra en función de la temperatura y es utilizado para caracterizar la estabilidad térmica y descomposición de un material [74]. La determinación consiste en el análisis de una masa de 5 mg de muestra, en una atmósfera inerte, la cual es colocada en una cápsula de platino, previamente tarada por el equipo. El programa de análisis para la muestra, se realizó mediante un barrido desde los 25 hasta los 600 °C, con un gradiente de temperatura de 20°C/min, utilizando una atmósfera inerte, con un flujo de nitrógeno gaseoso de 60 mL/min.

Determinación del peso molecular de las muestras finales. El peso molecular de las fructanas se determinó por la utilización de la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), también llamada cromatografía de permeación en gel (GPC) [75]. Para la determinación se adaptó un método con base en las metodologías descritas por Gómez– Ordóñez et al.[76] y de Oliviera et al. [77] para el análisis de muestras de polisacáridos. Para la obtención del peso molecular de las fructanas presentes en los ensayos, se prepararon seis patrones con concentraciones de 2,0 mg/mL para pesos moleculares de 1.000, 5.000, 12.000, 25.000, 80.000 y 150.000 kDa. Tanto los patrones como las muestras se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo utilizando dos columnas en serie con tamaño de poro de 60 y 150 Å, bajo las condiciones descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones instrumentales cromatográficas utilizadas para la determinación del peso molecular de las fructanas extraídas mediante la técnica de GPC.

<i>Módulo del equipo</i>	<i>Condiciones cromatográficas</i>
UltiMate 3000 Pump	Flujo: 0,500 mL/min. Fase Móvil: 100% Agua.
UltiMate 3000 Autosampler Column Compartment	Columna Macrosphere GPC–60 µm, de 250 mm·4,6 mm. Columna Macrosphere GPC–150 µm, de 250 mm·4,6 mm Temperatura en el compartimento de columna: 25°C. Temperatura en el compartimento de muestra: 17°C. Volumen de Inyección: 20 µL.
RI Detector, Shodex RI–101.	Temperatura: Off (ambiente, 22°C) Polaridad: Positiva

Las muestras que se analizaron fueron las de los ensayos 10 (L5, T90, t90) y 23 (L1, T70, t90), las cuales presentaron mayor concentración de fructanas según la cuantificación realizada mediante la metodología descrita anteriormente. El extracto utilizado es el obtenido posterior a la

ultrafiltración con la unidad de membrana de 10 kDa. Para la determinación se utilizó el *Extension Pack* para GPC del software *Chromleon Server Version 6.80* de *Dionex Corporation*, el cual genera el peso molecular promedio de los picos presentes en el cromatograma y el porcentaje de estos en la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los lotes de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo.

Análisis proximal de las muestras en estudio. El ñame (*Dioscorea alata*) está constituido por una amplia variedad de compuestos y nutrientes de importancia alimenticia, característicos según la variedad y las condiciones de cultivo de los tubérculos como el tipo de suelo, el clima y la altura. Por tanto, se ejecutó un análisis proximal del sustrato en estudio, que es referente según *Nielsen* [78] y *Barquero* [79] al contenido de humedad, ceniza, proteína, grasa y carbohidratos. En la Tabla 7 se presentan los datos del análisis de las muestras de los lotes de ñame de rechazo recolectadas e identificadas.

Tabla 7. Análisis proximal de las muestras de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo en estudio.

<i>Muestra en estudio</i>	<i>Humedad</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Proteína</i>	<i>Grasa</i>	<i>Carbohidratos totales</i>
Lote 1 (Los Chiles)	72,7 ± 0,6%	1,5 ± 0,1%	2,25 ± 0,03%	0,63 ± 0,04%	23,0 ± 0,6%
Lote 2 (Los Chiles)	70 ± 1%	2,5 ± 0,2%	1,49 ± 0,02%	0,57 ± 0,02%	25 ± 1%
Lote 3 (Upala)	81 ± 3%	4,6 ± 0,4%	1,90 ± 0,04%	0,41 ± 0,02%	12 ± 3%
Lote 4 (Upala)	79,6 ± 0,3%	6,3 ± 0,1%	2,79 ± 0,07%	0,36 ± 0,02%	11,0 ± 0,4%
Lote 5 (Guatuso)	73,9 ± 0,9%	2,5 ± 0,2%	0,90 ± 0,04%	0,46 ± 0,04%	22 ± 1%
Lote 6 (Guatuso)	76 ± 1%	4,6 ± 0,4%	1,27 ± 0,06%	0,48 ± 0,03%	18 ± 1%

El porcentaje de humedad representó el principal constituyente del sustrato para cada uno de los lotes en estudio, como lo muestran los resultados de la Tabla 7, donde el contenido de agua alcanzó valores de entre 70,4 y 80,6%. El contenido de humedad en las muestras constituye un

parámetro importante, el cual es utilizado como un factor para facilitar el procesamiento de las muestras, reduciendo los costos, el tiempo y generando una rentabilidad mayor en un proceso.

En lo que respecta al porcentaje de ceniza, los valores oscilan entre 1,5 – 6,3%, los cuales son relativamente similares a los reportados por *Sandí* para la misma especie en *Costa Rica* con un valor de 3,42% [2]. Los principales componentes de la ceniza según *Marshall* son las vitaminas y nutrientes como el calcio, hierro, potasio y magnesio [80]. Este ensayo en general para todas las muestras presenta una la variabilidad alta, lo que se determina que los componentes minerales relacionados al contenido de ceniza en las plantas superiores varían considerablemente, no solo de una especie a otra, también en las mismas especies según las condiciones de siembra, el tipo de suelo y los agroquímicos utilizados. Los resultados del contenido de proteína van del 0,90 al 2,79%, los cuales son valores relativamente bajos, en comparación con fuentes naturales de proteína como el pescado con porcentajes mayores al 20% [81], con lo que se determina que la especie de rechazo en estudio no es un producto con alto valor nutritivo en este tipo de compuesto. Además, el sustrato presentó porcentajes de grasa cercanos al 0,5% en cada una de las muestras, lo cual lo hace una materia prácticamente libre de grasa. El análisis de carbohidratos totales para las muestras presenta valores en el rango de 11,0 – 25%. Estos porcentajes son considerados altos en comparación a otras fuentes de origen vegetal como la cebolla, con porcentaje de 7,2% determinado por el ITCR en un estudio similar al del ñame, estos carbohidratos forman parte de la estructura funcional de reserva energética de la planta [82].

Como muestran los resultados, los Lotes 5, 1 y 2 presentan las mayores concentraciones de carbohidratos con valores ascendentes respectivamente de 22, 23,0, y 25%. Estas muestras representan ser las de mayor importancia sin dejar de lado las demás, debido a que las fructanas forman parte de los carbohidratos totales, siendo parte de los polisacáridos no amiláceos correspondientes, por definición según *Bender* [10] carbohidratos no disponibles o en su caso fibra dietética total, término general para los carbohidratos presentes en alimentos que no son digeridos por las enzimas digestivas, al ser fermentados por bacterias en el intestino [83].

En la Tabla 8, se muestran los resultados promedio obtenidos para la determinación de la solubilidad en agua fría y caliente, evaluando los seis lotes en estudio de ñame de rechazo (*Dioscorea alata*).

La determinación del porcentaje en agua fría muestra un rango de concentraciones entre 22 y el 30,7 %, referente a la presencia de taninos, colorantes, gomas y azúcares según la norma ASTM

D1110–84 (70). El análisis de la solubilidad de las muestras en agua caliente presenta porcentajes desde el 27 hasta el 37,8%, concentraciones mayores a las del análisis en agua fría, indicativo de la presencia de almidones y sus derivados, debido a sus características hidrosolubles a la temperatura de ebullición del agua, lo que demuestra que la prueba es confirmatoria de la presencia de estas sustancias en los lotes de interés, relacionado proporcionalmente con la presencia de fructanas al ser compuestos solubles en agua [10, 83].

Tabla 8. Determinación del porcentaje de solubilidad en agua caliente y fría de las muestras de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo en estudio.

<i>Muestra en estudio</i>	<i>Solubilidad en agua fría</i>	<i>Solubilidad en agua caliente</i>
Lote 1 (Los Chiles)	26,5 ± 0,5%	32,2 ± 0,6%
Lote 2 (Los Chiles)	24,3 ± 0,9%	27 ± 1%
Lote 3 (Upala)	29 ± 2%	37,8 ± 0,2%
Lote 4 (Upala)	30,7 ± 0,7%	33 ± 2%
Lote 5 (Guatuso)	22 ± 1%	29,3 ± 0,3%
Lote 6 (Guatuso)	30 ± 1%	32,8 ± 0,8%

Evaluación del porcentaje de fibra dietética total. La fibra dietética total por definición según Yang *et al.* [10] es aquella parte comestible de las plantas o en su caso carbohidratos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con la fermentación completa o parcial en el intestino grueso [12]. Es por esta razón que integrar la medición de la fibra dietética total es determinante en la investigación, al estar compuesta por fibra dietética soluble e insoluble [9], y ser las inulinas y sus derivados de oligofruktosas azúcares fermentables y con comportamientos de fibra dietética soluble en el tracto intestinal [12, 34]. En la Tabla 9, se muestran los resultados de fibra dietética total obtenidos para cada una de las muestras, además del porcentaje de carbohidratos disponibles.

Los porcentajes de fibra dietética total en base húmeda presentan valores que se encuentran en el intervalo del 2,9 al 7,2%. Determinaciones relativamente altas con respecto a los porcentajes citados por Blanco–Metzeler *et al.* [13] para la misma especie en estudio (*Dioscorea alata*) con valores de 2,3% en base húmeda.

Tabla 9. Determinación del porcentaje de fibra dietética total y carbohidratos disponibles en las muestras de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo en estudio.

<i>Muestra en estudio</i>	<i>Fibra dietética total</i>	<i>Carbohidratos disponibles</i>
Lote 1 (Los Chiles)	4,7 ± 0,2%	18,2 ± 0,6%
Lote 2 (Los Chiles)	6,8 ± 0,5%	18 ± 1%
Lote 3 (Upala)	3,8 ± 0,6%	9 ± 3%
Lote 4 (Upala)	2,9 ± 0,2%	8,1 ± 0,4%
Lote 5 (Guatuso)	5,4 ± 0,2%	17 ± 1%
Lote 6 (Guatuso)	7,2 ± 0,2%	10 ± 1%

*Carbohidratos disponibles = carbohidratos totales – fibra dietética total

A partir de estos resultados se puede relacionar el contenido de fibra dietética total con la concentración de fructanas presentes en las muestras, debido a que parte de la fibra dietética total pertenece a este tipo de compuestos; por lo tanto, se realizó un análisis estadístico para evaluar la relación de las muestras con respecto a los lotes de interés. Se determinó como variable de respuesta el porcentaje de fibra dietética total y como factor los lotes, siendo la hipótesis nula que los lotes sean iguales y la hipótesis alternativa que sean diferentes [84].

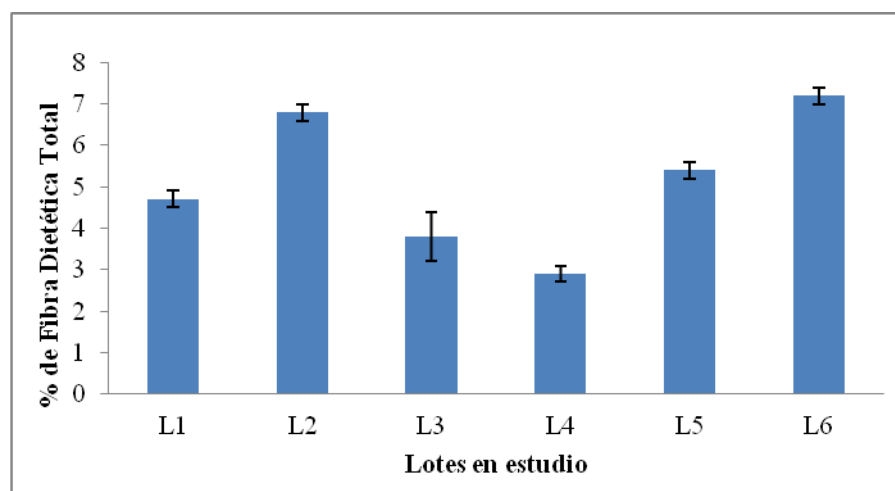


Figura 6. Porcentaje de fibra dietética total para los lotes en estudio.

La Figura 6 muestra la independencia de cada uno de los lotes del estudio, además que el Lote 3 evidencia ser la muestra con una variabilidad mayor y por el contrario el Lote 4 la que presenta una menor desviación. También, se puede observar como los Lotes 2 y 6 presentan los porcentajes más altos de fibra dietética total. Al realizar el análisis estadístico, se presentan resultados para el

valor p de 0 en el test de varianzas iguales, el cual es menor al nivel de significancia ($p < 0,05$). Por esta razón, hay evidencia estadística para aceptar la condición de que los datos sean diferentes, al rechazar la hipótesis nula.

Los lotes que presentan una mayor concentración de fibra dietética total son el Lote 2 ($6,8 \pm 0,5\%$) y el Lote 6 ($7,2 \pm 0,2\%$). Es por esta razón que al estar relacionado el análisis con la concentración de fructanas, estos dos lotes podrían presentar una mayor concentración de inulina y sus derivados, y el Lote 4 al poseer la concentración más baja de fibra dietética ($2,9 \pm 0,2\%$) sea la muestra con menor contenido de estos compuestos.

Determinación de la concentración de minerales de importancia alimenticia. La importancia nutricional y funcional de algunos minerales presentes en altas concentraciones y de forma natural en productos alimenticios es relevante de analizar, ya que pueden ser una fuente nutricional específica de algún elemento que posea características beneficiosas para la salud humana, al prevenir enfermedades y mantener un equilibrio metabólico adecuado. Es por esta razón que se decidió realizar un análisis de los principales minerales como el potasio, calcio, sodio, zinc y manganeso mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica [85, 86].

La muestra Lote 3 se escogió para esta determinación debido al contenido de ceniza que presenta, ya que su valor de $4,6 \pm 0,4\%$ es un porcentaje intermedio obtenido en relación a los demás lotes, este análisis está relacionado estrechamente a la presencia de minerales de importancia alimenticia. Los resultados del análisis de minerales se presentan en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Resultados del análisis de minerales al Lote 3 ($11^\circ 1'54.50''N$, $85^\circ 8'58.00''O$) de ñame (*Dioscorea alata*) proveniente de la zona *Huetar Norte específicamente de Upala*.

<i>Minerales</i>	<i>Concentración</i>
Potasio	$2,0 \pm 0,4\%$ m/m
Cinc	23 ± 1 mg/kg
Manganeso	$36,4 \pm 0,5$ mg/kg
Calcio	609 ± 7 mg/kg
Magnesio	67 ± 1 mg/kg
Sodio	295 ± 8 mg/kg

*Concentraciones en base húmeda

Los resultados muestran concentraciones de potasio de $2,0 \pm 0,4$ g en 100 gramos de sustrato,

donde en relación con los datos que presenta el *Institute of Medicine of the National Academies* [87] de RDA (*Recommended Daily Allowance*) que por definición según *Bender* es la concentración de nutrientes requeridos por día determinados mediante estudios en poblaciones [9], presentan para el potasio concentraciones de 2,8 a 3,3 g/día para hombres y 2,2 a 2,4 g/día para mujeres en edades entre 19 a 50 años. Esto evidencia que el sustrato en estudio está compuesto por una alta concentración de potasio, el cual con un consumo de 100 g puede incluso cubrir el requerimiento nutricional del mismo. El potasio es un componente importante en los fluidos celulares y del cuerpo, el cual beneficia en controlar la frecuencia cardiaca, la presión arterial y una disminución en los riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares al contrarrestar los efectos de hipertensión provocados por excesivas concentraciones de sodio [88, 89].

Las concentraciones de cinc y manganeso presentan valores de 23 ± 1 y $36,4 \pm 0,5$ mg/kg, respectivamente, las cuales son de valor nutricional medio, ya que la ingesta recomendada diaria es de 8 y 11 mg/día para el zinc y de 1,8 y 2,3 mg/día para el manganeso en mujeres y hombres respectivamente, en edades de entre los 19 y 50 años [90]. El zinc es un nutriente requerido necesario para la adecuada síntesis de proteínas, así como para la formación de colágeno, indispensable para mantener un sistema inmunológico sano y evitar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales [90, 91]. El manganeso interviene en la formación de los huesos y reacciones específicas relacionadas con los aminoácidos, el colesterol y el metabolismo de carbohidratos [90]. Por último, los valores para el calcio, magnesio y sodio son considerados bajos en comparación con los de RDA [87, 90].

Análisis del proceso de extracción de las fructanas y obtención de los extractos. La extracción de las fructanas contenidas en la especie *Dioscorea alata* de rechazo de las muestras de interés se basó en la solubilidad que presenta este compuesto en agua caliente. A escala de laboratorio se utilizó la misma relación de muestra y agua (30 g en 120 mL) para todos los ensayos del diseño, aprovechando a su vez que el porcentaje de humedad de las muestras tiene valores muy similares. *Roberfroid* [92] y *Frank* [26] han reportado que las inulinas son compuestos solubles en agua, los cuales presentan una solubilidad de 120 g/L a una temperatura de 25°C, específicamente para la inulina estándar comercial obtenida a partir de achicoria [26].

La extracción de las fructanas se realizó utilizando el diseño de experimentos a dos temperaturas (70 y 90°C) y dos tiempos (30 y 90 minutos) para cada una de las muestras, mediante el uso de un balón de tres bocas acoplado a un condensador para evitar la pérdida de volumen en el proceso. La solución resultante fue filtrada utilizando membranas de distintas porosidades hasta la

obtención de un extracto clarificado al eliminar las impurezas presentes. El extracto final presenta una coloración amarilla pálida, además es un líquido con una viscosidad cinemática de $5,561 \pm 0,008 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, mayor al valor del agua ($0,960 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a 22°C [93], este parámetro fue determinado al ensayo 11 perteneciente al Lote 2 en estudio, el cual presenta la mayor concentración de carbohidratos totales según la caracterización realizada. La prueba se ejecutó mediante la utilización de un viscosímetro N° 200 *Cannon–Fenske* calibrado. Este ensayo fue importante debido a que la presencia de sólidos solubles afecta la viscosidad del extracto, y a medida que incrementa la concentración de azúcares aumenta la viscosidad [94].

Cuantificación de las muestras

Hidrólisis enzimática. Las inulinas están compuestas por unidades de fructosa enlazadas químicamente por enlaces $\beta - (2 \rightarrow 1)$ fructosilfructosa, además de presentar enlaces del mismo tipo entre fructosas y glucosas terminales. Esta molécula puede ser hidrolizada en fructosas y glucosas mediante la utilización de la enzima inulinasa de *Aspergillus niger*. La cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción ha sido ampliamente utilizada en la determinación de azúcares y oligosacáridos. La concentración de fructanas en los extractos obtenidos se determinó mediante la metodología descrita, donde se evalúan los azúcares libres presentes en el extracto, específicamente fructosa, glucosa y sacarosa. Posteriormente, se realiza la hidrólisis enzimática, iniciando con la adición de $20 \mu\text{L}$ de amilogucosidasa de *Aspergillus niger* y luego con $20 \mu\text{L}$ de inulinasa del mismo microorganismo.

La amilogucosidasa utilizada tiene un pH y una temperatura óptima de actividad enzimática de 3,6 a 4,8 y 60°C respectivamente, para la hidrólisis de enlaces glucosídicos $\alpha - (1 \rightarrow 2)$ y $\alpha - (1 \rightarrow 6)$ presentes en la amilosa y amilopectina, componentes principales del almidón, para la obtención de $\beta\text{-D-glucosa}$ [95, 8]. La inulinasa que es una mezcla de endo-inulinasa y exo-inulinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger* es una enzima comercial con una densidad aproximada de $1,2 \text{ g/mL}$ y actividad enzimática entre 1,5 y $2,0 \text{ U/mg}$. La enzima posee un pH óptimo de acción a una temperatura de 60°C en el rango de 4,2 a 5,0 y tiene como función la hidrólisis de los enlaces $\beta\text{-(2}\rightarrow\text{1)}$ fructosídicos ligados en la inulina como se muestra en la Figura 7 [96–68].

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

Curvas de calibración y linealidad. La linealidad del método de análisis mediante la técnica de cromatografía de alta eficiencia fue evaluada para los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa.

El parámetro de desempeño de la linealidad se estimó mediante las curvas de calibración para cada uno de los carbohidratos, de los cuales se prepararon seis niveles de calibración ($k = 6$). Los resultados para el análisis de linealidad en las curvas de calibración se observan en la Tabla 11.

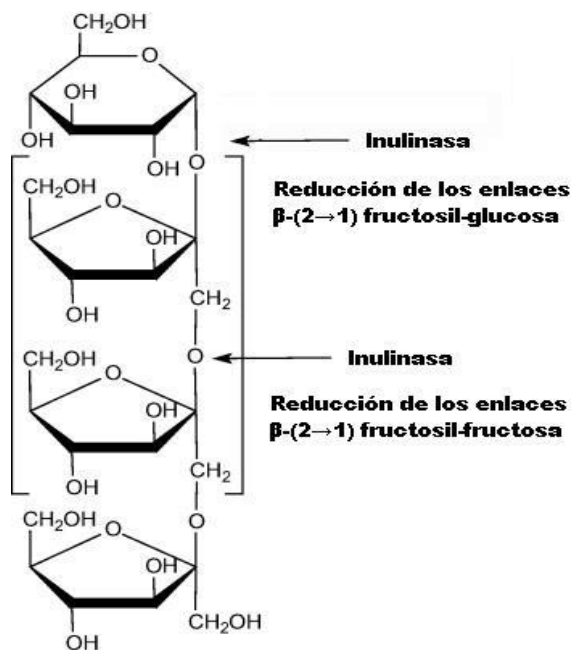


Figura 7. Acción de la inulinasa de *Aspergillus niger* [97].

Tabla 11. Estimadores estadísticos utilizados para evaluar la linealidad del HPLC para los carbohidratos en estudio, con un ámbito de concentración de 0,6 a 6,0 mg/mL.

<i>Compuesto</i>	<i>Estimadores estadísticos</i>		
	R^2	F_{ANOVA}	<i>Linealidad</i>
Fructosa	0,99954	8735	cumple con los estimadores estadísticos
Glucosa	0,99932	5922	cumple con los estimadores estadísticos
Sacarosa	0,99885	3472	cumple con los estimadores estadísticos

Como se puede observar en la Tabla 11, tanto la fructosa, la glucosa y la sacarosa cumplen cabalidad con los estimadores estadísticos para la verificación de la linealidad. Para el caso de la fructosa se obtuvo un valor de R^2 muy cercano a 1, evidenciando una muy buena linealidad. Además, la glucosa y sacarosa presentan un buen comportamiento al mostrar valores de R^2 superiores a 0,9975. Por lo tanto, como podemos ver en este caso, los tres azúcares cumplen con

dicho requisito [98].

De la misma manera la fructosa con el estimador estadístico de F_{ANOVA} presenta un valor muy lejano de la unidad, esto es indicativo de una excelente linealidad. Se puede ver una disminución en el valor de F_{ANOVA} para la glucosa y sacarosa respectivamente, pero ambos poseen un comportamiento de linealidad, al presentar valores para los estimadores mayores y lejanos de 1 [98].

Realizar un patrón de control es de suma importancia en un trabajo de cuantificación, para verificar la estabilidad y reproducibilidad de los datos de manera rápida y adecuada. El patrón de control presentó un resultado promedio para fructosa de 2,312 mg/mL con un RDS de 1,39%, obteniéndose un porcentaje de sesgo de 3,99%, estos valores son menores al 5 % por lo que se evidencia una adecuada cuantificación [99]. Los valores para la glucosa y sacarosa se pueden observar en la Tabla 12 a continuación, cumpliendo dicho requerimiento.

Resolución. El objetivo principal de las técnicas cromatográficas es la separación de los componentes individuales o de los solutos en las muestras, por lo tanto, es indispensable obtener un adecuado valor de resolución entre picos de interés. La resolución (R_s) según *McGuffin* [100] es un parámetro utilizado para expresar la medida de la separación entre dos picos adyacentes, determinado a partir de los tiempos de retención, así como de los anchos de los picos [100]. La Figura 8 muestra un cromatograma típico para obtener una completa separación de la fructosa, glucosa y sacarosa.

Tabla 12. Verificación de la reproducibilidad y estabilidad de los datos de la curva de calibración mediante la ejecución de un patrón control de concentración conocida.

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración promedio del patrón control</i>	<i>% RDS</i>	<i>% de sesgo</i>
Fructosa	2,312 mg/mL	1,39%	3,99%
Glucosa	2,489 mg/mL	0,42%	3,80%
Sacarosa	2,2866 mg/mL	0,91%	4,64%

Los cromatogramas obtenidos presentan una adecuada separación de los compuestos de interés, mostrando que la fructosa obtuvo un valor de resolución en cada una de sus corridas mayor a 2,56 con respecto a la señal de glucosa, así mismo, la glucosa presentó una resolución mayor al 11,65, evidenciando la correcta separación entre ellos, presentando una buena eficiencia y

selectividad. Valores de resolución mayores a 1,5 son necesarios para realizar análisis cuantitativos adecuados [100], como se puede observar en la Figura 8, la completa separación de los analitos se ve reflejada en los valores de resolución, que para este caso son valores muy grandes.

Evaluación de los carbohidratos. Las cuantificaciones iniciales de los azúcares libres en las muestras fueron de vital importancia para determinar la concentración de fructanas descritas por *Prosky y Hoebregs (84)*, en las ecuaciones de la 12 a la 16 de la sección 3.4.4.2. En cuanto a la fructosa, se determinó la concentración libre (FruL) en el extracto y la concentración de fructosa proveniente de la hidrólisis con inulinasa de las fructanas (FruT).

Por otra parte, se determinó el contenido de glucosa inicial, que se compone de la glucosa en forma libre más la proveniente de la hidrólisis enzimática de almidones y sus derivados (GlcI = GlcL + GlcA). Además, se cuantifica la concentración de glucosa total, que es la posterior al proceso de hidrólisis con inulinasa, de las fructanas (GlcT).

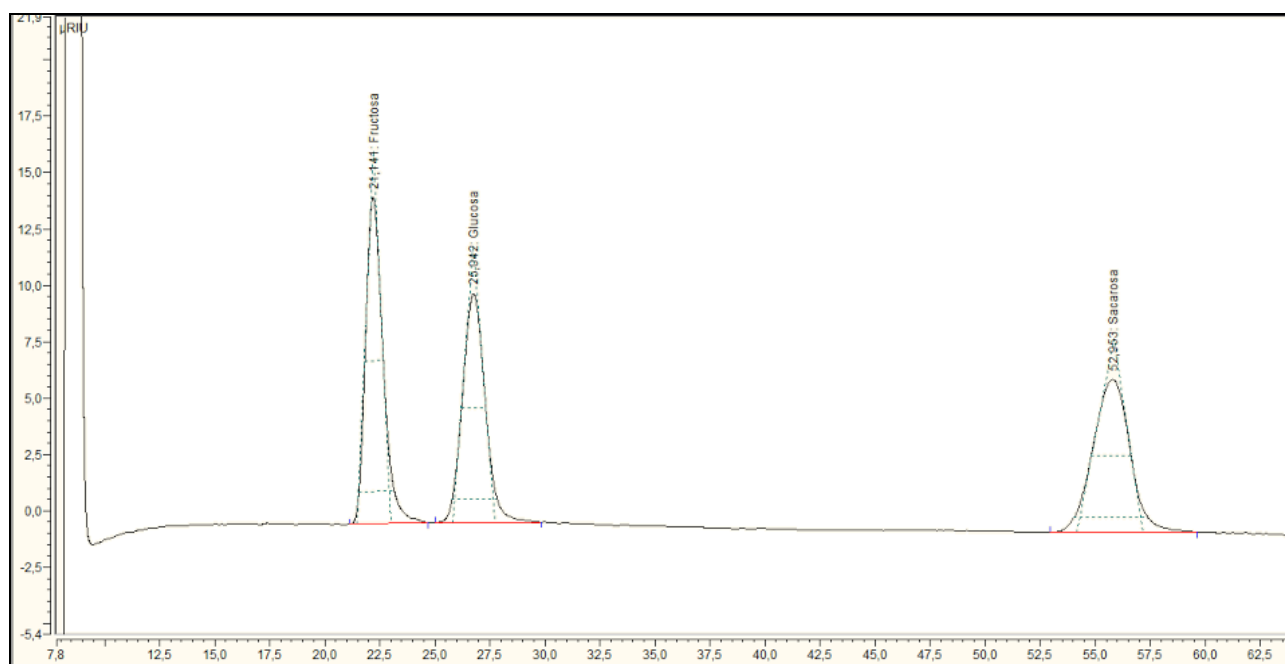


Figura 8. Perfil de carbohidratos presentes en el extracto de ñame de rechazo.

En la Figura 9 se muestran las concentraciones para los ensayos 4, 23, 8 y 2, pertenecientes a la muestra Lote 1, determinadas mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia. Se presentan los promedios de los carbohidratos en su concentración inicial y total (posterior a los tratamientos enzimáticos), necesarios para obtener los contenidos de fructosa y glucosa provenientes de la hidrólisis enzimática de las inulinas extraídas. Los resultados de los demás lotes presentan un comportamiento similar al gráfico mostrado.

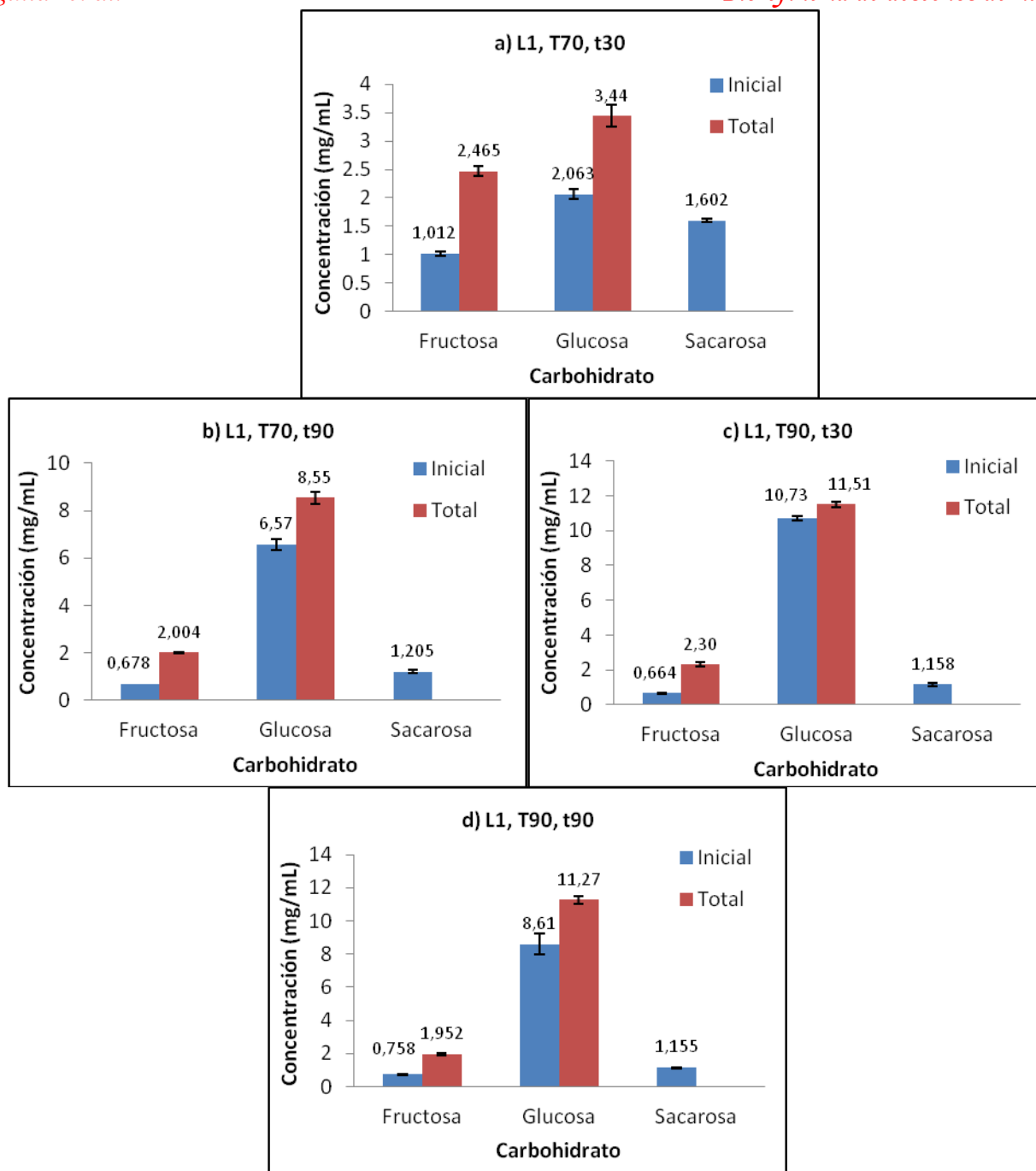


Figura 9. Concentración de los azúcares obtenidos para los ensayos pertenecientes a la muestra Lote 1, según los tratamientos de temperatura y tiempo, antes y después del proceso enzimático, a) Ensayo 4, Lote 1, extracción a 70°C por 30 min, b) Ensayo 23, Lote 1, extracción a 70°C por 90 min, c) Ensayo 8, Lote 1, extracción a 90°C por 30 min, d) Ensayo 2, Lote 1, extracción a 90°C por 90 min.

Se analiza la fructosa, donde específicamente para el gráfico a. se muestra una concentración de fructosa total mayor con respecto a la concentración del monosacárido libre o inicial en el extracto. La concentración aumentó de $1,01 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $2,46 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, en porcentajes se muestran incrementos del 143,58%. Los ensayos presentes en los gráficos b) (195,58%), c)

(246,38%) y d) (157,52%) para fructosa muestran un incremento superior e igual de alto, evidenciando el aumento en la concentración de la fructosa proveniente de las inulinas presentes.

El gráfico a) de la Figura 9 muestra un incremento del 66,75% en el contenido de glucosa, donde la concentración pasó de $2,06 \pm 0,09$ a $3,4 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los ensayos presentes en los gráficos b) (30,14%), c) (7,27%), y d) (30,89%) muestran incrementos inferiores, no obstante, evidencian el comportamiento creciente.

El aumento de concentración determinado en ambos casos se debe a las moléculas de fructosa y glucosa proveniente de las inulinas. Además, hay un aporte tanto de fructosa como de glucosa por parte de la sacarosa libre, ya que este compuesto presenta enlaces $\beta - (2 \rightarrow 1)$ entre la fructosa y la glucosa, los cuales son hidrolizados por la enzima inulinasa, es por esta razón que las ecuaciones descritas por *Prosky y Hoebregs* [67] poseen una corrección de sacarosa al ser dividida la concentración del azúcar libre entre un factor de 1,9.

El incremento en la concentración de las fructosas totales se debe a que las fructanas por definición [9] son polímeros compuestos por cadenas de fructosas. Por otra parte, el incremento de la glucosa se debe a la presencia como grupos terminales o en ramificaciones de las inulinas.

Evaluación del contenido de fructanas de las muestras en estudio. Los porcentajes de fructanas obtenidos para los ensayos de los lotes en estudio se encuentran dentro en la Tabla 13, donde se pueden observar valores en un intervalo de 0,22 a 3,8% en base seca de fructanas. Los valores determinados se evalúan con base en un análisis estadístico, para evaluar la relación de la concentración de fructanas como porcentaje, con respecto a los lotes en estudio, al tiempo (30 y 90 minutos) y a la temperatura (70 y 90°C).

En lo que respecta al análisis estadístico, se realizó una evaluación del tipo *ANOVA*, donde la validez de los resultados obtenidos queda supeditada a que los supuestos del modelo se cumplan, como lo son la normalidad, varianza constante e independencia de los datos. Esto quiere decir, que la variable de respuesta en cada tratamiento se debe distribuir de manera normal, con la misma varianza en cada tratamiento y las mediciones deben de ser independientes (*101*). Los gráficos de residuos determinaron que los supuestos no se cumplen, por esta razón se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Kruskal–Wallis*, las cuales no asumen normalidad en los datos, en oposición al tradicional análisis de varianzas, pero si asume bajo la hipótesis nula que los datos provienen de la misma distribución.

En primer lugar, se determinó como variable de respuesta el porcentaje de fructanas y como

factor los lotes, siendo la hipótesis nula que los lotes sean iguales y la hipótesis alternativa que sean diferentes. El análisis de *Kruskal–Wallis* presenta resultados para el valor p de 0,018, el cual es menor al nivel de significancia ($p < 0,05$). Por esta razón, hay evidencia estadística para aceptar la condición de que los datos sean diferentes, al rechazar la hipótesis nula. Con esto podemos decir que con respecto al porcentaje de fructanas (variable de respuesta) los lotes en estudio (factor) son diferentes entre sí. Esto respalda lo dicho para el caso de la fibra dietética total, donde se determina que los lotes en estudio son independientes y diferentes uno de otro.

Tabla 13. Rendimiento de la extracción de fructanas en las muestras de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo.

<i>Muestra en estudio</i>	<i>Temperatura 70°C, tiempo 30 min</i>	<i>Temperatura 70°C, tiempo 90 min</i>	<i>Temperatura 90°C, tiempo 30 min</i>	<i>Temperatura 90°C, tiempo 90 min</i>
	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje</i>
Lote 1 (Los Chiles)	1,52 ± 0,33	2,85 ± 0,52	1,59 ± 0,37	3,8 ± 1,0
Lote 2 (Los Chiles)	0,55 ± 0,27	0,89 ± 0,24	1,56 ± 0,62	1,80 ± 0,90
Lote 3 (Upala)	1,85 ± 0,32	2,37 ± 0,35	2,91 ± 0,44	1,93 ± 0,65
Lote 4 (Upala)	0,28 ± 0,41	0,22 ± 0,33	0,12 ± 0,33	0,50 ± 0,46
Lote 5 (Guatuso)	0,57 ± 0,39	0,73 ± 0,29	3,66 ± 0,81	3,26 ± 0,28
Lote 6 (Guatuso)	1,16 ± 0,31	0,85 ± 0,33	1,10 ± 0,65	1,92 ± 0,61

Como en el caso de la fibra dietética total, el porcentaje de carbohidratos y la concentración de fructanas mediante los métodos de extracción aquí utilizados, los lotes en estudio se pueden considerar diferentes, algunos con concentraciones mayores que otros, debido a las características independientes que presentan con base en la forma de crecimiento, el clima y el tipo de suelo, que hacen que los tubérculos generen mayor o menor cantidad de carbohidratos totales, relacionados con el contenido de fibra dietética total y por ende con el porcentaje de fructanas.

En segundo lugar, se evaluó el porcentaje de fructanas y como factor el tiempo de extracción, siendo la hipótesis nula que el tiempo de extracción sea igual y la hipótesis alternativa que sea diferente. De acuerdo con los resultados obtenidos para el ensayo de *Kruskal–Wallis*, estadísticamente el tiempo de extracción es igual al aceptar la hipótesis nula, debido a que el valor p es de 0,386, el cual es mayor al nivel de significancia ($p > 0,05$). Esto quiere decir, que al aceptar la hipótesis nula existe evidencia para afirmar que estadísticamente los tiempos en evaluación son iguales al no generar una diferencia significativa en los porcentajes de fructanas obtenidos. Con los resultados se evidencia, que con los dos tiempos, se puede obtener la misma concentración de

fructanas. No obstante, ejecutar extracciones con tiempos de 90 minutos puede generar costos mayores, debido a que se debe utilizar energía por un mayor tiempo en el proceso.

En tercer lugar, se evaluó el porcentaje de fructanas y como factor la temperatura de extracción, siendo la hipótesis nula que la temperatura en evaluación sea estadísticamente igual y la hipótesis alternativa que sea diferente. El ensayo de *Kruskal–Wallis* generó como resultado un valor p de 0,065, el cual es mayor al nivel de significancia ($p > 0,05$), donde se determina que hay evidencia estadística para aceptar la hipótesis nula y por consiguiente rechazar la condición de que los datos no son independientes, es decir que las temperaturas en estudio son iguales. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos para la cuantificación de fructanas en función de los lotes, los tiempos y las temperaturas estudiadas.

Se puede observar que los Lotes 1, 3 y 5 presentan las mayores concentraciones de fructanas, mientras que en el Lote 4 genera los contenidos más bajos. Los resultados muestran como el Lote 1 a mayor tiempo y temperatura de extracción presenta el valor más alto ($3,8 \pm 1,0\%$) en el contenido de fructanas de todo el estudio. Además, el Lote 5 genera resultados similares a una temperatura de 90°C sin que exista diferencia significativa en el tiempo de extracción ($3,66 \pm 0,81$ y $3,26 \pm 0,28\%$). Siendo estos tres tratamientos los que presentan las mayores concentraciones de fructanas.

Por otro lado, como una tendencia general, se evidencia que a mayor tiempo de extracción se obtiene una mayor concentración de fructanas. Así como, al aumentar la temperatura de extracción se presenta un incremento en la concentración del compuesto de interés.

Es importante resaltar que, aunque el modelo estadístico para todos los datos muestra valores de p mayores a 0,5, donde se determina que las temperaturas son estadísticamente similares entre sí, al realizar un análisis individual de los lotes, se puede observar como en el Lote 5 al incrementar la temperatura en 20°C para los ensayos a 30 minutos el rendimiento crece en 3,09%, y para 90 minutos de extracción el incremento es de 2,53%. Por tal razón, es de considerar que el incremento es significativo para la obtención de una mayor concentración de fructanas.

Para el caso del tiempo, al evaluar el Lote 1 de manera independiente se puede observar como un incremento de 30 minutos en el proceso de extracción genera una mayor concentración de fructanas, en un 1,33% para los ensayos a 70°C y un aumento de 2,21% para el tratamiento de 90°C , a pesar de que el análisis estadístico de todos los datos presentado anteriormente generó valores de p mayores a 0,5. Por esta razón, es importante considerar estas diferencias en función al escalamiento del proceso y al consumo energético implicado.

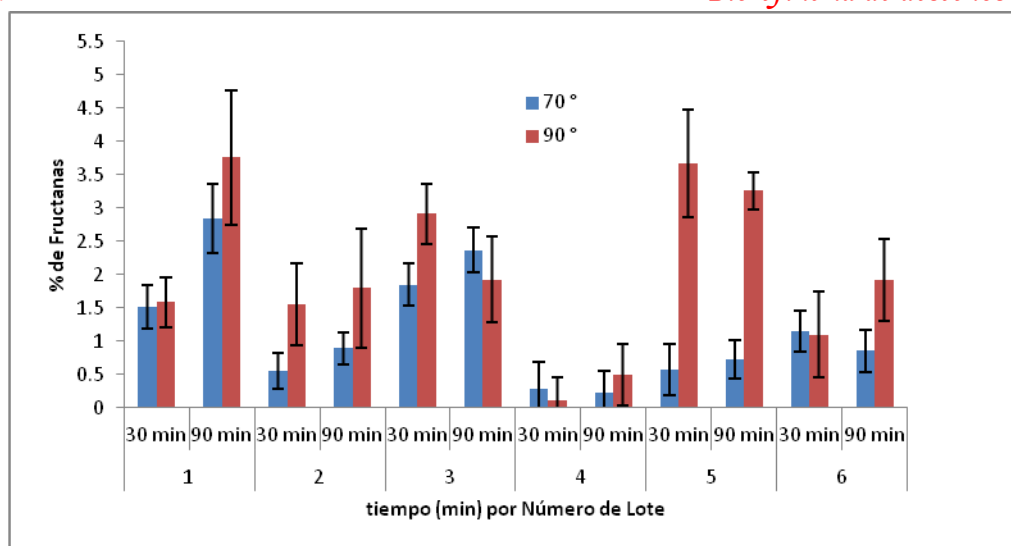


Figura 10. Comparación del porcentaje de fructanas como la variable de respuesta con respecto a los factores en estudio (lote, tiempo y temperatura).

Por último, con respecto a los resultados obtenidos para el estudio realizado en este caso se puede determinar que para obtener porcentajes de extracción de fructanas mayores se deben realizar procedimientos con temperaturas de 90 °C durante un tiempo de extracción de 90 minutos.

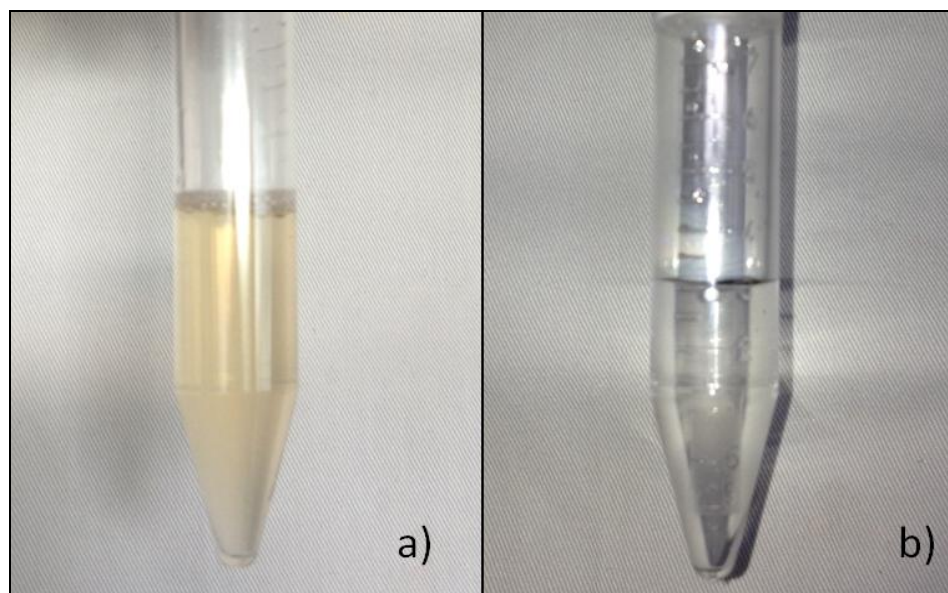


Figura 11. Purificación con carbón activado. a) extracto sin tratar, b) extracto purificado.

Purificación con carbón activado. La utilización de carbón activado se efectuó para purificar el extracto al eliminar sustancias causantes de producir alteraciones en el color, olor, sabor y turbidez de un producto. La Figura 11 presenta el extracto antes y después del proceso, en (a) el extracto obtenido posterior a la filtración de 0,45 μm y en la sección (b) muestra el mismo extracto

purificado con carbón activado. Se denota la efectividad en el tratamiento de purificación realizado, al eliminar la presencia de partículas que generan turbidez y por tanto, la coloración cambia del amarillo pálido inicial a transparente. Esto es un parámetro muy importante a nivel alimenticio y de mercado, puesto que el producto final posee un agradable aspecto visual y no posee olores desagradables.

Purificación con carbón activado. La utilización de carbón activado se efectuó para purificar el extracto al eliminar sustancias causantes de producir alteraciones en el color, olor, sabor y turbidez de un producto. La Figura 11 presenta el extracto antes y después del proceso, en (a) el extracto obtenido posterior a la filtración de 0,45 μm y en la sección (b) muestra el mismo extracto purificado con carbón activado. Se denota la efectividad en el tratamiento de purificación realizado, al eliminar la presencia de partículas que generan turbidez y por tanto, la coloración cambia del amarillo pálido inicial a transparente. Esto es un parámetro muy importante a nivel alimenticio y de mercado, puesto que el producto final posee un agradable aspecto visual y no posee olores desagradables.

CARACTERIZACIÓN DE LAS FRUCTANAS PRESENTES EN EL PRODUCTO DE ÑAME DE RECHAZO

Caracterización térmica por análisis termogravimétrico (TGA). Como se puede observar en la Figura 12, el termograma referente a una muestra de fructanas presenta un primer evento térmico desde los 25 hasta los 100°C, el cual corresponde a la pérdida de agua que contiene la muestra, correspondiendo aproximadamente a un valor superior al 12% de pérdida de masa en la muestra inicial. Además, se observa un segundo evento térmico correspondiente a la descomposición del polímero, con una pérdida de peso alrededor del 73%, presentando una temperatura de descomposición máxima de 336,93°C, relativamente superior a las que son reportadas por *Espinoza–Andrews y Urias–Silvas* [101] en el 2012, con valores de descomposición para las fructanas extraídas de *Agave tequilana* weber variedad azul a los 230°C, esto debido a las diferencias estructurales que presentan los compuestos de interés al ser obtenidos a partir de fuentes de distintas especies.

Las aplicaciones de las fructanas en la industria alimenticia poseen un futuro promisorio, es por esta razón que realizar una evaluación de la estabilidad térmica de estos compuestos, permite determinar que las inulinas extraídas a partir de ñame de rechazo en la zona de estudio, pueden ser

incorporadas en procesos industriales alimenticios con temperaturas altas no superiores a los 330°C, la cual es la temperatura de descomposición máxima que presenta el material.

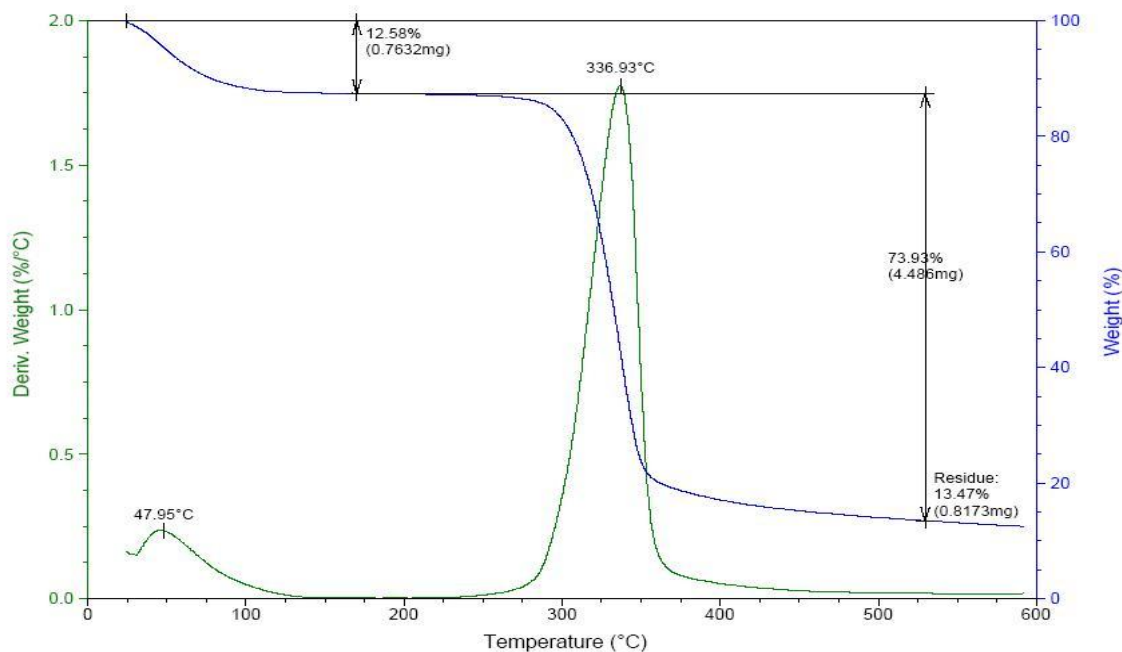


Figura 12. Termograma para una muestra de fructanas, extraída de ñame (*Dioscorea alata*) de rechazo de la zona Huétar Norte.

Determinación del peso molecular mediante GPC. La determinación de la distribución de peso molecular de las fructanas obtenidas a partir de ñame de rechazo de la especie en estudio es de suma importancia, en vista de las diferencias en las propiedades funcionales que exhiben las inulinas con base en su masa molecular. Por ejemplo, la solubilidad de las fructanas decrece conforme incrementa el grado de polimerización de las mismas. Además, esto infiere en el hecho de que las fructanas de cadena corta ($DP < 10$) son principalmente jarabes y presentan características alimenticias que les permiten ser consideradas como de sustitutos de azúcar, mientras que inulinas de cadenas largas ($DP \geq 10$) pueden ser utilizadas como fibra dietética o sustituto de grasas [33, 102].

Es por tal razón, que se ejecutó el ensayo de peso molecular utilizando la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC) equipado con un detector de índice de refracción para la obtención del peso molecular promedio de las fructanas presentes. El análisis se realizó para dos de los ensayos obtenidos a partir de la realización de las extracciones, basándose en los tratamientos

determinados mediante el diseño estadístico, los cuales presentaron las dos concentraciones mayores de inulinas según la cuantificación enzimática ejecutada.

El ensayo 10 referente al Lote 5, con un tratamiento de extracción a 90°C por 90 minutos, presentó compuestos con pesos moleculares promedio de 1.485 ± 291 Da en un 15,67%, mientras que 84,33% restante corresponde a pesos moleculares inferiores a 1.000 Da. Por otro lado, el Ensayo 23 perteneciente al Lote 1, con extracción de 90 minutos a 70°C presentó en su totalidad pesos moleculares menores a 1.000 Da.

Los pesos moleculares promedio para los dos ensayos realizados son cercanos o inferiores a 1.000 Da, por lo que se determinó que las fructanas extraídas y presentes en este estudio a partir de ñame de rechazo son de pesos moleculares bajos o de cadena corta ($DP < 10$), las cuales pueden ser utilizadas como sustitutos del azúcar. En comparación con otras fuentes como la raíz de achicoria que presentan grados de polimerización de 10 – 60 [27], las cuales son utilizadas como sustitutas de grasas.

CONCLUSIONES

Esta investigación demuestra que es posible realizar la extracción de las fructanas en agua caliente a partir de ñame de rechazo de la especie *Dioscorea alata* de la zona *Huetar Norte del país*, debido a la solubilidad que presentan estos compuestos en agua caliente. Esto a partir de la metodología propuesta en el trabajo, que resulta eficiente y se obtienen porcentajes de extracción de hasta un 3,8% en base seca del sustrato en estudio.

Además, ha permitido desarrollar una ficha técnica del sustrato de interés para cada uno de los puntos de muestreo, demostrando que el ñame de la especie *Dioscorea alata* es una fuente valiosa para la extracción de carbohidratos y fibra dietética.

A través del muestreo realizado ha sido posible determinar en cual punto de los evaluados en la zona *Huetar Norte de Costa Rica* es posible obtener una materia prima de rechazo con mayor valor contenido en fructanas. Esta investigación demostró que el Lote 1, ubicado en el cantón de los Chiles ($10^{\circ}47'44.40''N$, $84^{\circ}35'30.51''O$) posee la concentración mayoritaria con una concentración de $3,8 \pm 1,0\%$ de fructanas al utilizar 90°C en 90 minutos de extracción.

Exclusivamente para el análisis estadístico del porcentaje de fibra dietética total, se determinó que los lotes son independientes y diferentes entre sí. La investigación demostró que el Lote 6, ubicado en el cantón de *Guatuso* ($10^{\circ}43'10.60''N$, $84^{\circ}50'46.50''O$) presentó la mayor concentración de fibra dietética total con un valor de 7,23%.

En este estudio se logró desarrollar una metodología de cuantificación de fructanas mediante el análisis de azúcares simples, realizando una hidrólisis enzimática de las inulinas presentes para su correcta cuantificación.

El análisis estadístico realizado con base en el tiempo de extracción de las fructanas a partir del ñame en estudio, determinó que es posible obtener una adecuada extracción de las mismas utilizando un tiempo de 30 minutos, con lo que es posible bajar los costos de producción al realizar extracciones de duración corta.

Aunque los resultados del análisis estadístico para el factor de temperatura, generaron valores de *p* superiores al nivel de significancia, a partir de lo cual se interpreta que la extracción con temperatura de 70 o de 90°C genera rendimientos similares, es un criterio a tomar en cuenta para un escalamiento en el proceso y un análisis de factibilidad económica. Los resultados demostraron que un incremento de 20°C en la temperatura de extracción aumenta hasta en un 3% la concentración de fructanas extraídas.

La determinación de peso molecular mediante la técnica de GPC demostró que los compuestos extraídos poseen pesos moleculares menores a 1.500 Da, lo que significa que las fructanas obtenidas a partir del ñame de rechazo de la especie *Dioscorea alata* son de cadena corta y por tanto pueden tener aplicaciones a nivel alimenticio como sustitutos del azúcar, con características prebióticas.

La prueba térmica realizada en la investigación demostró la estabilidad térmica que poseen las fructanas extraídas a partir del sustrato obtenido en la zona *Huetar Norte de Costa Rica*, las cuales alcanzaron una temperatura de descomposición máxima de 330°C.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible generar un nuevo nicho de mercado para productos obtenidos a partir de fuentes no tradicionales, como lo es el caso de ñame, específicamente de la especie *Dioscorea alata*, con la posibilidad de motivar a los agricultores para la utilización de estos residuos en la obtención de productos con un mayor valor agregado y así contribuir en la disminución del impacto de los residuos en el medio ambiente.

De acuerdo a las características de las fructanas aisladas se puede visualizar su potencial para ser utilizado como sustituto de azúcar con características prebióticas, lo que le daría un lugar para su implementación en productos alimenticios funcionales, pertenecientes a las nuevas tendencias de los mercados mundiales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Arguedas, I.; Calderón, J.C.; Céspedes, E.; Chacón, M.; López, K.; Medaglia, C.; Mora, E.; Vargas, F. *Estadísticas de Comercio Exterior de Costa Rica 2013*; Dirección de Inteligencia Comercial; Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica: San José, Costa Rica, Mayo 2014
- [2] Sandí AY “Utilización del ñame (*Dioscorea alata*) y del tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*) de rechazo para la obtención de adhesivos naturales en base acuosa”. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2008
- [3] Matamoros X “Formulación de Adhesivos Naturales a partir del Desecho Agrícola de Ñame (*Dioscorea alata*) en Base Acuosa”. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2009
- [4] *Memoria de Gestión del Sector Agroalimentario 2010–2014*; Sector Agroalimentario; Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica, Abril 2014
- [5] Bach O. *Decimonoveno Informe del Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible: Agricultura–Rumbo a la sostenibilidad*; Estado de la Nación. San José, Costa Rica, 2013.
- [6] Chacón AG, Saborío F, Gómez L, Torres S, Valverde R “El tipo de gelificante en el desarrollo in vitro y la climatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*)”, *Agron. Costarric.*, **24** (2), 57 (2000)
- [7] Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica. Portal Estadístico de Comercio Exterior. <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx> (accesado el 15 de Abril, 2015)
- [8] Horton, H. R.; Moran, L. A.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D.; Rawn, J. D., *Principios de Bioquímica*. Cuarta ed.; Pearson Educación: México, 2008; pp 222–252.
- [9] Bender, D. A., *Benders’ Dictionary of Nutrition and Food Technology*. Octava ed.; Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC: Cambridge, England, 2006; pp 90–92, 187, 203.
- [10] . Yang, J.; Xiao, A.; Wang, C. Novel Development and Characterisation of Dietary Fibre from Yellow Soybean Hulls. *Food Chem.* **2014**, *161*, 367–375.
- [11] Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Fernández–Bolaños, J.; Guillén, R.; Heredia, A., Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 3–15.
- [12] Quemener, B.; Thibault, J. F.; Coussement, P. Integration of Inulin Determination in the AOAC Method for Measurement of Total Dietary Fibre. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *21*, 175–178.
- [13] Blanco–Metzler, A.; Tovar, J.; Fernández–Piedra, M. Caracterización Nutricional de los Carbohidratos y Composición Centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2004**, *54* (3), 322–327.
- [14] Truswell, A. S., *Cholesterol and Beyond. The Research on diet and coronary heart disease 1900–2000*. Springer Science Bussines Media: London, 2010.
- [15] Olvera, C.; Castillo, E.; López–Munguía, A. Fructosiltransferasas, Fructanas y Fructosa. *Biotechnología* **2007**, *14*, 327–346.
- [16] Roberfroid MB “*Inulin–Type Fructans: Functional Food Ingredients*”. CRC Press: Boca Raton, USA, 2005
- [17] Roberfroid, M. B.; Delzenne, N. M., Dietary Fructans. *Annu. Rev. Nutr.* **1998**, *18*, 117–143.
- [18] Król, B.; Grzelak, K. Qualitative and Quantitative Composition of Fructooligosaccharides in Bread. *Eur. Food Res. Technol.*, **223**, 755 (2006)
- [19] Franck, A., Inulin. In *Food Polysaccharides and Their Applications*, Second ed.; Stephen, A. M.; Phillips, G. O.; Williams, P. A., Eds. CRC Press: Boca Raton, FL, United States of America, 2006.
- [20] Corona–González, R. I.; Pelayo–Ortiz, C.; González–Álvarez, V.; Zuñiga–Partida, V., Optimización de la Producción de Inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de *Agave tequilana* Weber Variedad Azul. *e–Gnosis* **2005**, *3* (8), 1–10.
- [21] Winarti, S.; Harmayani, E.; Nurismanto, R., Extraction of Inulin from Various Yam Tubers (*Dioscorea spp.*). In *The 12th ASEAN Food Conference*, Bangna, Bangkok, Thailand, Jun 16–18, 2011; PF–135, pp 669–673.
- [22] Moshfegh, A. J.; Friday, J. E.; Goldman, J. P.; Ahuja, J. K., Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Americans. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1407S–1411S.
- [23] Ritsema T, Smeekens S “Fructans: Beneficial for Plants and Humans”, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **6**, 223 (2003)
- [24] Stevens, C. V.; Meriggi, A.; Booten, K. “Chemical Modification of Inulin, a Valuable Renewable Resource, and Its Industrial Applications”, *Biomacromolecules* *2*(1), 1 (2001)
- [25] Vijn I, Smeekens S “Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate?” *Plant. Physiol.*, **120**, 351 (1999)
- [26] Franck A “Technological functionality of inulin and oligofructose”, *Br. J. Nutr.*, *87*(2), 287

(2002)

- [27] Biedrzycka, E.; Bielecka, M., Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 170–175.
- [28] Kelly, G., Inulin – Type Prebiotics – A Review: Part 1. *Altern. Med. Rev.* **2008**, *13* (4), 315–329.
- [29] Kelly, G., Inulin – Type Prebiotics: A Review (Part 2). *Altern. Med. Rev.* **2009**, *14* (1), 36–55.
- [30] Roberfroid MB “Caloric Value of Inulin and Oligofructose”, *J. Nutr.*, **129**, 1436S (1999)
- [31] Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T.; Englyst, H. N. Prebiotic Digestion and Fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 415S–420S.
- [32] Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B., Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401–1412.
- [33] Kaur, N.; Gupta, A. K., Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* **2002**, *27*, 703–714.
- [34] Li, D.; Kim, J. M.; Jin, Z.; Zhou, J., Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. *Anaerobe* **2008**, *14*, 29–34.
- [35] Bouhnik, Y.; Vahedi, K.; Achour, L.; Attar, A.; Salfati, J.; Pochart, P.; Marteau, P.; Flourié, B.; Bornet, F.; Rambaud, J.–C., Short–Chain Fructo–Oligosaccharide Administration Dose–Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 113–116.
- [36] Bouhnik, Y.; Raskine, L.; Simoneau, G.; Paineau, D.; Bornet, F., The capacity of short–chain fructo–oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose–response relationship study in healthy humans. *Nutr. J.* **2006**, *5* (8), 1–6.
- [37] Hond, E. D.; Geypens, B.; Ghos, Y., Effect of High Performance Chicory Inulin on Constipation. *Nutr. Res.* **2000**, *20* (5), 731–736.
- [38] Leenen, C. H. M.; Dieleman, L. A. Inulin and Oligofructose in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2572S–2575S.
- [39] Abrams, S. A.; Griffin, I. J.; Hawthorne, K. M.; Liang, I.; Gunn, S. K.; Darlington, G.; Ellis, K. J., A Combination of Prebiotic Short– and Long–Chain Inulin–Type Fructans Enhances Calcium Absorption and Bone Mineralization in Young Adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 471–476.
- [40] Van–den–Heuvel, E.; Muys, T.; Van–Dokkum, W.; Schaafsma, G., Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 544–548.
- [41] Davidson, M. H.; Maki, K. C. Effects of Dietary Inulin on Serum Lipids. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1474S–1477S.
- [42] Rault–Nania, M. H.; Gueux, E.; Demougeot, C.; Demigné, C.; Rock, E.; Mazur, A. Inulin Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Br. J. Nutr.* **2006**, *96*, 840–844.
- [43] Dahech, I.; Harrabi, B.; Hamden, K.; Feki, A.; Mejdoub, H.; Belghith, H.; Belghith, K. S. Antioxidant Effect of Nondigestible Levan and Its Impact on Cardiovascular Disease and Atherosclerosis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *58*, 281–286.
- [44] Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H, Mejdoub H “Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan–induced diabetic rats”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49**, 742 (2011)
- [45] Buddington, K. K.; Donahoo, J. B.; Buddington, R. K. Dietary Oligofructose and Inulin Protect Mice from Enteric and Systemic Pathogens and Tumor Inducers. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 472–477.
- [46] Roberfroid, M. B., Introducing inulin–type fructans. *Br. J. Nutr.* **2005**, *93* (1), S13–S25.
- [47] Borromei, C.; Careri, M.; Cavazza, A.; Corradini, C.; Elviri, L.; Mangia, A.; Merusi, C., Evaluation of Fructooligosaccharides and Inulins as Potentially Health Benefiting Food Ingredients by HPAEC–PED and MALDI–TOF MS. *Int. J. Anal. Chem* **2009**, 1–9.
- [48] Chacón–Villalobos, A., Perspectivas Agroindustriales Actuales de los Oligofructosacáridos (FOS). *Agron. Mesoam.* **2006**, *17* (2), 265–286.
- [49] Mendoza, E.; García, M. L.; Casas, C.; Selgas, M. D., Inulin as Fat Substitute in Low Fat, Dry Fermented Sausages. *Meat Sci.* **2001**, *57*, 387–393.
- [50] Swennen, K.; Courtin, C. M.; Delcourk, J. A., Non–digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. *Criti Rev Food Sci Nutr* **2006** *46*, 459–471.
- [51] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación E1757–01: “Standard Practice for Preparation of Biomass for Compositional Analysis”. pp 1–3.
- [52] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación D4442–92: “Standard Test Methods for Direct Moisture Content Measurement of Wood and Wood–Base Materials”. pp 1–6.
- [53] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación E1755–01: “Standard Test Method for Ash in Biomass”. pp 1–3.
- [54] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación D1110–84 “Standard Test

Method for Water Solubility of Wood”. pp 1–2.

[55] Min, D. B.; Ellefson, W. C., Fat Analysis. In *Food Analysis*, Fourth ed.; Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; p 117–132.

[56] Eaton A, L Clerecsi, E Rice. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1999, 20th edition. American Health Associaton, American Waterworks Associaton, Water Enviroment Federation. pp 4–123 – 4–125.

[57] Sánchez, V.; Solís, E.; Valdés, J.; Fernández, J. F.; Coto, J. M.; Mendelewicz, M., *Química analítica experimental*. Primera ed.; Editorial Universidad Nacional: Heredia, Costa Rica, 2008

[58] BeMiller, J. N., Carbohydrate Analysis. In *Food Analysis*, Fourth ed.; Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; pp 147–177.

[59] Ramírez, A. Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. M.S. Thesis, Instituto Politécnico Nacional, México, 2009.

[60] Zubaidah, E.; Akhadiana, W. Comparative Study of Inulin Extracts from Dahlia, Yam, and Gambili Tubers as Prebiotic. *Food Nutr. Sci.* **2013**, *4*, 8–12.

[61] Judprasong, K.; Tanjor, S.; Puwastien, P.; Sungpuag, P. Investigation of Thai Plants for Potential Sources of Inulin–Type Fructans. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 642–649.

[62] Partida, V. Z.; Camacho, A.; Martínez, A. Method of producing fructose syrup from agave plants. U.S. Patent 5,846,333, Dec. 8, 1998.

[63] Vendrell–Pascuas, S.; Castellote–Bargalló, A. I.; López–Sabater, M. C. Determination of Inulin in Meat Products by High–Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 591–597.

[64] Xiaoli, X.; Liyi, Y.; Shuang, H.; Wei, L.; Yi, S.; Hao, M.; Jusong, Z.; Xiaoxiong, Z. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum L*) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **2008**, *111*.

[65] International Honney Commision, *Harmonised Methods of the International Honey Commission*; Switzerland, **2009**, pp 46–48.

[66] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación E1758–01: “Standard Test Methods for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography”.

[67] Prosky L, Hoebregs H “Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose”, *J. Nutr.* **1999**, 1418S– 1423S.

[68] Wang H, Zhang Z, Liang L, Wen S, Liu C, Xu X “A comparative study of high–performance liquid chromatography and colorimetric method for inulin determination”, *Eur. Food Res. Technol.*, *230*, 701 (2010)

[69] Liu, Z.; Mouradov, A.; Smith, K. F.; Spangenberg, G. An Improved Method for Quantitative Analysis of Total Fructans in Plant Tissues. *Anal. Biochem.* **2011**, *418*, 253–259.

[70] Andersen, R.; Sorensen, A. An Enzymatic Method for the Determination of Fructans in Foods and Food Products. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *210*, 148–152.

[71] Hoehn, E.; McKay, C. J.; Murray, E. D. Production of high fructose syrup from inulin involving ultrafiltration. U.S. Patent 4,421,852, Dec. 20, 1983.

[72] Alvarado, C.; Camacho, R. M.; Cejas, R.; Rodríguez, J. A. Profiling of Commercial Agave Fructooligosaccharides Using Ultrafiltration and High Performance Thin Layer Chromatography. *Rev. Mex. Ing. Química* **2014**, *13* (2), 417–427.

[73] American Society for Testing and Materials. (ASTM). Designación E1131–98: “Standard Test Method for Compositional Analysis by Thermogravimetry”. pp 1–5.

[74] Hatakeyama, T.; Hatakeyama, H., *Thermal Properties of Green Polymers and Biocomposites*. Springer Science + Business Media, Inc.: Netherlands, 2005; Vol. 4, pp 13–38.

[75] Silberring, J.; Kowalczyk, M.; Bergquist, J.; Kraj, A.; Suder, P.; Dylag, T.; Smoluch, M.; Chervet, J.–P.; Ekman, R., Size–exclusion chromatography. In *Chromatography. Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods. Part A: Fundamentals and Techniques*, sixth ed.; Heftmann, E., Ed. Elsevier B.V.: Amsterdam, Netherlands, 2004; pp 213–251.

[76] Gómez–Ordóñez, E.; Jiménez–Escrig, A.; Rupérez, P., Molecular Weight Distribution of Polysaccharides from Edible Seaweeds by High–Performance Size–Exclusion Chromatography (HPSEC). *Talanta* **2012**, *93*, 153–159

[77] de Oliveira AJB, Gonçalves RAC, Chierrito TPC, dos Santos MM, de Souza LM Gorin PAJ, Sasaki GL, Iacomini M “Structure and Degree of Polymerisation of Fructooligosaccharides Present in Roots and Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni”, *Food Chem.*, **129**, 305 (2011)

[78] Nielsen, S., Introduction to Food Analysis. In *Food Analysis*, Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; pp 3–14.

- [79] Barquero, M., *Análisis proximal de alimentos*. Primera ed.; Editorial Universidad de Costa Rica: San José, Costa Rica, 2012; p 87–196.
- [80] Marshall, M. R., Ash Analysis. In *Food Analysis*, Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; pp 105–115.
- [81] Chang, S. K. C., Protein Analysis. In *Food Analysis*, Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; pp 133–146.
- [82] Aguilar, A.; Esquivel, M.; Sibaja, M.; Vega, J.; Ledezma, A.; Chaves, L.; Araya, M., Gestión para el aprovechamiento de residuos de ñame y cebolla en la extracción de nuevos materiales. En *VII Congreso de la Red Latinoamericana de Ciencias Ambientales*, San Carlos, Costa Rica, 2013; p 573.
- [83] Roberfroid, M. B., Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1398S–1401S.
- [84] Gutiérrez H, De la Vara R “*Análisis y Diseño de Experimentos*”. 3^a ed.; Mc Graw Hill Education, México, 2012
- [85] Ward, R. E.; Carpenter, C. E., Traditional Methods for Mineral Analysis. In *Food Analysis*, Nielsen, S., Ed. Springer Science Bussines Media: IN, USA, 2010; pp 201–215.
- [86] Dwyer JT, Holden J, Andrews K, Roseland J, Zhao C, Schweitzer A, Perry CR, Harnly J, Wolf WR, Picciano MF, et al. “Measuring Vitamins and Minerals in Dietary Supplements for Nutrition Studies in the USA”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 37 (2007)
- [87] *Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride and Sulfate*; Institute of Medicine of The National Academies, The National Academies Press: Washington, DC, 2005
- [88] Tucker KL, Hannan MT, Chen H, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP, “Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women”, *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 727 (1999)
- [89] D’Elia L, Barba G, Cappuccio FP, Strazzullo P, “2Potassium Intake, Stroke, and Cardiovascular Disease”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57(10)**, 1210 (2011)
- [90] Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD “*Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*”. Institute of Medicine of The National Academies, The National Academic Press: Washington, DC, 2006
- [91] Tomat, A. L.; Costa, M.; Arranz, C. T. Zinc Restriction during Different Periods of Life: Influence in Renal and Cardiovascular Diseases. *Nutrition* **2011**, *27*, 392–398.
- [92] Roberfroid MB “Inulin–Type Fructans: Functional Food Ingredients”, *J. Nutr.*, **137**, 2493 (2007)
- [93] Geankoplis, C. J., *Procesos de transporte y principios de procesos de separación*. Cuarta ed.; Grupo Editorial Patria: México, 2007; p 970.
- [94] Augusto, P. E. D.; Ibarz, A.; Cristianini, M. Effect of High Pressure Homogenization (HPH) on the Rheological Properties of a Fruit Juice Serum Model. *J. Food Eng.*, **111**, 474 (2012)
- [95] *Amyloglucosidase for Total Dietary Fiber Assay*; Sigma–Aldrich Inc: Saint Louis, Missouri, USA
- [96] Chen HQ, Chen XM, Li Y, Wang J, Jin ZY, Xu X M, Zhao JW, Chen TX, Xie ZJ “Purification and Characterisation of Exo– and Endo–Inulinase from *Aspergillus Ficum* JNSP5–06”, *Food Chem.*, **115**, 1206 (2009)
- [97] Especificidad de la inulinas. Sigma–Aldrich Inc. Recuperado en octubre 2014 de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i6285?lang=en®ion=US>.
- [98] Calvo, F. Implementación de un Método Analítico de Aplicación Forense para el Escrutinio de Plaguicidas en Agua. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2011.
- [99] Miller, J. C.; Miller, J. N., *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta ed.; Pearson Education S.A.: Madrid, 2002.
- [100] McGuffin, V. L., Theory of chromatography. In *Chromatography. Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods. Part A: Fundamentals and Techniques*, sixth ed.; Heftmann, E., Ed. Elsevier B.V.: Amsterdam, Netherlands, 2004; pp 1–88.
- [101] Espinosa–Andrews H, Urias–Silvas J “Thermal properties of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul), *Carbohydr. Polymers*, **87**, 2671 (2012)
- [102] Evans M, Gallagher JA, Ratcliffe I, Williams PA “Determination of the Degree of Polymerisation of Fructanas from Ryegrass and Chicory Using MALDI–TOF Mass Spectrometry and Gel Permeation Chromatography Coupled to Multiangle Laser Light Scattering”, *Food Hydrocolloids*, **120**, 15