

ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE JARABE DE AGAVE AZUL (*Agave tequilana* Weber var. azul) Y OTROS JARABES NATURALES

COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN BLUE AGAVE SYRUP (*Agave tequilana* Weber var. azul) AND OTHER NATURAL SYRUPS

Erika Mellado-Mojica, Mercedes Gpe. López-Pérez*

Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Km 9.6 Lib. Norte Carretera Irapuato-Leon. 36821. Irapuato, Guanajuato. México. (mlopez@ira.cinvestav.mx).

RESUMEN

El jarabe de agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) es la sustancia dulce natural producida por hidrólisis de los fructanos almacenados en la planta de maguey. Este endulzante se ha popularizado por su capacidad prebiótica e índice glucémico bajo respecto a otros jarabes y mieles naturales. Las marcas comerciales, distribuidores, producción y comercialización de estos jarabes han incrementado, por ello es conveniente conocer sus características físicas y químicas y contrastarlas con las de otros productos del mismo tipo. En el presente estudio se determinaron el contenido de sólidos solubles totales (SST) y de humedad, pH, perfil de carbohidratos y algunas características sensoriales de 29 muestras de jarabes de agave azul, maíz y caña, y miel de abeja. El jarabe de agave azul, en promedio tuvo SST equivalentes a 76 °Brix, 22 % de humedad (% H) y pH 4; en contraste la miel presentó el contenido mayor de SST (82 °Brix), el menor de humedad (16 % H) y pH (pH 3.7). La cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), mostró que el jarabe de agave azul contiene principalmente fructosa y fructooligosacáridos; los de maíz y caña y la miel contienen glucosa, sacarosa y maltooligosacáridos con perfiles diferenciables.

Palabras clave: *Agave tequilana* Weber var. azul, endulzante natural, fructooligosacáridos, jarabe de agave azul, perfil de carbohidratos, propiedades físicas y químicas.

ABSTRACT

The blue agave syrup (*Agave tequilana* Weber var. azul) is the natural sweet substance produced by hydrolysis of fructans stored in the agave plant. This sweetener has become popular for its prebiotic capacity and low glycemic index compared to other natural syrups and honeys. The trademarks, distributors, production and commercialization of these syrups have increased; therefore, it is important to know their physical and chemical characteristics and contrast them with other products of the same type. In this study we determined the content of total soluble solids (TSS) and of humidity, pH, carbohydrate profile and some sensorial characteristics of 29 samples of blue agave and corn, sugarcane syrups, and honey. The blue agave syrup, on average, had TSS equivalent to 76 °Brix, 22 % humidity (% H) and pH 4; in contrast, honey showed the highest TSS content (82 °Brix), the lowest values of humidity (16 % H) and pH (pH 3.7). Thin-layer chromatography (TLC) and anion-exchange chromatography with high-performance coupled to a pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD), showed that the blue agave syrups contains mainly fructose and fructooligosaccharides; those of corn, sugarcane, and honey contain glucose, sucrose and maltooligosaccharides with differentiated profiles.

Key words: *Agave tequilana* Weber var. azul, natural sweetener, fructooligosaccharides, blue agave syrup, carbohydrate profile, physical and chemical properties.

INTRODUCTION

Plants of the *Agave* genus store fructans (polymers of fructose) as main reserve carbohydrates (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli and López, 2006). In this genus, *Agave tequilana* Weber var. azul stands out as an

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2012. Aprobado: abril, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 47: 233-244. 2013.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Agave* almacenan fructanos (polímeros de fructosa) como principal carbohidrato de reserva (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006). En este género, *Agave tequilana* Weber var. azul sobresale como un cultivo con importancia agronómica en México por ser la materia prima principal para la elaboración de tequila (NOM, 2006), por la capacidad prebiótica de sus fructanos y su efecto sistémico en la salud (Urías-Silvas *et al.*, 2008; Urías-Silva y López, 2009). Los fructanos de *Agave* sp. disminuyen los niveles de glucosa y colesterol sérico e incrementan la absorción de calcio en los huesos (Urías-Silvas *et al.*, 2008; García-Vieyra y López, 2010). El gran número de marcas comerciales y distribuidores de jarabe de agave azul reflejan el incremento de su producción y aceptación como endulzante en México y otros países (NMX, 2008; Phillips *et al.*, 2009). Según la Norma Mexicana NMX, 2008 (NMX-FF-110-SCFI-2008) el jarabe de agave azul es la sustancia dulce natural producida por hidrólisis de sus fructanos y no debe contener aditivos alimentarios, almidones, melazas, glucosa, dextrinas, fructosa u otros azúcares de otro origen. No obstante su popularidad, la literatura disponible acerca del jarabe de agave azul está relacionada con producción (Partida *et al.*, 1998), diseño de estrategias biotecnológicas para ese fin (García-Aguirre *et al.*, 2009), capacidad antibacteriana (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983) y potencial como antioxidante (Phillips *et al.*, 2009). Por tanto, es necesario conocer sus características físicas y químicas y los carbohidratos que contiene, lo que permitirá validar su autenticidad, calidad e impacto en la salud. El objetivo de este estudio fue determinar las propiedades físicas y químicas del jarabe de agave azul, identificar el tipo y abundancia de sus carbohidratos y compararlos con otros endulzantes naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estándares de carbohidratos

Para la identificar y cuantificar los mono y disacáridos se usaron estándares de glucosa, fructosa y sacarosa de Sigma-Aldrich (EE.UU.), los de los fructooligosacáridos (FOS) kestosa, nistosa

agronomical important crop in Mexico as the main raw material for tequila production (NOM, 2006), by the prebiotic capacity of its fructans and its systemic effect on health (Urías-Silvas *et al.*, 2008; Urías-Silva and López, 2009). Fructans of *Agave* spp. decrease glucose levels and serum cholesterol and increase the absorption of calcium in bones (Urías-Silvas *et al.*, 2008; García-Vieyra and López, 2010). The large number of trademarks and distributors of blue agave syrup reflect the increase in production and acceptance as a sweetener in Mexico and other countries (NMX, 2008, Phillips *et al.*, 2009). According to the Mexican Standard NMX, 2008 (NMX-FF-110-SCFI-2008) blue agave syrup is the natural sweet substance produced by hydrolysis of fructans, and contains no food additives, starches, molasses, glucose, dextrin, fructose or other sugars from other sources. Despite its popularity, the available literature on the blue agave syrup is related to production (Partida *et al.*, 1998), design of biotechnological strategies for this purpose (García-Aguirre *et al.*, 2009), antibacterial ability (Davidson and Ortiz de Montellano, 1983) and potential as an antioxidant (Phillips *et al.*, 2009). Therefore, it is important to know the physical and chemical characteristics and carbohydrates that it contains, which will validate its authenticity, quality and impact on health. The objective of this study was to determine the physical and chemical properties of the blue agave syrup, identify the type and abundance of its carbohydrates it and compare them with other natural sweeteners.

MATERIALS AND METHODS

Carbohydrate standards

To identify and quantify mono-and di-saccharides standards of glucose, fructose and sucrose from Sigma-Aldrich (USA) were used; those of fructooligosaccharides (FOS), kestose, nystose and kestopentaosa were from Wako Pure Chemicals (Japan), and the maltooligosaccharides (MOS) were from Supelco (USA).

Analyzed samples of syrups and honey

Twenty nine products were analyzed and they were purchased in supermarkets of the cities of Arandas, Jalisco; Celaya, Guanajuato; District Federal, Guadalajara, Jalisco;

y kestopentaosa fueron de Wako Pure Chemicals (Japón), y los de los maltooligosacáridos (MOS) de Supelco (EE.UU.).

Muestras analizadas de jarabes y miel

Se analizaron 29 productos adquiridos en supermercados de las ciudades de Arandas, Jalisco; Celaya, Guanajuato; Distrito Federal; Guadalajara, Jalisco; Irapuato, Guanajuato; Morelia, Michoacán; Oaxaca, Oaxaca; Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Veracruz, Veracruz; y Zacatecas, Zacatecas. El número de muestras y la nomenclatura fue la siguiente: 15 muestras de jarabe de agave azul (JA), 2 muestras de jarabe de maíz (JM), 2 muestras de jarabe de caña (JC) y 10 muestras de miel de abeja (MA). Previo a su análisis las muestras se homogenizaron durante 60 min con agitación a 500 rpm y 50 °C, se sonicaron 30 min, se enfriaron a temperatura ambiente (25 °C) y se almacenaron a 20 °C.

Sólidos solubles totales y contenido de humedad

Los SST (°Brix), la humedad (% H) y pH se cuantificaron según las especificaciones y métodos de la Norma Mexicana (NMX, 2008) para el producto denominado jarabe de agave azul elaborado con *Agave tequilana* Weber var. azul. Se evaluaron tres repeticiones de cada muestra.

El contenido de SST y de humedad se determinaron en un refractómetro Abbé Carl Zeiss 736008 (Jena, Alemania) en 200 mL de muestra; la lectura se obtuvo en °Brix y en la escala de índice de refracción. El porcentaje de humedad se calculó con la tabla de equivalencias de índice de refracción y contenido de humedad, descrita en la United States Standards for Grades of Extracted Honey (USDA, 1985^[1]).

pH

El pH de las muestras se midió con un potenciómetro 3510 pHmeter Jenway (EE.UU.), en tres alícuotas de una solución con 10 g de jarabe en 75 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono.

Color

El color de las muestras se determinó con la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Benchmark-Plus Microplate de Biorad (EE.UU.), de acuerdo con el protocolo descrito en United States Standards for Grades of Extracted Honey (USDA, 1985^[1]). Se usó glicerol como blanco y el color se definió según la escala para miel de abeja.

Irapuato, Guanajuato; Morelia, Michoacan; Oaxaca, Oaxaca; Tuxtla Gutierrez, Chiapas; Veracruz, Veracruz; and Zacatecas, Zacatecas. The number of samples and the nomenclature were as follows: 15 samples of blue agave syrup (JA), 2 samples of corn syrup (JM), 2 samples of cane syrup (JC) and 10 samples of honey (MA). Prior to analysis, the samples were homogenized by shaking at 500 rpm for 60 min and 50 °C, sonicated for 30 min, cooled to room temperature (25 °C) and stored at 20 °C.

Total soluble solids and humidity content

TSS (°Brix), humidity (% H) and pH were quantified according to specifications and methods of the Mexican Standard (NMX, 2008) for the product called blue agave syrup made from *Agave tequilana* Weber var. azul. Three replicates were evaluated for each sample.

The content of TSS and humidity content were determined on an Abbé refractometer Carl Zeiss 766008 (Jena, Germany) in 200 mL of sample; reading was obtained on °Brix and in the refractive index scale. The humidity percentage was calculated with the table of equivalents of refractive index and humidity content, described in the United States Standards for Grades of Extracted Honey (USDA, 1985^[1]).

pH

The pH of the samples was measured with a potentiometer pHmeter Jenway 3510 (USA) in three aliquots of a solution containing 10 g of syrup in 75 mL of distilled water carbon dioxide free.

Color

The color of the samples was determined with absorbance at 560 nm in a spectrophotometer Benchmark-Plus Microplate of Biorad (USA) according to the protocol described in United States Standards for Grades of Extracted Honey (USDA, 1985^[1]). Glycerol was used as white and the color was defined according to the scale for honey.

Carbohydrate content in syrups and honeys

Carbohydrates were identified and quantified by thin layer chromatography and high-performance anion exchange chromatography coupled to a pulsed amperometric detector.

¹ USDA, 1985: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3011895>

Contenido de carbohidratos en los jarabes y mieles

Los carbohidratos se identificaron y cuantificaron con cromatografía en capa fina y cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, acoplada a un detector de pulso amperométrico.

Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Se aplicó 1 mL de las soluciones acuosas de los jarabes (100 mg mL^{-1}) a las placas de sílica gel con soporte de aluminio. Las placas de TLC se desarrollaron en un sistema de solventes butanol/propanol/agua (Kanaya *et al.*, 1978) y la presencia de los carbohidratos se detectó con anilina/difenilamina/ácido fosfórico en acetona (Anderson *et al.*, 2000).

Análisis por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

En los jarabes y miel se cuantificaron glucosa, fructosa y sacarosa mediante HPAEC-PAD con un cromatógrafo de iones Dionex ICS-3000 (USA), con una guarda-columna CarboPac PA-100 y columna CarboPac-PA100. Para el análisis se usaron 25 mL de las muestras diluidas (0.2 mg mL^{-1} con agua desionizada y se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45 mm). La separación de los carbohidratos se realizó con un gradiente de acetato de sodio (0-500 mM) en NaOH 150 mM, con un flujo de 0.8 mL min^{-1} y temperatura de columna de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. El potencial aplicado para la detección por pulso amperométrico para E1 (400 ms), E2 (20 ms), E3 (20 ms) y E4 (60 ms) fue +0.1, -2.0, +0.6 y -0.1 V (Mellado-Mojica y López, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólidos solubles totales, humedad y pH

Los jarabes de agave azul tuvieron el contenido promedio menor de SST (76.41°Brix) y el mayor de humedad (22 % H) (Cuadro 1), el jarabe de maíz (77°Brix y 21.5 % H) tuvo valores cercanos a los del jarabe de agave azul, y el jarabe de caña y la miel tuvieron el contenido de SST mayor y la humedad menor ($79^\circ\text{Brix}/19\% \text{ H}$, y $82^\circ\text{Brix}/16\% \text{ H}$). Los valores de ambas características de los jarabes de agave azul estuvieron en el intervalo especificado por la Norma Mexicana para este producto; los valores

Analysis by thin layer chromatography (TLC)

From the aqueous solutions of syrups (100 mg mL^{-1}) 1 mL was applied to the silica gel plates with aluminum support. TLC plates were developed in a solvent system of butanol/propanol/water (Kanaya *et al.*, 1978) and the carbohydrates presence was detected with aniline/diphenylamine/acetone phosphoric acid (Anderson *et al.*, 2000).

Analysis by high performance anion exchange chromatography coupled with a pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)

Glucose, fructose and sucrose were quantified in syrups and honey through HPAEC-PAD with a Dionex ion chromatograph ICS-3000 (USA) with a CarboPac PA-100 Guard Column and a CarboPac PA-100 Column. For the analysis, 25 mL of diluted samples (0.2 mg mL^{-1} with deionized water and filtered through a 0.45 mm nylon membrane) were used. Carbohydrate separation was performed using a sodium acetate gradient (0-500 mM) in 150 NaOH mM at a flow of 0.8 mL min^{-1} and column temperature of $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The potential applied to the detection by pulse amperometric for E1 (400 ms), E2 (20 ms), E3 (20 ms) and E4 (60 ms) was +0.1, -2.0, +0.6 and -0.1 V, respectively (Mellado-Mojica and López, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Total soluble solids, humidity and pH

The blue agave syrups had the lowest average content of TSS (76.41°Brix) and the highest average of humidity (22 % H) (Table 1), corn syrup (77°Brix and 21.5 % H) presented values close to those of blue agave syrup, and those of cane syrup and honey had the highest TSS content and the lowest humidity ($79^\circ\text{Brix}/19\% \text{ H}$, and $82^\circ\text{Brix}/16\% \text{ H}$). The values of both characteristics of blue agave syrups were in the range specified by the Mexican Standard for this product; the maximum and minimum values were detected in samples JA4 and JA12, and the latter were lower than those of the Mexican Standard (NMX, 2008). This is relevant because syrup of blue agave with low content of TSS and high humidity content is susceptible to develop pathogens and will decrease its quality (NMX, 2008).

The pH also differed among sweeteners and it was slightly acid pH (3.47 to 5.08). The average

Cuadro 1. Sólidos solubles totales (SST), contenido de humedad (%) y pH de jarabes y miel.
Table 1. Total soluble solids (TSS), humidity content (%) and pH of syrups and honey.

Jarabe	SST (°Brix)	Humedad (%)	pH	Jarabe [†]	SST (°Brix)	Humedad (%)	pH
JA1	75.2 ± 0.2	23.2 ± 0.2	4.40 ± 0.02	JM1	77.4 ± 0.0	21 ± 0.0	4.05 ± 0.02
JA2	77.5 ± 0.3	20.8 ± 0.2	3.69 ± 0.05	JM2	76.6 ± 0.05	21.9 ± 0.1	4.73 ± 0.01
JA3	79.1 ± 0.1	19.2 ± 0.2	4.11 ± 0.01	JC1	78.5 ± 0.05	19.9 ± 0.1	4.83 ± 0.01
JA4	79.5 ± 0.5	19 ± 0.4	4.11 ± 0.03	JC2	80.1 ± 0.1	18.2 ± 0.0	5.08 ± 0.12
JA5	75.0 ± 0.0	23.4 ± 0.0	4.16 ± 0.02	MA1	82.3 ± 0.1	15.9 ± 0.1	4.25 ± 0.06
JA6	76.0 ± 0.0	22.4 ± 0.0	3.74 ± 0.01	MA2	81.3 ± 0.1	17 ± 0.0	3.77 ± 0.03
JA7	74.1 ± 0.1	24.3 ± 0.1	3.85 ± 0.01	MA3	82.0 ± 0.1	16.2 ± 0.2	3.47 ± 0.01
JA8	77.0 ± 0.0	21.5 ± 0.1	3.74 ± 0.01	MA4	84.0 ± 0.0	14.3 ± 0.0	3.80 ± 0.01
JA9	77.7 ± 0.15	21 ± 0.2	3.91 ± 0.02	MA5	82.4 ± 0.0	15.8 ± 0.0	3.91 ± 0.02
JA10	78.0 ± 0.0	20.3 ± 0.1	3.87 ± 0.04	MA6	80.0 ± 0.0	18.2 ± 0.0	3.60 ± 0.01
JA11	78.1 ± 0.1	20.3 ± 0.1	3.96 ± 0.02	MA7	82.8 ± 0.25	15.4 ± 0.3	3.59 ± 0.01
JA12	73.4 ± 0.0	25 ± 0.0	3.87 ± 0.02	MA8	81.0 ± 0.0	17.4 ± 0.0	3.53 ± 0.01
JA13	75.4 ± 0.0	23 ± 0.0	3.99 ± 0.02	MA9	80.6 ± 0.0	17.7 ± 0.1	3.74 ± 0.0
JA14	75.7 ± 0.1	22.7 ± 0.1	4.07 ± 0.01	MA10	83.1 ± 0.1	15.1 ± 0.0	3.57 ± 0.01
JA15	74.5 ± 0.1	23.9 ± 0.1	4.16 ± 0.01				

[†] JA=jarabe de agave azul; JM=jarabe de maíz; JC=jarabe de caña; MA=miel de abeja ❖ [†] JA=blue agave syrup; JM=corn syrup; JC=cane syrup; MA=honey.

máximos y mínimos se detectaron en las muestras JA4 y JA12, y los de esta última fueron menores a los de la Norma (NMX, 2008). Esto es relevante porque un jarabe de agave azul con contenido bajo de SST y alto de humedad es susceptible al desarrollo de patógenos y disminuirá su calidad (NMX, 2008).

El pH también difirió entre los endulzantes y fue ligeramente ácido (3.47 a 5.08). El pH promedio de los jarabes de agave azul fue 4, y el de las muestras JA1 y JA2 fue el mayor (4.4) y menor (3.69) de ese grupo. El pH del jarabe de agave azul indicado en la Norma es de 4 a 6; varias de las muestras analizadas no cumplieron con la normatividad pues su pH fue menor, pero sus valores coinciden con el reportado por López *et al.* (2011). Así, el pH del jarabe de agave azul más frecuente es cercano a 4.

Las mieles tuvieron el pH menor (3.72), los jarabes de agave azul (pH 3.97) y de maíz (pH 4.5) tuvieron valores intermedios y el de caña (pH 4.95) fue el mayor.

Los valores de SST, contenido de humedad y pH coincidieron con las especificaciones en la NNDSR (USDA, 2011^[2]) para jarabes de maíz, y de caña, y la miel. Esto permite señalar que las tres características de los jarabes y miel son típicas de cada tipo

pH of the blue agave syrups was 4, and that of the samples JA1 and JA2 was the highest (4.4) and the lowest (3.69) in this group. The pH of the blue agave syrup indicated in the Mexican Standard is between 4 and 6; several of the analyzed samples did not meet the regulations as their pH was lower, but their values coincide with those reported by López *et al.* (2011). Thus, the pH of the blue agave syrup more frequent is close to 4.

Honeys had the lowest pH (3.72), the blue agave syrup (pH 3.97) and of corn (pH 4.5) had intermediate values and that of cane (pH 4.95) was the highest.

Values of TSS, humidity content and pH coincided with the specifications in the NNDSR (USDA, 2011^[2]) for corn and cane syrups, and honey. This allows to point out that the three characteristics of syrups and honey are typical of every kind and could to validate the authenticity and quality of these products.

Color

The blue agave syrup and honey had the greatest range of colors; in contrast, corn and sugar cane syrups had a unique hue (Table 2). Therefore, color

² USDA, 2011: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

y podrían validar la autenticidad y calidad de esos productos.

Color

El jarabe de agave azul y la miel presentaron la gama mayor de colores; en contraste, los jarabes de maíz y de caña tuvieron una tonalidad única (Cuadro 2). Por tanto, el color no es una variable adecuada para validar o identificar estos endulzantes.

Identificación y contenido de carbohidratos

Los carbohidratos, separados con TLC e identificados mediante estándares (Cuadro 3), de cada jarabe o miel son específicos, y diferentes entre los productos con origen diverso (Figura 1). La misma metodología mostró que los jarabes de agave azul contienen fructosa en abundancia y algunos contienen trazas de FOS $DP \leq 4$ (kestosa y nistosa), formados en la hidrólisis de los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul cuando se elabora el jarabe (García-Aguirre *et al.*, 2009 y NMX, 2008). El jarabe de maíz y caña presentaron glucosa y MOS, y la presencia de sacarosa diferenció al jarabe de caña. La miel presentó glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa y un trisacárido de coloración rojiza cuyo factor de retardo (FR) estuvo entre los carbohidratos.

El análisis HPAEC-PAD mostró que glucosa, fructosa y sacarosa fueron azúcares comunes y los más abundantes en los endulzantes. Los cromatogramas (Figuras 2 y 3) mostraron patrones similares, como la presencia y abundancia de esos tres azúcares en las muestras de cada tipo (Figura 2A-2D) y diferentes entre los tipos de endulzantes (2E).

is not a suitable variable to validate or identify these sweeteners.

Carbohydrate content and identification

Carbohydrates, separated by TLC and identified with standards (Table 3), of each syrup or honey were specific and different among the products with different origin (Figure 1). The same methodology showed that blue agave syrups contain fructose in abundance and that some contain traces of FOS $DP \leq 4$ (kestose and nystose), formed during the hydrolysis of fructans of *A. tequilana* Weber var. azul when making the syrup (García-Aguirre *et al.*, 2009 and NMX, 2008). Corn and cane syrups presented glucose and MOS, and the presence of sucrose differentiated the cane syrup. Honey presented glucose, fructose, maltose, maltotriose and a reddish trisaccharide whose retardation factor (RF) was among the carbohydrates.

HPAEC-PAD analysis showed that glucose, fructose and sucrose were common sugars and the most abundant in sweeteners. Chromatograms (Figures 2 and 3) showed similar patterns, as the presence and abundance of these three sugars in samples of each type (Figure 2A-2D) and different between types of sweeteners (2E).

Abundance of fructose, shortage of glucose and apparent absence of sucrose in the blue agave syrups was confirmed by HPAEC-PAD (Figure 2A). Corn syrup presented inverse relationship of sugars, respect to the blue agave syrup, because glucose was more abundant than fructose (Figure 2B). The high abundance of sucrose in the cane syrup allowed us to differentiate it from corn syrup (Figure 2C); so, the presence and abundance of disaccharide could be used to differentiate them. This contrasted with

Cuadro 2. Gama de colores en los jarabes y miel.
Table 2. Range of colors in syrups and honey.

Jarabe	DO [†]	Color USDA [‡]
Agave azul	0.017 -0.961	Transparente a ámbar claro
Maíz	0.003 -0.005	Transparente
Caña	2.553 -3.956	Ámbar a ámbar oscuro
Abeja	0.034 -0.426	Transparente a ámbar extra claro

[†] DO=absorbancia del jarabe a 560 nm. [‡] USDA, 1985^[3] [§] DO=absorbance of syrup at 560 nm. [¶] USDA, 1985^[3].

³ USDA, 1985: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3011895>

Cuadro 3. Propiedades cromatográficas de carbohidratos utilizados como estándares.
Table 3. Chromatographic properties of carbohydrates used as standards.

Abreviación	Carbohidrato	DP [†]	Tipo [‡]	Color	FR [§]	TR ^b
X	Xilosa	1	MS	Azul	0.70	n.d.
G	Glucosa	1	MS	Azul	0.60	6.88
F	Fructosa	1	MS	Rojo	0.60	8.00
IM2	Isomaltosa	2	MOS	Azul	n.d.	11.02
S	Sacarosa	2	DS	Café	0.55	12.58
IM3	Isomaltotriosa	3	MOS	Azul	n.d.	15.20
K	Kestosa	3	FOS	Rojizo	0.44	15.92
M2	Maltosa	2	MOS	Azul	0.5	16.25
NK	Neokestosa	3	FOS	Rojizo	0.49	18.32
N	Nistosa	4	FOS	Rojizo	0.37	18.95
M3	Maltotriosa	3	MOS	Azul	0.41	19.58
DP5	DP5	5	FOS	Rojizo	0.31	22.12
M4	Maltotetraosa	4	MOS	Azul	0.3	22.78
M5	Maltopentaosa	5	MOS	Azul	0.22	25.93
M6	Maltohexaosa	6	MOS	Azul	0.16	29.62
M7	Maltoheptaosa	7	MOS	Azul	0.12	32.75

[†] DP=grado de polimerización. [‡] DS=disacárido; FOS=fructooligosacárido, MOS=maltooligosacárido; MS=monosacárido; coloración del carbohidrato en TLC. [§] FR=factor de retardo en TLC. ^b TR=tiempo de retención (min) en HPAEC-PAD ❖ [†] DP=degree of polymerization. [‡] DS=disaccharide, FOS=fructooligosaccharide, MOS=maltooligosaccharide, MS=monosaccharide; staining of carbohydrate in TLC. [§] FR=factor of retard in TLC. ^b TR=retention time (min) in HAPAEC-PAD.

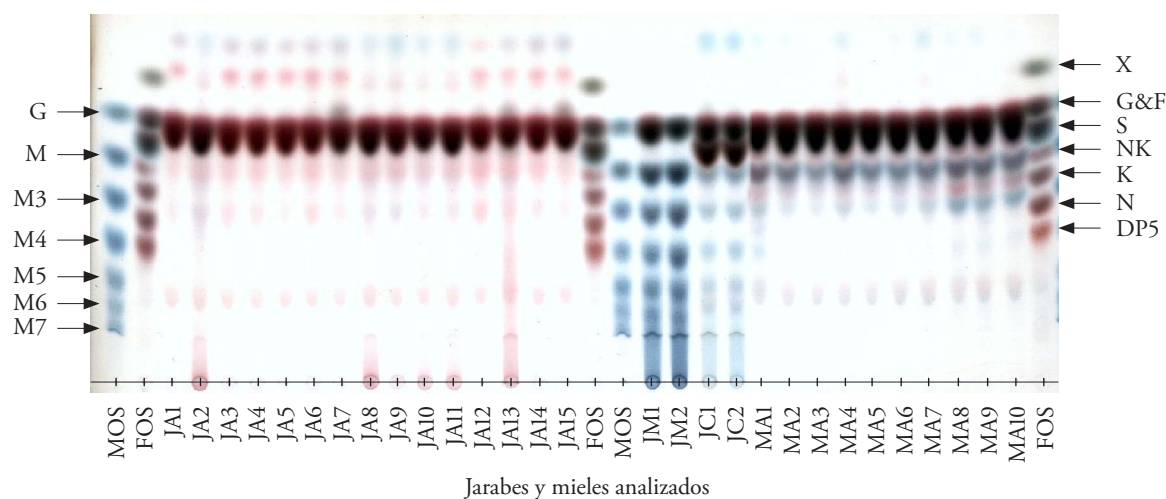


Figura 1. Cromatografía en capa fina (TLC) de los jarabes y mieles estudiados. La nomenclatura de los estándares corresponde a la descrita en materiales y métodos.

Figure 1. Thin layer chromatography (TLC) of syrups and honeys studied. The standard nomenclature corresponds to that described in materials and methods.

Mediante HPAEC-PAD (Figura 2A) se confirmó la abundancia de fructosa, la escasez de glucosa y ausencia aparente de sacarosa en los jarabes de agave azul. El jarabe de maíz presentó relación inversa de azúcares, respecto al de agave azul, ya que la glucosa

honey since it showed similar glucose and fructose content, and absence of sucrose (Figure 2D).

The results confirm that the presence or absence and abundance of glucose, fructose and sucrose (Figure 2E), could be a tool in the analysis of

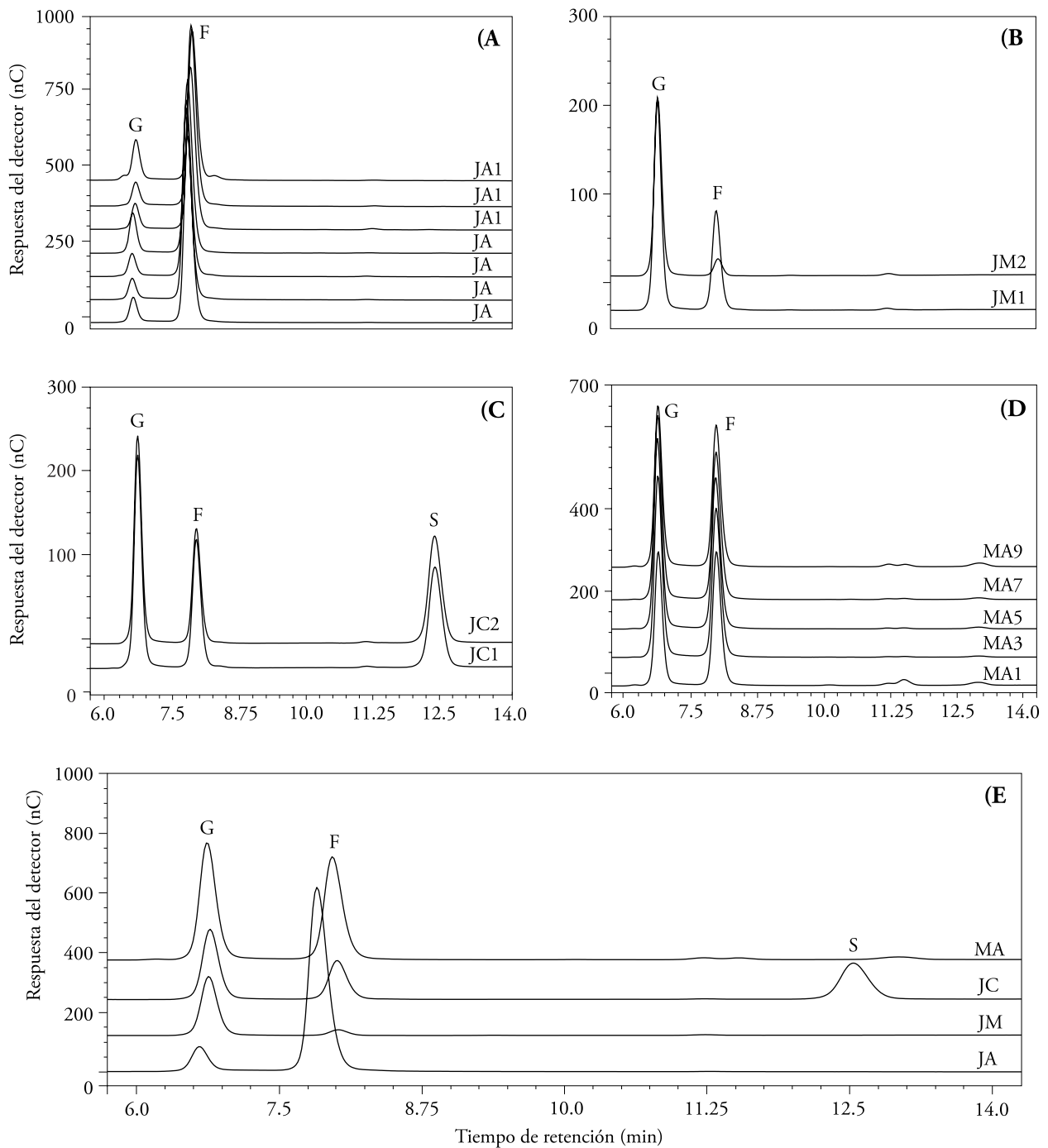


Figura 2. Perfil de glucosa (G), fructosa (F) y sacarosa (S) mediante HPAEC-PAD de A) jarabe de agave azul, B) jarabe de maíz, C) jarabe de caña, D) miel de abeja y E) comparativo entre los jarabes y miel.

Figure 2. Profile of glucose (G), fructose (F) and sucrose (S) by HPAEC-PAD of A) blue agave syrup, B) corn syrup, C) cane syrup, D) honey and E) comparative between syrups and honey.

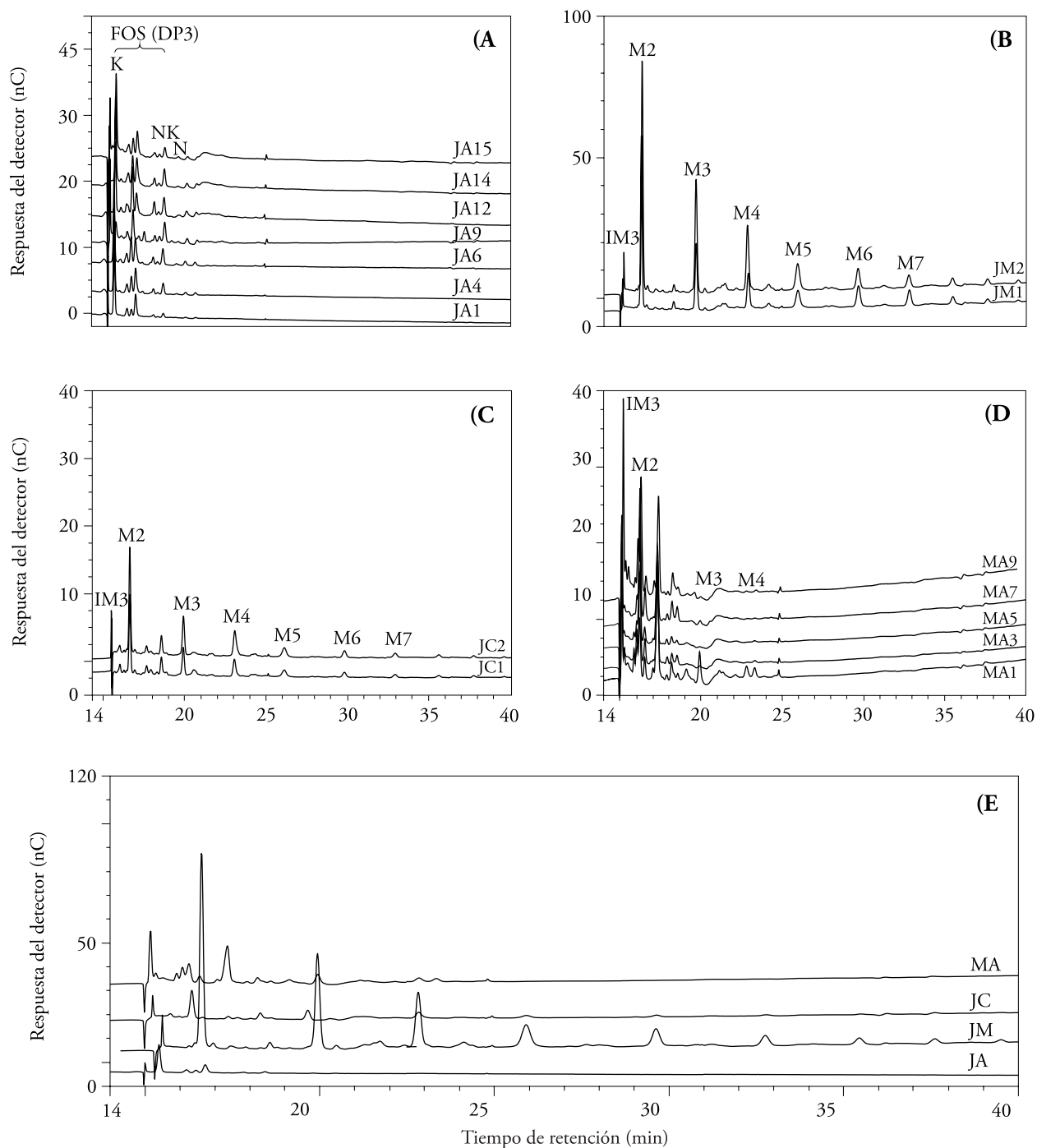


Figura 3. HPAEC-PAD de oligosacáridos presentes en A) jarabe de agave azul, B) jarabe de maíz, C) jarabe de caña, D) miel de abeja y E) comparativo entre jarabes y miel. La identidad de los carbohidratos corresponde a lo indicado en el Cuadro 2.
Figure 3. HPAEC-PAD of oligosaccharides present in A) blue agave syrup, B) corn syrup, C) cane syrup, D) honey and E) Comparative between syrups and honey. The identity of carbohydrates corresponds to that indicated in Table 2.

fue más abundante que la fructosa (Figura 2B). La gran abundancia de sacarosa en el jarabe de caña permitió diferenciarlo del de maíz (Figura 2C); así, la presencia y abundancia del disacárido podría usarse para diferenciarlos. Lo anterior contrastó con la miel, pues presentó contenido similar de glucosa y fructosa, y ausencia de sacarosa (Figura 2D).

Los resultados confirman que la presencia o ausencia y abundancia de glucosa, fructosa y sacarosa (Figura 2E), puede ser una herramienta en el análisis de autenticidad de los jarabe de agave azul y usarse para identificar algunos adulterantes.

Mediante HPAEC-PAD se obtuvo el perfil (tipo y abundancia) de oligosacáridos de los jarabes y miel, se reconoció el perfil similar de ellos entre las muestras de cada tipo de jarabe o miel, y la diferencia entre los tipos (Figura 3). Los cromatogramas corresponden a una muestra representativa de las diversas muestras de cada tipo de jarabe de agave azul.

Los oligosacáridos diferentes a sacarosa presentes en los jarabes de agave azul son conocidos como fructooligosacáridos, con $DP < 5$, incluyeron 1-kestosa (K), neokestosa (NK) y nistosa (N) (Figura 3A). En contraste, los jarabes de maíz y caña presentaron maltooligosacáridos con un DP_2 a DP_9 , y fueron más abundantes en el jarabe de maíz (Figura 3B-3C). También se confirmó la presencia de maltosa, maltotriosa y maltotetraosa en la miel y hubo otros carbohidratos diferentes a los incluidos como estándares en el estudio (Figura 3D). Además de los MOS identificados en la miel, se han reportado varios oligosacáridos, como erlosa, rafinosa, turanosa y laminariobiosa (Cotte *et al.*, 2003; Megherbi *et al.*, 2009; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010) y alguno de estos puede corresponder con los compuestos no identificados.

El perfil de oligosacáridos del jarabe de agave azul fue único por la presencia de fructooligosacáridos (Figura 3E) y oligosacáridos diferentes a los de los otros jarabes y miel. Esto indica que mediante HPAEC-PAD es posible establecer diferencias inequívocas entre los endulzantes analizados, y reconocer su origen y calidad. HPAEC-PAD es una herramienta para identificar la presencia y tipo de otros jarabes que pudieran usarse como adulterantes de los jarabes de agave azul, por el tipo de los oligosacáridos.

El contenido de glucosa, fructosa y sacarosa fue similar entre las muestras del mismo tipo y diferente entre los tipos de jarabes y miel. Los resultados de los

authenticity of blue agave syrups and be used to identify some adulterants.

By HPAEC-PAD the profiles (type and abundance) of oligosaccharides of all syrups and honeys were obtained, similar profiles were found for samples of the same natural origin, besides relevant differences on the oligosaccharide profiles were observed for products of different natural source (Figure 3). The chromatograms correspond to a representative sample of the different samples used for each type of blue agave syrup.

Oligosaccharides different from sucrose present in blue agave syrups are known as fructooligosaccharides with $DP < 5$, and included 1-kestose (K), neokestose (NK) and nystose (N) (Figure 3A). In contrast, corn and cane syrups presented maltooligosaccharides with a DP_2 to DP_9 , and they were more abundant in corn syrup (Figures 3B-3C). It was further confirmed the presence of maltose, maltotriose and maltotetraose in honey and there were other carbohydrates different from those listed as standards in the study (Figure 3D). Besides the MOS identified in honey, several oligosaccharides, such as erlosa, raffinose, turanose and laminariobiosa are documented (Cotte *et al.*, 2003; Megherbi *et al.*, 2009; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010), and any of these may correspond to unidentified compounds.

The oligosaccharide profile of blue agave syrup was unique due to the presence of fructooligosaccharides (Figure 3E) and oligosaccharides different to those of other syrups and honey. This indicates that by HPAEC-PAD is possible to establish unequivocal differences among sweeteners analyzed and their origin and quality can be recognized. HPAEC-PAD is a tool to identify the presence and type of other syrups that could be used as adulterants of blue agave syrups, by the type of oligosaccharides.

The content of glucose, fructose and sucrose was similar among samples of the same kind and different between different types of syrups and honey. The results observed on the TLC coincided with the qualitative analysis of those by HPAEC-PAD (Figure 4).

The content of fructose in the blue agave syrups was higher than 500 mg g^{-1} and that of glucose on average is lower than $>150 \text{ mg g}^{-1}$, in contrast with fructose formed by hydrolysis of fructans in the *Agave genus* (López *et al.*, 2003), and in corn syrup glucose and MOS derived from hydrolysis of corn

análisis cualitativos de TLC coincidieron con los de HPAEC-PAD (Figura 4).

El contenido de fructosa en los jarabes de agave azul fue mayor a 500 mg g^{-1} y el de glucosa en promedio es menor a $>150 \text{ mg g}^{-1}$, en contraste con la fructosa formada por la hidrólisis de los fructanos en el género *Agave* (López *et al.*, 2003), y en el jarabe de maíz la glucosa y los MOS derivan de la hidrólisis del almidón de maíz. En el jarabe de caña, la sacarosa es la más abundante ($>300 \text{ mg g}^{-1}$) y contrasta con la glucosa y fructosa ($<200 \text{ mg g}^{-1}$). En la miel el contenido de glucosa es similar al de fructosa (320 y 370 mg g^{-1}) y la sacarosa (40 mg g^{-1}) y representa $<5 \%$ de la muestra.

La relación fructosa/glucosa (relación F/G) es usada para determinar el dulzor en edulcorantes (Figura 4). Los jarabes de agave azul tuvieron los valores mayores de la relación F/G (>5) respecto a los otros endulzantes, y el orden decreciente fue miel, jarabe de caña y jarabe de maíz.

CONCLUSIONES

Los jarabes de agave azul pueden ser diferenciados de otros edulcorantes por su contenido de SST, pH,

starch. In cane syrup, sucrose is the most abundant ($>300 \text{ mg g}^{-1}$) and contrasts with glucose and fructose ($<200 \text{ mg g}^{-1}$). In honey glucose content is similar to that of fructose (320 and 370 mg g^{-1}) and sucrose (40 mg g^{-1}), and represents $<5 \%$ of the sample.

The relationship fructose/glucose (F/G relationship) is used for determination of sweetness in sweeteners (Figure 4). The blue agave syrups had higher values than the F/G relationship (>5) compared to the other sweeteners, and the decreasing order was honey, cane syrup and corn syrup.

CONCLUSIONS

The blue agave syrups can be differentiated from other sweeteners for their TSS content, pH, and carbohydrate type and content. The evaluations in this study are suitable tools for the comparative and quality study of blue agave syrup and other syrups and natural honeys.

—End of the English version—

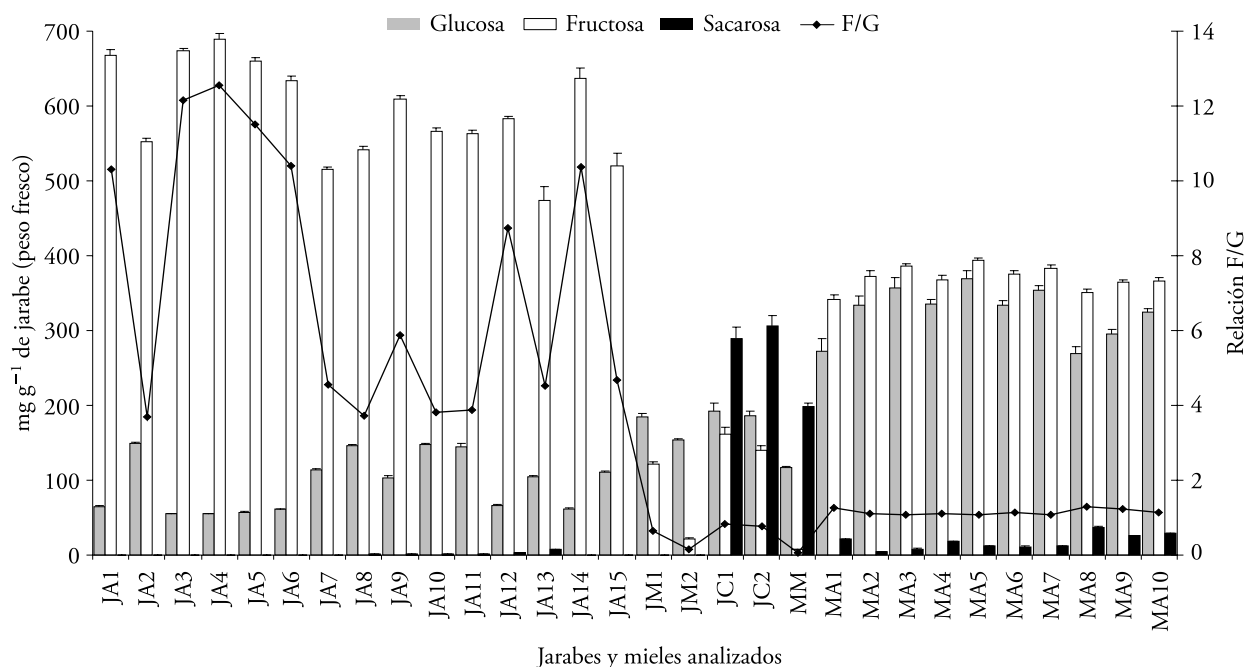


Figura 4. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en jarabes y mieles naturales. La nomenclatura de los estándares es la descrita en materiales y métodos.

Figure 4. Content of glucose, fructose and sucrose in syrups and natural honeys. Standards nomenclature is described in materials and methods.

tipo y contenido de carbohidratos. Las evaluaciones en este estudio son herramientas adecuadas para el estudio comparativo y de calidad del jarabe de agave azul y otros jarabes y mieles naturales

LITERATURA CITADA

- Alvarez-Suarez, J. M., S. Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, and M. Battino. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3: 15-23.
- Anderson, K., S. C. Li, and Y. T. Li. 2000. Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealin glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Anal. Biochem.* 287: 337-339.
- Cotte, J. F., H. Casablanca, S. Chardon, J. Lheritier, and M. F. Grenier-Loustalot. 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J. Chromatogr. A.* 1021: 145-155.
- Davidson, J. R., and B. R. Ortiz de Montellano. 1983. The bacterial properties of an aztec wound remedy. *J. Ethnopharmacol.* 8: 149-161.
- García-Aguirre, M., V. A. Sáenz-Álvarez, M. A. Rodríguez-Soto, F. J. Vicente-Maguey, E. Botello-Álvarez, H. Jiménez-Islas, M. Cárdenas-Manríquez, R. Rico-Martínez, and J. L. Navarrete-Bolaños. 2009. Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10205-10210.
- García-Vieyra, M. I., and M. G. López. 2010. Agave fructans prevent bone loss by stimulating bone formation. *In: Abstracts of 239 American Chemical Society (ACS) National Meeting.* Agric. Food Chem. Division. San Francisco CA. EE.UU.
- Kanaya, K., S. Chiba, and T. Shimomura. 1978. Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1947-1948.
- López, M. G., N. A. Mancilla-Margalli, and G. Mendoza-Díaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7835-7840.
- López, M. G., A. M. Vera-Guzmán, and E. Mellado-Mojica. 2011. Open new doors: Agave syrup. *In: Abstracts of 241 American Chemical Society (ACS) National Meeting.* Agric. Food Chem. Division. Anaheim. CA. EE.UU.
- Mancilla-Margalli, N. A., and M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structures patterns from Agave and *Dasyllirion* species. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7832-7839.
- Megherbi, M., B. Herbreteau, R. Faure, and A. Salvador. 2009. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2105-2111.
- Mellado-Mojica, E., and M. G. López. 2012. Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber Blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11704-11713.
- NMX-2008, Norma Mexicana (2008) que establece las especificaciones del producto denominado jarabe de agave elaborado con *A. tequilana* Weber. Var. azul. Especificaciones y métodos de prueba. NMX-FF-110-SCFI-2008. Diario Oficial 22 de abril del 2009. México.
- NOM-2006, Norma Oficial Mexicana (2006) que establece las características y especificaciones de todos los integrantes de la cadena productiva, industrial y comercial del Tequila. Tequila especificaciones. NOM-006-SCFI-2005. Diario Oficial 6 de enero del 2006. México.
- Partida, V., A. Camacho, and A. J. Martínez. 1998. Method of producing fructose syrup from agave plants. US patent 5 846 333.
- Phillips, K. M., M. H. Carlsen, and R. Blomhoff. 2009. Total antioxidant content of alternatives to refined sugar. *J. Am. Diet. Assoc.* 109: 64-71.
- USDA-1985. Agricultural Marketing Service. Fruit and Vegetable Division. Processed Products Branch. United States Standards for Grades of Extracted honey. <http://www.ams.usda.gov/AMSv1.0/getfile?dDocName=STELDEV3011895>. (Consultado: marzo 2012).
- USDA-2011. Nutrient Data Laboratory. National Nutrient Database for Standard reference. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. (Consultado: marzo 2012).
- Urías-Silvas, J. E., P. D. Cani, E. Delmée, A. Neyrinck, M. G. López, and N. M. Delzenne. 2008. Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and *Dasyllirion* spp. *Brit. J. Nutr.* 99: 254-261.
- Urías-Silvas, J. E., and M. G. López. 2009. *Agave* spp. and *Dasyllirion* sp. fructans as a potential novel source of prebiotics. *Dynam. Biochem. Proc. Biotech. Mol. Biol.* 3: 59-64.