



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR-IPN-MICHOACÁN



Obtención de insumos de interés industrial a partir
de las fructanas del agave mezcalero potosino
(*Agave salmiana*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

PRESENTA:

IBQ. CARLA GABRIELA VARGAS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. JOSÉ LUÍS MONTAÑEZ SOTO

Jiquilpan, Mich., Abril de 2009

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Bromatología de Alimentos, del Departamento de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Michoacán, ubicado en la ciudad de Jiquilpan, Michoacán.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich. siendo las 11:00 horas del día 27 del mes de marzo del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-MICHOACÁN para examinar la tesis de titulada:
“Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*)”

Presentada por el alumno (a) :

VARGAS
Apellido paterno

VÁZQUEZ
Apellido materno

CARLA GABRIELA
Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	2	0	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **Maestría en Producción Agrícola Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA
Director de tesis


DR. JOSÉ LUIS MONTANEZ SOTO


DR. JOSÉ VENEGAS GONZÁLEZ


DRA. HORENCIA GABRIELA MENA
VIOLANTE


DRA. FABIOLA GABRIELA ZUNO
FLORIANO


M.C. IGNACIO GARCÍA RUIZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. CARLOS VÍCTOR MUÑOZ RUIZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich. el día 13 del mes de abril del año 2009, el (la) que suscribe Carla Gabriela Vargas Vázquez alumno (a) del Programa de Maestría en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B061205 adscrito al CIIDIR-IPN-MICH, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Luis Montañez Soto y cede los derechos del trabajo intitulado "Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (agave salmiana)", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección carla_gabriela_v@hotmail.com, montasoto@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Carla Gabriela Vargas Vázquez
Nombre y firma

Agradezco al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-MICH), al Instituto Politécnico Nacional y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), por el apoyo académico y económico brindado, que hicieron posible la realización de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma muy valiosa a mi Director de Tesis, Dr. José Luis Montañez Soto, por planear, dirigir y mantener el desarrollo del proyecto de investigación; así como por su enseñanza y por todo el tiempo invertido en el mismo.

A mi comité tutorial por sus consejos y por su participación en la revisión de esta tesis:

- *Dra. Fabiola Gabriela Zuno Floriano*
- *Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante*
- *Dr. José Venegas González*
- *MC. Ignacio García Ruíz*
- *MC. Luis Fernando Ceja Torres*

A todas aquellas personas de la institución involucradas de manera directa e indirecta en el desarrollo de mi proyecto, de manera muy especial a mis amigos y compañeros de clases por el apoyo incondicional y la valiosa amistad, pues fueron una importantísima herramienta en mis estudios de maestría; así como a todos mis profesores, por el apoyo académico brindado y por los conocimientos constantes para cumplir el objetivo de llegar a una meta más en mi vida.

A mi institución CIIDIR-IPN, Mich., por abrirme las puertas y darme la oportunidad de superación.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con todo amor a mis padres, Raúl Vargas Estrada y Rosa María Vázquez Robledo; a mis hermanos Claudia, Jacob y María Isabel; que con sus consejos y cariño, se convirtieron en una inspiración a continuar y terminar este proyecto de vida.

A mi esposo Alfonso Bautista Lúa quien es una parte muy importante de mi vida y que incondicionalmente me ha apoyado en el logro de cada una de mis metas, como el obtener mi grado de Maestría; a su familia especialmente al Prof. Armando Bautista Canela y Rosa María Lúa, por ser un apoyo más en este camino a recorrer.

CONTENIDO

	PÀGINA
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESÚMEN	IX
ABSTRACT	XI
NOTACIÓN	XIII

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EDULCORANTES	2
1.1.1 Generalidades	2
1.1.2 Clasificación	3
1.1.3 Poder edulcorante	3
1.1.4 Propiedades funcionales	4
1.1.5 Tendencias de consumo	5
1.1.6 Características y métodos de obtención	7
1.2 FRUCTANAS	10
1.2.1 Descripción y clasificación	10
1.2.2 Características físicas y químicas	12
1.2.3 Biodisponibilidad	12
1.2.4 Toxicidad	13

1.2.5 Consumo y aplicaciones	14
1.2.6 Obtención de jarabes fructosados, inulinas y fructoligosacáridos a partir de fructanas	16
1.2.7 Fuentes potenciales de fructanas	18
1.3 EL AGAVE MEZCALERO POTOSINO (<i>Agave salmiana</i> L.)	19
1.3.1 Generalidades	19
1.3.2 Distribución geográfica	21
1.3.3 Usos	24
1.3.4 El maguey como materia prima para la producción de mezcal	25
1.3.5 Panorama económico del agave mezcalero potosino	27
1.4 JUSTIFICACIÓN	28
1.5 HIPÓTESIS	28
1.6 OBJETIVO GENERAL	29
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1 MATERIAS PRIMAS	31
2.2 REACTIVOS	31
2.3 EQUIPO	32
2.4 MÉTODOS	32
2.4.1 Métodos generales	32
2.4.2 Métodos específicos	33
2.4.2.1 Fibra dietaria	33
2.4.2.2 Perfil de ácidos grasos	34

2.4.2.3	Determinación de glucosa	35
2.4.2.4	Determinación de fructosa y glucosa directa	36
2.4.2.5	Determinación del contenido de fructoligosacáridos	37
2.4.2.5.1	Grado de polimerización promedio de los fructoligosacáridos	39
2.4.2.5.2	Peso molecular promedio de los fructoligosacáridos	39
2.4.2.6	Determinación de inulina	39
2.4.2.6.1	Grado de polimerización promedio de las inulinas	41
2.4.2.6.2	Peso molecular promedio de las inulinas	41
2.4.2.7	Determinación de sólidos solubles (°Brix)	42
2.4.2.8	Análisis estadístico de los resultados	42
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	43
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	44
3.1.1	Acondicionamiento de la materia prima	44
3.1.2	Análisis químico porcentual del <i>Agave salmiana</i> L.	45
3.1.3	Perfil de ácidos grasos	46
3.2	EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FRUCTANAS	46
3.2.1	Extracción de las fructanas	46
3.2.2	Caracterización de las fructanas	48
3.3	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINA	50

3.3.1 Determinación de las condiciones de precipitación de la inulina	50
3.3.2 Caracterización química de la inulina	52
3.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTOLIGOSACÁRIDOS	52
3.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS JARABES	54
3.5.1 Determinación de las condiciones de hidrólisis	54
3.5.2 Elaboración de los jarabes de alta fructosa	56
3.5.3 Caracterización física y química de los jarabes	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	60
4.1.1 Acondicionamiento de la materia prima	60
4.1.2 Análisis químico porcentual	61
4.1.3 Contenido de fibra dietaria	63
4.1.4 Contenido de ácidos grasos	64
4.2 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FRUCTANAS	66
4.2.1 Extracción de las fructanas	66
4.2.2 Caracterización de las fructanas	68
4.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINA	73
4.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTOLIGOSACÁRIDOS	77
4.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS JARABES CON ALTO CONTENIDO DE FRUCTOSA	81

5. CONCLUSIONES	88
6. LITERATURA CITADA	91

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	TÍTULO	PÁGINA
1	Poder edulcorante relativo de algunas sustancias	4
2	Algoritmos utilizados para la caracterización de las fructanas	50
3	Análisis químico porcentual de las fracciones del <i>Agave salmiana</i> L.	61
4	Contenido de fibra dietaria en las diferentes fracciones del <i>A. salmiana</i> L.	63
5	Composición del extracto oleoso de la piña del <i>A. salmiana</i> L.	65
6	Cuantificación de las fructanas de las diferentes fracciones del <i>A. salmiana</i> L.	69
7	Caracterización y cuantificación de las fructanas de las diferentes fracciones del <i>A. salmiana</i> L.	71
8	Obtención de inulina a diferentes concentraciones de etanol	74
9	Caracterización química de las inulinas del <i>A. salmiana</i> L. e inulina de <i>Cichorium intybus</i> L.	75
10	Caracterización química de los fructoligosacáridos	79
11	Caracterización química de los jarabes del <i>A. salmiana</i> L. y de maíz	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	TÍTULO	PÁGINA
1	Proyección del consumo de edulcorantes en Estados Unidos de América	6
2	Producción e importaciones de jarabes de maíz con alto contenido de fructosa –HFCS-	6
3	Diagrama de flujo del proceso para la obtención industrial de jarabes de alto contenido de fructosa, jarabes con alto contenido de glucosa, glucosa y fructosa cristalina	9
4	Estructura química de las fructanas	11
5	Acción de la exo- y la endo-inulinasa sobre la inulina	18
6	Agave mezcalero potosino (<i>Agave salmiana</i> L.)	20
7	Distribución geográfica de los principales agaves en la República Mexicana	23
8	Aprovechamiento integral de las hojas y “piña” de los agaves en la alimentación de ganado vacuno	25
9	Magueyera típica en explotación en el Altiplano Potosino	26
10	Diagrama de flujo del acondicionamiento de la materia prima	45
11	Curva tipo de fructosa para la determinación de azúcares reductores totales y reductores directos (ART y ARD)	47
12	Diagrama de flujo del proceso de extracción de las fructanas contenidas en la piña del <i>Agave salmiana</i> L.	48
13	Diagrama de flujo del proceso de caracterización de las fructanas	49
14	Diagrama de flujo para la obtención de inulina a partir de las fructanas de “la piña” del <i>A. salmiana</i> L.	51

15	Diagrama de flujo del proceso de obtención de fructoligosacáridos por hidrólisis enzimática de inulina	54
16	Determinación de las condiciones de hidrólisis enzimática de las fructanas para la obtención de jarabes con alto contenido de fructosa	56
17	Diagrama de flujo del proceso de obtención de jarabes de alta fructosa a partir de la harina de “la piña” del <i>A. salmiana</i> L.	57
18	Efecto de tiempo y temperatura de maceración, en la extracción de las fructanas contenidas en la piña del <i>A. salmiana</i> L.	67
19	Acción hidrolítica de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i> sobre los fructoligosacáridos presentes en los extractos del <i>A. salmiana</i> L.	68
20	Grado de polimerización promedio de las fructanas contenidas en las diferentes fracciones del <i>A. salmiana</i> L.	71
21	Inulina en polvo obtenida a partir de las bases de las hojas y “la piña” del <i>Agave salmiana</i> L.	74
22	Cinética de la hidrólisis de inulina con la endo-inulinasa de <i>A. niger</i>	78
23	Fructoligosacáridos obtenidos a partir de “la piña” del <i>Agave salmiana</i> L.	81
24	Cinética de la hidrólisis enzimática del extracto de “la piña” del <i>A. salmiana</i> L.	83
25	Jarabes con alto contenido de fructosa, obtenidos a partir de “la piña” y bases de las hojas del <i>Agave salmiana</i> L.	87

RESUMEN

Anualmente, México importa grandes volúmenes de jarabes con alto contenido de fructosa, fructosa cristalina, inulinas y fructoligosacáridos; productos que son utilizados en la elaboración de una gran variedad de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos. Industrialmente los dos primeros se obtienen a partir del almidón de maíz, mientras que los segundos se obtienen a partir de las fructanas; polímeros de fructosa que constituyen los principales carbohidratos de reserva de muchas plantas, entre las que destacan los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.), las raíces de la achicoria (*Cichorium intybus* L.), los tubérculos de la planta de dalia (*Dahlia variabilis* Willd.) y las cabezas o “piñas” de las plantas del género *Agave*, como el agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.); planta vigorosa que crece en las regiones semiáridas de México. Su “piña” representa la parte comercial del cultivo y se utiliza en la producción de mezcal y pulque, pero su bajo precio de cotización, ha desmotivado a ejidatarios y empresarios, ocasionando el cierre de empresas y el abandono de los cultivos. Considerando la importancia económica, social y cultural que tiene el cultivo del *Agave salmiana* L. para el país, es necesario promover la investigación que genere el conocimiento sobre la composición y las propiedades de los principales constituyentes del agave y en base a ello, desarrollar alternativas que conlleven al aprovechamiento integral de la planta.

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un proceso enzimático para la elaboración de jarabes con alto contenido de fructosa, inulinas y fructoligosacáridos, a partir de las fructanas contenidas en las bases de las hojas y en “la piña” del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.).

En una primera etapa se determinó la composición química porcentual de “la piña” y de las bases de las pencas de la planta. En una segunda etapa se determinaron las condiciones óptimas (tiempo, temperatura) para la extracción de las fructanas, se continuó con su cuantificación y caracterización química. Extractos de ambas fracciones de la planta fueron posteriormente hidrolizados con una mezcla de exo- y

endo- inulinasas de *Aspergillus niger* a pH de 4.5 y 50°C, para obtener así los jarabes con alto contenido de fructosa, que se concentraron a 70°Brix y se determinó la composición química de los mismos, comparando ésta, con la composición de un jarabe comercial con alto contenido de fructosa que es obtenido a partir de almidón de maíz (Frudex 55). En una cuarta etapa se determinaron las condiciones óptimas para la precipitación de la inulina contenida en dichos extractos; la inulina así obtenida fue químicamente caracterizada y comparada con una muestra de inulina comercial obtenida de la raíz de achicoria (*Cichorium intybus* L.). También se determinaron las condiciones óptimas para la obtención de fructoligosacáridos por hidrólisis de inulina mediante la endo-inulinasa de *Aspergillus niger* y finalmente se determinó la composición química porcentual de los mismos.

El alto contenido de fructanas en la base de las pencas (54.16%) y en “la piña” (77.25%) del *Agave salmiana* L., hacen de éste cultivo una prometedora materia prima para la obtención industrial de insumos de interés industrial como jarabes de alta fructosa, fructosa cristalina, inulinas y fructoligosacáridos. Las condiciones óptimas para la extracción de las fructanas contenidas en el agave fueron: relación sólido-agua de 1:6, 70°C y 30 minutos de maceración y tres ciclos de extracción para obtener arriba del 95% de los carbohidratos totales presentes. Las fructanas de “la piña” se conforman por un 44.25 % de inulinas con un GPP de 18.5 unidades y por un 22.55% de FOS con un GPP de 4.7 unidades. Por su parte, las fructanas de las bases están integradas por 27.61% de inulinas con un GPP de 15.3 unidades y 12.31% de fructoligosacáridos con un GPP de 4.2 unidades. A una concentración de etanol de 80% se obtuvo la mayor cantidad de inulina precipitada; la inulina obtenida a partir de “la piña” del agave presentó un mayor grado de polimerización promedio (32.61 unidades) y por ende un mayor peso molecular promedio (5,283 unidades) que la inulina extraída de las bases de las hojas del agave. No existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el grado de polimerización promedio y por ende, en el peso molecular promedio de los fructoligosacáridos obtenidos a partir de las bases de las hojas y de la piña del agave mezcalero potosino. Se obtuvieron jarabes con un contenido de fructosa muy superior (>80%) al que contiene el jarabe alta fructosa comercial Frudex 55, cuyo contenido de fructosa fue de 53.42%.

ABSTRACT

Annually, México imports large volumes of high fructose syrups, crystalline fructose, inulin and fructooligosaccharides; which are used to manufacture a wide variety of foods, beverages and pharmaceutical products. The first two are derived from corn starch, while the latter is obtained from the fructans. Fructose polymers which constitute the major carbohydrate reserve in many plants, among which are the tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), the roots of chicory (*Cichorium intybus* L.), tubers of dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.) and the heads of “pine cone” of the genus *Agave* plants such as agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.), vigorous plant that grows in semiarid regions of Mexico. It’s “pine cone” represents the commercial crop and is used in the production of mezcal and pulque, but its low price has demotivated farmers and industrial-men, causing business closures and the abandonment of crops. Considering the economic, social and cultural context that is the cultivation of *Agave salmiana* L. for country, it’s “pine cone” necessary to promote research that generates knowledge about the composition and properties of the main constituents of the agave, and on this basis, develop alternatives which involve the plant integral use.

The aim of this study was to develop an enzymatic process for the production of syrups with high fructose concentration, inulin and fructooligosaccharides from fructans contained in the bases of the leaves and in the agave mezcalero potosino head (*Agave salmiana* L.).

In a first stage we determined the percentage chemical composition of the “pine cone” and the leaves bases of the plant. In a second phase we identified the optimum conditions (time, temperature) for the extraction of fructans, continuing with its quantification and chemical characterization. Extracts of both fractions of the plant were subsequently hydrolyzed with a mixture of exo- and endo-inulinases of *Aspergillus niger* at pH 4.5 and 50°C, to obtain syrups with high fructose concentration, which were concentrated at 70°Brix and was determined the chemical

composition of them, comparing it with the high fructose syrup commercial composition which is produced from corn starch (Frudex 55). In the fourth stage the optimum conditions for precipitation of the inulin contained in these extracts was determined. The inulin obtained was chemically characterized and compared with a commercial sample of inulin obtained from chicory root (*Cichorium intybus* L.). We also assessed the optimal conditions for obtaining fructooligosaccharides from inulin hydrolysis by the endo-inulinase from *Aspergillus niger* enzyme and finally we determined its chemical composition percentage.

The high content of fructans in the bases of the leaves (54.16%) and in the “pine cone” (77.25%) of *Agave salmiana* L., make of this crop a promising raw material for obtaining industrial inputs such as high fructose syrups, crystalline fructose, inulin and fructooligosaccharides. The optimum conditions for the extraction of fructans were solid-water ratio 1:6, 70°C and 30 minutes of soaking and three extraction cycles to get up to 95% of carbohydrates present in the plant. The carbohydrates of the “pine cone” are integrated by 44.25% of inulin with a GPP of 18.5 units and 22.55% of fructooligosaccharides with a GPP of 4.7 units. The fructanas of the bases of the leaves are composed of 27.61% inulin with a GPP of 15.3 units and 12.38% of fructooligosaccharides with a GPP of 4.2 units. The maximum inulin precipitation was obtained at a concentration of 80% ethanol; inulin obtained from the agave's head presents a greater average degree of polymerization (32.61 units) and hence a higher average molecular weight (5,283 units) than inulin extracted from the bases of the leaves. There was no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the average degree of polymerization and hence the average molecular weight of the fructooligosaccharides obtained from the fructans contained in the bases of the leaves, with those obtained from the fructans contained in the “pine cone” of the agave mezcalero potosino. The obtained syrups were a fructose content much higher (>80%) that contains high fructose syrup commercial Frudex 55, whose fructose content was 53.42%.

NOTACIÓN

DESCRIPCIÓN	ABREVIACIÓN
Ácido 3, 5-Dinitrosalicílico	Ácido 3,5 DNS
Azúcares reductores directos	ARD
Azúcares reductores directos que integran los fructoligosacáridos	ARD _{FOS}
Azúcares reductores directos después de la hidrólisis con invertasa	ARD _I
Azúcares reductores directos que integran la inulina	ARD _{INU}
Azúcares reductores directos libres.	ARD _L
Azúcares reductores totales	ART
Base seca	BS
Fructosa	F
Fructosa en estado libre	F _D
Fructosa que integra los fructoligosacáridos	F _{FOS}
Fructosa después de su hidrólisis con invertasa de los extractos	F _I
Fructosa que integra la inulina.	F _{INU}
Fructosa en estado libre	F _L
Fructosa total	F _T
Fibra dietaria insoluble	FDI
Fibra dietaria soluble	FDS
Fibra dietaria total	FDT
Fructoligosacáridos	FOS
Glucosa	G

Glucosa en estado libre	G_D
Glucosa después de la hidrólisis con invertasa de los extractos	G_I
Glucosa que integra la inulina.	G_{INU}
Glucosa en estado libre	G_L
Glucosa que integra los fructoligosacáridos	G_{FOS}
Glucosa total	G_T
Grado de polimerización	GP
Grado de polimerización promedio	GPP
Grado de polimerización promedio de la inulina	GPP_{INU}
Grado de polimerización promedio de los fructoligosacáridos	GPP_{FOS}
Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa	HFCS
Jarabe de maíz con alto contenido de glucosa	HGCS
Peso molecular	PM
Peso molecular promedio	PMP
Peso molecular promedio de la inulina	PMP_{INU}
Peso molecular promedio de los fructoligosacáridos	PMP_{FOS}
Policloruro de vinilo	PVC

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EDULCORANTES

1.1.1 Generalidades

Los edulcorantes se encuentran entre los principales insumos de interés industrial y dada su capacidad endulzante son utilizados en la elaboración de una gran variedad de alimentos y bebidas; los tipos de edulcorantes más comunes y conocidos son los azúcares que son producidos por una gran variedad de plantas, también se encuentran en algunos productos como el aguamiel, la miel y la leche. La glucosa y la fructosa son los principales monosacáridos o azúcares simples que integran carbohidratos más complejos conocidos como polisacáridos, entre los que se encuentran: la celulosa, el almidón, las pectinas, el glucógeno y las fructanas, entre otros. Estos polisacáridos pueden formar parte de la estructura firme del producto que los contiene y no ser digeribles, o bien, pueden fungir como carbohidratos de reserva energética (García, *et al.*, 2000).

Durante la época prehispánica los únicos edulcorantes usados por los indígenas fueron la miel de abeja y el aguamiel, con la llegada de los españoles al continente americano se introdujo el cultivo de la caña de azúcar que marcó el inicio de la participación de la sacarosa en el mercado de los edulcorantes. Hoy en día, la sacarosa enfrenta fuertes presiones que atentan contra la preferencia que ha ostentado por casi 500 años de liderazgo en el mercado nacional y mundial de los edulcorantes (Fuchs, 1987); entre los factores que han contribuido a la disminución del consumo de la sacarosa se tienen los siguientes: cambios en los hábitos de alimentación, demanda de alimentos especiales para diabéticos, descubrimiento y síntesis química de edulcorantes no calóricos de alta intensidad, la funcionalidad, disponibilidad y precio de los edulcorantes competentes, finalmente el desarrollo de la biotecnología para la producción comercial de edulcorantes naturales como los jarabes de alta fructosa y la fructosa cristalina (Fleming y GrootWassink, 1979; Fuchs, 1987).

1.1.2 Clasificación

Existen varias formas de clasificar los edulcorantes (Badui, 1997), entre las que destacan las siguientes:

- A. De acuerdo a su origen se clasifican en edulcorantes naturales y sintéticos
- B. En base a su aporte calórico se clasifican en edulcorantes calóricos y no calóricos
- C. En base al requerimiento de insulina se clasifican en insulina dependientes e insulina independientes y
- D. En base a su poder edulcorante se clasifican en edulcorantes de alta intensidad y de baja intensidad.

1.1.3 Poder edulcorante

Actualmente existen en el mercado varios productos que presentan diversas propiedades funcionales tales como el poder edulcorante y aporte calórico, siendo éstos los aspectos más relevantes que determinan su utilización en la elaboración de una gran variedad de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos. El poder edulcorante de una sustancia se refiere a su capacidad de producir la sensación de dulzor al interactuar con las papilas gustativas y se mide tomando como base de comparación el dulzor de la sacarosa, a la que se le atribuye un valor relativo de 1 o de 100; es decir, si una sustancia presenta un poder edulcorante de 2, significa que dicha sustancia es dos veces más dulce que la sacarosa, en términos de la misma cantidad de masa (Cuadro 1) (Badui, 1997).

El dulzor que presentan los edulcorantes se ve afectado por varios factores como: la temperatura, la concentración y la presencia de otros compuestos (Badui, 1982); por ejemplo, cuando los azúcares se disuelven en agua, se presentan reacciones de mutarrotación y se produce una mezcla de tautómeros con diferente dulzor, esto se observa en las soluciones de fructosa recién preparadas, las que son más dulces que las soluciones de fructosa que se dejan en reposo y alcanzan su equilibrio

tautomérico. La temperatura afecta de manera inversa la capacidad endulzante de los carbohidratos, un ejemplo claro es, que se ha comprobado que la fructosa es más dulce a temperaturas bajas, propiedad que se aprovecha en la elaboración de bebidas refrescantes; por otro lado también se ha establecido que jarabes de glucosa y de sacarosa al 40% presentan el mismo grado de dulzor. Dentro de otros factores que influyen el dulzor se encuentran: la viscosidad, la presencia de sales, ácidos y algunos polímeros; por ejemplo, el alcohol aumenta el poder edulcorante de la sacarosa, mientras que la carboximetilcelulosa y el almidón lo reducen, el maltol y el etil maltol intensifican la dulzura de muchos azúcares.

Cuadro 1. Poder edulcorante relativo de algunas sustancias

Edulcorantes calóricos	Poder edulcorante relativo	Edulcorantes no calóricos	Poder edulcorante relativo
Glucosa	0.74	Dulcina	200
Xilitol	1	Aspartame	200
Sacarosa	1	Sacarina	400
Azúcar invertido	1	Dihidrochalcona	1500
HFCS al 42%	1	Prillartina	2000
HFCS al 55%	1.05	Monelina	2500
HFCS al 90%	1.5	Taumatina	3000
Fructosa	1.73	Osladina	3000

HFCS: Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (Badui, 1997)

1.1.4 Propiedades funcionales

Tanto la fructosa como los jarabes con alto contenido de fructosa presentan importantes ventajas funcionales y tecnológicas sobre la sacarosa; entre las que destacan mayor poder edulcorante, mayor capacidad higroscópica, mayor solubilidad

en agua y etanol, menor tendencia a la cristalización, menor poder cariogénico, menor costo en base a su poder edulcorante, la independencia de la hormona insulina para su biodisponibilidad, menor viscosidad de sus soluciones, el requerimiento de menores temperaturas para que se presenten las reacciones de maillard y el incremento de su poder edulcorante al disminuir la temperatura (Salminen y Hallikainen, 1990; Mancilla y López, 2002).

1.1.5 Tendencias de consumo

Desde que surgieron los jarabes de maíz con alto contenido de fructosa (HFCS) y los edulcorantes de alta intensidad (aspartame y sacarina) el consumo de la sacarosa ha venido perdiendo terreno en el mercado, tal como lo muestra un estudio realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (Figura 1) sobre la proyección del consumo de edulcorantes (Fuchs, 1987).

Los HFCS se empezaron a producir en 1967 y para 1979 se habían colocado en segunda posición de la demanda total de los edulcorantes representando un 17%, esta participación para 1985 alcanzó el 31% y para el 2005 llegó al 37%, de esta forma ocuparon el 1^{er} sitio, el 2^o y 3^o lugar los edulcorantes de alta intensidad y la sacarosa, respectivamente. En ese mismo periodo también se observó un incremento considerable en el consumo de edulcorantes no calóricos de alta intensidad como el aspartame y la sacarina, lo que entre otras causas, obedece a una tendencia actual hacia la disminución del consumo de edulcorantes calóricos como la sacarosa, a requerimiento de dietas controladas principalmente de enfermos diabéticos, etc. (Fuchs, 1987; INEGI, 2004).

En México, esta misma tendencia de consumo se deduce a partir de los datos sobre importaciones de edulcorantes derivados de la hidrólisis del almidón, realizadas en los últimos años (Figura 2) (INEGI, 2008); en donde cada tonelada de jarabe de alto contenido de fructosa que se utiliza en la industria, desplaza al menos una tonelada de sacarosa, esto respecto a su poder edulcorante. México es uno de los mayores

productores de azúcar en el mundo; sin embargo, los jarabes fructosados y la fructosa cristalina cada vez se usan más en lugar de ésta (Montes y Magaña, 2002).

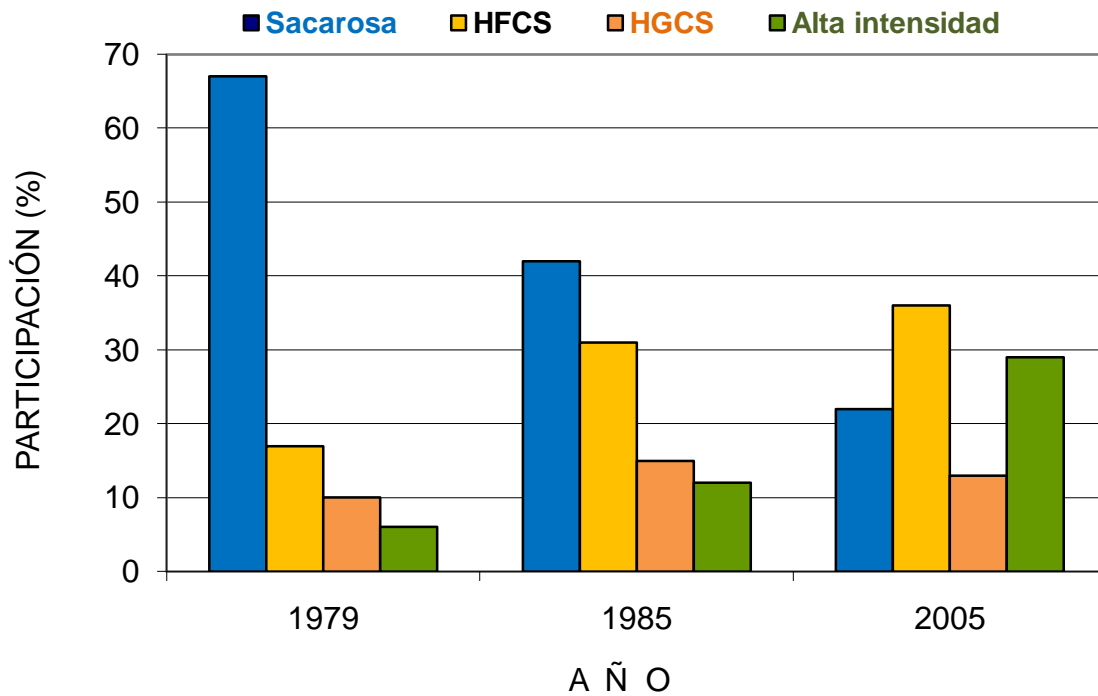


Figura 1. Proyección del consumo de edulcorantes en Estados Unidos de América (Fuchs, 198; INEGI, 2004)

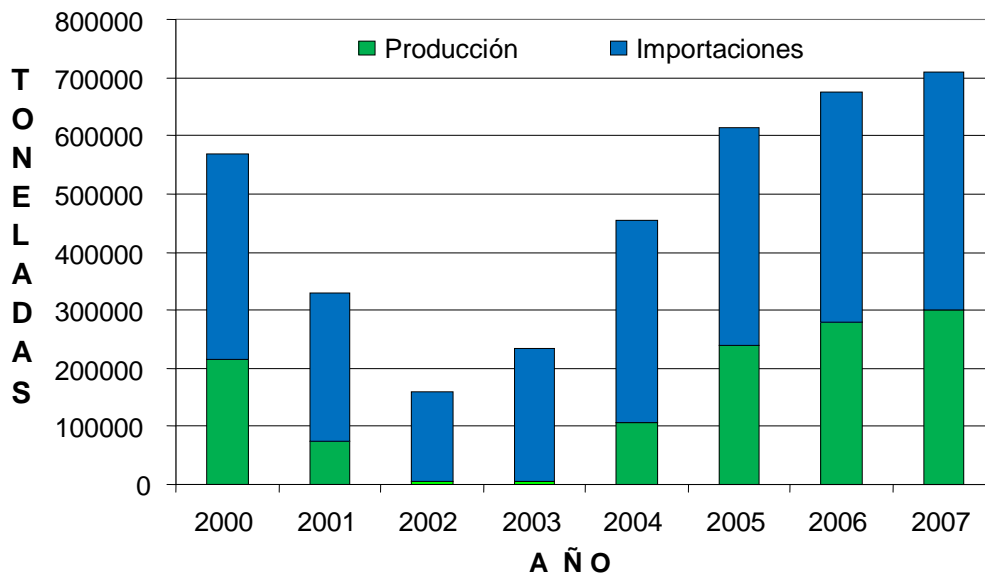


Figura 2. Producción e importación de jarabes de maíz con alto contenido de fructosa - HFCS- (INEGI, 2008)

1.1.6 Características y métodos de obtención

La sacarosa es el disacárido más ampliamente distribuido en la naturaleza, está constituida por glucosa y fructosa unidas a través de un enlace glucosídico $\alpha(1,2)$; es el edulcorante de mayor demanda mundial y su consumo per cápita anual excede los 40 kg en el mundo occidental. Se obtiene a partir de la caña de azúcar y de la remolacha; su hidrólisis ácida o enzimática produce lo que se conoce como azúcar invertido, que es una mezcla integrada por cantidades equimolares de sus dos monosacáridos constituyentes (glucosa y fructosa) (García *et al.*, 2000).

La glucosa o dextrosa, es el azúcar más importante en el metabolismo de las células vivas, su aporte calórico es de 4 Kcal/g y constituye la principal forma a la que otros azúcares son transformados en el cuerpo, de aquí que sea el azúcar más abundante encontrado en la sangre; está presente en muchas frutas y es la unidad base de la celulosa, el almidón y el glucógeno. Se obtiene principalmente por hidrólisis ácida o enzimática del almidón de maíz o de la sacarosa; su poder edulcorante es menor al de la sacarosa y cuenta con un amplio mercado en el área de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos (Scriban, 1985).

La D-fructosa o levulosa, es un isómero estructural de glucosa, manosa y galactosa, todas ellas presentan la misma fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$) pero la fructosa posee diferente grupo funcional, es una cetosa a diferencia de los otros tres azúcares que son aldosas; las cuatro son D-azúcares debido a que tienen la misma configuración que el D-gliceraldehído en el penúltimo átomo de carbono. La fructosa es el azúcar más dulce de los edulcorantes naturales, tiene 1.73 veces el poder edulcorante de la sacarosa, su máximo dulzor se obtiene a pH neutro o ligeramente ácido y bajas temperaturas; la forma furanosa es más dulce que la forma piranosa; presenta una alta solubilidad en agua y una baja tendencia a la cristalización; se encuentra principalmente en las frutas y en la miel (Lehninger, 2005; Hicks, 2001).

La fructosa puede obtenerse de varias formas entre las que destacan la hidrólisis de la sacarosa como parte del azúcar invertido; la hidrólisis del almidón para obtener glucosa y su posterior isomerización a fructosa (Figura 3) y la oxidación del D-manitol

ó del D-glucitol (sorbitol). Actualmente otro método para producir fructosa y que está recibiendo mucha atención, involucra la obtención de este azúcar a partir de las fructanas (polímero de fructosa) presentes en algunas plantas (Vandamme y Derycke, 1983).

Los jarabes con alto contenido de fructosa son de importante valor comercial y se ha logrado obtenerlos por hidrólisis enzimática del almidón de maíz principalmente (Figura 3); estos jarabes están constituidos por una mezcla del 42 al 90% de fructosa y el resto de glucosa. El método tradicional para su producción requiere por lo menos de tres enzimas; α -amilasa (EC 3.2.1.1), glucoamilasa (EC 3.2.1.3) y glucosa isomerasa (EC 5.3.1.18); así como, de varias etapas de separación, purificación, conversión, decoloración y concentración, de esta manera se obtienen jarabes con una concentración de fructosa superior al 42% (Beynum y Roels, 1987; Marcelli, 2000).

Con objeto de simplificar el proceso de elaboración y disminuir el costo del mismo, se han explorado varias alternativas entre las que destacan la inmovilización de enzimas, la optimización del proceso tradicional de producción y recientemente, se está recurriendo al uso de plantas que producen y acumulan fructanas como fuentes más viables para la producción industrial, tanto de jarabes con alto contenido de fructosa como de fructosa cristalina (Kierstan, 1980; Guiraud y Galzy 1981; Fuchs, 1987).

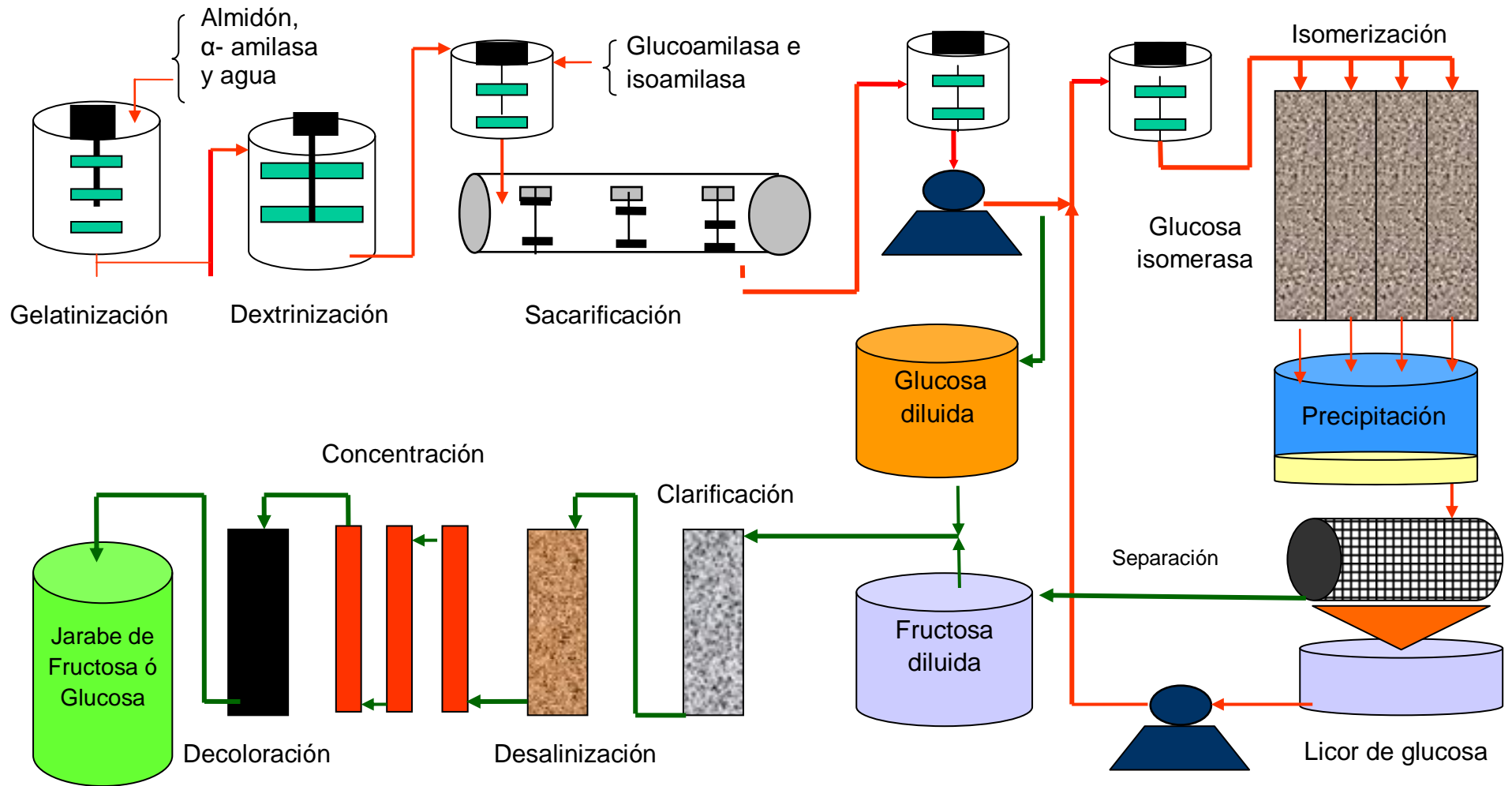


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso para la obtención industrial de jarabes de alto contenido de fructosa, jarabes con alto contenido de glucosa, glucosa y fructosa cristalina (Beynum and Roels, 1987)

1.2 FRUCTANAS

1.2.1 Descripción y clasificación

Las fructanas son polímeros de fructosa que constituyen los principales carbohidratos de reserva en algunas plantas y también son producidas por microorganismos. Otros de los nombres con que se les conoce a estos polímeros son fructanos o fructosanos, puesto que su unidad básica es la fructosa (Badui, 1997) y también se les conoce con el nombre de polifruetosilsacarosas, debido a que son polímeros sintetizados a partir de la molécula de sacarosa (Ritsema y Smeekens, 2003). Las fructanas son compuestos conformados por porciones lineales de moléculas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$, se concentran en raíces, rizomas, tubérculos, inflorescencias y frutos inmaduros de las plantas que las producen, sólo contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula y se encuentra unida a la cadena principal, a través de un enlace glucosídico $\alpha(1-2)$ (Homme *et al.*, 2001). Presentan diferente grado de polimerización (GP), peso molecular (PM), estructura y por lo tanto, diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales. En base a su estructura molecular se clasifican en: fructoligosacáridos (FOS), inulinas, levanas y fructanas mixtas o ramificadas (Carpita *et al.*, 1996).

Las inulinas son polímeros lineales de moléculas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$ y contienen una molécula de glucosa en el extremo reductor de la cadena unida por enlace glucosídico $\alpha(1-2)$ (Figura 4). Se encuentran en algunas plantas monocotiledóneas de las familias Liliaceae, Agavaceae, Amaryllidaceae e Iridaceae, así como también en algunas dicotiledóneas de las familias Compositae, Boraginaceae, Malpighiaceae, Primulaceae, Styracaceae y Violaceae (Carpita *et al.*, 1996). El grado de polimerización de las inulinas llega a ser hasta de 200 unidades de fructosa, aunque generalmente su tamaño oscila entre 30 y 60 unidades de fructosa (Rosa *et al.*, 1986).

Las fructanas del tipo de las levanas (también llamadas fleínas), son producidas por plantas monocotiledóneas y también por bacterias. Su estructura básica consiste en

polímeros lineales de moléculas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2-6)$ (Figura 4). Las levanas de origen bacteriano, son las fructanas de mayor peso molecular (cerca de 2×10^7 dal); alcanzan grados de polimerización superiores a las 100,000 unidades (Carpita *et al.*, 1996).

Dentro de las fructanas ramificadas o mixtas, se encuentran aquellos polímeros representados por cadenas lineales conformadas por residuos de fructosa unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$ y cadenas laterales de residuos de fructosa unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta(2-6)$ (Figura 4). Principalmente son producidas por plantas de la familia de las gramíneas, por ejemplo en los pastos forrajeros. Algunas gramíneas como *Avena sativa* L. y *Lolium sp* L. contienen fructanas de estructuras más complejas como los neo-azúcares combinados con cadenas de fructanas ramificadas (Carpita *et al.*, 1996; Ritsema y Smeekens, 2003).

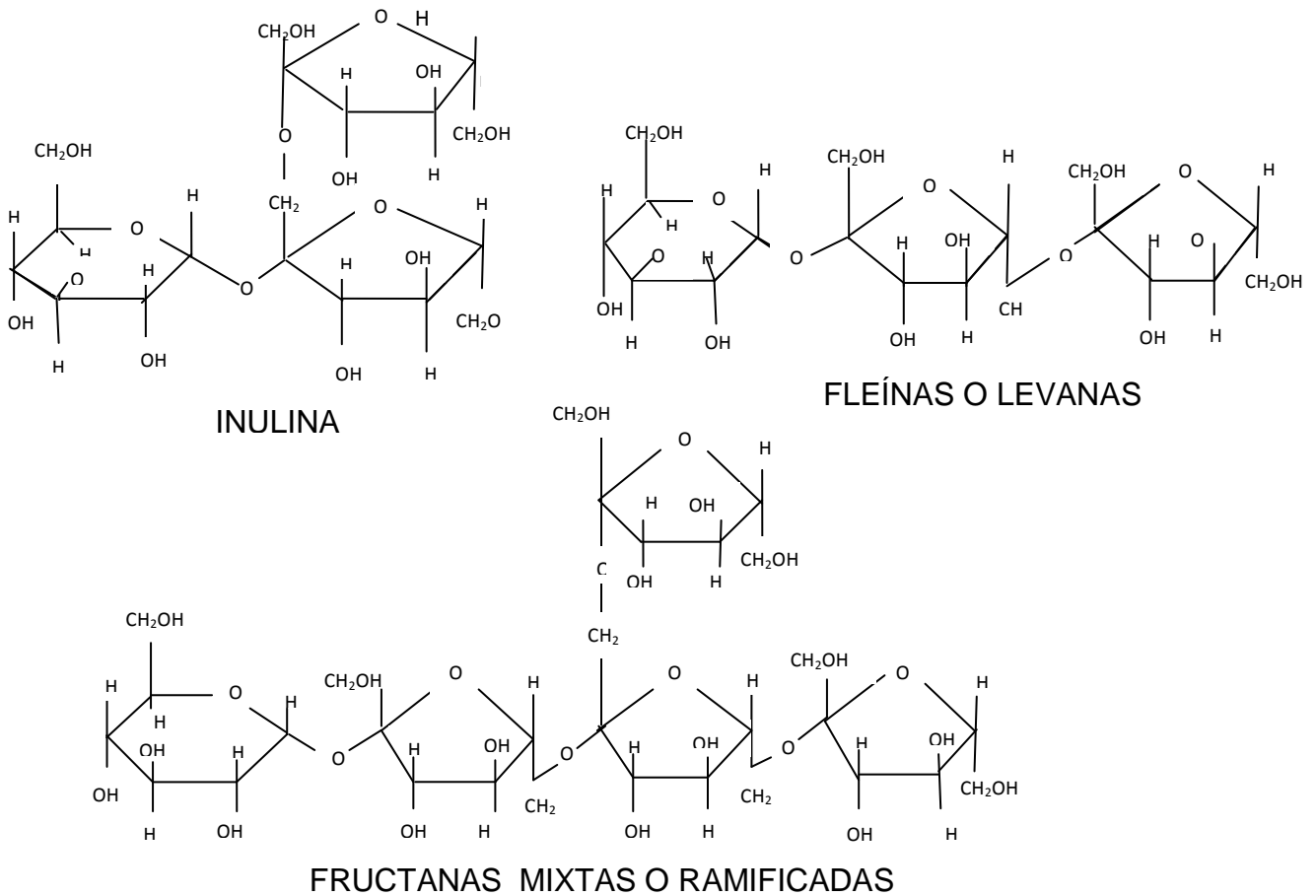


Figura 4. Estructura química de las fructanas (Carpita *et al.*, 1996)

El último tipo de fructanas lo constituyen los fructoligosacáridos (FOS), polímeros de fructosa que derivan de la hidrólisis de los tres grupos de fructanas anteriores; su grado de polimerización no va más allá de 10 unidades de fructosa (Carpita *et al.*, 1996; Ritsema y Smeekens, 2003).

1.2.2 Características físicas y químicas

Las propiedades físicas y químicas de las fructanas dependen de su GP, PM y estructura; son solubles en agua y por lo tanto osmóticamente activas; su solubilidad en agua fría depende de su PM, pues a menor PM su solubilidad se incrementa y viceversa; son muy solubles en agua caliente; son insolubles en alcohol absoluto pero solubles en alcohol diluido; no precipitan con acetato de plomo pero sí con hidróxido de bario y etanol; no son reductoras; son levorrotatorias; no son hidrolizadas por la enzima invertasa, excepto las fructanas de bajo PM (con GP de hasta 7 unidades), resisten la acción de las amilasas pero son muy susceptibles a la hidrólisis ácida; no se tiñen con yodo pero obtienen una coloración púrpura con vapores de HCl, lo que ayuda a diferenciarlas de otros polisacáridos (Pontis y Campillo, 1985, Salminen y Hallikainen, 1990; Carpita *et al.*, 1996; García *et al.*, 2000). Por otro lado, las fructanas de alto GP como las inulinas, son menos dulces y dado que tampoco son digeribles por el organismo humano; se les clasifica como fibra dietaria insoluble (Flamm *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2002; Roberfroid, 2006).

1.2.3 Biodisponibilidad

Dado que nuestro organismo carece de las enzimas digestivas necesarias para la hidrólisis de las fructanas, estos polímeros entran en la definición de fibra dietaria y como consecuencia de su solubilidad en agua: la inulina es considerada como fibra dietaria insoluble (FDI), mientras que los FOS constituyen la fibra dietaria soluble (FDS); es por ello que, cuando ingerimos alimentos ricos en fructanas, estos polímeros viajan a través del sistema digestivo sin sufrir prácticamente alteración

alguna hasta llegar al intestino grueso, donde la microflora presente en el colon (principalmente bifidobacterias) las utiliza como sustrato fermentativo, dando como resultado diversos beneficios (Wang y Gibson, 1993; Spiegel *et al.*, 1994; Flamm *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2002). En su acción como fibra dietaria, las fructanas reducen la absorción de metabolitos tóxicos; disminuyen el estreñimiento por acelerar el tránsito del bolo fecal en el intestino; no alteran el índice glicémico ni las reservas de glucógeno; tienen efectos benéficos en el tratamiento de diabetes; disminuyen la presión arterial en personas hipertensas, reducen la concentración de lipoproteínas de baja densidad y disminuyen la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre; mejoran la absorción de minerales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , PO_4^{3-} , etc. y previene el cáncer de colon (Wang y Gibson, 1993; Flamm *et al.*, 2001).

Como agentes probióticos, las fructanas contribuyen a la salud estimulando el crecimiento de bifidobacterias, cuyos productos de fermentación lo constituyen algunos gases (hidrógeno, metano y dióxido de carbono), aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) causantes de la disminución del pH y la inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos y putrefactivos como *E.coli*, *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella* y *Salmonella* (Roberfroid, 2006; Homme *et al.*, 2001).

Se ha comprobado que tanto las inulinas como los FOS presentan un efecto bifidogénico en dosis de 2.75 g/día y de 1 g/día, respectivamente. Por otro lado, también se ha comprobado que la concentración de bifidobacterias intestinales decrece al disminuir la ingesta de estos compuestos (Homme *et al.*, 2001).

1.2.4 Toxicidad

La extensa información disponible indica que la toxicidad no es un problema en el caso de la inulina y los FOS, pues no aumentan la morbilidad o mortalidad, no son mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos. La única posible intolerancia se ha atribuido a su característica de fermentar, lo que ocasiona malestares gastrointestinales como: flatulencia (la más común), borborismo, hinchazón y

laxación (la más severa), lo que depende de la dosis ingerida, además del régimen diario de ingesta y pueden variar significativamente de una persona a otra (Roberfroid, 2000).

La toxicidad de las fructanas ha sido evaluada a través de estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, tanto en los animales como en el hombre. En el hombre, una sola dosis diaria de 10 g no causa síntomas de malestar intestinal, mientras que una sola dosis diaria de 20 g puede producir síntomas, que se generalizan cuando se ingiere una sola dosis diaria de 30 g o más; además se ha comprobado que los síntomas son menores en personas que habitualmente consumen alimentos ricos en fibras. Por otro lado, si la dosis se fracciona los síntomas se reducen y pueden llegar a desaparecer, aún con una ingesta diaria total de hasta 40 g (Roberfroid, 1993; Hermann, 1998; Flamm *et al.*, 2001).

Por todas estas razones, en prácticamente todo el continente europeo, así como en Estados Unidos de América y Japón, tanto la inulina como los FOS, están oficialmente reconocidos como aditivos seguros para su utilización en la elaboración de alimentos (Smeekens, 1998).

1.2.5 Consumo y aplicaciones

En Japón las fructanas están consideradas como ingredientes alimentarios y se encuentran en más de 500 productos de consumo diario; en Europa el consumo diario per cápita de fructanas en el año 2001 fue de 3 a 11 g, mientras que en los Estados Unidos de América su consumo per cápita fue de 1 a 4 g. Además, el consumo promedio diario de FOS provenientes de fuentes naturales fue de aproximadamente 806 mg/día (Homme *et al.*, 2001).

Debido a su poder edulcorante relativamente bajo (0.4 a 0.6 veces el dulzor de la sacarosa) y a su bajo aporte calórico (1.5 Kcal/g), los FOS se han convertido en importantes ingredientes para la elaboración de alimentos bajos en calorías, así como en la elaboración de alimentos dirigidos a personas con problemas de diabetes

(Homme *et al.*, 2001). Los FOS también presentan una amplia aplicación como fuente de azúcares fermentables en la obtención de metabolitos tales como: etanol, ácido cítrico, sorbitol, ácido glucónico, etc. (Rosa *et al.*, 1986; Kim y Kim, 1992; Ohta *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1996); tanto en Estados Unidos como en Japón, son utilizados como aditivos en la elaboración de alimentos para aves de corral (Hermann, 1998).

La inulina, por su parte tiene una gran importancia para la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales entre las que destacan su poder gelificante y su capacidad de retención de humedad en pastelería, panificación y embutidos; sirve para proporcionar cuerpo y mejorar la textura, lo que la convierte en un ingrediente potencial para reemplazar la grasa en la elaboración de productos “light” tales como quesos, mayonesas y chocolates (Spiegel *et al.*, 1994); como agente emulsionante en la elaboración de margarinas; evita la formación de cristales gruesos en la elaboración de helados (Carpita *et al.*, 1996); incrementa la palatabilidad y reduce las calorías en los alimentos (Smeekens, 1998); no aporta color, sabor, ni olor a los alimentos o productos farmacéuticos en los que se utiliza, esto representa una ventaja para la inulina en comparación a otros ingredientes similares (Tokunaga *et al.*, 1986; Spiegel *et al.*, 1994).

Entre las aplicaciones industriales más sobresalientes de la inulina se encuentran la síntesis de plásticos biodegradables, la producción de jarabes de alta fructosa y fructosa cristalina (Nakamura *et al.*, 1995; Wenling *et al.*, 1999), la producción de FOS de bajo peso molecular y la producción de alimentos para mascotas (Kim *et al.*, 1997).

En medicina conjugados de inulina se usan como acarreadores de drogas directamente en el tracto urinario y se cree que sea un camino alternativo para la actividad antitumoral humana (Roberfroid, 2006). Además, se ha intentado incrementar la longitud promedio de la cadena de la inulina por ingeniería genética para obtener inulina de un tamaño molecular promedio similar al tamaño de la molécula de almidón (Smeekens, 1998).

En química la inulina es utilizada para la obtención de glicerol, hidroximetil furfural, manitol (un valioso edulcorante de bajo aporte calórico), polímeros con actividad antifúngica y antibacteriana, protectores solares, producción de ácido levulínico que es el precursor del herbicida ácido δ -aminolevulínico; producción de α -metiltetrahidrofurano y α -angelicalatona, este último es ampliamente demandado como extensor de gasolina por ser más barato que el etanol. Finalmente la hidrólisis de la inulina por hidrogenación produce manitol no higroscópico ni cariogénico (Fuchs, 1987).

1.2.6 Obtención de jarabes fructosados, inulinas y fructoligosacáridos a partir de fructanas

Las principales etapas en el proceso de obtención de jarabes de alta fructosa a partir de las fructanas contenidas en las plantas son: extracción y concentración de las fructanas, hidrólisis del extracto por vía ácida o enzimática, remoción de impurezas y concentración del jarabe (Fleming y GrootWassink, 1979).

En la hidrólisis ácida se utilizan condiciones muy diversas que dependen del tipo de ácido, la concentración de fructanas y la temperatura del proceso. Bajo condiciones ácidas débiles no es posible hidrolizar los enlaces glucosídicos $\alpha(1,2)$, para ello se requieren condiciones de acidez y temperatura más drásticas (Fleming y GrootWassink 1979; Kim y Rhee 1989; Manzoni y Cavazzoni, 1992). Entre los ácidos más utilizados destacan: clorhídrico, sulfúrico, oxálico, cítrico y fosfórico y también se ha utilizado invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Vandamme y Derycke, 1983) para romper estos enlaces e incrementar la conversión de inulina hasta fructosa libre. Una etapa adicional que requiere este proceso es la neutralización después de la hidrólisis con ácidos minerales, lo que provoca un incremento en la mineralización del jugo de fructanas y es elevado el costo de este proceso (Kim y Rhee, 1989).

En los procesos de hidrólisis enzimática de las fructanas se utilizan inulinasas obtenidas de levaduras (Manzoni y Cavazzoni, 1992; Otha *et al.*, 1993; Selvakumar y Pandey, 1999), bacterias (Park, 1996; Kim *et al.*, 1997; Selvakumar y Pandey, 1999),

hongos (Porna y Kulkarni, 1995; Nakamura *et al.*, 1994) y plantas superiores (Edelman y Jefford 1968; Claessen *et al.*, 1990) que de acuerdo a su modo de acción se clasifican en:

- A. Endo-inulinasa (2,1- β -D fructan fructanohidrolasa EC 3.2.1.7); hidroliza los enlaces internos $\beta(2,1)$ de la molécula de inulina y da como producto final una mezcla de FOS de diferente grado de polimerización (Figura 5). Esta enzima no es capaz de romper el enlace $\alpha(1,2)$ que une la glucosa a la cadena principal de la inulina (Nakamura *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1998).
- B. Exo-inulinasa (β -D-fructan fructanohidrolasa EC 3.2.1.8), hidroliza los enlaces $\beta(2,1)$ de la inulina y separa sucesivamente unidades de fructosa a partir del extremo terminal de la molécula, produce una mezcla de glucosa y fructosa libres, dado que ésta enzima sí hidroliza el enlace glucosídico $\alpha(1,2)$ que une la glucosa a la cadena principal de la inulina (Figura 5).
- C. Invertasa (β -fructofuranosido fructohidrolasa EC 3.2.1.26). Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico $\alpha(1,2)$ presente en la molécula de sacarosa y también hidroliza los enlaces $\beta(2,1)$ presentes en los FOS de bajo peso molecular (Wight y Niekerk, 1983).

En los procesos de obtención de jarabes de alta fructosa y fructosa cristalina, se utilizan las exo-inulinasas solas o en combinación con las endo-inulinasas para la hidrólisis total del polímero; mientras que para la obtención de FOS de bajo peso molecular, sólo se utilizan las endo-inulinasas. Las enzimas pueden utilizarse en solución, inmovilizadas y en forma continua (Bajpai y Margaritis, 1986; Kim y Rhee, 1989; Nakamura *et al.*, 1995); la producción de estos FOS, fructosa y glucosa se ha convertido en un negocio importante con el uso de estas enzimas (Montes y Magaña, 2002).

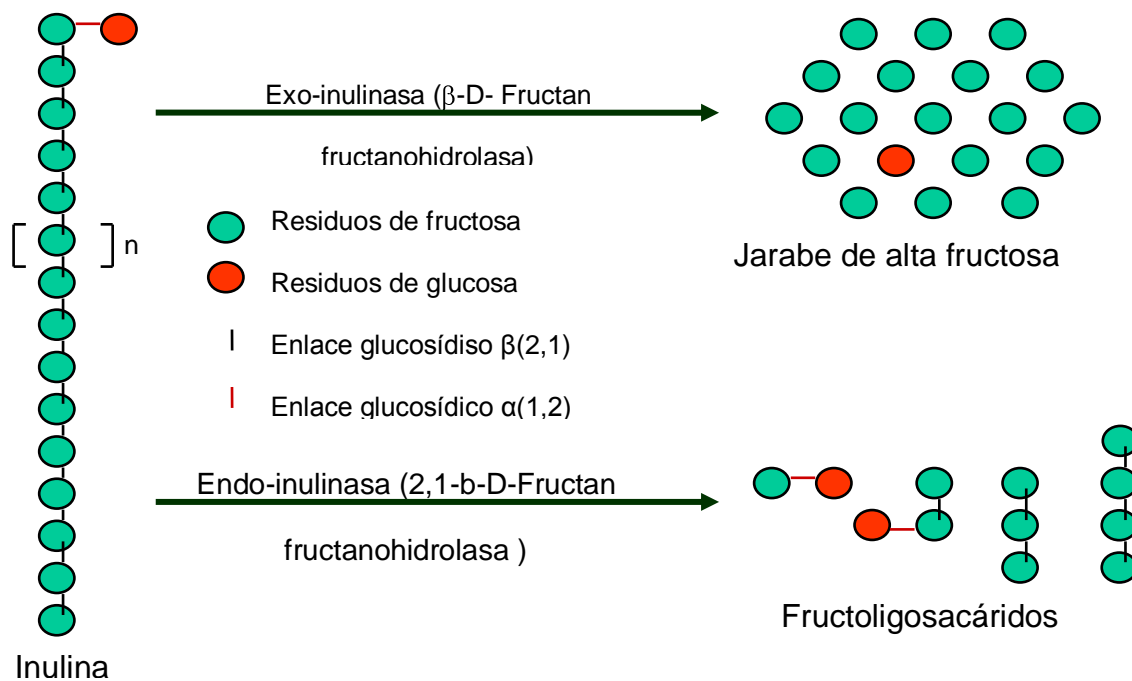


Figura 5. Acción de la exo y endo- inulinasa sobre la inulina (Fuchs, 1987; Guiraud y Galzy, 1981)

Después de comparar los métodos de hidrólisis ácida y enzimática para la obtención de jarabes de alta fructosa; Guiraud y Galzy (1981) mencionan que el método enzimático presenta las siguientes ventajas: se requiere de condiciones de hidrólisis más suaves, menor consumo de energía, mayor especificidad en la hidrólisis, no se generan compuestos coloridos, ni olores, ni sabores indeseables, se tiene un menor contenido de sales en el producto final y por lo tanto, resultan menores costos de purificación, mayor rendimiento y mayor calidad del producto final.

1.2.7 Fuentes potenciales de fructanas

Se ha estimado que una tercera parte de la vegetación total del mundo contiene fructanas, polímeros que también son producidos por el 12 al 15% de las especies de plantas con flores de las familias de las Liliaceas, Poaceas, Asteraceas, Campanulaceas, Polemoniceas, Ericaceas y Dipsacaceas; también se

encuentran en importantes cultivos tales como el trigo, la cebada, la cebolla y la achicoria, además de ser producidas por bacterias y hongos (Carpita *et al.*, 1996; Ritsema y Smeekens, 2003; Wei *et al.*, 2002). La mayoría de las plantas que producen fructanas se encuentran en regiones de estaciones secas o frías (Ritsema y Smeekens, 2003); estos polímeros presentan diferente longitud de cadena, estructura y sus proporciones varían de acuerdo a la especie de la planta y a su estado de maduración, que a su vez dependen de las condiciones agronómicas del cultivo (Rosa *et al.*, 1986).

Entre las principales fuentes potenciales de fructanas para la obtención industrial de jarabes con alto contenido de fructosa, inulina y FOS, destacan los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.), cuyo contenido de fructanas alcanza el 80% en base seca; las raíces de la planta de achicoria (*Cichorium intybus* L.) y los tubérculos de la planta de dalia (*Dahlia variabilis* Willd.) (Smeekens, 1998; Ritsema y Smeekens, 2003). Se han encontrado también importantes cantidades de fructanas en la “cabeza” o “piña” de plantas de la familia de las Agaváceas como el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) (Mancilla y López, 2002; López *et al.*, 2003) y el agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.), entre otras (Peña *et al.*, 2004).

1.3 EL AGAVE MEZCALERO POTOSINO (*Agave salmiana* L.)

1.3.1 Generalidades

El agave mezcalero potosino (*A. salmiana* L.) (Figura 6) forma parte de la familia Agavaceae, es endémico de América y se distribuye desde el sur de Canadá hasta el Caribe pasando por Estados Unidos, México, Centroamérica y norte de Sudamérica; ha sido una de las especies más importantes en la historia del país, debido particularmente al aprovechamiento de su sabia fresca (aguamiel) o fermentada (pulque), lo que motivó su cultivo y dispersión (García, 1992).



Figura 6. Agave mezcalero potosino (*A. salmiana* L.)(Aguirre *et al.*, 2001)

El *A. salmiana* L. es una planta robusta, monocotiledónea, de tamaño mediano a grande, compuesta por hojas o pencas que se insertan en espiral, dándole la forma de una roseta, Posee una raíz fibrosa y revestida de escamas, en general forma rosetas macizas de 1.5 a 2 m de alto e igual o el doble de ancho. Sus hojas son carnosas y macizas; de jóvenes son rectas y ligeramente separadas en su eje central, de adultas se curvan hacia el suelo y adquieren una coloración verde grisácea, son profundamente convexas en la base y cóncavas hacia arriba; presentan una espina terminal pungente de 5 a 8.5 cm de largo y con abundantes espinas laterales, son largas, acanaladas, simples, enteras, más o menos lanceoladas, con el ápice agudo de color verde oscuro. La inflorescencia es una panícula, robusta, de 6 a 8 m de altura, quiole con 15 a 24 pedúnculos o ramas laterales, el escapo floral presenta brácteas carnosas y suculentas. Sus flores son hermafroditas, tienen ovario ínfero, perianto de 6 piezas, androceo de 6 estambres

largos, gineceo constituido por un ovario oblongo y cilíndrico, trilocular, multiovalado, estilo central y con los frutos superpuestos. El fruto es una cápsula oblonga con 6 casillas longitudinales y 3 lóbulos. Las semillas son negras, triangulares, con el embrión recto y el endospermo carnoso. Su periodo de floración ocurre entre los meses de mayo a julio; por otro lado, se estima que el periodo de vida del agave mezcalero potosino es de 16 años a partir de que emerge la plántula de semilla o del hijuelo, hasta su recolección como cabeza de maguey (Aguirre *et al.*, 2001).

1.3.2 Distribución geográfica

El agave mezcalero potosino se puede encontrar en el área central de México, principalmente en los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Morelos, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Figura 7). En Zacatecas y en San Luis Potosí constituye el maguey mezcalero más importante, mientras que en Durango es el segundo o tercero en importancia para la elaboración de mezcal; en los estados de Guerrero y Oaxaca al igual que otras especies de agaves también se utiliza para la elaboración de mezcal, (Aguirre *et al.*, 2001). El *A. salmiana* L. es el principal maguey pulquero del altiplano mexicano; prospera con éxito entre los 1,000 a 2,250 msnm, en climas que van de semiseco a seco y con una precipitación pluvial de 320 a 720 mm anuales; del 90 al 95% incide en verano y el resto en invierno (Gentry, 1982). El régimen térmico puede ser de templado a semicálido extremo y la temperatura promedio anual puede ser de 16 a 22°C, las temperaturas mínimas hasta -12°C pueden dañar las puntas de sus hojas; en primavera y verano tolera temperaturas promedio de 26°C o extremas diarias de hasta 35°C. Pueden crecer en pisos de valles rocosos, laderas de cerro, bajadas o abanicos aluviales, excepto en lugares propensos a inundaciones o con problemas de sales o sodio en el suelo.

El agave mezcalero potosino en altitudes de 2,300 msnm se acompaña con bosque de pinos y encinos con suelos derivados de yeso y carece de limitaciones para establecerse casi en cualquier medio físico o biótico de los climas secos o

semisecos; no obstante la mayor productividad se logra en los suelos derivados de rocas ígneas que comprenden las áreas óptimas para su desarrollo. Actualmente este agave se distribuye en la región de Pinos-Zacatecas, en una área de aproximadamente 60,000 ha (Martínez *et al.*, 2005) y prácticamente en la totalidad del Altiplano Potosino (Aguirre *et al.*, 2001).



Figura 7. Distribución geográfica de los principales agaves en la República Mexicana (Aguirre *et al.*, 2001)

1.3.3 Usos

A lo largo y ancho del territorio mexicano, la utilización que se le da a los agaves es muy variada y depende tanto del lugar y la especie, como de la estación del año. Como su nombre lo indica, el uso principal del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.) es la producción de mezcal que se elabora a partir de los carbohidratos concentrados en la piña de la planta (actividad que constituye la base económica de las localidades donde se explota). Otro uso importante del agave es la producción de aguamiel, a partir de cuya fermentación se elabora el pulque, que además de emplearse como bebida alcohólica, también se utiliza en la elaboración del conocido pan de pulque.

Las hojas o pencas que forman parte de los residuos agrícolas del cultivo, así como todas aquellas piñas que no son captadas por la industria mezcalera, son utilizadas como forraje para la alimentación de animales de corral, principalmente vacas, cabras, ovejas y caballos (Figura 8). Tan solo en el estado de San Luis Potosí, se estima que entre 2 a 8 mil toneladas de agave se utilizan anualmente como forraje (Martínez *et al.*, 2005).

Las pencas se utilizan para obtener la fibra que se utiliza para fabricar cuerdas, telas, redes y bolsas; anteriormente también se empleaban como relleno de colchones y sillones para autos, etc.; el quiote ha sido usado como material de construcción (Gentry, 1982). Por otro lado, en el estado de Puebla se han utilizado los agaves como barreras naturales inmensas alcanzando una altura de 1.8 a 2.1 m y 4.5 a 6 m de ancho, filas de 2 a 3 agaves sirven como rompevientos y barreras contra la arena del desierto (Martínez *et al.*, 2005).



Figura 8. Aprovechamiento integral de las hojas y “piña” de los agaves en la alimentación de ganado vacuno (Aguirre *et al.*, 2001)

1.3.4 El maguey como materia prima para la elaboración de mezcal

A la llegada de los españoles, el pulque representaba la única bebida alcohólica fermentada que se conocía en el país y una vez establecido el proceso de destilación, surgieron bebidas de alto grado alcohólico obtenidas del maguey, a las que originalmente se les llamó “vino de agave” ó “vino de mezcal”, donde la palabra Mezcal proviene del náhuatl Mexcalmetl que significa Agave, posteriormente surgió el tequila a finales del año 1800. Técnicamente hablando podría decirse que el tequila es una forma de mezcal, pero no que el mezcal es una forma de tequila (Aguirre *et al.*, 2001).

Existen diferentes especies de agave y cada uno produce un tipo diferente de mezcal; a diferencia del tequila que se elabora

industrialmente y en cuyo proceso se utilizan los azúcares del *A. tequilana* Weber, el mezcal propiamente dicho se elabora artesanalmente a partir de la destilación del jugo fermentado (100% agave) de varias especies de agaves entre las que destacan: *Agave salmiana* L., *Agave angustifolia* Haw., *Agave patotorum* Zucc., entre otros. Estos agaves, a diferencia del *Agave tequilana* Weber prácticamente no se cultivan y sus cabezas o piñas son recolectadas de las magueyeras silvestres (Figura 9).

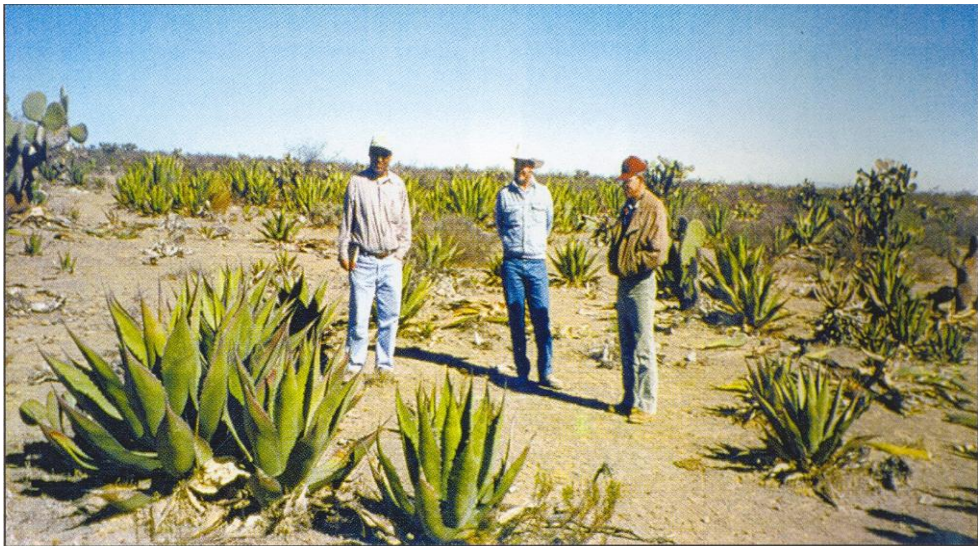


Figura 9. Magueyera típica en explotación en el Altiplano Potosino (Aguirre *et al.*, 2001)

El cuidado y atención que se les brinda a estas magueyeras es escaso y nulo en muchos de los casos, razón por la que su productividad es comparativamente inferior a la del *A. tequilana* Weber, pero gracias a su estructuración, siempre contienen magueyes maduros aprovechables (Aguirre *et al.*, 2001).

El mezcal se produce en varios estados de la República Mexicana como son: San Luis Potosí, Durango, Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Zacatecas y Tamaulipas. Se estima que en el estado de

San luís Potosí aproximadamente 20,200 t anuales de piñas de *A. salmiana* L. se destinan para la producción de mezcal (Baena, 2005).

1.3.5 Panorama económico del agave mezcalero potosino

Las formas actuales de aprovechamiento del *A. salmiana* L. para la elaboración de mezcal y como forraje; son bastante ineficientes y el bajo precio que paga la industria mezcalera por las piñas de esta planta (\$140 por tonelada), resulta poco atractivo para que el ejidatario pueda invertir por cuenta propia en el maguey. Esta situación ha enmascarado la necesidad de mejorar la eficiencia del proceso de producción, la normalización del producto, así como la modernización de su comercialización. Con ello, se ha establecido el círculo vicioso “materia prima a precios bajísimos, desinterés de ejidatarios y propietarios por manejar y fomentar las magueyeras; así como por mejorar los procesos de producción y comercialización de la bebida” (Aguirre *et al.*, 2001).

Otros factores que intervienen en la pérdida de valor agroindustrial del cultivo del *A. salmiana* L. son la producción de productos secundarios tales como: la colección de semillas y especímenes maduros para usos ornamentales, la introducción de diversas bebidas alcohólicas al mercado mexicano y el bajo precio que paga la industria mezcalera por esta materia prima (Aguirre *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2005).

1.4 JUSTIFICACIÓN

El bajo precio que paga la industria mezcalera por las cabezas o piñas del agave mezcalero potosino, ha desmotivado a campesinos ejidatarios y empresarios, ocasionando el cierre de empresas y el abandono de cultivos, con la consecuente migración de los campesinos hacia el extranjero y otras zonas urbanas de México. Es por ello que, considerando la importancia económica y social que tiene el cultivo del *Agave salmiana* L. para el país, es necesario promover la investigación tendiente al mejoramiento y modernización de las tradicionales formas de uso del agave, a fin de ampliar el número de alternativas para su aprovechamiento primario en la elaboración de productos que actualmente son ampliamente demandados principalmente por la industria farmacéutica y de alimentos; de esta manera, el precio del agave no dependerá de los productores del mezcal, quienes fundamentan el éxito de sus negocios en una materia prima cautiva por la que pagan precios irrisorios. La elaboración moderna y competitiva de productos con mayor valor agregado, elaborados a partir del *A. salmiana* L., tendrá que traducirse en precios atractivos que hagan rentable el enriquecimiento, ampliación y manejo eficiente de las magueyeras, convirtiendo de esta forma al agave mezcalero potosino en un importante elemento para el desarrollo rural de México.

1.5 HIPÓTESIS

Las fructanas contenidas en el agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.) pueden ser transformadas por métodos enzimáticos a jarabes con alto contenido de fructosa, inulinas y fructoligosacáridos.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Elaborar jarabes con alto contenido de fructosa, inulinas y fructoligosacáridos a partir de las fructanas contenidas en la “piña” del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana* L.) por métodos enzimáticos.

1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Determinar la composición química porcentual de las bases de las hojas y “piña” del *Agave salmiana* L.
- B. Determinar las condiciones óptimas de extracción de las fructanas presentes en las diferentes fracciones del *Agave salmiana* L.
- C. Caracterizar y cuantificar las fructanas contenidas en las bases de las hojas y en la “piña” del *Agave salmiana* L.
- D. Determinar las condiciones óptimas de precipitación de la inulina presente en las diferentes fracciones del *Agave salmiana* L.
- E. Utilizar un método enzimático para producir fructoligosacáridos a partir de la inulina presente en el *Agave salmiana* L.
- F. Utilizar un método enzimático para producir jarabes con alto contenido de fructosa a partir de las fructanas contenidas en las bases de las hojas y en la “piña” del *Agave salmiana* L.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIA PRIMA

Cinco plantas maduras de agave mezcalero potosino (*A. salmiana* L.) de 10 años de edad, fueron recolectadas de magueyerías localizadas en terrenos del ejido “La Piña”, municipio de Ahualulco, San Luis Potosí.

2.2 REACTIVOS

- Exo-inulinasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.8). Polvo liofilizado con actividad específica de 1100 unidades/mg de sólido, (Megazyme - Irlanda).
- Endo-inulinasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.7). Polvo liofilizado con actividad específica de 230 unidades/mg de sólido, (Megazyme - Irlanda).
- Invertasa grado V de *Saccharomyces cerevisiae* (Sacarasa, EC 3.2.1.26). Polvo liofilizado con actividad específica de 54 unidades/mg de sólido, (Sigma - USA).
- Inulina de tubérculos de dalia (Catálogo I-3754, Sigma - USA).
- D(-) Fructosa (Catálogo F0127, Sigma - USA).
- β -D(+) Glucosa. (Catálogo D-9434, Sigma - USA).
- Kit para determinación de fructosa (Catalogo FA20, Sigma - USA).
- Kit para determinación de glucosa por el método de Trinder (Adaltis – Italia)
- Ácido 3,5 dinitro-salicílico (Catálogo D-0550, Sigma - USA).
- Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

2.3 EQUIPO

- Balanza analítica (Mettler H80, USA)
- Balanza granataria (Brainweigh TM B5000, USA)
- Baño maría (Cole Parmer Instrument CO., USA)
- Centrifuga (Damon/IEC Division, USA)
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer modelo Autosystem
- Equipo de digestión Kjeldahl (Labconco, USA)
- Espectrofotómetro de luz UV-visible (Perkin Elmer, Lambda 2; Alemania)
- Estufa de vacío (Blue M, USA)
- Liofilizadora (Labconco, USA)
- Molino coloidal (IKA, Alemania)
- Molino de martillos (Thomas-Wiley, USA)
- Mufla (Thermolyne 1500 Fumare, USA)
- Potenciómetro (Thermo Orion, USA)
- Refractómetro ABBE (Américan Optical Co., USA)
- Refractómetro manual (de 0-32%, Américan Optical Co., USA)
- Rotavapor (Buchi, Suiza)
- Secador de charolas (Gunt Hamburg, Alemania)
- Tamiz (Montinox, México)

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Métodos generales

- A. Humedad: método 14.003 (AOAC, 1984).
- B. Cenizas: método 14.006 (AOAC, 1984).
- C. Extracto etéreo: método 7.062 (AOAC, 1984).

- D. Nitrógeno total y proteínas: método 42.014 (AOAC, 1984).
- E. Fibra cruda: método de AOAC y AOCS (1958).
- F. Carbohidratos totales: método del fenol- sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).
- G. Azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART): método del ácido 3,5 DNS (Miller, 1959).

2.4.2 Métodos específicos

2.4.2.1 Fibra dietaria

La fibra dietaria se determinó de acuerdo al método descrito por Prosky *et al.* (1985) que consistió en lo siguiente: 1 g de la muestra se incubó inicialmente con la enzima α -amilasa termoestable, a un pH de 6.0 durante 30 min y a 100°C en un baño maría. Posteriormente la muestra se ajustó a pH de 7.5, se colocó en un baño maría a 60°C y se le adicionó una enzima con actividad proteolítica, que se dejó actuar por 30 min. Finalmente, el pH de la muestra se ajustó a 4.5 y se le adicionó la enzima amiloglucosidasa que se dejó actuar por 30 min y a 60°C. Concluida la digestión, la reacción enzimática se detuvo por calentamiento de la muestra a ebullición durante 3 min, la muestra se filtro y el filtrado se utilizó para determinar fibra dietaria soluble (FDS); mientras que el residuo se usó para determinar fibra dietaria insoluble (FDI).

Para cuantificar la FDI, el residuo obtenido anteriormente se lavó con etanol y acetona, se sometió a un proceso de secado en estufa a 80°C, hasta peso constante. El peso de este residuo correspondió al contenido de FDI en la muestra.

El contenido de FDS en la muestra se cuantificó de la siguiente forma: el etanol y la acetona resultantes de los lavados del residuo en la determinación de FDI, se agregaron al filtrado resultante de la filtración inicial. A estos filtrados se les adicionó cuatro volúmenes de etanol al 95% para precipitar la FDS, se dejó en reposo durante 30 min y se filtró a través de papel filtro. El filtrado resultante se lavó con etanol y acetona, finalmente fue secado en estufa a 80°C hasta peso constante. El peso de este precipitado correspondió al contenido de fibra dietaria soluble en la muestra.

Finalmente el contenido de fibra dietaria total (FDT) en la muestra se obtiene como la sumatoria de la FDS con la FDI.

2.4.2.2 Perfil de ácidos grasos

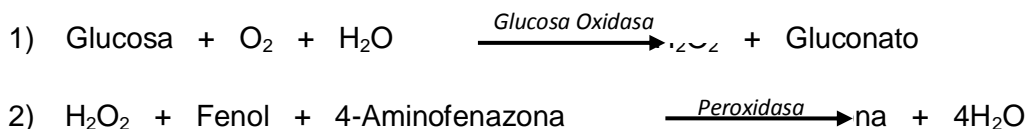
El fundamento del uso de la técnica de cromatografía de gases es el siguiente: la muestra por analizar se introdujo en el inyector del aparato en donde se calentó hasta alcanzar su fase de vapor y de esta forma, se transportó por un gas (fase móvil) a través de una columna empacada con la fase estacionaria, ésta retarda selectivamente los componentes de la muestra de acuerdo a sus coeficientes de partición entre ambas fases, formando bandas separadas en la fase móvil que llegaron al detector del aparato en tiempos diferenciados. El detector recibió la señal y la codificó en una señal eléctrica que posteriormente se amplificó y registró como un pico cuya altura se dio en milivolts, mientras que al tiempo que tarda en salir el pico desde el momento de la inyección de la muestra se le conoce como tiempo de retención. Este registro recibe el nombre de cromatograma (McNair y Esquivel, 1980).

Para determinar la composición y cuantificar los ácidos grasos que integraron el extracto oleoso de la harina de la piña del *A. salmiana* L., primero se obtuvo el extracto oleoso de la harina que posteriormente fue sometido a un proceso de metilación para formar así los metil-ésteres de los ácidos grasos correspondientes (Metcalf *et al.*, 1966) y se inyectó al cromatógrafo equipado con detector de ionización de flama e integrador.

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del detector 250°C, temperatura del inyector 220°C, temperatura de la columna 150°C (2 min) seguido de una rampa de temperatura de 5°Cmin⁻¹, hasta llegar a 220°C (8 min) y una segunda rampa de 8°Cmin⁻¹, hasta llegar a 230°C y se mantuvo por 12 min. Se utilizaron estándares de ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico) para su identificación que se realizó por porcentaje de área, de acuerdo al tiempo de retención y la cuantificación de los mismos.

2.4.2.3 Determinación de glucosa

El contenido de glucosa en las muestras fue determinado de acuerdo al método enzimático colorimétrico específico propuesto por Trinder (1969), el fundamento del método se baso en lo siguiente: la glucosa es oxidada a gluconato por la enzima glucosa oxidasa en presencia de oxígeno y agua, así se produce peróxido de hidrógeno que en presencia de fenol y 4-aminofenazona, es transformado en una quinona de color rosa por la enzima peroxidasa. La intensidad de color fue leído en un espectrofotómetro y la cantidad de quinona producida fue proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Las reacciones que se llevan a cabo en esta determinación son las siguientes:



El procedimiento para llevar a cabo esta determinación se describe a continuación: 2 mL del reactivo específico (enzimas más 4-aminofenazona) más 20 µL de muestra por analizar fueron adicionados en tubos de ensaye de 10 mL. Los tubos se colocaron en un baño maría a 37°C durante 10 min, a fin de que la reacción se llevara a cabo. Al término de la incubación, el color desarrollado fue leído en el espectrofotómetro a 505 nm, previamente ajustado a cero con un blanco de reactivos. Por comparación de la absorbancia de la muestra problema contra la absorbancia del estándar de glucosa, se obtuvo la concentración de la muestra problema, sin olvidar que la concentración del estándar es de 100 mgL⁻¹. Este método es lineal hasta concentraciones de 500 mgL⁻¹ de glucosa y la coloración es estable por 30 min a temperatura ambiente.

2.4.2.4 Determinación de fructosa y glucosa directa

El total de glucosa y fructosa que se encontraban en estado libre se cuantificaron como azúcares reductores directos (ARD) por el método de Miller (1959), Posteriormente la glucosa se determinó por el método de Trinder (1969) y asumiendo que estos ARD en las muestras están constituidos por glucosa y fructosa, la fructosa se determino indirectamente como la diferencia entre los ARD y la glucosa.

$$3) \text{ARD}_L = \text{G}_L + \text{F}_L$$

$$4) \text{F}_L = \text{ARD}_L - \text{G}_L$$

Donde: el subíndice (_L) indica las especies en estado “libre”.

2.4.2.5 Determinación del contenido de fructoligosacáridos

Para cuantificar los FOS en una muestra, fue necesario hidrolizarlos previamente para cuantificarlos como azúcares reductores y estimar también la cantidad de glucosa y fructosa que los integran; partir de estos datos, se determinó el grado promedio de polimerización (GPP) y el peso molecular promedio (PMP) de estos compuestos. La hidrólisis de los FOS se llevó a cabo con la invertasa de *S. cerevisiae* (Wight y Niekerk, 1983).

Procedimiento: Inicialmente se extrajeron las fructanas presentes en las diferentes fracciones de la planta; para ello, 1 g de harina se llevó a 100 mL con agua destilada y se incubó en baño maría a 70°C durante 30 min y agitación constante. Después de la extracción la mezcla se filtró y el extracto obtenido se llevó a un volumen final de 100 mL. Posteriormente, los FOS presentes en los extractos se hidrolizaron con invertasa de *S. cerevisiae* para lo que, en una serie de tubos de ensaye se colocaron 10 mL de extracto y se adicionaron 10 mg de la enzima en polvo. Los tubos se incubaron a 55°C con agitación constante y a diferentes tiempos de reacción; al cabo de estos, los tubos se colocaron en un baño maría a ebullición por 3 min, después de enfriarlos a chorro de agua, la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 mL. En el extracto hidrolizado se determinaron los azúcares reductores directos (ARD_i) por el método de Miller (1959); la glucosa (G_i) por el método de Trinder (1969) y la fructosa (F_i) como la diferencia entre ambos ($F_i = ARD_i - G_i$). El subíndice (i) indica las cantidades de azúcares reductores presentes después de la hidrólisis con invertasa.

Cuando el contenido de ARD_I en el hidrolizado se mantuvo constante, en ese momento concluyó la hidrólisis de los FOS. Para determinar el contenido de FOS en las muestras así como la cantidad de glucosa y fructosa que integran dichos polímeros, se aplicaron las siguientes consideraciones (Martínez, 1999):

$$5) \quad ARD_I = F_I + G_I$$

$$9) \quad F_I = ARD_I - G_I$$

$$6) \quad ARD_I = ARD_L + ARD_{FOS}$$

$$10) \quad G_{FOS} = G_I - G_L$$

$$7) \quad ARD_{FOS} = ARD_I - ARD_L$$

$$11) \quad F_{FOS} = F_I - F_L$$

$$8) \quad G_I = G_L + G_{FOS}$$

Donde:

ARD_{FOS} = Azúcares reductores directos correspondientes a los FOS de la muestra.

ARD_L = Azúcares reductores directos o libres contenidos en la muestra.

ARD_I = Azúcares reductores directos presentes en la muestra después de la hidrólisis con invertasa.

G_{FOS} y F_{FOS} = Contenido de glucosa y fructosa que integran los FOS.

G_L y F_L = Contenido de glucosa y fructosa presentes inicialmente en estado libre.

G_I y F_I = Contenido de glucosa y fructosa en la muestra, después de su hidrólisis con invertasa.

2.4.2.5.1 Grado de polimerización promedio de los fructoligosacáridos

Asumiendo que los FOS son polímeros de fructosa que sólo contienen una molécula de glucosa en el extremo terminal de la molécula, después de la hidrólisis con invertasa de *S. cerevisiae*, del extracto de fructanas y una vez cuantificada la cantidad de glucosa y fructosa que integran estos polímeros, el grado de polimerización promedio de los FOS (GPP_{FOS}) se obtuvo aplicando el siguiente razonamiento (Livingston III, 1989):

$$12) GPP_{FOS} = (F_{FOS} + G_{FOS})/G_{FOS}$$

2.4.2.5.2 Peso molecular promedio de los fructoligosacáridos

Una vez conocido el GPP de los FOS y partiendo del hecho de que el peso molecular de cada uno de los residuos de glucosa ó fructosa que integran el polímero es de 162, el peso molecular promedio (PMP_{FOS}) de estos polímeros se determinó mediante la siguiente expresión (Livingston III, 1989):

$$13) PMP_{FOS} = GPP_{FOS} \times 162$$

2.4.2.6 Determinación de inulina

El contenido de inulina, así como la fructosa y glucosa que integran estos polímeros, fueron determinados de acuerdo al procedimiento descrito por Méndez (1999) y que consistió en lo siguiente: una vez extraídos los carbohidratos presentes en las diferentes fracciones del agave, se tomaron 10 mL de extracto y se mezclaron con 10 mL

de HCl 2N. La mezcla de reacción se colocó en un baño maría a 70°C durante 30 min y con agitación constante, concluido el tiempo de hidrólisis, la mezcla se enfrió a chorro de agua, se neutralizó con NaOH 2N y se llevó a un volumen final de 100 mL. En los extractos ya hidrolizados se determinaron: ART por el método de Miller (1959), glucosa total (G_T) por el método de Trinder (1969) y fructosa total (F_T) por diferencia ($F_T = ART - G_T$). Finalmente, para calcular la inulina presente en los extractos, así como la glucosa y fructosa que integran estos polímeros, se aplicaron las siguientes consideraciones (Martínez, 1999):

$$14) \text{ ART} = \text{ARD}_L + \text{ARD}_{\text{FOS}} + \text{ARD}_{\text{INU}} \qquad 17) \text{ G}_{\text{INU}} = \text{G}_T - (\text{G}_L + \text{G}_{\text{FOS}})$$

$$15) \text{ ARD}_{\text{INU}} = \text{ART} - (\text{ARD}_L + \text{ARD}_{\text{FOS}}) \qquad 18) \text{ F}_{\text{INU}} = \text{ARD}_{\text{INU}} - \text{G}_{\text{INU}}$$

$$16) \text{ G}_T = \text{G}_L + \text{G}_{\text{FOS}} + \text{G}_{\text{INU}}$$

Donde:

ART = Contenido de azúcares reductores totales después de la hidrólisis ácida.

ARD_L = Contenido inicial de azúcares reductores directos en estado libre.

ARD_{FOS} = Azúcares reductores directos correspondientes a los FOS en la muestra.

ARD_{INU} = Azúcares reductores directos correspondientes al contenido de inulina.

G_T y F_T = Cantidad total de glucosa y fructosa presentes en la muestra.

G_L y F_L = Cantidad de glucosa y fructosa presentes en la muestra en estado libre.

G_{FOS} y F_{FOS} = Cantidad de glucosa y fructosa que integran los FOS.

G_{INU} y F_{INU} = Cantidad de glucosa y fructosa que integran la inulina.

De acuerdo con lo anterior, se puede decir que:

$$19) \text{ ART} = \text{ARD} + \text{FOS} + \text{INULINAS}$$

2.4.2.6.1 Grado de polimerización promedio de las inulinas

Una vez calculadas las cantidades de glucosa (G_{INU}) y fructosa (F_{INU}) que integran las inulinas y asumiendo que estos polímeros de fructosa sólo contienen una molécula de glucosa en el extremo terminal de la molécula, su grado de polimerización promedio (GPP_{INU}) se obtuvo aplicando el siguiente razonamiento (Livingston III, 1989):

$$20) \text{ GPP}_{INU} = (F_{INU} + G_{INU})/G_{INU}$$

2.4.2.6.2 Peso molecular promedio de las inulinas

Una vez conocido el GPP de las inulinas y partiendo del hecho de que el peso molecular de cada uno de los residuos de glucosa o fructosa que integran el polímero es de 162, el peso molecular promedio de las inulinas (PMP_{INU}) se determinó de la siguiente forma (Livingston III, 1989):

$$21) \text{ PMP}_{INU} = \text{GPP}_{INU} \times 162$$

2.4.2.7 Determinación de sólidos solubles (°Brix)

El porcentaje de sólidos solubles (°Brix) en los extractos y jarabes fue determinado por medio de un refractómetro manual y ajustado previamente a 0°Brix con agua destilada y atemperada a 25°C. Posteriormente en la cámara del refractómetro se coloca una gota de la muestra problema previamente atemperada a 25°C y se realizó la lectura en la escala del refractómetro que está dada en porcentaje (p/p) de sólidos solubles; es decir, gramos de sólidos en 100 g de muestra.

2.4.2.8 Análisis estadístico de los resultados

Dado que todas las determinaciones se realizaron por triplicado, los datos reportados corresponden a la media aritmética y también a su desviación estándar. Se realizó un análisis de ANOVA de un factor y se identificaron las diferencias significativas en los valores promedio mediante la prueba de Tukey, con un factor de confianza del 95% ($p < 0.05$) (SAS, 1996).

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

3.1.1. Acondicionamiento de la materia prima

Se obtuvieron las hojas y “la piña” de cinco plantas de agave mezcalero potosino de 10 años de edad; las hojas fueron cortadas por su mitad longitudinal, desechando la mitad correspondiente a las puntas. Enseguida las bases de las hojas se cortaron longitudinalmente en tiras de 1 cm de ancho, mientras que la piña se cortó en rodajas de 1cm de espesor aproximadamente, se determinó el peso de cada una de estas fracciones para estimar su proporción en el peso total de la planta. Posteriormente estos materiales fueron deshidratados en un secador de charolas a 60°C y una vez concluido el proceso de secado, se determinó nuevamente el peso de cada fracción y se estimó el contenido de humedad en las mismas. Las fracciones ya deshidratadas fueron molidas inicialmente en un molino de martillos y después en un molino coloidal, el material obtenido fue tamizado a través de una malla N°60 (250 micras de tamaño de abertura) y las harinas se envasaron en frascos de PVC con tapa hermética, se identificaron y almacenaron en un lugar fresco y seco para su posterior utilización (Figura 10).

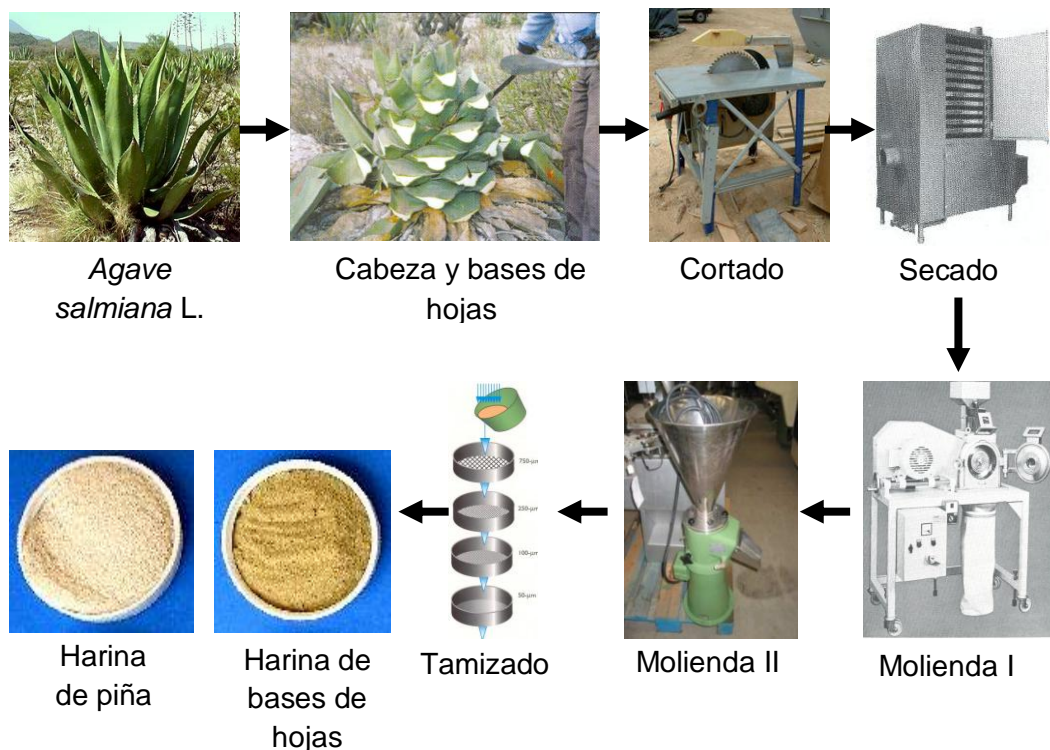


Figura 10. Diagrama de flujo del acondicionamiento de la materia prima

3.1.2 Análisis químico porcentual del *Agave salmiana* L.

Inicialmente se determinó la proporción que guardan las diferentes fracciones (bases de hojas y piña) en el peso total de la planta, aplicando la metodología descrita anteriormente y enseguida se realizó el análisis químico proximal tanto de las bases de las hojas como de “la piña” del *A. salmiana* L; en dicho análisis se incluyó la determinación del contenido de humedad, cenizas, proteína, grasas, fibra cruda y carbohidratos totales; así como el contenido de FDS, FDI y FDT en dichas fracciones. Se realizaron tres determinaciones de cada parámetro evaluado de ambas fracciones de la planta.

3.1.3 Perfil de ácidos grasos

La determinación de la composición y cuantificación de los ácidos grasos que integran el extracto oleoso de la harina procedente de la piña del *A. salmiana* L. se llevó a cabo mediante la técnica conocida como cromatografía de gases, cuyo procedimiento se describe en la parte de metodología correspondiente, para ello se utilizaron estándares de ácidos grasos para su identificación de acuerdo al tiempo de retención y la cuantificación de los mismos se realizó por porcentaje de área.

3.2 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FRUCTANAS

3.2.1 Extracción de las fructanas

La extracción de las fructanas contenidas en las diferentes fracciones del agave se basó en su solubilidad en agua caliente; para ello, inicialmente la maceración de las harinas obtenidas se llevó a cabo ensayando tres diferentes relaciones sólidos-agua que fueron: 1:3, 1:6 y 1:9. Posteriormente, una vez conocida la relación sólidos-agua adecuada para el manejo de las muestras, se realizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 2^2 , donde se ensayaron diferentes tiempos (0, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 100 min) y temperaturas (60, 70 y 80°C) de maceración en el proceso de extracción de las fructanas, los polímeros extraídos se cuantificaron como ART (interpolando concentración en Figura 11).

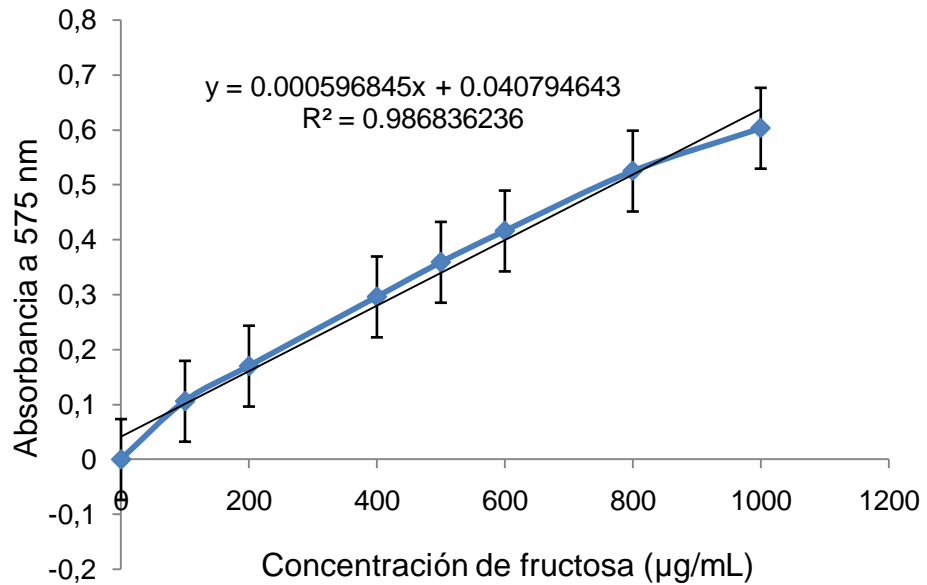


Figura 11. Curva tipo de fructosa para la determinación de azúcares reductores totales y directos (ART y ARD)

Bajo el esquema anterior, se determinó la temperatura y el tiempo de maceración óptima, así como los ciclos necesarios de centrifugación para extraer la mayor cantidad de fructanas contenidas en la harina de “la piña” del agave mezcalero potosino (Figura 12).

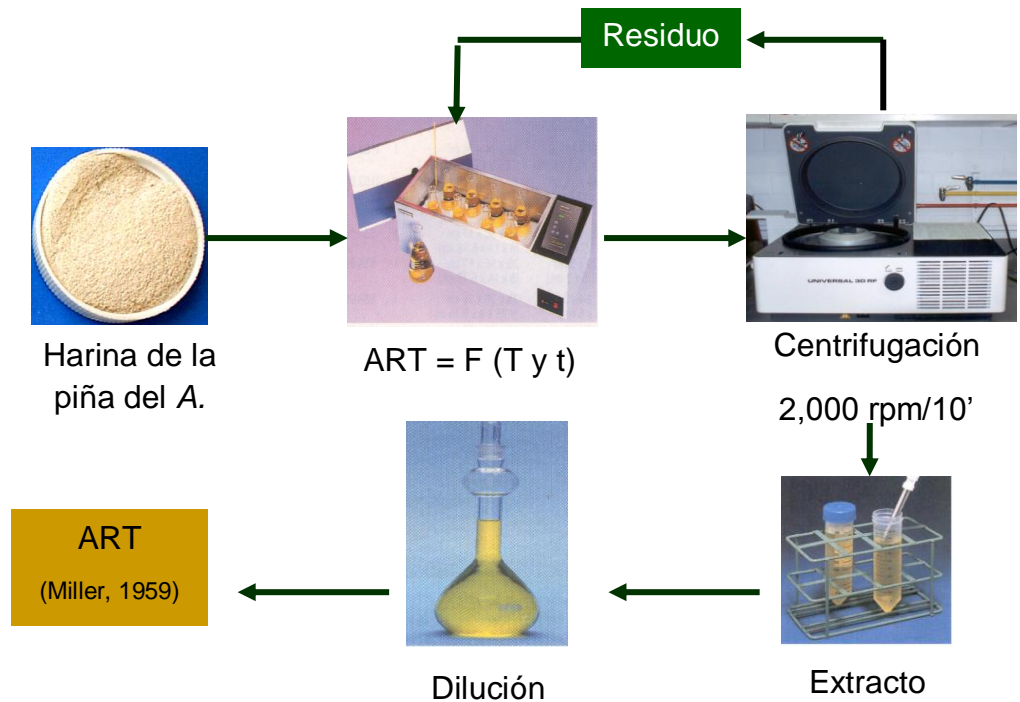


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de extracción de las fructanas contenidas en “la piña” del *A. salmiana* L.

3.2.2 Caracterización de las fructanas

La caracterización de las fructanas contenidas en las bases de las hojas y en “la piña” del agave se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Wight y Niekerk, (1983) y consistió en tres etapas (Figura 13).

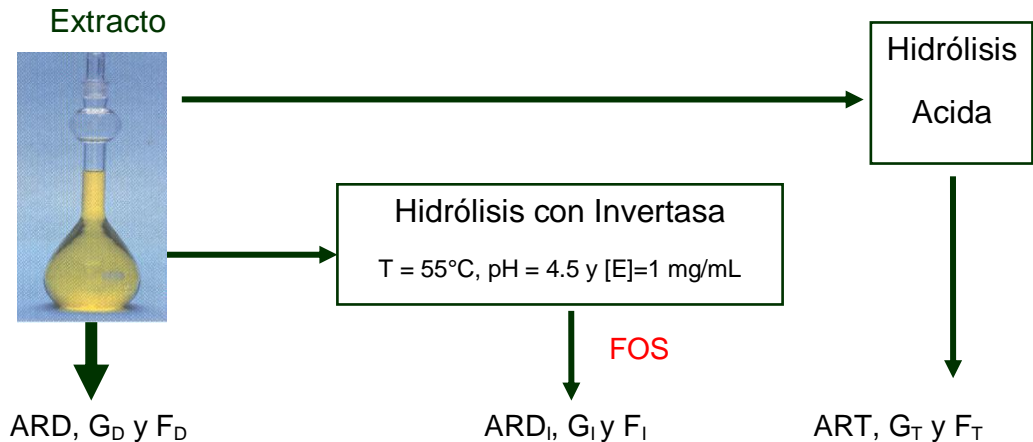


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de caracterización de las fructanas

En la primera etapa se determinaron los ARD, además de la glucosa (G_D) y la fructosa (F_D) que se encuentran como azúcares libres. La segunda etapa consistió en hidrolizar previamente los extractos de las diferentes fracciones del agave con la invertasa de *S. cerevisiae* y posteriormente se determinaron los azúcares reductores directos (ARD_I), así como la glucosa (G_I) y la fructosa (F_I) presentes en los extractos. Con esta información y aplicando los algoritmos del Cuadro 2, se cuantificaron y caracterizaron los FOS presentes en los diferentes extractos. En una tercera etapa, los extractos se sometieron a una hidrólisis ácida (HCl, 2N, 30 min a 70°C) y al término de la misma, se cuantificaron los ART, así como la cantidad de glucosa total (G_T) y fructosa total (F_T) contenidas en los mismos. Nuevamente, con esta información y aplicando los algoritmos del Cuadro 2, se caracterizaron y cuantificaron las inulinas contenidas en los extractos de las diferentes fracciones del agave en estudio.

Cuadro 2. Algoritmos utilizados para la caracterización de las fructanas

Carbohidratos	Fructosa	Glucosa	GPP	PMP
Monosacáridos	F_D	G_D	1	180
Fructoligosacáridos	$F_O = F_I - F_D$	$G_O = G_I - G_D$	$(F_O + G_O) / G_O$	$GPP \times 162$
Inulinas	$F_I = F_T - F_I$	$G_I = G_T - G_I$	$(F_I + G_I) / G_I$	$GPP \times 162$

Donde: F_D y G_D = fructosa y glucosa libres en el extracto, F_I y G_I = fructosa y glucosa presentes en el extracto después de hidrolizarlo con invertasa, F_O y G_O = fructosa y glucosa que integran los FOS, F_T y G_T = fructosa y glucosa presentes en el extracto después de hidrolizarlo con ácido; F_i y G_i = fructosa y glucosa que integran las inulinas; GPP = grado de polimerización promedio y PMP = peso molecular promedio.

3.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINA

3.3.1 Determinación de las condiciones de precipitación de la inulina

La inulina se obtuvo aplicando el diagrama de flujo mostrado en la figura 14, para ello primero se llevó a cabo la extracción de las

fructanas contenidas en “la piña” del agave, bajo las condiciones de extracción previamente determinadas; después el extracto se concentró a 20°Brix en un evaporador rotatorio a 60°C y una presión de 40 cm Hg La separación de la inulina a partir del extracto se basó en la insolubilidad de ésta en presencia de etanol: a partir de los extractos con 20% de sólidos totales, se ensayó la precipitación de inulina a diferentes proporciones (40, 53, 60, 80 y 90%) de extracto–etanol absoluto, para encontrar de esta forma la concentración de etanol a la que se obtiene la mayor cantidad de inulina. Una vez hechas las mezclas extracto–etanol absoluto, estas se mantuvieron en reposo por 10 min al cabo de los que fueron centrifugadas a 2,000 rpm durante 15 min, los precipitados obtenidos fueron liofilizados y pulverizados en un micromolino. En cada caso se determinó el peso de la inulina obtenida y con ello el porcentaje de extracción; finalmente las muestras se envasaron en frascos color ámbar y almacenaron a 4°C para su posterior caracterización.

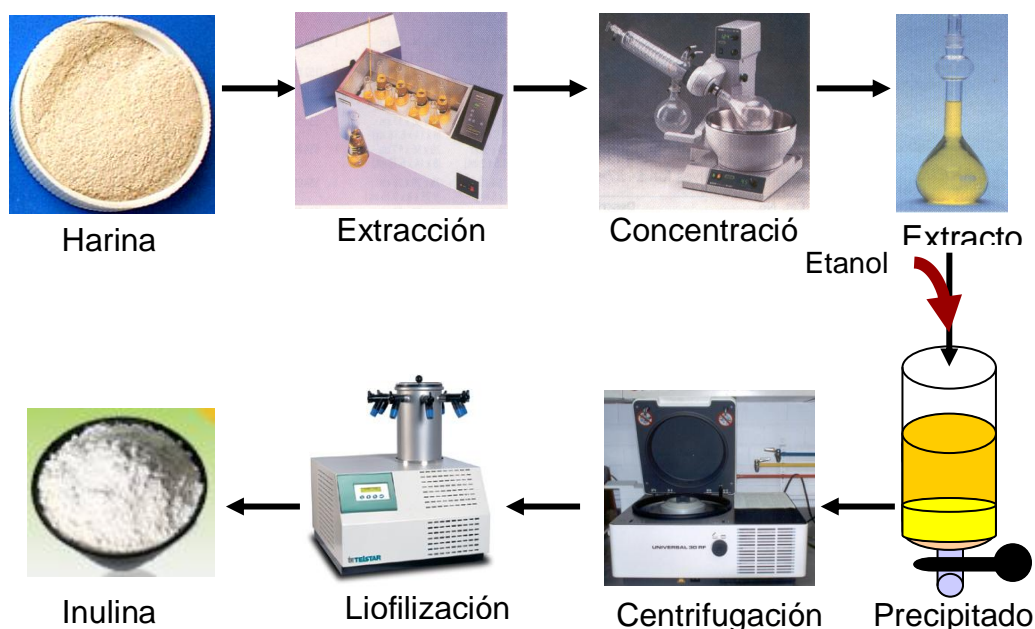


Figura 14. Diagrama de flujo para la obtención de inulina a partir de las fructanas de “la piña” del *A. salmiana L.*

3.3.2 Caracterización química de la inulina

Después de obtener las inulinas de “la piña” del *A. salmiana* L. y de las bases de las hojas, se procedió a la caracterización química de las mismas. Se determinó su contenido de humedad y cenizas, su contenido de ARD y de ART, su contenido de glucosa y el contenido de fructosa, que se evaluó como la diferencia entre ARD – G ó ART – G; también se determinó la relación F/G, GPP y PMP de las inulinas. Paralelamente y a modo de comparación se hicieron las mismas determinaciones con inulina comercial grado reactivo obtenida de las raíces de achicoria (*C. intybus* L.); las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTOLIGOSACÁRIDOS

La materia prima para la obtención de FOS fue la inulina procedente de la piña y de las bases de las hojas del *A. salmiana* L. y el procedimiento utilizado para la obtención de dichos fructoligosacáridos se muestra en la Figura 15. Una vez obtenida la inulina contenida en “la piña” del agave mezcalero potosino, se procedió a su hidrólisis parcial con endo-inulinasa de *A. niger*; para lo que, en un matraz erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 100 mL de una solución de inulina al 5% preparada con un buffer de acetatos 0.02M y pH de 4.5, empleado como disolvente. El matraz se colocó en un baño maría a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una vez que la solución de inulina alcanzó la temperatura deseada, se agregaron 200 U de actividad de la enzima endo-inulinasa y la mezcla se mantuvo con agitación constante durante 24 h.

Cada 30 min se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción para cuantificar los ARD que son liberados como resultado de la actividad de la enzima sobre la molécula inulina, a fin de determinar el tiempo mínimo requerido para que la reacción se llevara a cabo. El tiempo mínimo requerido representa el tiempo al que se logró el máximo grado de hidrólisis y corresponde al momento en que ya no se incrementó el contenido de azúcares reductores directos (ARD) en la mezcla de reacción. Bajo las condiciones de hidrólisis previamente determinadas, se obtuvieron FOS a partir de inulina procedente de ambas fracciones del agave y una vez hidrolizadas las muestras, éstas fueron centrifugadas a 2,000 rpm durante 10 min, después fueron concentradas (50 °Brix) en la estufa eléctrica a 60 °C para evitar reacciones de deterioro de los FOS; posteriormente se liofilizaron estos polímeros a fin de alargar su vida de anaquel y obtenerlos en forma de un polvo fino que fue envasado en recipiente color ámbar, cerrado herméticamente y almacenado en un lugar seco y fresco para su posterior caracterización química.

Dentro de la caracterización química de los FOS obtenidos se incluyó la determinación de su contenido de humedad y cenizas mediante los métodos gravimétricos correspondientes (AOAC, 1984); también se determinó su contenido de ARD y de ART, así como su contenido de glucosa (G) y su contenido de fructosa (F) obtenido por diferencia; posteriormente con estos datos, se determinó el grado de polimerización promedio (GPP) y el peso molecular promedio (PMP) de los FOS obtenidos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados muestran el valor promedio \pm la desviación estándar de la serie. Bajo las condiciones de hidrólisis previamente determinadas, se procedió a obtener una cantidad mayor de FOS con objeto de contar

con el material suficiente para llevar a cabo su caracterización química.

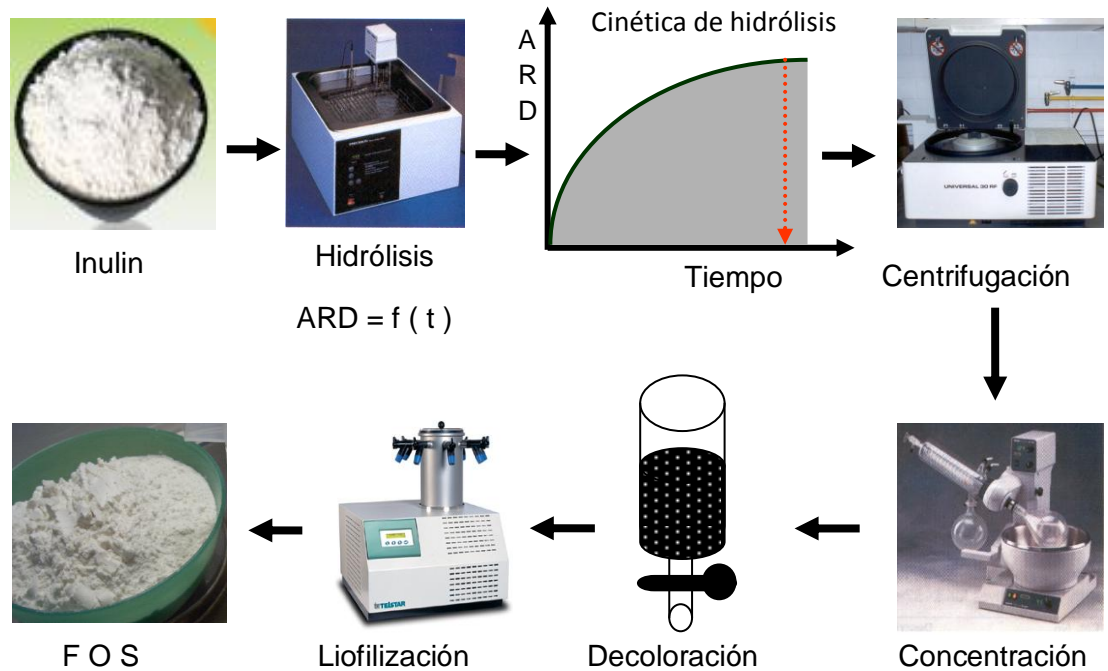


Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de obtención de fructoligosacáridos por hidrólisis enzimática de inulina

3.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS JARABES

3.5.1 Determinación de las condiciones de hidrólisis

Después de haber extraído las fructanas presentes en las bases de las hojas y en “la piña” del agave mezcalero potosino (*A. salmiana* L.), dichos extractos fueron concentrados en un evaporador rotatorio (60°C, 15 pulg Hg) a 20% de sólidos, que se determinaron como

ART. Posteriormente el pH de los extractos se ajustó a 4.5 con NaOH 2N, dado que a este pH tanto la exo- como la endo-inulinasa de *A. niger* presentan su máxima actividad. Concluido el acondicionamiento de los extractos, 10 mL de cada uno se colocaron en tubos de ensaye con taparrosca y en un baño maría a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con agitación constante.

De acuerdo a la actividad de las enzimas utilizadas y con objeto de llegar a la hidrólisis total de las fructanas contenidas en los extractos en un tiempo, en cada tubo de ensaye se adicionó la enzima (22 U mL^{-1} de extracto). Cada 30 minutos se tomaron muestras para determinar el contenido de ARD y de esta forma, estimar el tiempo mínimo requerido para llegar a una hidrólisis total de las fructanas contenidas en los extractos, lo que correspondió al momento en que la muestra hidrolizada contenía un 20% de ARD (Figura 16). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los extractos obtenidos a partir de las diferentes fracciones del agave y los resultados emitidos representan el promedio más la desviación estándar de la serie.

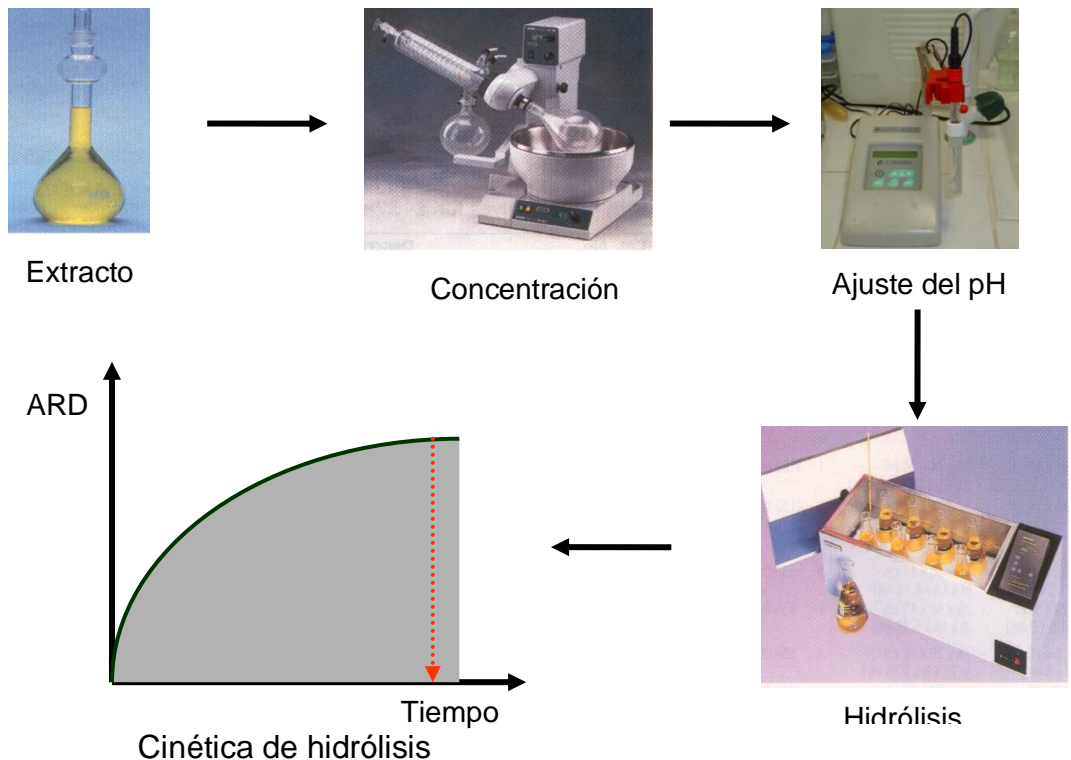


Figura 16. Determinación de las condiciones de hidrólisis enzimática de las fructanas para la obtención de jarabes con alto contenido de fructosa

3.5.2 Elaboración de jarabes de alta fructosa

Bajo las condiciones de hidrólisis ya mencionadas, se obtuvo una mayor cantidad de extracto hidrolizado a partir de 200 g de harinas de ambas fracciones del agave; estos extractos se sometieron a la hidrólisis enzimática con una mezcla de ambas inulinasas y concluida esta etapa, los hidrolizados fueron clarificados, haciéndolos pasar a través de una columna de carbón activado, después se concentraron a 70 °Brix en un evaporador rotatorio a 60°C y 40 cm Hg, los jarabes se decoloraron nuevamente con carbón activado y se ajustó el pH a 4.5 con NaOH 2N, a fin de evitar su oscurecimiento e incrementar su estabilidad y conservación. Finalmente los jarabes fueron analizados y se

comparó su composición química con un jarabe comercial de alta fructosa (Frudex 55) que se obtuvo por hidrólisis enzimática del almidón de maíz. En el siguiente diagrama (Figura 17) se muestran las principales etapas del proceso de obtención de jarabes de alta fructosa a partir de las fructanas contenidas en las diferentes fracciones del agave.

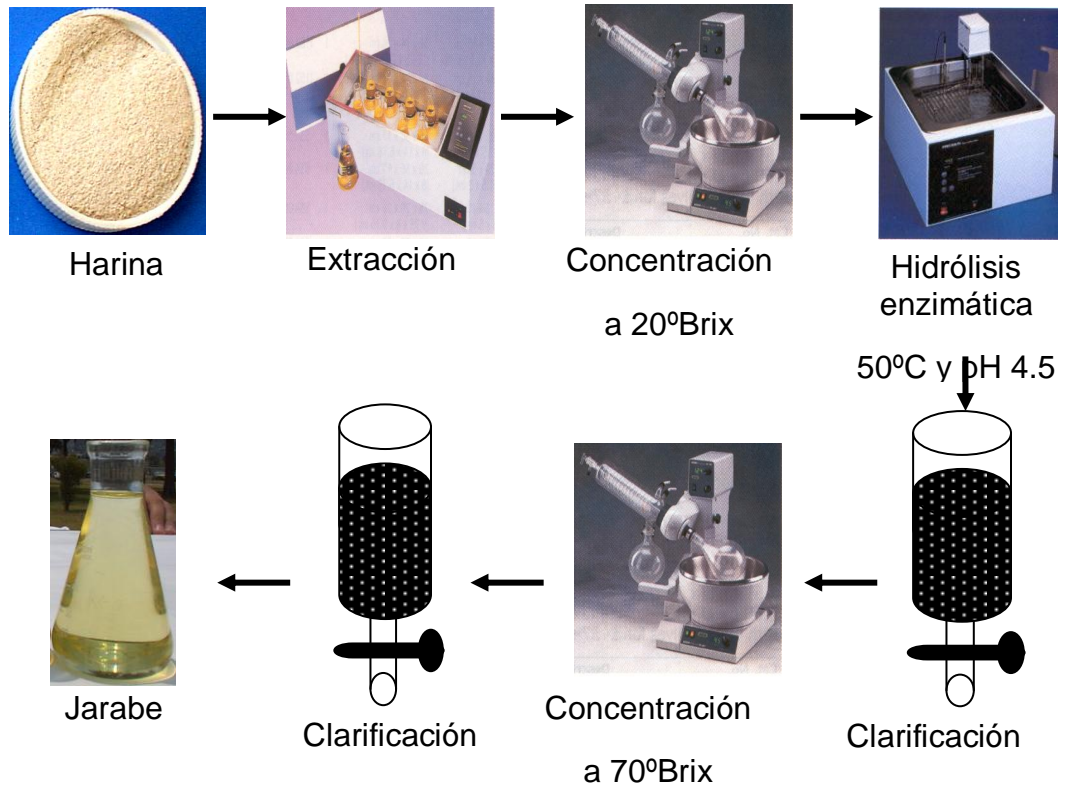


Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de obtención de jarabes de alta fructosa a partir de la harina de “la piña” del *A. salmiana* L.

3.5.3 Caracterización física y química de los jarabes

Una vez obtenidos los jarabes con alto contenido de fructosa a partir de las fructanas contenidas en las bases de las hojas y en “la piña” del agave mezcalero potosino, los jarabes fueron analizados para

evaluar algunas de sus propiedades físicas y químicas más importantes. Para fines de comparación, al mismo tiempo se evaluó un jarabe comercial de alta fructosa que es obtenido por hidrólisis enzimática del almidón de maíz y que de acuerdo con el fabricante, contiene 70% de sólidos, integrados por 55% de fructosa y 45% de glucosa. Los parámetros químicos y físicos evaluados en los diferentes jarabes fueron: pH, °Brix, humedad, cenizas, ARD, ART, fructosa (F), glucosa (G) y relación F/G; cada uno de estos parámetros se evaluó de acuerdo a la metodología y procedimientos descritos anteriormente; cada determinación se realizó por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

4.1.1 Acondicionamiento de la materia prima

Existe importante variación en el desarrollo del maguey mezcalero potosino y esto se manifiesta en el tamaño y peso (20 a 300 Kg) que alcanzan a la madurez las cabezas o piñas de las plantas recolectadas de un mismo paraje, lo que entre otras cosas obedece a las características demográficas de la colonia, así como a su situación particular (desarrollo de la planta madre, competencia de hijuelos y calidad de los periodos de lluvia en que se desarrollaron) (Aguirre *et al.*, 2001).

“La piña” del *A. salmiana* L., representa la parte comercial del cultivo y constituyó el 40% de la biomasa total de la planta; el restante 60% está integrado por las bases y las puntas de las hojas (35 y 25%, respectivamente). La proporción que guardó “la piña” en el peso total de la planta fue similar a la del agave tequilero (*A. tequilana* Weber), pues de acuerdo con Méndez (1999) en este, “la piña” puede constituir hasta el 45% del peso total de la planta. Aún cuando su proporción en el peso total de la planta es similar en ambas especies, existe una diferencia muy marcada en el número de hojas o pencas que contienen, pues de acuerdo a datos reportados por Aguirre *et al.*, (2001), en el agave tequilero puede encontrarse desde 110 y hasta 150 pencas por planta, mientras que el agave mezcalero potosino sólo tiene entre 10 a 50 pencas por planta en etapa de madurez.

4.1.2 Análisis químico porcentual

El análisis químico porcentual tanto de las bases de las hojas como de “la piña” del agave mezcalero potosino se realizó a partir de sus harinas respectivas que se obtuvieron con la finalidad de alargar la vida de anaquel por la inactivación de las enzimas endógenas y sin pérdida de inulinas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis químico porcentual de las fracciones del *Agave salmiana* L.

ANÁLISIS	Fracción de la planta			
	Bases de las hojas		Cabeza o “piña”	
	% _{BH}	% _{BS}	% _{BH}	% _{BS}
Humedad	80.25 ± 1.86	-----	71.10 ± 1.59	-----
Cenizas	1.56 ± 0.09	7.90 ± 0.48	1.45 ± 0.06	5.02 ± 0.22
Grasas	0.36 ± 0.02	1.82 ± 0.07	0.20 ± 0.01	0.69 ± 0.04
Proteínas	0.64 ± 0.07	3.24 ± 0.15	0.62 ± 0.06	2.14 ± 0.13
Fibra cruda	6.38 ± 0.21	32.30 ± 1.06	4.29 ± 0.25	14.84 ± 0.85
Extracto libre de nitrógeno	10.81 ± 1.72	54.74 ± 1.66	22.34 ± 1.76	77.31 ± 0.98

Medias ± desviación estándar, BH= base húmeda, BS= base seca

La humedad representó el principal constituyente en ambas fracciones y fue mayor en las bases de las hojas que en “la piña”; porcentajes de humedad similares fueron determinados por Méndez (1999) en la piña del agave tequilero. Lo inverso sucedió con el contenido de sólidos totales (100 - % Humedad), que es mayor en la

cabeza o “piña” de la planta y dentro de éstos, el extracto libre de nitrógeno (carbohidratos totales) constituyó el principal componente en ambas fracciones, seguido en orden descendente por la fibra cruda, cenizas (minerales), proteínas y grasas. Es importante resaltar que al igual que en el agave tequilero (Méndez, 1999), en “la piña” del *A. salmiana* L. se concentró la mayor cantidad de carbohidratos, lo que obedece a que esta estructura funciona como órgano de reserva energética de la planta. El contenido de carbohidratos en “la piña” de ambas agaváceas es similar al 80% reportado en la alcachofa de Jerusalén (*H. tuberosus* L.), principal fuente potencial para la obtención industrial de fructanas y de jarabes de alta fructosa (Fleming y GrootWassink, 1979; Nakamura *et al.*, 1996; Wenling *et al.*, 1999). Se pudo apreciar también que el contenido de carbohidratos en las bases de las hojas o pencas fue considerable (54.74%). En la actualidad, estos compuestos son desaprovechados al igual que en el agave tequilero, pues estas pencas o bases de las hojas representan los residuos agrícolas del cultivo (Valenzuela, 1997).

El segundo componente de mayor abundancia en los sólidos totales de ambas fracciones del agave lo constituyó la fibra cruda, componente integrado fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pentosanas (Fisher y Hart, 1991). La fibra cruda junto con pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas, constituyen las estructuras celulares de los vegetales (Roberfroid, 1993; Niñez, 1999; Flamm *et al.*, 2001) y las bases de las hojas son fuente importante de fibra cruda pues su concentración (32.30%) fue mayor que en “la piña” de la planta.

4.1.3 Contenido de fibra dietaria

Desde el punto de vista de la nutrición, los alimentos contienen dos tipos de material fibroso, que de acuerdo a su solubilidad en agua reciben el nombre de fibra dietaria insoluble (FDI) y fibra dietaria soluble (FDS) (Flamm *et al.*, 2001). Por esta razón, a la fibra cruda también se le conoce con el nombre de fibra dietaria insoluble, dado que el organismo humano carece de las enzimas digestivas para hidrolizar y digerir sus constituyentes, estos compuestos no son asimilados por el cuerpo. Por su parte, la fibra que es soluble en agua recibe el nombre de fibra dietaria soluble y la comprenden los fructoligosacáridos, inulinas, pectinas y gomas (Flamm *et al.*, 2001); que tampoco son hidrolizados por las enzimas del tracto gastrointestinal humano.

El contenido de FDS resultó mayor en la cabeza (65.30%) y disminuyó hacia las hojas de la planta, lo contrario sucedió con la FDI, que fue mayor en las bases (33.15%) y disminuyó hacia la cabeza o “piña” de la planta (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido de fibra dietaria en las diferentes fracciones del *A. salmiana* L.

CONTENIDO (% _{BS})	Fracción de la planta	
	Bases de las hojas	Cabeza o “piña”
Fibra Dietética Soluble	36.58 ± 1.65	65.30 ± 1.92
Fibra Dietética Insoluble	33.15 ± 1.82	14.65 ± 1.10
Fibra Dietética Total	69.73 ± 3.47	79.95 ± 3.02

Medias ± desviación estándar, BS= base seca

4.1.4 Contenido de ácidos grasos

El 61.21% de ácidos grasos insaturados representan la fracción oleosa de “la piña” del agave mezcalero potosino y el restante 38.79% los ácidos grasos saturados (Cuadro 5). El ácido palmítico y el ácido esteárico conformaron la fracción saturada mientras que el ácido oleico, linoleico y linolénico la fracción insaturada de ácidos grasos. En orden de contenido decreciente, los principales ácidos grasos que integran la fracción oleosa de “la piña” del agave mezcalero potosino son los ácidos: linoleico, palmítico y oleico.

Tanto el ácido linoleico como el ácido linolénico son ácidos grasos esenciales para el hombre, debido a que el organismo es incapaz de sintetizarlos, por lo que para satisfacer los requerimientos del cuerpo, es necesario ingerirlos a través de la dieta (1 a 2% de los lípidos totales), dado que son necesarios para la síntesis de prostaglandinas, son parte constitutiva de la membrana de diferentes tejidos celulares y también funcionan como precursores de la síntesis del ácido araquidónico (tetra insaturado) que se requiere para darle rigidez a la mitocondria celular (Hicks, 2001; Lehninger, 2005).

Estos resultados estuvieron acordes a los encontrados por Montañez (2005) al analizar la fracción oleosa de la piña del agave tequilero, donde el ácido linoleico (38.27%) se encontró en mayor cantidad, así como a los obtenidos por Peña *et al.*, (2004), quien reportó la composición de la fracción oleosa del *A. angustifolia* Haw. Los autores encontraron aunados al ácido linolénico y a los ya mencionados, otros ácidos como: láurico, mirístico, pentadecílico, palmitoléico, margárico; Mancilla y López (2002) encontraron otros ácidos grasos de cadena corta en la fracción oleosa del agave

tequilero, como el ácido acético, ácido propanóico ácido butírico, ácido pentanóico, ácido caproico, ácido heptanóico, entre otros. Estos autores sugirieron que el contenido y perfil de ácidos grasos que integran la fracción oleosa de cada una de las diferentes especies de agaves, son en cierta forma responsables de las diferencias en las características organolépticas (olor y sabor) de las bebidas que se obtienen a partir de cada una de estas especies y que además, elevadas concentraciones de estos constituyentes en la materia prima generan olores y sabores indeseables en las mismas.

Cuadro 5. Composición del extracto oleoso de “la piña” del *A. salmiana* L.

ÁCIDO GRASO	CONTENIDO (%BS)
Grasa saturada	38.78
Grasa polinsaturada	45.1
Grasa monoinsaturada	16.11
Ácido palmítico	34.67
Ácido esteárico	4.11
Ácido oleico	16.11
Ácido linoleico	42.05
Ácido linolénico	3.04

BS= base seca

4.2 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FRUCTANAS

4.2.1 Extracción de las fructanas

Inicialmente en la maceración de las harinas se ensayaron tres relaciones sólidos-agua (1:3, 1:6 y 1:9); de acuerdo a la capacidad de hidratación, facilidad de agitación y manejo de la dispersión, las mejores condiciones del proceso de maceración se obtuvieron al utilizar una relación sólidos-agua de 1:6; a menor relación sólidos-agua (1:3), el agua utilizada resultó insuficiente para la hidratación de las harinas, mientras que a mayor relación sólidos-agua (1:9), las dispersiones obtenidas resultaron muy diluidas, lo que repercutiría posteriormente en la etapa de concentración de los extractos. Por lo tanto, en la extracción de las fructanas contenidas en la harina de la piña del *A. salmiana* L., se utilizó una relación sólidos-agua de 1:6 y el pH de las dispersiones se ajustó a 6.0 con NaOH 0.1N para evitar la hidrólisis de las fructanas presentes en las diferentes fracciones del agave. Se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos de maceración para encontrar las condiciones más adecuadas para la extracción de la mayor cantidad de fructanas contenidas en la harina de la piña de la planta (Figura 18). Como variable de respuesta se utilizó el porcentaje de azúcares reductores totales (ART).

A un nivel de confianza del 95%, no existió diferencia estadística significativa en la cantidad de carbohidratos extraídos (%ART) a tiempos de maceración superiores de 30 min, pero si a temperaturas mayores de 70°C; sin embargo la variación en el porcentaje de fructanas extraídas es mínimo (74.59% y 75.15%, para 70 y 100 °C, respectivamente) por lo que las mejores condiciones de maceración de la harina establecidas para la

extracción de las fructanas de ambas fracciones del agave mezcalero potosino fueron: relación sólidos-agua de 1:6, pH 6.0, temperatura de 70°C y un tiempo de maceración de 30 min. Bajo estas condiciones se requirieron tres ciclos de extracción consecutivos (2,000 rpm, 15 min) para obtener más del 95% de los ART presentes en la piña del agave.

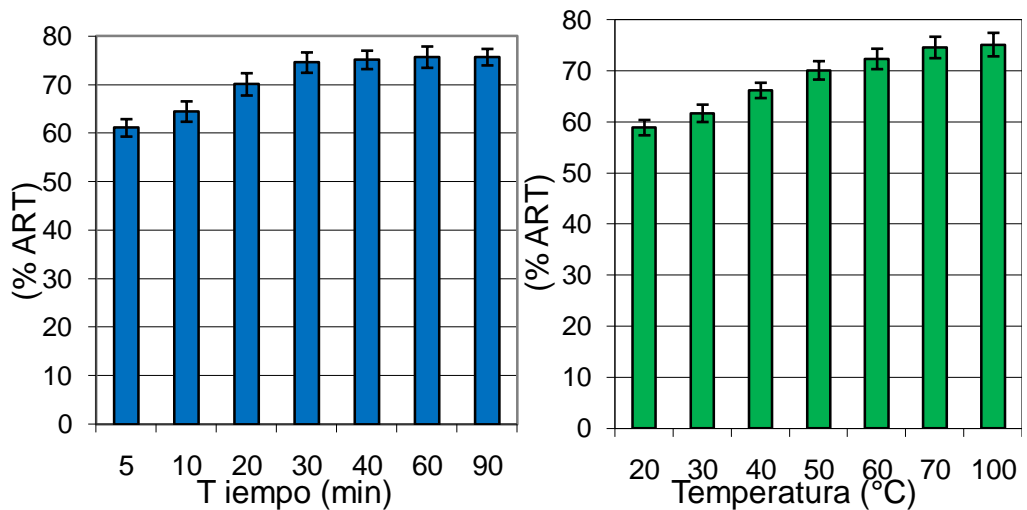


Figura 18. Efecto de tiempo y temperatura de maceración, en la extracción de fructanas contenidas en el *A. salmiana* L.

Wei *et al.*, (2002) manejo ciclos de centrifugación de 3,000 rpm por 10 min para la extracción de carbohidratos de *Poa secunda* L. y temperaturas de 90 a 95°C con un tiempo de maceración de 15 min; Blanco (1979) solo extrajo el 68.5% de carbohidratos presentes en la piña del *A. tequilana* Weber, cuando la maceración la realizó a una relación sólidos-agua de 1:3 y temperaturas entre 60 y 70°C.

4.2.2 Caracterización de las fructanas

Bajo las condiciones de hidrólisis utilizadas (10 mL de extracto como volumen total de reacción, pH de 4.5 unidades, $55 \pm 1^\circ\text{C}$ y una concentración de enzima de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), el tiempo mínimo requerido para hidrolizar los FOS con invertasa de *S. cerevisiae* fue de 80 min (15.93% y 24.98% para las bases de las hojas y “piña” del agave, respectivamente); a un tiempo de hidrólisis superior y a un nivel de confianza del 95%, existió diferencia estadística significativa en el porcentaje de ARD generados por acción de la enzima sobre los FOS presentes en ambos extractos; sin embargo, la variación de un tiempo a otro es mínima (Figura 19).

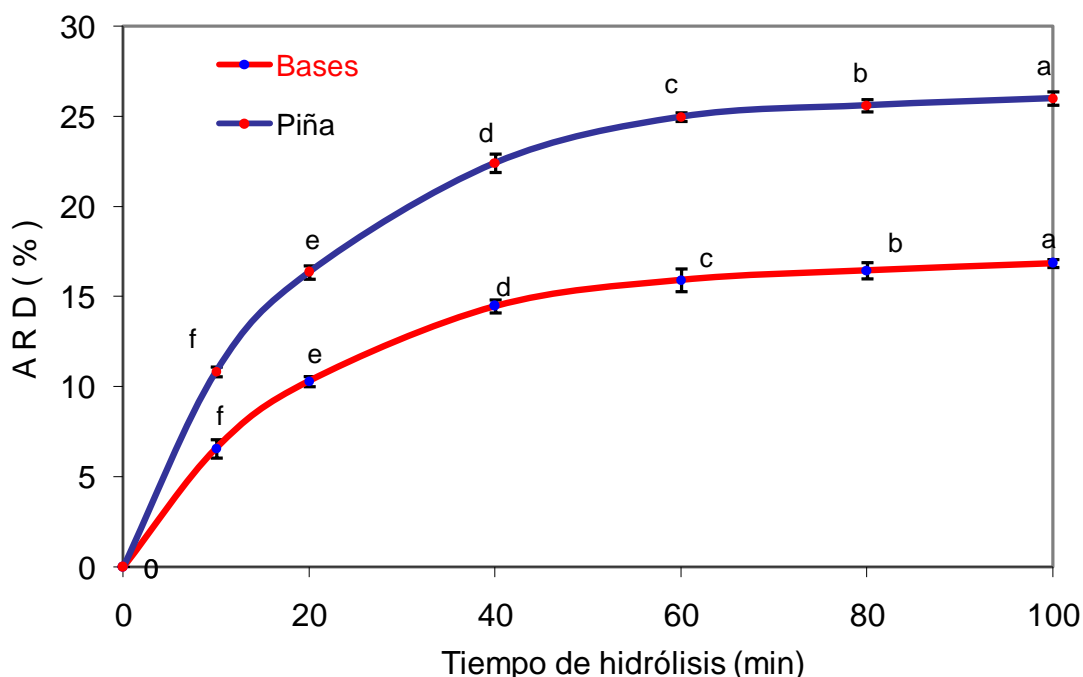


Figura 19. Acción hidrolítica de la invertasa de *S. cerevisiae* sobre los fructoligosacáridos presentes en los extractos del *A. salmiana* L.

Para asegurar la hidrólisis total de los FOS, se utilizaron 90 min como tiempo final, después se realizó la determinación de ARD, caracterización y cuantificación (Wight y Niekerk, 1983) de las diferentes fructanas presentes en las bases de las hojas y en la piña del *A. salmiana* L. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuantificación de las fructanas de las diferentes fracciones del *A. salmiana* L.

Carbohidratos (% _{BS})	Fracción de la planta	
	Bases de hojas	Cabeza o "Piña"
Azúcares Reductores Directos	14.24 ± 0.85 ^a	10.45 ± 0.78 ^b
Fructoligosacáridos	12.31 ± 0.95 ^b	22.55 ± 1.15 ^a
Inulinas	27.61 ± 1.20 ^b	44.25 ± 1.50 ^a
Azúcares Reductores Totales	54.16 ± 1.10 ^b	77.25 ± 1.35 ^a

Medias ± desviación estándar, BS= base seca, Subíndices= diferencias estadísticas significativa a $p < 0.05$

“La piña” del agave funciona como órgano de almacenamiento de carbohidratos principalmente en forma de inulina (López *et al.*, 2003), es por ello que en esta fracción de la planta, el contenido de ART (77.25%) fue muy superior al de las bases de las hojas (54.16%), en ambas fracciones predominaron las fructanas tipo inulina, seguidas por los FOS y ARD; mientras que en las bases de las hojas, a la inulina le siguen los ARD y finalmente los FOS (Cuadro 6). Por otro lado, el contenido de ARD en las bases de las hojas fue superior al que se encontró en “la piña”, pues una vez

sintetizados en las hojas, los ARD son polimerizados en forma de inulinas y almacenados en “la piña” del agave (Edelman y Jefford, 1968; Aspinall y Aupta, 1987).

Para la etapa de cuantificación de la inulina del *A. salmiana* L., se realizó una hidrólisis ácida con HCl 2N a 70°C y 30 min del extracto, Nakamura *et al.*, (1996) utilizó HCl 0.05N a 100°C y 1hr y reportó que la inulina de los tubérculos de achicoria (*C. intybus* L.) representó cerca del 80% en base seca de sus fructanas y sus raíces se conformaron por un 15-20% de inulina y 5-10% de FOS (Niñez, 1999). Por otra parte Kierstan (1980) indicó que los tubérculos de alcachofa de Jerusalén se representaron de 60 a 70% de inulina en base seca, mientras que la piña del agave en estudio contenía menos del 50%. En el contenido de los diferentes carbohidratos de ambas fracciones del agave en estudio, existió diferencia estadística significativa con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

En la figura 20 se muestra el GPP de las fructanas presentes en las diferentes fracciones del *A. salmiana* L.; los FOS presentes en las bases de las hojas y en “la piña” del agave muestran GPP muy parecido (4.2 y 4.7, respectivamente); mientras que el tamaño de los polímeros de las inulinas varía, ya que el GPP de las inulinas contenidas en las bases fue de 15.3 unidades, contra las 18.5 unidades que presentaron las inulinas de “la piña”.

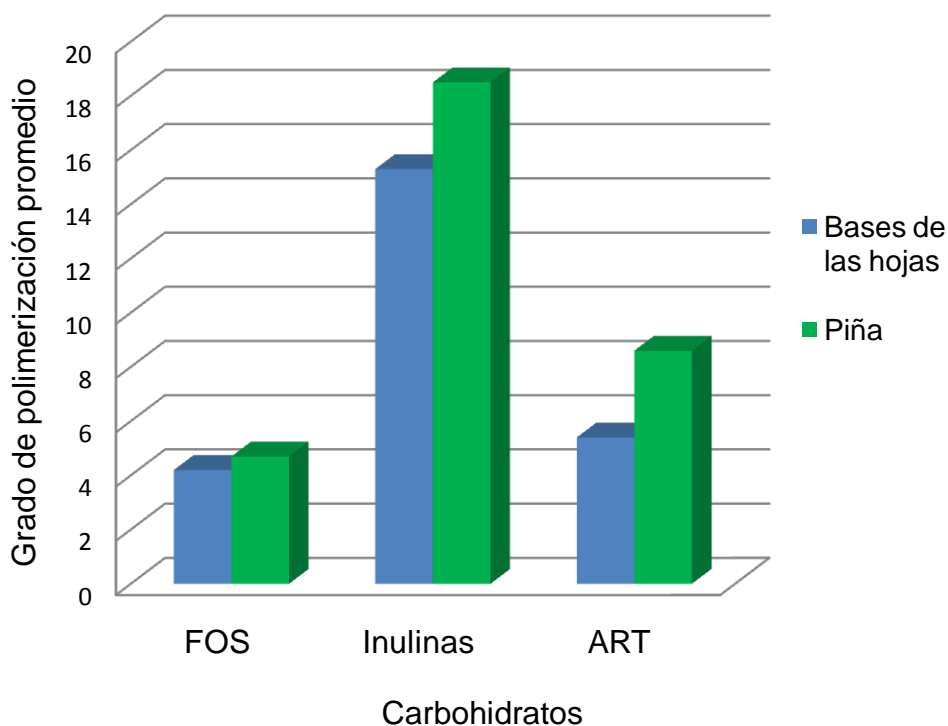


Figura 20. Grado de polimerización promedio de las fructanas contenidas en las diferentes fracciones del *A. salmiana* L.

Los polímeros de inulina contenidos en “la piña” del *A. salmiana* L. presentaron mayor GPP y por ende, mayor PMP que los polímeros de inulina presentes en las bases de las hojas; es importante hacer notar que, de acuerdo a la relación en el contenido de fructosa (F) y glucosa (G), a partir de los azúcares reductores totales presentes en “la piña” del agave, podrían obtenerse jarabes con un contenido de fructosa del 88%, mientras que a partir de los ART presentes en las bases de las hojas, podrían obtenerse jarabes con un contenido de fructosa del 81% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización y cuantificación de las fructanas de las diferentes fracciones del *A. salmiana* L.

Fracción	Carbohidratos	Glucosa % BS	Fructosa % BS	GPP (residuos)	PMP (g/mol)
	ARD	5.48 ± 0.25 ^b	4.97 ± 0.25 ^b	1.00	180
"Piña"	FOS	4.80 ± 0.4 ^a	17.75 ± 0.8 ^a	4.70	761
	Inulinas	2.39 ± 0.2 ^a	41.86 ± 1.2 ^a	18.5	2997
	ART	8.98 ± 0.3 ^b	68.27 ± 1.3 ^a	8.60	1393
	ARD	8.15 ± 0.4 ^a	6.09 ± 0.4 ^a	1.00	180
Bases	FOS	2.93 ± 0.3 ^b	9.38 ± 0.7 ^b	4.20	680
	Inulinas	1.80 ± 0.1 ^b	25.81 ± 0.8 ^b	15.30	2479
	ART	10.03 ± 0.25 ^a	44.13 ± 1.2 ^b	5.40	874

Medias ± desviación estándar, BS= base seca, GPP= grado de polimerización promedio, PMP= peso molecular promedio, subíndices= diferencias estadísticas significativas a $p < 0.05$

4.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINA

En el agave, las hojas o pencas constituyen las estructuras morfológicas donde se lleva a cabo la fotosíntesis y por lo tanto, la producción de los carbohidratos que la planta requiere para su

crecimiento y desarrollo, cuyos excedentes son almacenados en la cabeza o “piña” de la planta; principalmente en forma de inulina (López *et al.*, 2003). Se decidió obtener y caracterizar la inulina contenida tanto en las bases de las hojas como en “la piña” del *A. salmiana* L., a fin de determinar los rendimientos obtenidos y características químicas de las mismas.

La obtención de la inulina se basó en la insolubilidad que presenta este polímero en etanol como disolvente; es por ello que bajo las condiciones previamente determinadas, se obtuvieron las inulinas de ambas fracciones de la planta. De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 8, se pudo observar que a medida que se incrementó la concentración de etanol, se incrementó la cantidad de inulina precipitada, lo que indica que las inulinas son más solubles en etanol diluido. El mayor rendimiento de inulina se obtuvo al emplear una concentración de etanol al 80%, pues existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con las otras concentraciones de etanol. Los rendimientos obtenidos están acordes a los encontrados por Méndez (1999) al precipitar la inulina de “la piña” del agave tequilero; así como a los reportados por Livingston III (1989), quien precipitó inulinas de avena (*A. sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) con etanol al 90 y 95%, obteniendo porcentajes de recuperación hasta de 106 y 77%, respectivamente.

Cuadro 8. Obtención de inulina a diferentes concentraciones de etanol

Etanol (%)	Rendimiento (%)
40	22.30 ± 1.5 ^e
53	64.40 ± 2.3 ^d
60	78.80 ± 2.5 ^c
80	101.5 ± 2.6 ^a
90	100.8 ± 2.3 ^b

Medias ± desviación estándar, subíndices= diferencias estadísticas significativas a $p < 0.05$

Una vez obtenidas las inulinas de las diferentes fracciones del agave (Figura 21) y de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, se realizó la caracterización química de las mismas y de la inulina comercial grado reactivo para efectos de comparación (Cuadro 9).



Inulina de “la piña”

Inulina de las bases de las hojas

Figura 21. Inulina en polvo obtenida a partir de las bases de las hojas y “la piña” del *Agave salmiana* L.

Cuadro 9. Caracterización química de las inulinas del *A. salmiana* L. e inulina de *C. intybus* L.

CONCEPTO	Inulina de <i>A. salmiana</i> L.		Inulina de Achicoria hojas
	Bases de hojas	de "Piña"	
Humedad (%)	2.50 ± 0.1 ^a	2.65 ± 0.1 ^a	3.15 ± 0.1 ^b
Cenizas (%) _{BS}	0.21 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	0.00 ± 0.0 ^b
ART (%) _{BS}	101.5 ± 1.5 ^b	101.8 ± 1.3 ^a	101.3 ± 1.4 ^c
ARD (%) _{BS}	4.40 ± 0.2 ^a	3.00 ± 0.1 ^b	2.87 ± 0.1 ^c
Glucosa (%) _{BS}	4.20 ± 0.2 ^a	3.05 ± 0.1 ^b	2.78 ± 0.1 ^c
Fructosa (%) _{BS}	95.00 ± 1.5 ^c	96.40 ± 1.2 ^b	96.79 ± 1.3 ^a
GPP (residuos)	23.62 ± 0.9 ^c	32.61 ± 0.6 ^b	35.81 ± 0.7 ^a
PMP (g/mol)	3826 ± 146 ^c	5283 ± 97 ^b	5801 ± 114 ^a
Relación F/G	22.62 ± 0.8 ^c	31.61 ± 0.6 ^b	34.82 ± 0.7 ^a

Medias ± desviación estándar, BS= base seca, subíndices= diferencias estadísticas significativas a $p < 0.05$

El bajo contenido de humedad en las muestras de inulina obtenida favorece su conservación y su bajo contenido de cenizas indicó la ausencia de sales minerales en los productos, lo que se debió a las repetidas etapas de extracción, precipitación y secado en las que se eliminaron las sales provenientes de la materia prima. Phelps (1965) calculó el porcentaje de cenizas y humedad por los mismos métodos utilizados en este trabajo y reportó que inulina grado laboratorio contenía 0.05-0.08% de cenizas y 9.7-11.1% de humedad; datos similares a los obtenidos en las inulinas del agave mezcalero potosino.

Por otro lado el contenido de ART en las muestras analizadas fue prácticamente del 100%, lo que indicó que el proceso de extracción y purificación fue eficiente para la especie química en cuestión. El bajo contenido de ARD en las muestras fue indicativo del alto grado de pureza de los polímeros obtenidos; es decir, de la ausencia de azúcares libres en las muestras. Existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el contenido de ART y de fructosa en las muestras de inulina analizadas pero la variación fue muy mínima, el contenido de ARD y glucosa también presentaron una diferencia estadística significativa por lo que también se arrojaron diferencias estadísticas en el GPP y por ende, en el PMP y en la relación F/G presente en las muestras.

El bajo GPP y PMP de las inulinas obtenidas a partir de ambas fracciones del agave, puede ser atribuible a que durante la concentración de los extractos se produjo una hidrólisis parcial de los polímeros. Ohta *et al.*, (1993) reportó que la inulina de la achicoria presentó un GPP de 33.6 unidades, muy parecido al obtenido en este estudio (35.81 unidades). El GPP de las inulinas presentes en “la piña” del *A. salmiana* L. (32.61 unidades) fue similar al reportado por López *et al.*, (2003), para las inulinas obtenidas de “la piña” del *A. tequilana* Weber. El GPP de las inulinas obtenidas de los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén se reportó de 35 unidades (Edelman y Jefford, 1968), mientras que las inulinas contenidas en los tubérculos de la dalia (*D. variabilis* Willd.) presentaron un GPP de 40.3 unidades (Ohta *et al.*, 1993) y de 38.8 unidades según Nakamura *et al.*, (1994). Martínez (1999) reportó que el GPP de la inulina de la piña del *A. atrovirens* Karw. fue equivalente a 27 unidades y Méndez (1999) que el GPP de la inulina del *A. tequilana* Weber fue de 20 unidades.

Es importante resaltar que tanto la concentración de ARD, ART, F, G, F/G, GPP y PMP que integran las diferentes inulinas; se ven influenciadas por la especie botánica, las condiciones agronómicas del cultivo, el estado de madurez de las plantas y por la metodología empleada para su determinación y cuantificación (Chabbert *et al.*, 1985; Schorr y Guiraud, 1996; Valenzuela, 1997).

4.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTOLIGOSACÁRIDOS

Las unidades de actividad enzimática usadas de la endo-inulinasa fueron 200 de manera que se lograra obtener la mayor cantidad de FOS en el menor tiempo posible y una solución al 5% de inulina en buffer de acetatos al 0.02 M; Guiraud y Galzy (1981) usaron soluciones de 0.025 y 0.15% para la hidrólisis enzimática de la inulina de alcachofa de Jerusalén y achicoria, respectivamente, con 0.12-0.36 U mL⁻¹ de enzimas de *Debaryomyces cantareli* y *Kluyveromyces fragilis*; Martínez y Morales (2007), una solución de inulina de *Agave atrovirens* Karw del 1.5% y Corona, *et al.*, (2005) utilizó 1 mL de enzima diluida de *S. cerevisiae* en buffer de acetatos 0.1M y una solución al 5% de inulinas de *A. tequilana* Weber. Tras la cinética enzimática, se estimó el tiempo mínimo requerido (5 horas) para alcanzar la hidrólisis parcial de las fructanas del *A. salmiana* L. en el proceso de conversión de inulina en FOS (Figura 22).

Dado que la endo-inulinasa de *A. niger* hidroliza los enlaces internos $\beta(2-1)$ de la molécula de inulina y genera una mezcla de FOS de diferente grado de polimerización (3 a 5 unidades de fructosa, tales como: inulotriosa, inulotetraosa y inulopentaosa) (Nakamura *et al.*,

1995; Kang *et al.*, 1998), no es posible hidrolizar el 100% de los enlaces de la inulina, de ahí que la máxima conversión de inulina en ARD se haya alcanzado en un tiempo de 5 horas, pues a tiempos de hidrólisis mayores ya no hubo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el contenido de ARD (11.7%) de los hidrolizados.

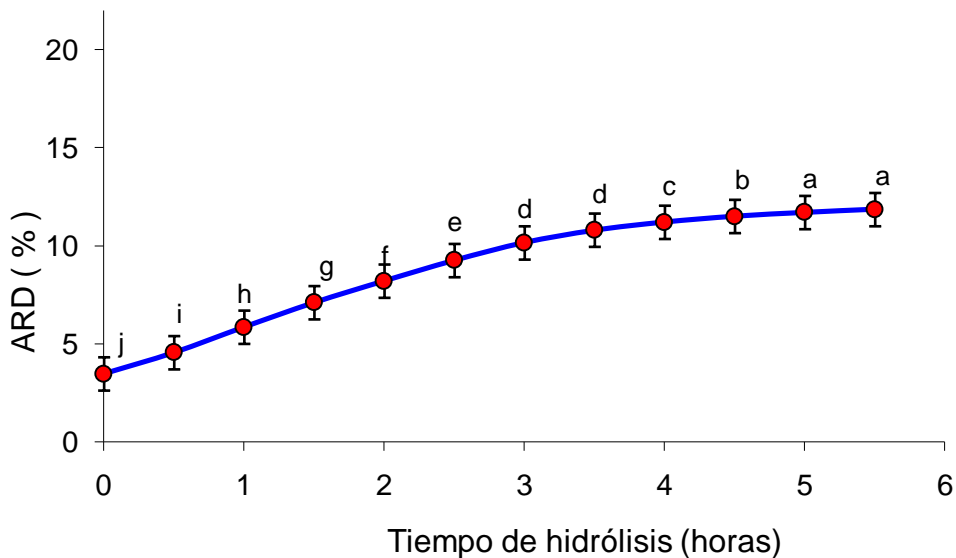


Figura 22. Cinética de hidrólisis de inulina con la endo-inulinasa de *A. niger*

Bajo las condiciones de hidrólisis previamente determinadas, se obtuvieron FOS de ambas fracciones del agave y su caracterización química (Cuadro 10) indicó que existió diferencia estadística significativa en la composición química de los FOS obtenidos de las diferentes fracciones lo que era de esperarse y es indicativo de que el proceso de elaboración de los mismos no dependió de la fuente de la materia prima utilizada; a simple vista los FOS obtenidos presentaron una coloración oscura (Figura 23) y sabor dulce. Su bajo contenido de humedad habla de la eficiencia del método de secado utilizado y garantiza la conservación de los productos. La

ausencia de cenizas en los FOS se debió a que las sales minerales de la materia prima se perdieron durante las repetidas etapas de extracción, precipitación y purificación de los productos, lo que también contribuyó a que el contenido de ART en los productos fuera prácticamente del 100%. En un estudio realizado (Santiago *et al.*, 2007) sobre los fructanos del *A. potatorum* Zucc. y *angustifolia* Haw., se reflejó un rendimiento de FOS obtenidos en forma deshidratada de 1.2 y 1.4% respectivamente, mientras que de inulina fueron de 18.8 y 20%. Los FOS del *A. atrovirens* Karw contenían: 1-2.46% de ART, 0-0.55% de glucosa, 0.84-2.45% de fructosa (Martínez y Morales, 2007).

Cuadro 10. Caracterización química de los fructoligosacáridos

ANÁLISIS	FRUCTOLIGOSACÁRIDOS	
	Bases	“Piña”
Humedad (%)	2.35 ± 0.1 ^b	2.45 ± 0.1 ^a
Cenizas (%) _{BS}	0.00 ± 0.0 ^a	0.00 ± 0.0 ^a
ART (%) _{BS}	101.2 ± 1.5 ^a	100.6 ± 1.4 ^b
ARD (%) _{BS}	30.6 ± 1.0 ^a	30.4 ± 1.2 ^b
GLUCOSA (%) _{BS}	30.2 ± 0.5 ^a	29.9 ± 0.6 ^b
FRUCTOSA (%) _{BS}	68.9 ± 1.5 ^b	69.6 ± 1.4 ^a
GPP (residuos)	3.31 ± 0.2 ^b	3.33 ± 0.2 ^a
PMP (g/mol)	536 ± 32 ^b	540 ± 32 ^a
Relación F/G	2.28 ^b	2.33 ^a

Medias ± desviación estándar, BS= base seca, subíndices= diferencias estadísticas significativas a p<0.05

El GPP de los FOS obtenidos indicó que estos polímeros están conformados por 3.3 unidades de monosacáridos en promedio y la fructosa se encontró en mayor proporción que la glucosa. Méndez (1999) reportó que el contenido de FOS es independiente del estado de madurez de la planta y determinó que el GPP de los FOS presentes en “la piña” del *A. tequilana* Weber fue de 6.22 unidades. Roberfroid (2006) reportó que la hidrólisis parcial de la inulina de achicoria con endo-inulinasa de *A. niger* produjo FOS con un GPP de 4; mientras que Martínez y Morales (2007) obtuvieron FOS con un GPP de 3.6 unidades al hidrolizar la inulina de *A. atrovirens* Karw.

Dado que los FOS no son metabolizados por enzimas digestivas humanas y por lo tanto, su consumo no aporta calorías al organismo, su sabor dulce y su prácticamente nulo contenido de cenizas, hace de los FOS un importante edulcorante especial para personas que quieren cuidar su ingesta calórica sin prescindir de ingerir alimentos dulces; también los hace atractivos para aquellas personas que padecen diabetes e hipertensión (Roberfroid, 2000).



Figura 23. Fructooligosacáridos obtenidos a partir de “la piña” del *Agave salmiana* L.

4.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS JARABES CON ALTO CONTENIDO DE FRUCTOSA

Para la producción de jarabes con alto contenido de fructosa por vía enzimática se utilizó una mezcla de las inulinasas de *A. niger* porque presentan máxima actividad a similares valores de pH y temperatura, lo que representa una ventaja desde el punto de vista operativo, dado que permite trabajar bajo las mismas condiciones de proceso con ambas enzimas o con cada una de ellas por separado dependiendo del proceso en cuestión. Para la producción de jarabes de fructosa es recomendable la utilización de la mezcla

de ambas enzimas, mientras que para la producción de FOS lo recomendable es utilizar únicamente la endo-inulinasa esto se debe a la forma de actuar o de acción de cada una de estas enzimas sobre la molécula de inulina (Nakamura *et al*, 1995).

Entre las isoformas de inulinasas producidas por *Aspergillus ficumm*; la exo-inulinasa presenta mayor afinidad por el sustrato que la endo-inulinasa y por lo tanto mayor velocidad de hidrólisis (Ettalibi y Baratti, 1990), lo que se atribuye principalmente a los diferentes mecanismos de reacción de cada enzima con la inulina, ya que mientras la exo-inulinasa separa sucesivamente unidades de fructosa rompiendo los enlaces $\beta(2-1)$ a partir del extremo no reductor de la molécula, la endo-inulinasa hidroliza en forma aleatoria los enlaces internos de la molécula de inulina y así se obtiene una mezcla de FOS con grados de polimerización de 2-5 unidades (Nakamura *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998) y al mismo tiempo la exo-inulinasa los hidroliza, de esta manera se obtiene únicamente una mezcla de glucosa y fructosa libres debido a que esta enzima también presenta actividad de invertasa; es decir, hidroliza el enlace glucosídico $\alpha(1-2)$ que une la glucosa a la cadena principal de la inulina. Gracias a la actividad sinérgica de las inulinasas se uso una mezcla de ellas para obtener los jarabes de alta fructosa a partir de los extractos de *A. salmiana* L.

El tiempo mínimo requerido para la hidrólisis de los extractos concentrados a 20%, por acción de la mezcla de ambas inulinasas fue de 2.5 horas (Figura 24), tiempo en el que se logró la conversión total de los polímeros en ARD; es decir, en azúcares libres, pues a tiempos de hidrólisis mayores no existió una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) en el contenido de ARD (20%) presentes en los extractos.

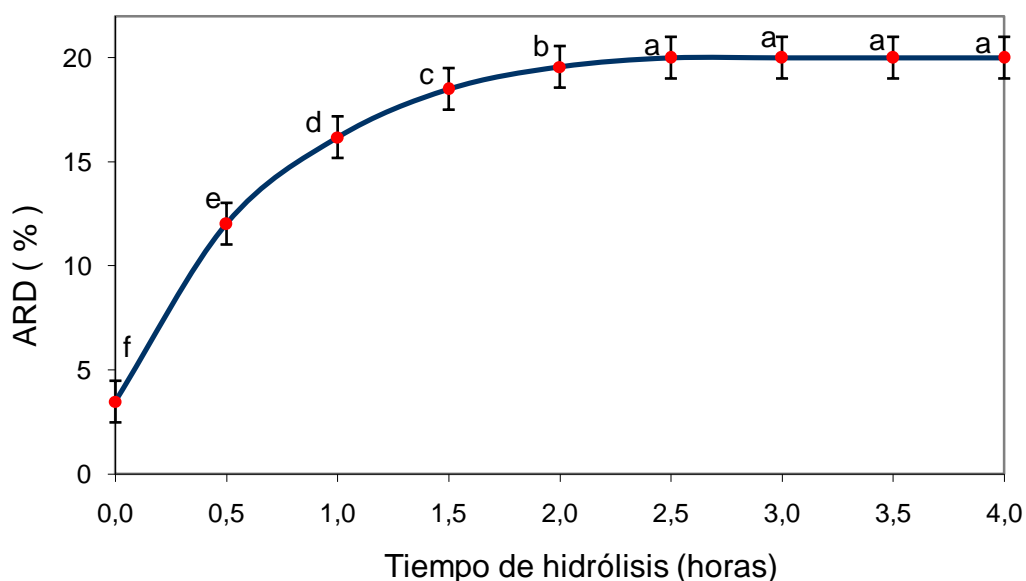


Figura 24. Cinética de la hidrólisis enzimática del extracto de "la piña" del *A. salmiana* L.

Para esta etapa se utilizó la hidrólisis enzimática, porque se requiere menor energía y no se mineralizan los extractos, no produce colores o reacciones secundarias por lo que existe menor daño a la

aparición y cualidades organolépticas de los jarabes además se simplifican las etapas de purificación del producto; mientras que, la hidrólisis química afecta primero los grandes polímeros y después la sacarosa y produce efectos secundarios a los jarabes. En el cuadro 11 se muestra la composición química de los jarabes obtenidos y del comercial, todos ellos con alto contenido de fructosa.

Dado que el pH, el contenido de sólidos (°Brix) y con ello la humedad de los jarabes de agave fueron igualados a los valores que presenta el jarabe comercial de maíz con alto contenido de fructosa, a fin de poder realizar su comparación química de una forma más equitativa; no existió una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los parámetros mencionados. Se observó diferencia estadística en el contenido de ARD y de ART entre los tres de jarabes, pero la variación en el porcentaje de estos compuestos es mínima, lo que se refiere a la pureza de los jarabes y que están básicamente compuestos de azúcares; ello significa que en los mismos sólo se tienen azúcares libres en forma de monómeros; es decir, no existen disacáridos, ni trisacáridos u otros azúcares de mayor número de monómeros y por lo tanto, de mayor peso molecular, por lo tanto, también es indicativo de que se alcanzó la hidrólisis total de los polímeros presentes en los extractos

y de que la conversión de fructanas en azúcares libres fue del 100%.

Cuadro 11. Caracterización química de los jarabes del *A. salmiana* L. y de maíz

PARÁMETRO	TIPO DE JARABE		
	Bases de hojas	Cabeza “piña”	o Maíz
pH	4.25 ± 0.0 ^a	4.25 ± 0.01 ^a	4.25 ± 0.01 ^a
Sólidos (°Brix)	70 ± 0.1 ^a	70 ± 0.1 ^a	70 ± 0.1 ^a
Humedad (%)	30 ± 0.1 ^a	30 ± 0.1 ^a	30 ± 0.1 ^a
Cenizas (%)	0.9 ± 0.03 ^a	0.7 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.001 ^c
ARD (% _{BS})	99.25 ± 0.8 ^c	99.55 ± 1.2 ^b	99.67 ± 0.6 ^a
ART (% _{BS})	99.30 ± 0.7 ^c	99.60 ± 1.1 ^b	99.82 ± 0.7 ^a
Fructosa (% _{BS})	80.54 ± 1.3 ^b	85.62 ± 1.3 ^a	53.42 ± 1.0 ^c
Glucosa (% _{BS})	19.20 ± 0.4 ^b	14.24 ± 0.4 ^c	46.56 ± 1.1 ^a
Relación F/G	4.19 ± 0.16 ^b	5.8 ± 0.48 ^a	1.15 ± 0.05 ^c

Medias ± desviación estándar, BS= base seca, subíndices= diferencias estadísticas significativas a $p < 0.05$

Además existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el contenido de glucosa y de fructosa y por ende, en la relación F/G en los tres tipos de jarabes. La mayor concentración de fructosa se presentó en el jarabe obtenido a partir de “la piña” del agave (85.62%), le siguió el jarabe de las bases de las hojas y finalmente

el jarabe de maíz; como la fructosa tiene mayor poder edulcorante que la glucosa (Badui, 1997) es por esta razón que, el jarabe obtenido a partir de “la piña” del agave presentó un mayor poder edulcorante que el obtenido de las bases de las hojas y éste, mayor poder edulcorante que el que presentó el jarabe comercial de maíz; es decir, el más dulce de los tres jarabes fue el obtenido a partir de “la piña” del agave, mientras que el menos dulce fue el de maíz con alto contenido de fructosa (Frudex 55). El jarabe de “la piña” presentó mayor cantidad de fructosa, pero menor contenido de glucosa (14.24%) resultados similares a los encontrados en los jarabes obtenidos de la alcachofa de Jerusalén según Manzoni y Cavazzoni (1992) y Wenling *et al.*, (1999) (fructosa 86.4 y 85%, glucosa 13.6 y 15%, respectivamente).

El pH de los jarabes se debe principalmente a algunos ácidos orgánicos como: acético, propiónico, butanoico, hexanoico, entre otros (Mancilla y López, 2002). Se puede observar también que los jarabes del *A. salmiana* L. presentaron un contenido de cenizas superior al del jarabe de maíz, esto se debe a que los jarabes de agave contienen una mayor cantidad de sales, a consecuencia de que éstos no fueron desmineralizados mediante su paso a través de resinas de intercambio iónico. Como consecuencia de la acidez del medio y las altas temperaturas de extracción, hidrólisis y concentración, durante el proceso de elaboración de los jarabes de alta fructosa a partir del agave, se generan compuestos que imparten una coloración café oscuro y son responsables del desarrollo de olores y sabores indeseables en los jarabes (Fleming y GrootWassink, 1979). Entre estos compuestos se encuentran algunos furanos, piranos, aldehídos y compuestos nitrogenados y sulfurados como el 5-hidroximetil-furfural, el metil-2-furoato y el 2,3

dihidróxi-3,5 dihidro-6-metil-4-piranona (Mancilla y López, 2002); todos estos compuestos son derivados de las reacciones de maillard y se eliminaron mediante procesos de clarificación y decoloración de los jarabes con carbón activado y su posterior filtración, operación que se realizó durante tres ciclos consecutivos para alcanzar la coloración que presentan los jarabes (Figura 25).

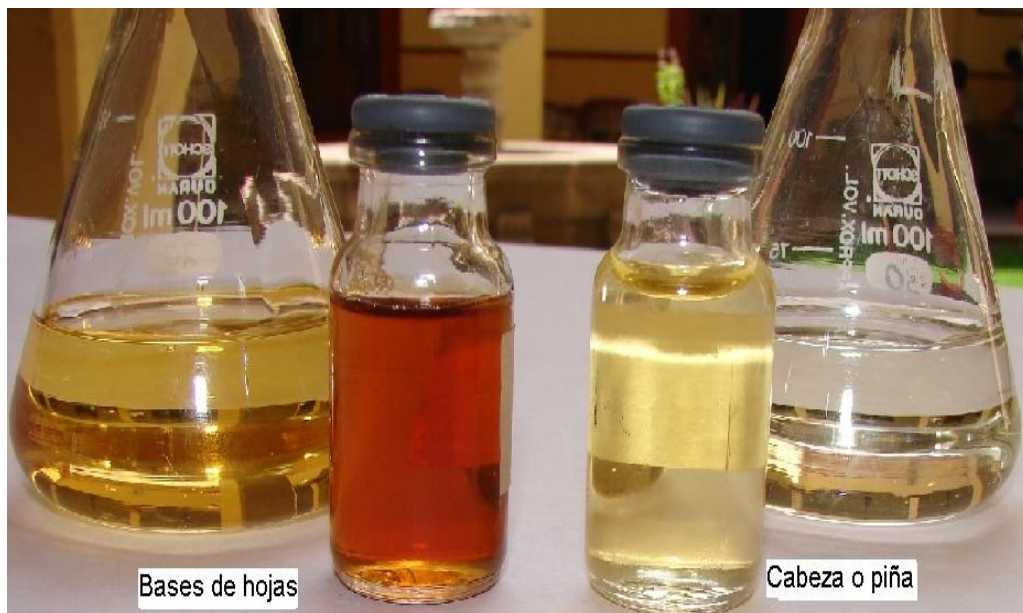


Figura 25. Jarabes con alto contenido de fructosa, obtenidos a partir de las fructanas de “la piña” y bases de las hojas del *A. salmiana* L.

5. Conclusiones

La cabeza o “piña” del agave mezcalero potosino (*A. salmiana* L.) así como las bases de las hojas o pencas, normalmente no son utilizadas en la industria y pueden emplearse sus fructanas para la obtención de insumos de interés industrial como son las inulinas, fructoligosacáridos y jarabes con alto contenido de fructosa.

El contenido (77.25%) y las características químicas de las fructanas presentes en “la piña” del agave mezcalero potosino son similares a las que se encuentran en otras fuentes comerciales de fructanas como: tubérculos de alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.), raíces de achicoria (*Cichorium intybus* L.) y tubérculos de la planta de dalia (*Dahlia variabilis* Willd.).

La fibra dietaria insoluble se encuentra en mayor proporción en las bases de las hojas del agave mezcalero potosino, mientras que “la piña” del agave es fuente importante de fibra dietaria soluble como inulinas, fructoligosacáridos, gomas y pectinas. La fracción oleosa del *A. salmiana* L. está representada en mayor porcentaje por los ácidos linoleico, palmítico y oleico (42.05, 34.67 y 16.11%, respectivamente).

Las condiciones óptimas de extracción de fructanas a partir de ambas fracciones del agave mezcalero potosino fueron: relación sólidos-agua de 1:6, pH 6.0, 70°C y 30 min de maceración, con un porcentaje de extracción por arriba del 95% de estos azúcares, conformados en orden descendiente por ART, inulinas y fructoligosacáridos en ambas fracciones de la planta.

En base a la insolubilidad de la inulina en etanol, se logró su obtención hasta un 101.5% en una disolución al 80%, el contenido de fructosa (96.40%) fue mayor en la inulina de “la piña” del agave y

con un GPP de 32.61, menor en tres unidades al GPP de la inulina comercial de achicoria (*Cichorium intybus* L.)

Se obtuvieron fructoligosacáridos con un GPP de 3 residuos, por hidrólisis enzimática de la endo-inulinasa de *Aspergillus niger* hasta 100% y principalmente se conformaron por fructosa.

Por la razón de que la exo- tanto la endo-inulinasa de *A. niger* presentan un efecto sinérgico y máxima actividad hidrolítica a iguales condiciones de pH, temperatura, resulta muy ventajoso desde el punto de vista de aplicación industrial el uso de ambas para la obtención de jarabes de alto contenido de fructosa. Dada la cantidad y tipo de enzimas, así como las distintas condiciones de trabajo requeridas por cada una de ellas, el proceso de obtención de jarabes a partir de materias primas ricas en fructanas resulta mucho más sencillo que el proceso clásico actual donde dichos productos se obtienen a partir de materias primas ricas en almidón. Se logró obtener jarabes de alto contenido de fructosa a partir de las fructanas de las bases de las hojas y “piña” del agave mezcalero potosino, con un porcentaje del monosacárido de 80.54 y 85.62%, respectivamente.

6. LITERATURA CITADA

1. Aguirre R. J., Charcas S. H., Flores F. J. (2001). El maguey mezcalero potosino. Memorias del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. S.L.P., México.
2. AOAC (1995). Official Methods of Analysis. Fourteenth edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, U. S. A.
3. Aspinall J., Aupta P. (1987). The structure of the fructosan from *Agave veracruz* mill. Process Chemical; 193: 718-722.
4. Badui D. S. (1997). Química de los Alimentos. Tercera edición, quinta reimpression. Longman de México Editores, S. A. de C. V. Alhambra Mexicana. México, D.F. págs. 45-117.
5. Baena, G. A. (2005). Aprovechamiento del bagazo del maguey verde (*Agave salmiana*) de la agroindustria del mezcal en San Luis Potosí para la producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. México.
6. Bajpai, P., Margaritis, A. (1986). Optimization studies for production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry. February: 16-18.
7. Beynum G., Roels J. (1987). Starch conversion technology. Marcel Dekker, Inc. USA; pp 5-60.
8. Carpita N. C., Kanabus J., Houstey T. (1996). Basic fructan info; Plant call; 8: 1461-1463.

9. Chabbert N., Guiraud J. P., Arnoux M., Galzy P. (1985); Productivity and fermentability of different Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) cultivars. *Journal of Biomass*. 6: 271-284.
10. Claesen G., Van Laere A., Proft M. (1990). Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*C. intybus* L.). *Journal of Plant Physiology*; 136: 35-39.
11. Corona G. R., Pelayo O. C., González A. V., Zúñiga P. V. (2005). Optimización de la producción de inulinasas por *Saccharomyces* sp. a partir de *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Revista Digital Científica y Tecnológica – Redalyc-*; ISSN (1665-5745): 1-10.
12. Dubois M., Gills K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*; 28: 350-356.
13. Edelman J., Jefford T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism en higer plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.*; 67: 517-531.
14. Ettalibi M., Baratti J. C. (1990). Molecular and Kinetic Properties of *Aspergillus ficuum* inulinasas. *Agric. Biol. Chem.*; 54 (1): 61-68.
15. Fisher H. J., Hart F. L. (1991). Análisis moderno de los Alimentos. Primera edición; Editorial Acribia, España; pp. 618.

16. Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L., Roberfroid M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber. *Critical Review in Food Science and Nutrition*; 41: 353-362.
17. Fleming S. E., GrootWassink J. W. (1979). Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *CRC Crítical reiew in Food Science and Nutrition*; 31; 1-28.
18. Fuchs A. (1987). Potentials for non food utilization of fructose and inulin. *Starch/stärke*; presented at the 38th Starch Convention; 39: 335-343.
19. García M. A. (1992); Distribution of Agave (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent journal*. 74: 177-187.
20. García G. M., López M. C., Quintero R. R. (2000). *Bioteconología de alimentos: Edulcorantes*; primera edición, tercera reimpresión. Editorial Limusa, S.A. de C. V., México; 519-551.
21. Gentry H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona, USA. Pág. 670.
22. Guiraud J. P., Galzy P. (1981). Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin. *Enzyme microb. Technology*; 3: 305-308.
23. Hicks G. J. J. (2001). *Bioquímica*. Primera edición. Editorial Mc-Graw Hill, Iberoamericana; México, 861.
24. Hermann J. R. (1998). Dietary fiber. *Nutrition Education Specialist*; OSU; T-3138: 1-6.

25. Homme C. L., Peschet J. L., Puigserver A., Biagini A. (2001). Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography*; 920: 291-297.
26. INEGI –Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática- (2004). Importación de productos derivados de la hidrólisis del almidón; México.
27. INEGI –Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática- (2008). Importación de productos derivados de la hidrólisis del almidón; México.
28. Kang S., Chang Y. J., Oh S. J., Kim S. (1998). Purification and properties of an endoinulinase from an *Arthrobacter sp.* *Biotechnology Letters*; 20: 983-986.
29. Kierstan M. (1980). Production of Fructose Syrups from Inulin. *Process Biochemistry*; 24: 32-34.
30. Kim D. H., Rhee S. K. (1989). Fructose production from Jerusalem artichoke y inulinase immobilized on chitin. *Biotechnology Letters*; 11: 201-206.
31. Kim D. M., Kim H. S. (1992). Continues production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zimomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnology and Bioengineering*; 39: 336-342.
32. Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S. K., Yun, J. W. (1997). Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase

- from a *pseudomonas sp.* Biotechnology Letters; 19 (4): 369-371.
33. Lehninger A. L. (2005). Biochemistry. Second edition; eighth printing. Worth publisher, INC; USA. 1089.
34. Livingston III D. P. (1989). Fructans precipitation from a water/ethanol extract of oats and barley; Department of Agriculture-Agricultural Research Service, U.S.A.; 92: 767-769.
35. López, G. M., Mancilla, M. N., Mendoza, D. G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber azul. J. Agric. Food Chem.; 51: 7835-7840.
36. López, M. C. A., Quintero R. R. García, G. M. y (2000). Biotecnología de alimentos: Edulcorantes. 1ª Edición, 3ª Reimpresión, Editorial Limusa, S. A. de C. V. México. 519-551.
37. Mancilla M., López G. M. (2002). Generation of maillard compounds from Inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber azul. Journal of Agric. Food Chemical; 50: 806-812.
38. Manzoni M., Cavazzoni V. (1992). Hydrolysis of topinambur (*Jerusalem artichoke*) fructans by extracellular inulinase of *Klyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. Journal of Chem. Technol. Biotechnol.; 53: 311-315.
39. Marcelli M. M. (2000). La fructosa: más sana y más barata. Gaceta Universitaria de la UNAM; México.

40. Martínez C. P. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de la inulina en el aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química-UNAM; México.
41. Martínez, P. A., Eguiarte, L.E., Furnier, G.R., 1999. Genetic Diversity of the endangered endemic *Agave victoriae reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. American Journal of Botany; 86 (8), 1093–1098.
42. Martínez S. M., Valdez C. R., Arias H. R., Beltrán M. L, Murillo A. B., Troyo D. E., Ortega R. A. (2005). Distribution and density of maguey plants in the arid Zacatecas Plateau, Mexico. Journal of Arid Environments; 61: 525-534.
43. Martínez T. R., Morales D. U. (2007). Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructoligosacáridos. Alfa Editores Técnicos: Tecnología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas- IPN; 11-19.
44. McNair, H. M. y Esquivel, B. H., (1980). Monografía N°10. Cromatografía líquida de alta presión. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Segunda edición. Santiago de Chile.
45. Méndez R. D. (1999). Acumulación de fructanas en *Agave tequilana* Weber Azul cultivado en campo. Tesis de maestría. ENCB-IPN, México.

46. Metcalf, L. D.; Schmitz, A. A. y Pelka, J. R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* Vol. 38. 514-515.
47. Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*; 31: 426-428.
48. Montañez, S. J. L. (2005). Obtención de jarabes de alta fructosa por vía enzimática a partir de las fructanas del *Agave tequilana* Weber Azul. Tesis Doctoral. CINVESTAV. IPN, México.
49. Montes H. M., Magaña P. I. (2002). Enzimas con aplicación industrial. *CINVESTAV-IPN, México*; 21: 279-282.
50. Nakamura T., Nagatomo Y., Hamada S., Nishino Y., Ohta K. (1994). Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*; 78: 134-139.
51. Nakamura T., Ogata Y., Shitara A., Ohta K. (1995). Continuous production of fructose syrup from Inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*; 80: 164-169.
52. Nakamura T., Ogata Y., Hamada S., Ohta K. (1996). Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*; 81: 564-566.
53. Niñez K. R. (1999). Inulin and oligofructosa: What are they?. *Journal of Nutrition*; 129 (7): 1405-1409.

54. Ohta K., Hamada S., Nakamura T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from Inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*; Applied and Environmental Microbiology; 59: 729-733.
55. Park A. (1996). An efficient purification with a high recovery of the inulin fructotransferase of *Artrobacter* sp. A-6 from recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology Letters; 22: 291-293.
56. Peña A. A., Díaz L., Medina A., Labastida C., Capella S., Vera L. E. (2004). Characterization of tree Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography- mass spectrometry. Journal of Chromatography; 1027: 131-136.
57. Phelps C. F. (1965). The physical properties of inulin solutions; Journal of Biochemical; 95: 41-47.
58. Pontis H. y Campillo E. (1985). Fructans: Biochemistry of Storage carbohydrates in Green Plants. Dey P. and Dixon R. editors. Academic Press, USA. Pp 65-98.
59. Porna V., Kulkarni P. R. (1995). A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design; Bioresource Technology; 54: 315-320.
60. Prosky L., Georg A. N., Schweizer T. F., Derries J. W., Furda I. (1985). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products. Journal Assoc. of Anal. Chem.; 71: 1017-1023.

61. Ritsema T. and Smeekens S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*; 6: 223-230.
62. Roberfroid M. B. (1993). Dietary fiber, inulin and oligofructosa: a review comparing their effects. *Critical Review in Food Science and Nutrition*; 33: 103-148.
63. Roberfroid, M.B. (2000). Chicory fructooligosacharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*. 16: 677-679.
64. Roberfroid M. B. (2006). Inulin type fructans: Functional food ingredients. Book review;. *Trends in Food Science and Technology*; 17: 39-41.
65. Rosa M. F., Vieira A. M., Bartolomeu M. L. (1986). Production of high concentration of ethanol from mash, juice and pulp of Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.*; 8: 673-676.
66. Salminen S., Hallikainen A., (1990). Sweeteners. Branen L.A., Davidson M.P. y Salminen S. *Food Additives*. Editorial Marcel Decker, New York; 297-323.
67. Santiago G. P., Vera G. A., López M. G. (2007); Fructanos de agave. Edición de la revista de AGROPRODUCE del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); 7-20.
68. Schorr G. S., Guiraud J. P. (1996). Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. *Journal of Bioresource Technology*; 60: 15-20.

69. Scriban R. (1985). Biotecnología; segunda edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México; págs. 167-378.
70. Selvakumar P., Pandey A. (1999). Comparatives studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus sp.* and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture. *Bioresource Technology*; 69: 123-127.
71. Smeeckens S. (1998). A convert to fructans in sugar beet; *Nature Biotechnology*; 16: 822-823.
72. Spiegel J. E., Rose R., Karabell P., Frankos V. A., Schmitt D. F. (1994). Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food technology*; 85-89.
73. Statistical Analysis System –SAS- 1996.
74. Tokunaga T., Oku T., Hosoya N. (1986). Influence of chronic intake of new sweetener, fructooligosaccharides (neosugars) in rats. *Journal of Nutrition*; 119:553-559.
75. Trinder P. (1969). Enzymatic and colorimetric method for determination of glucose. *Ann. Clinical Biochemistry*; 6: 24-26.
76. Valenzuela Z. A. (1997). El agave tequilero: su cultivo e industria; segunda edición; Litteris editores; págs. 17-150.
77. Vandamme E. J., Derycke D.J. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Laskin A. I. Adv. In Appl. Microb.* 29:139-176.

78. Wang, X. Y Gibson, G.R., (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.*; 75:373-380.
79. Wei J. Z., Chatterton N. J., Harrison P. A., Wang R. R., Larson S. R. (2002). Characterization of fructan biosynthesis in big bluegrass (*Poa secunda*). *Journal of Plant Physiology*; 159: 705-715.
80. Wenling W., Le Huiying W. W., Shiyuan W. (1989). Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces sp. Y-85*. *Journal of process biochemistry*; 34: 643-646.
81. Wight A., Niekerk P. (1983). Determination of reducing sugars, sucrose and inulin in chicory root by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture Food Chem*; 67: 244-248.