



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

## TESIS

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Por

I.A. Abril Ramírez Higuera

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DEL AGUAMIEL DE MAGUEY (*Agave salmiana*) EN *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***

Dirigida por

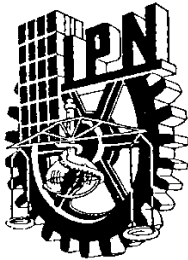
Director: Dr. Gustavo Valencia del Toro

Codirector: Dr. Jorge Yáñez Fernández

México, D.F. 13 de Enero del 2010



*Evaluación del efecto prebiótico*



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 13 del mes de Enero del año 2010, la que suscribe I.A. Abril Ramírez Higuera alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B071858, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Doctor Gustavo Valencia del Toro y la codirección del Doctor Jorge Yáñez Fernández y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 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 [abrileja@hotmail.com](mailto:abrileja@hotmail.com), [gvovaltor@yahoo.com.mx](mailto:gvovaltor@yahoo.com.mx), [jyanez68@hotmail.com](mailto:jyanez68@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Abril Ramírez Higuera



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 13 del mes de enero del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de laUPIBI-IPN para examinar la tesis de titulada:

Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en  
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

Presentada por el alumno:

RAMÍREZ  
Apellido paterno

HIGUERA  
Apellido materno

ABRIL  
Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	8	5	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dr. Enrique Durán Páramo

Co-Director de tesis

Dr. Jorge Yáñez Fernández

Dr. Fabián Robles Martínez

M. en C. Leonardo Ordaz Contreras

EL PRESIDENTE DEL  
COLEGIO

Dr. Edgar Salgado Manjarez



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

I.A. Abril Ramírez Higuera.

Vo. Bo. Doctor Gustavo Valencia del Toro  
Director

Vo. Bo. Doctor Jorge Yáñez Fernández  
Codirector

“Yo I.A. Abril Ramírez Higuera declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director y codirector de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Este trabajo se realizó en los laboratorios de Cultivos celulares y Bioingeniería de la sección de Investigación y Posgrado de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Gustavo Valencia del Toro y la codirección del Dr. Jorge Yáñez Fernández, con el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) con los proyectos N° 20082396, N°20091065 y de CONACYT proyecto N° 900032.

Agradecemos amablemente al laboratorio de Bioconversiones del Departamento de Bioprocesos en especial al Dr. Enrique Durán Páramo por la cepa proporcionada y al M. en C. Hermilo Sánchez Pineda por la inulina grado comercial.



## **DEDICATORIA**

*A mis dos ángeles que el próximo 30 de Marzo van a cumplir 25 de años de velar por mi y de los cuales llevo un ala de cada lado, ya que han hecho el favor de donarme una cada una y sin ellas, yo sé que no hubiera volado nunca tan alto, como lo he hecho hasta ahora, muchas gracia a mis dos madres Aida Higuera Rivas y Zammy Zayidira Ramírez Higuera.*

*A ellas dedicó esta tesis y todo el aliento de mi vida*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mi Padre Albino Ramírez por su apoyo incondicional.

A los Doctores Gustavo Valencia del Toro y al Doctor Jorge Yáñez por su valioso apoyo no sólo para la culminación de esta tesis sino en mi formación profesional y personal.

A los miembros del Jurado Doctores Enrique Durán, Leobardo Ordaz y Fabián Robles por tomarse el tiempo de evaluar este trabajo.

A los Doctores Juan Aranda y Edgar Salgado por su comprensión y brindarme el espacio físico para realizar este proyecto.

A Gabriela Mendoza y Aurea Alarcón por su valiosa contribución en mi formación en la maestría y en todos los días de mi vida gracias amigas por realizar este viaje a mi lado.

A Olivia Cruz, Alejandro Muñoz, Ada Cartas, Cesar Sierra, Leticia Aguilar, Karina Cruz, Jonás Martínez, Miriam, Lorena, Hernán, Luis por brindarme el apoyo técnico y una gran amistad.

A Xazael Molotla y Alma Vázquez ya que sin su ayuda el estrés me hubiera consumido, y por ser mis muletas en los momentos más difíciles en mi vida personal.



A Rubén Medina por las valiosas lecciones de vida, su paciencia, su contribución y apoyo, tanto en la parte experimental de este trabajo como en mi vida personal.

A mis padres Rosa Rivas e Ismael Higuera por que aun a través de la distancia siempre están conmigo

A mi prima Patricia Gómez por ser una gran hermana y una guía a seguir.

A mi tía Jovita Ramírez por ser siempre una luz en la oscuridad.

A mis primos Fabiola, Jordana, Antonieta, Roberto Sandoval y Moisés Gómez por su compañía invaluable

A Josefina Porras, Angélica Jaime, Michel Canul, Iliana Barrera, por hacer ameno el lugar de trabajo y por su amistad

A la Doctora Carmen Oliver por orientarme en este proyecto y en el siguiente paso de mi vida.

Al profesor Juan Carlos Villaseñor por seguir impulsándome

A la Doctora Guadalupe Arroyo por aceptar orientar este trabajo a pesar de las ocupaciones y el momento de cambio de Director en UPIBI

A Carlos y Adolfo por ser la compañía de mis madres y unos grandes amigos.



## CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Alimentos funcionales	4
2.2. Probióticos	4
2.2.1. Microorganismos identificados como probióticos	4
2.2.2. Beneficios de los probióticos	5
2.2.3. Importancia de las bacterias lácticas	5
2.2.4. Metabolismo de las bacterias lácticas	6
2.3. Prebióticos	7
2.3.1. Oligosacáridos con efecto bifidogénico	8
2.3.2. Inulina y fructooligosacáridos (FOS)	9
2.3.3. Aplicaciones de la inulina y fructooligosacáridos (FOS)	11
2.3.4. Inulina y fructooligosacáridos (FOS) desde el punto de vista funcional	12
2.4. Agave como fuente de inulina	13
2.4.1. Aguamiel	13
2.4.2. Fructooligosacáridos en el aguamiel	14
3. Antecedentes	14
4. Justificación	18
5. Objetivos	19
5.1. Objetivo general	19
5.1.1. Objetivos específicos	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Etapas	20
6.2. Material biológico	20
6.3. Operaciones de acondicionamiento	20
6.4. Análisis químico proximal de la piña	20
6.4.1. Humedad	20
6.4.2. Cenizas	21
6.4.3. Grasa	21
6.4.4. Proteínas	21
6.4.5. Fibra cruda	22
6.4.6. Carbohidratos	23
6.4.7. Acidez titulable	23
6.4.8. pH	23
6.5. Determinación de azúcares	24
6.5.1. Azúcares reductores	24
6.5.2. Azúcares totales	24
6.6. Procesos de extracción de azúcares	24
6.6.1. Proceso de extracción mecánico	24





6.6.2. Proceso de extracción sólido-líquido	25
6.6.3. Raspado tradicional	25
6.7. Determinación de azúcares reductores directos	26
6.8. Pretratamiento del aguamiel	26
6.9. Análisis cualitativo de la inulina	27
6.9.1. Espectroscopia infrarrojo	27
6.9.2. Cromatografía HPEAC-PAD	27
6.9.3. Resonancia magnética nuclear	28
6.10. Análisis cuantitativo de la inulina	28
6.10.1. Determinación de inulina por HPLC	28
6.11. Efecto prebiótico de los FOS en BAL	29
6.11.1. Cinética de crecimiento	30
6.11.2. Determinación de la velocidad máxima	30
6.11.3. Análisis estadístico	30
7. Resultados y discusión	31
7.1. Análisis químico proximal de la piña de <i>Agave salmiana</i>	31
7.2. Procesos de extracción de inulina	31
7.3. Pretratamientos del aguamiel	39
7.4. Identificación cualitativa	40
7.4.1. Espectroscopia infrarroja	40
7.4.2. Cromatografía HPAEC-PAD	44
7.4.3. Identificación de inulinas por resonancia magnética	48
7.5. Análisis cuantitativo de la inulina	54
7.5.1. Determinación del contenido de inulina por HPLC	54
7.6. Efecto prebiótico	57
7.6.1. Cinética de crecimiento MRS con glucosa	57
7.6.2. Cinética de crecimiento MRS sin glucosa	59
7.7. Determinación de la velocidad máxima	65
8. Conclusiones	66
9. Referencias	68



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del aguamiel	2
Cuadro 2. Especies bacterianas empleadas como probióticos en seres humanos	5
Cuadro 3. Oligosacáridos no digeribles con efecto bifidogénico disponibles de manera comercial	9
Cuadro 4. Fuentes vegetales más comunes de inulina	11
Cuadro 5. Condiciones utilizadas en el equipo de detección para la separación de azúcares	28
Cuadro 6. Componentes del medio MRS y su preparación	29
Cuadro 7. Análisis químico proximal de la cabeza de <i>Agave salmiana</i>	31
Cuadro 8. Análisis del extracto, jugo y aguamiel	32
Cuadro 9. Comparación del aguamiel de <i>A.salmiana</i> con la norma	33
Cuadro 10. Características fisicoquímicas de aguamiel de cuatro tipos de maguey de México	37
Cuadro 11. Características del aguamiel en polvo	40
Cuadro 12. Concentración de las inulinas empleadas en g/L	55
Cuadro 13. Velocidad máxima (UFC/mL/h) medio MRS con y sin glucosa	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de levana e inulina	10
Figura 2. Etapas del proceso de extracción y evaluación del efecto prebiótico de inulina del <i>Agave salmiana</i>	20
Figura 3. Esquema del proceso de obtención de jugo de <i>A.salmiana</i>	25
Figura 4. Esquema del proceso de obtención del extracto de <i>A.salmiana</i>	26
Figura 5. Fibra de Agave ( <i>Americana L.</i> )	36
Figura 6. Espectro de IR del extracto obtenido por el proceso de extracción mecánica	41
Figura 7. Espectro de IR del jugo obtenido por el proceso de extracción sólido-líquido	41
Figura 8. Espectro de IR del aguamiel	42
Figura 9. Espectro de IR de la inulina comercial grado alimentario	42
Figura 10. Espectro de IR de la inulina de Achicoria	43
Figura 11. Cromatograma de la inulina utilizada como patrón ( <i>Dalia</i> )	44
Figura 12. Cromatograma de la inulina de la Achicoria	45
Figura 13. Cromatograma de la inulina de la separación de maltodextrina	45
Figura 14. Cromatograma de la inulina de <i>Agave salmiana</i>	46
Figura 15. Cromatograma del aguamiel liofilizado	46
Figura 16. Cromatograma del aguamiel precipitado con alcohol previo al liofilizado	47
Figura 17. Cromatograma del aguamiel secado por aspersión	48
Figura 18. Espectro de RMNH <sup>-1</sup> de la inulina extraída de <i>Agave salmiana</i>	49
Figura 19. Espectro de RMNH <sup>-1</sup> de la inulina extraída de <i>Agave americana</i>	50
Figura 20. Molécula de inulina y agavina	50



Figura 21. Ampliación del espectro de RMNH <sup>-1</sup> de la inulina de <i>Agave salmiana</i>	51
Figura 22. Espectro de RMNH <sup>-1</sup> para la inulina comercial grado químico	52
Figura 23. Espectro de RMNH <sup>-1</sup> de la inulina extraída de Achicoria	53
Figura 24. Espectro de RMNH <sup>-1</sup> de la inulina grado comercial	53
Figura 25. Espectro del análisis de inulinas empleando HPLC	55
Figura 26. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (4 g/L)	57
Figura 27. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (12 g/L)	58
Figura 28. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (20 g/L)	58
Figura 29. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (4 g/L)	59
Figura 30. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (12 g/L)	60
Figura 31. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (20 g/L)	60



## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto prebiótico del aguamiel extraído del maguey *Agave salmiana*, sobre la cepa bacteriana *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (BAL). La investigación se realizó en dos etapas principales, la primera consistió en la evaluación de tres fuentes de obtención de carbohidratos del maguey, para lo cual se evaluó la extracción mecánica del jugo obtenido de la piña de maguey, la extracción sólido-líquido de la misma y el aguamiel obtenido de manera tradicional mediante el raspado del maguey. De esta primera etapa se seleccionó el aguamiel, el cual fue sometido a un proceso de liofilización, otro de precipitación con alcohol, previo al proceso de liofilización y un tercero a un secado por aspersión. Este último procedimiento generó un producto terminado de fácil manejo.

En la segunda etapa se determinó el crecimiento microbiano de la bacteria láctica *L. delbrueckii* cultivada en medio MRS con y sin glucosa, el cual fue complementado con inulina de aguamiel y se comparó con los medios complementados con inulinas comerciales grado químico y alimentario, todas las inulinas se adicionaron en concentraciones de 4, 12 y 20 g/L. El contenido de inulina obtenido fue 4.457 g/L en la extracción mecánica, 9.522 g/L en la extracción sólido-líquido, y 15.981 g/L en el aguamiel.

La respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento de la BAL se analizó por medio de un ANOVA de medidas repetidas, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano. Se observó que la inulina obtenida del aguamiel incrementó el crecimiento de bacterias lácticas al igual que las inulinas controles empleadas. Hallándose diferencias significativas con la inulina grado químico y comercial. Siendo la mayor velocidad específica de 1.6972 UFC/mL/h para la mayor concentración, inulina grado químico, y medio MRS sin glucosa.

La evaluación realizada sirve como base para investigaciones posteriores con perspectiva de emplear esta fuente potencial de azúcares como una sustancia nutracéutica.



## **ABSTRACT**

In this work we studied the prebiotic effect of aguamiel extracted from maguey *Agave salmiana*, on the bacterial *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (BAL). The research was conducted in two main stages; the first was the evaluation of three carbohydrate sources for obtaining the maguey, which was evaluated for mechanical extraction of pineapple juice obtained from the maguey, the solid-liquid extraction of the pineapple and aguamiel traditionally obtained by scraping the maguey. From this first stage we selected the aguamiel, which was subjected to a lyophilization process, another alcohol precipitation, prior to the lyophilization process and a third to a spray-dried. The latter procedure produced a finished product easy to use.

In the second stage determined the microbial growth of lactic bacteria *L. delbrueckii* grown in MRS medium with and without glucose, which was supplemented with aguamiel inulin and compared with media supplemented with commercial inulin chemical and food grade, all inulins were added at concentrations of 4, 12 and 20 g/L.

The content of inulin obtained was 4.457 g/L in the mechanical extraction, 9.522 g/L in the solid-liquid extraction, and 15.981 g/L in the aguamiel.

The response to different growth conditions of the BAL was analyzed using a repeated measure ANOVA, finding statistically significant differences between the culture media used for bacterial growth. It was observed that inulin from the aguamiel increased the growth of lactic bacteria as the inulins controls used. Find significant differences in the chemical and commercial grade inulin. Being faster specific speed was 1.6972 CFU/mL/h for the highest concentration, inulin chemical grade, and MRS medium without glucose.

The assessment serves as the basis for further research perspective to use this potential source of sugars as a nutraceutical substance





## **1. INTRODUCCIÓN**

El maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave salmiana*) es una planta suculenta de origen mexicano. Taxonómicamente es una especie complicada con un gran número de formas morfológicas, sin embargo, sólo se reconocen tres variedades y una subespecie: *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. salmiana* var. *angustifolia*, *A. salmiana* var. *ferox* y *A. salmiana* subsp. *crassispina* (Cortés y Basurto, 2007). Existen otras variedades que también producen aguamiel para la producción de pulque como son: *A. atrovirens* Karw., *A. mapisaga*, *A. hookeri*, *A. americana* (Scott, 2004). Los principales magueyes productores en el Valle de México son: *A. teometl* Zucc., *A. weberi* Cels., *A. altísima* Jacobi., *A. compliata* Trel., *A. gracillispina* Englem., *A. malliflua* Trel., *A. quitifera* Trel., *A. mapisaga* Trel. (García, 1994; Ramírez y Gentry, 1982).

El pulque es el principal producto del cual se deriva el nombre genérico de la planta a nivel popular (“maguey pulquero”), esta bebida es un fermento del aguamiel. El maguey manso y los agaves pulqueros en general tardan de 8 a 12 años para florecer, momento en el que son aprovechados para la extracción de aguamiel, éste se extrae del área donde nace el cogollo y la yema vegetativa, antes de la floración. Ambos se cortan y posteriormente por medio del raspado o desgaste de esta zona se forma una cavidad en el centro, hacia la cual escurre la savia dulce o aguamiel. Cada individuo puede producir de 500 a 1000 litros de aguamiel en su vida productiva, que tiene un período de unos cuantos meses (Alfaro *et al.*, 2007).

El pulque se produce mediante la fermentación del aguamiel, posteriormente se almacena en tinacales durante 8 a 30 días para su fermentación etapa que se lleva a cabo por medio de algunas bacterias como *Zimomonas mobilis*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, las cuales confieren la viscosidad característica, mientras que el grado alcohólico lo proporcionan las levaduras *Saccharomyces* (Peña *et al.*, 2004). Este producto ha sido por mucho tiempo una bebida muy popular y parte importante de la cultura en México. El aguamiel también se toma como bebida refrescante, atole, se produce miel, la cual se consume como endulzante y golosina.

Tanto en forma de aguamiel como de pulque, se les consideran bebidas con propiedades alimenticias por sus azúcares, aminoácidos esenciales y vitaminas. Sus propiedades curativas son muchas, presentando gran diversidad de preparaciones y formas de ser aplicados. Por estas razones el maguey ha sido calificado como excepcional (Cortés y Basurto, 2007).



El aguamiel puede ser una fuente importante de elementos nutricionales para consumo humano cuya composición química se ilustra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química del aguamiel

Componente	mg/L
Densidad	10.490
Acidez	0.680
Glucosa	0.120
Sacarosa	94.500
Gomas	6.000
Albuminoides	8.060
Cenizas	4.500

Fuente: Granados, 1993

También contiene agua, fructosa, minerales como hierro y zinc en cantidades de 21.500 y 14.100 mg/L, respectivamente y vitamina C (Loyola, 1956; Cravioto *et al.*, 1953). En evaluaciones recientes, se ha detectado la presencia de inulina (Silos *et al.*, 2007). Es un producto que contiene fructosa en mayor cantidad que glucosa, la cual esta prohibida en grandes cantidades para el diabético, sin embargo, la fructosa no estimula la secreción digestiva de la insulina y es de los azúcares que más se recomiendan para este tipo de pacientes (Matarese y Gottschlich, 2004).

Durante los últimos años, nuevos conceptos han emergido en relación con la ciencia de la nutrición; como, por ejemplo, los alimentos nutracéuticos o funcionales. Tanto la inulina como los FOS (fructooligosacáridos), han sido reconocidos oficialmente como ingredientes funcionales en Europa y se clasificaron como fibra dietética en la mayoría de estos países. El consumo diario se estima en 1 a 4 g en EEUU. (Moshfegh *et al.*, 1999) y entre 3 a 12 g en Europa (Van *et al.*, 1995).

La fibra dietética es el remanente de las partes comestibles de los vegetales que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado y tiene una fermentación parcial o completa en el intestino grueso; incluye polisacáridos, oligosacáridos (presentes en el agave pulquero) y otras sustancias. La fibra dietética promueve efectos fisiológicos importantes en el cuerpo, tales como efecto laxante, disminución del colesterol sanguíneo, disminución de la glicemia, por lo que ha adquirido gran importancia en nutrición y salud. Actualmente, es el ingrediente más utilizado en la elaboración de alimentos nutracéuticos, representando más de un 50% del total de ingredientes





del mercado y se encuentra en expansión como suplemento dietético y farmacéutico (Abundis, 2007).

La inulina y los oligosacáridos han destacado porque son capaces de aumentar la absorción de calcio o de reducir el colesterol; propiedades que dependen de sus características estructurales. Por otro lado, el concepto de que el uso de determinados alimentos o sus componentes pueden influir en las características fisiológicas del tracto gastrointestinal y tener efectos beneficiosos para el individuo, ha despertado mucho interés, especialmente aquellos relacionados con los efectos prebióticos; nutrientes de bacterias que colonizan el intestino grueso y que promueven la salud (Abundis, 2007).



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES**

El apresurado ritmo de vida actual, así como el alto grado de estrés al que estamos sometidos, sin importar el área en que nos desempeñamos, han obligado a modificar la alimentación, haciendo cada vez más difícil encontrar el punto medio entre las necesidades orgánicas y las exigencias sociales tan comunes como trabajo y escuela. En este contexto, han surgido los llamados alimentos funcionales, considerados como aquellos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad (Sanz *et al.*, 2003). Entre los más importantes se encuentra los probióticos y prebióticos.

### **2.2. PROBIÓTICOS**

Los probióticos forman parte de uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales, los cuales han sido consumidos en productos tales como el yogur, probablemente desde hace cientos de años, sin embargo, fue hasta los años noventas del siglo XX cuando los científicos comenzaron a investigar el vínculo que existía entre la salud y la longevidad, efecto provocado por la ingesta de un producto lácteo fermentado (yogur) gracias a la observación de Elie Metchnikoff en el Instituto Pasteur (Nagendra, 2007).

Desde ese tiempo se ha intentado definir la palabra probiótico, considerada en sus inicios como "cualquier sustancia secretada por un organismo para el crecimiento y estimulación del desarrollo de otro" (Lilly y Stillewell, 1965) hasta nuestros días, cuya definición es: "Productos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microflora de un compartimiento del huésped, ejerciendo así un efecto beneficioso sobre la salud de éste" (Schrezenmeir y Vrese, 2001).

#### **2.2.1. MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS COMO PROBIÓTICOS**

En términos de capacidad de crecimiento y viabilidad bacteriana las especies más utilizadas como probióticos en el ser humano se muestran en el Cuadro 2 (Itsaranuwat *et al.*, 2003).



Cuadro2. Especies bacterianas empleadas como probióticos en seres humanos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

Fuente: Itsaranuwat *et al.*, 2003

### 2.2.2. BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS

Un gran número de beneficios se han mencionado a favor de los productos que contienen probióticos, incluyendo actividad antimicrobiana y prevención de infecciones gastrointestinales. Ayudan al metabolismo de la lactosa, tienen propiedades antimutagénicas, anticarcinogénicas, reducen el colesterol, son antidiarreicos, estimulan el sistema inmune (Nagendra, 2007), reducen reacciones inflamatorias, previenen el cáncer de colon, reducen alergias causadas por cierto tipo de alimentos, modifican la flora benéfica fomentando su desarrollo (Simmering y Blaut, 2001).

### 2.2.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Desde hace millones de años, entre el hombre y los microorganismos de su entorno, se ha desarrollado una colaboración mutua. Esta simbiosis encuentra su máximo exponente en la variada composición de la flora intestinal. El intestino alberga cerca de 100 billones de bacterias, que supera varias veces la cifra de células del organismo. Un grupo muy importante para el mantenimiento de la salud del ser humano es el constituido por las bacterias lácticas, microorganismos Gram negativos, capaces de colonizar de forma natural, grandes segmentos del tubo digestivo humano, para desempeñar distintas funciones, dentro de las cuales destacan:

- Producción de ácidos láctico y acético que estabilizan el grado de acidez del contenido intestinal, que originalmente es ligeramente ácido.



- Favorecer la función de barrera natural del intestino.
- Producción de sustancias micromicidas (peróxido de hidrogeno) que estabilizan el equilibrio de la microbiota intestinal.
- Formación de ácidos grasos de cadena corta, mediante los cuales se estimula la peristalsis intestinal y se favorece la digestión.
- Absorción de minerales como calcio y vitaminas del complejo B, que contribuyen al mantenimiento de la salud.

Estas funciones se pueden ver disminuidas por el consumo excesivo de antibióticos, corticoides, laxantes, alcohol, tabaco o por una alimentación no variada o más rica en energía y pobre en fibra (Symbiopharm, 2007).

#### **2.2.4. METABOLISMO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

Los lactobacilos tienen requerimientos muy complejos para su crecimiento. Requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales. Las bifidobacterias pueden crecer en medios semi-sintéticos que contengan sólo lactosa, tres aminoácidos libres (cisteína, glicina y triptofano), muchas vitaminas y nucleótidos, lo que contrasta con los grandes requerimientos nutricionales de los lactobacilos. Los lactobacilos fermentan glucosa a ácido láctico, en el caso de una homofermentación, o producen cantidades equimolares de ácido láctico y CO<sub>2</sub> en el caso de la heterofermentación (Gomes y Malcata, 1999).

Las bacterias ácido lácticas producen ácidos grasos de cadena corta, en diversas cantidades como productos metabólicos, los cuales ejercen acción antagónica contra otros organismos (Fooks *et al.*, 1999). Se ha sugerido que las bacterias ácido lácticas, tienen la habilidad de eliminar bacterias patógenas al convivir estrechamente con ellas, ya que producen sustancias antimicrobianas. La mayor parte de estas sustancias son ácidos orgánicos, especialmente láctico y acético. Pueden producir también peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono. Si las bacterias ácido lácticas están metabólicamente activas durante su paso a través de los intestinos, es muy probable que algunas de las sustancias mencionadas se produzcan. Algunos indicadores de esto provienen de la observación de que ciertas cepas probióticas reducen el pH de las heces fecales, lo que indica la producción de ácidos orgánicos. La producción de otros componentes antimicrobia



nos como diacetilo, ácido piroglutámico y bacteriocinas, no es muy común bajo condiciones *in vivo* (Ouwehand *et al.*, 1999).

### **2.3. PREBIÓTICOS**

Otra alternativa orientada a la mejora funcional de los alimentos mediante la modulación de la flora intestinal la constituyen los prebióticos (Aggett *et al.*, 2003). Estos tienen una larga historia y el término originariamente fue empleado por Hipsley en 1953, donde se les consideraba como constituyentes, principalmente polisacáridos, extraídos de fuentes vegetales, los cuales eran resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas que posee el ser humano. El término fue evolucionando y actualmente la definición más aceptada es la siguiente: “ingredientes alimentarios no digeribles que, selectivamente, favorecen el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos, existentes en el tracto gastrointestinal del individuo” (Gibson y Roberfroid, 1995a).

El concepto de prebiótico surgió de la observación de que ciertos azúcares estimulaban el crecimiento de bacterias benéficas. Posteriormente, se descubrió que los oligosacáridos eran el componente activo para este comportamiento (Weston y Brocklebank, 1999). Ciertas configuraciones o enlaces de oligosacáridos, los colocan dentro de la clasificación de carbohidratos no digeribles y en la mayoría de los casos, se encuentran de manera natural en fuentes vegetales (Crittenden, 1999).

Comercialmente son producidos vía enzimática, por hidrólisis de polisacáridos o por síntesis a partir de azúcares pequeños utilizando transglucosilasas, sin embargo, los productos comerciales con aplicaciones en alimentos no son químicamente homogéneos (Crittenden y Playne, 1996a).

Inicialmente los oligosacáridos fueron desarrollados como sustitutos de sacarosa, después se determinó que podían potencializar el desarrollo de bifidobacterias en el colon. Actualmente son empleados como ingredientes funcionales por su efecto prebiótico. Existen gran variedad de carbohidratos no digeribles empleados comercialmente, que tienen propiedades bifidogénicas, entre los cuales tenemos (Crittenden y Playne, 1996b):

1. Fructanas: en este tipo se incluye la inulina y los fructooligosacáridos (FOS). La inulina se extrae de fuentes vegetales como Achicoria. Los fructooligosacáridos se producen por transfructosilación de la sacarosa, empleando  $\beta$ -fructosidasa o bien por hidrólisis de la inuli



- na vía enzimática. Se emplean como sustituto de azúcar y grasa, para modificar la textura de ciertos alimentos, salsas, aderezos, bebidas, productos de panificación, postres congelados, coberturas bajas en grasas, jarabes, pays y suplementos dietéticos.
2. Galacto-oligosacáridos (GOS): están constituidos por una lactosa central con uno o más residuos de galactosa unidos por enlaces  $\beta$  1-3,  $\beta$  1-4 y  $\beta$  1-6. Se obtienen por transgalactosilación de la galactosa. Han sido adicionados en fórmulas lácteas para bebés, postres congelados, cremas etc. Tienen efecto directo sobre la microbiota intestinal.
  3. Oligosacáridos de soya (SOY): se componen de residuos de galactosa unidos por enlaces  $\alpha$  1-6 a una sacarosa central. Se extraen de la soya. Se emplean como sustituto de azúcar. Tienen actividad en la flora intestinal.
  4. Isomalto-oligosacáridos (IMO): se componen de residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$  1-6. Se extraen del mijo, soya, miel etc. Se obtienen de manera comercial por transglucosilación de residuos de glucosa mediante transglucosidasas. Tienen efecto directo sobre la microbiota intestinal.
  5. Xilo-oligosacáridos (XOS): son residuos de xilosa unidos por enlaces  $\beta$  1-4. Se obtienen por hidrólisis parcial vía enzimática empleando polixilanas o xilanasas. No son hidrolizados por las enzimas del tracto intestinal y tienen efecto sobre los lípidos en la sangre. Estos son más estables a pH ácido que otros prebióticos.
  6. Transgalactosiloligosacáridos (TOS): se componen de galactopiranososa unida por enlaces  $\beta$  1-6 a una  $\alpha$ -D-glucosa por enlaces  $\alpha$  1-4. Se producen de forma natural por la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Tienen efecto en la actividad metabólica de la microflora intestinal.
  7. Gluco-oligosacáridos (GOS): son mezclas de  $\alpha$ -D-glucosa. Se obtienen por transglucosilación empleando  $\alpha$ -glucosidasa. Se utilizan en salsas, aderezos para ensalada, cremas y productos parcialmente hidrolizados. Tienen efecto directo sobre la microbiota intestinal.

### **2.3.1. OLIGOSACÁRIDOS CON EFECTO BIFIDOGÉNICO**

El efecto bifidogénico, es considerado como la proliferación de las bacterias beneficiosas, principalmente Lactobacilos y Bifidobacterias y el fomento de su selectividad metabólica, de tal forma, que se mejora la absorción de nutrientes, se acelera el tránsito intestinal y se refuerzan las defensas del sistema inmune (Moreno, 2008).



De manera general, los monosacáridos que al enlazarse para formar oligosacáridos, y que presentan un efecto bifidogénico son: glucosa, galactosa, xilosa y fructosa. Los oligosacáridos mas representativos con esta propiedad se enlistan en el Cuadro 3 (Solange y Mussatto, 2006).

Cuadro 3. Oligosacáridos no digeribles con efecto bifidogénico disponibles de manera comercial.

Oligosacáridos con efecto bifidogénico	
Componente	Estructura
Ciclodextrinas	Glucosa
Fructooligosacáridos	Fructosa-Glucosa
Galactooligosacáridos	Galactosa-Glucosa
Glucosilucrosa	Glucosa-Fructosa
Isomaltooligosacáridos	Glucosa
Lactosucrosa	Galactosa-Glucosa-Fructosa
Xilooligosacáridos	Xilosa

Fuente: Solange y Mussatto, 2006

### 2.3.2. INULINA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS)

Las fructanas son consideradas como oligo y polisacáridos resistentes, que contiene como unidad monomérica, fructosa (Englyst *et al.*, 1995). Las podemos dividir en dos clases (Van *et al.*, 1995):

- 1) Levanas: son fructanas unidas por enlaces  $\beta$  2-6, con varios grados de enlaces o ramificaciones  $\beta$  2-1. Son producidas por una gran variedad de bacterias como: *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus reuteri.*, *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae pv glycinea*, *P. syringae pv phaseolicola* y *Acetobacter diazotrophicus*. Este tipo no esta disponible comercialmente. Figura 1A.
- 2) Inulinas: son producidas por la mayoría de las plantas dicotiledóneas como carbohidratos de reserva. Se obtiene de manera industrial de la raíz de Achicoria, por extracción con agua caliente, seguida de una refinación y un secado por aspersion. Es una mezcla polidispersa de moléculas lineales, todas ellas bajo la estructura química simbolizada como G-Fn (G=glucosa terminal, Fn= n-número de fructosas unidas entre si mediante enlaces  $\beta$  2-1 o Fn sin glucosa terminal. Figura 1B.

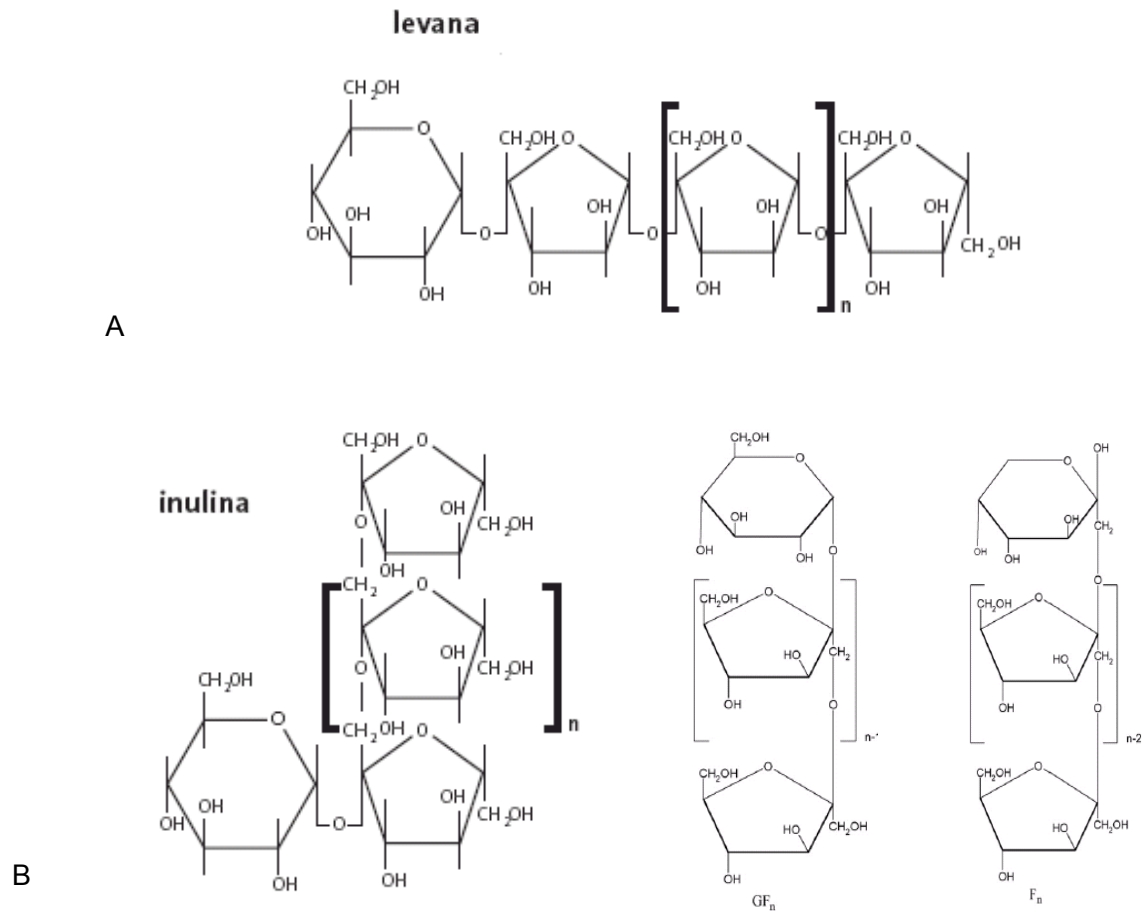


Figura 1: A Estructura básica de fructana tipo levana. B Estructuras de inulina (López et al., 2003).

Los fructooligosacáridos (FOS), son producidos por la hidrólisis enzimática de la inulina o transfructosilación de la sacarosa. Los FOS se diferencian de los fructo-polisacáridos (inulina), solo por el grado de polimerización, los FOS poseen de 3-10 unidades monoméricas, mientras que la inulina llega a poseer de 10-60 (Baghurst *et al.*, 1996).

Son constituyentes comunes de un gran número de fuentes vegetales como las mostradas en el Cuadro 4 y son considerados como fibra dietaria (Worawuthiyanan *et al.*, 2006).





Cuadro 4. Fuentes vegetales más comunes de inulina

Vegetal	Contenido de inulina (%)
Achicoria <sup>1</sup>	15-20
Trigo <sup>1</sup>	1-4
Ajo <sup>1</sup>	9-16
Cebolla <sup>1</sup>	1-8
Plátano <sup>1</sup>	0.3-0.7
Espárrago <sup>1</sup>	2-3
Porro <sup>1</sup>	3-10
Alcachofa <sup>1</sup>	16-20
<i>Agave<sup>2</sup> tequilana</i>	20-24

Fuente: <sup>1</sup>Worawuthiyanan *et al.*, 2006 y <sup>2</sup>Arrazola, 1969

### 2.3.3. APLICACIONES DE LA INULINA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La inulina tiene sabor neutro, por lo que se puede combinar fácilmente con otros ingredientes. Es moderadamente soluble en agua. Contribuye a la textura y palatabilidad de los productos a los cuales se adiciona. Tiene una excelente capacidad para remplazar las grasas, cuando se mezcla con agua forma un gel, ofreciendo una estructura cremosa, que da palatabilidad similar a la textura de los productos que contienen grasa. Puede emplearse como estabilizador de emulsiones, así como, en sinergismo con otros geles (Van *et al.*, 1995).

Los FOS son más solubles en agua y poseen un sabor moderadamente dulce, lo que los hace magníficos, para ser empleados como sustitutos de azúcar. En combinación con otros azúcares, pueden potenciar el sabor afrutado de ciertos productos. Contribuyen a la textura, muestran propiedades humectantes, reducen la actividad de agua, y los efectos que sufren los productos, al someterse a cambios bruscos de temperaturas, ya sea productos que se escaldan, hierven o congelan (Van *et al.*, 1995).

La aplicación de ambos como fibra dietaria, les confiere propiedades organolépticas a los productos, por lo que son altamente empleados en yogurs, leches fermentadas, bebidas, postres, alimentos bajos en grasas y como sustitutos de azúcares (Van *et al.*, 1995).



### **2.3.4. INULINA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) DESDE EL PUNTO DE VISTA FUNCIONAL**

Desde el punto de vista funcional la inulina y los fructooligosacáridos, no son hidrolizados por las enzimas digestivas del ser humano, tampoco se absorben en la parte superior del tracto intestinal. Ambos son cuantitativamente fermentados, por la microbiota localizada en el colon y estimulan selectivamente el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias. Tienen efectos importantes en la profilaxis de desordenes gastrointestinales (Roberfroid *et al.*, 1998).

La inulina y los fructooligosacáridos pueden ser considerados como fibra dietaría, ya que incrementan la biomasa del colon. Su fermentación, produce ácidos grasos de cadena corta como ácido propiónico, butírico, acético y láctico, lo que disminuye el pH. A través de la reabsorción de estos ácidos, se puede rescatar un aporte energético que va de 1-1.5 Kcal/g. El ácido butírico juega un papel importante en el mantenimiento de la función de las células epiteliales, previniendo el cáncer de colon, ya que puede modular la actividad de las enzimas bacterianas, que están asociadas con este padecimiento, así mismo, regula los químicos que causan las lesiones precancerígenas y los tumores de colon, vía modulación y diferenciación de actividades metastáticas de las células tumorales, inhibiendo su crecimiento. Una vez que la inulina y los FOS son aprovechados por las bacterias lácticas, estas modulan el metabolismo de lípidos, hormonas, respuesta inmune, ya que previenen infecciones gastrointestinales, atenuando la virulencia de agentes patógenos y su adherencia, ayudan a la absorción de nutrientes en el intestino y a disminuir la intolerancia hacia ciertos alimentos (Reddy *et al.*, 1997).

Las fracturas de los huesos debido a la osteoporosis aumentan con la edad. La misma enfermedad, afecta a una de cada tres mujeres, después de la menopausia. Normalmente el 50% del calcio consumido en la dieta es absorbido y depositado en los huesos, con la edad, el porcentaje de absorción se ve disminuido, ocasionando problemas graves de salud. La inulina y los fructooligosacáridos aumentan la superficie del área intestinal (a nivel de microbiota), para que se realice con mayor eficacia esta función y por lo tanto se aumenta la biodisponibilidad de algunos minerales esenciales, como el calcio y el magnesio. La absorción se incrementa, a medida que aumenta la difusión a nivel pared celular del calcio y el transporte del mismo, a través del intestino por aumento de la codificación de genes, para la unión calcio-proteína. Se ha podido comprobar el aumento de calcio en el fémur, así como, la densidad mineral por retención de calcio de manera general en los huesos al utilizar estos prebióticos (Heaney ,1996).



Varios oligosacáridos no digeribles, han sido estudiados por sus efectos en la comunidad microbiana, que se localiza en el tracto intestinal, principalmente en el colon. Con lo que se ha podido evidenciar su efecto en el incremento de la biomasa, su incremento en la producción de cadenas cortas de ácidos grasos, la estimulación del crecimiento y actividad de bacterias ácido lácticas, el aumento de la disponibilidad de minerales, la capacidad de regular el nivel de triglicéridos y colesterol y disminuir el riesgo de cáncer de colon (Reddy *et al.*, 1997).

#### **2.4. AGAVE COMO FUENTE DE INULINA**

Varios estudios indican que las piñas o cabezas de los agaves son ricos en carbohidratos, entre los que se encuentra la inulina (Arrazola, 1969). Se han realizado análisis en piñas de *Agave tequilana* Weber, que muestran que el contenido de carbohidratos es de 75%, se ha identificado azúcares como glucosa, dextrina, almidón y principalmente inulina, que representa el 24% de los azúcares totales (Arrazola 1969), comparándola con otras variedades, como carpintero, bermejo, pata de mula, zopilochino, que contienen entre 15-20% de inulina, sin embargo, también se colocan dentro del rango alto de contenido de inulina, tal como la fuente principal de extracción a nivel industrial; la Achicoria (López *et al.*, 2003; Mancilla y Lopez, 2006). No se reportan datos para el *Agave salmiana*.

##### **2.4.1. AGUAMIEL**

El agave pulquero (*Agave salmiana*) planta de la familia *Agavaceae*, crece en el altiplano semiseco y frío de México. El aguamiel, es un fluido obtenido del agave. El fluido se produce en las plantas adultas y se obtiene de la etapa previa a la floración. El jugo se acumula en la parte baja de la planta (mesontete). Este fluido es rico en carbohidratos como inulina, sacarosa y fructosa (Moreno, 2008), además contiene pequeñas cantidades de aminoácidos y vitaminas. Desde hace 400 años, el jugo del agave (aguamiel), se fermenta y se obtiene una bebida alcohólica ligera denominada pulque. Esta bebida, tuvo una importancia elevada desde el punto de vista comercial; sin embargo en la actualidad ya no la tiene a raíz de la incursión de la cerveza, que la ha desplazado y orillado a la casi extinción del cultivo de este tipo de maguey (Flores *et al.*, 1996).



#### 2.4.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN EL AGAVE

En los agaves, los principales polímeros de reserva energética son los fructooligosacáridos (FOS), cuya estructura y peso molecular depende de la especie (López *et al.*, 2003). En México existen diversos géneros de agave, los cuales han desarrollado algunas adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir, una de éstas adaptaciones fisiológicas es el uso del metabolismo ácido (Wang y Nobel, 1998), donde el principal producto son los fructanos o fructooligosacáridos, que son de naturaleza glucosídica, de interés benéfico a la salud como prebiótico y fibra soluble, así como por sus propiedades funcionales (Kaur y Gupta, 2002), además de encontrarlos como componentes naturales de frutas, hortalizas, cereales, etc. Desde el punto de vista económico, el agave es de particular interés, no sólo por su empleo en la industria de la fermentación, sino por las amplias posibilidades para su aprovechamiento integral (Sánchez, 1979).

### 3. ANTECEDENTES

Los cuatro principales grupos de bacterias que representan la microflora colónica pertenecen a los géneros: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus* en concentraciones de  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$  UFC/g aproximadamente, estos organismos se conocen como flora dominante. La flora subdominante o secundaria está compuesta por *Streptococcus*, *Lactobacillus* y en menor cantidad *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y levaduras de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  UFC/g (Danone, 2002). De ahí la importancia de ampliar productos que estimulen el desarrollo tanto de *Lactobacillus* como de *Bifidobacterium*, cepas probióticas importantes para fomentar la salud.

Existen estudios significativos *in vivo* donde se ha visto un incremento considerable en el número de bacterias lácticas del tipo *bifidobacterium*. Gibson *et al.* (1995b), realizaron la estimulación específica de bifidobacterias en el colon humano, a partir de la adición de oligofruktosa e inulina. En el estudio se demuestra el crecimiento preferencial de Bifidobacterias, mientras se atenúa o se disminuye en número, microorganismos como *E.coli* y *Clostridium perfringens*. El estudio consistió en someter a 8 individuos a un sistema controlado, donde 4 de ellos fueron alimentados los primeros 15 días con 15 g al día de oligofruktosa, los siguientes 15 días con 15 g de sacarosa y los últimos 15 con 15 g de inulina, al final se compararon los resultados con los que no consumieron estas azúcares. Ambos tanto la inulina como la oligofruktosa, dieron un porcentaje de 71% de *Bifidobacterium* y 26% de bacterias patógenas, mientras que el porcentaje de *Bifidobacterium* en los individuos que no consumieron inulina y oligofruktosa fue de 20% y de bacterias patógenas de 65%.



La influencia de fructooligosacárido (FOS) en la capacidad de combatir a *Salmonella typhimurium* en pollos, fue investigado por Bailey *et al.* (1991), que realizaron el análisis en laboratorio que demostró que *Salmonella* no creció, cuando los FOS fueron la única fuente de carbono. En el estudio *in vivo*, a la concentración de 0.75% de FOS, menos del 12% de aves alimentadas con FOS fueron colonizadas con *Salmonella*, en comparación con el control de las aves. Los pollos tratados con FOS, tuvieron una reducción de cuatro veces el nivel de *Salmonella*. Lo que demostró que la incorporación de FOS en la dieta, pudo modificar la flora microbiana fortaleciendo el sistema inmune.

Otras investigaciones, muestran que la molécula de la inulina, no es digerida por las enzimas digestivas del ser humano y puede llegar intacta al colon, donde se fermenta. Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro*, con respecto al incremento de bacterias benéficas de bifidobacterias y lactobacilos, por la adición de inulina y sus derivados, como la oligofructosa (Solis, 2008).

De acuerdo al estudio del Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas, por sus siglas en inglés ESPGHAN, publicado en noviembre de 2004, hasta enero del mismo año, había 3 ensayos clínicos aleatorizados (ECA) en que se añadió suplementos de inulina y FOS a fórmulas infantiles. Estos 3 estudios incluyen un total de 286 niños (148 en el grupo experimental y 138 controles). En todos los casos se empleó una mezcla de inulina (90%) y FOS (10%), y en uno de ellos se utilizó una concentración variable de 0.4, 0.8 y 1 g de FOS por 100 mL. Se obtuvo un incremento de bifidobacterias y lactobacilos el cual es dependiente de la concentración, a mayor concentración mayor incremento de bacterias ácido lácticas (Miñana, 2007).

En los tres estudios anteriores, la modificación en la flora intestinal, se evaluó por sondas fluorescentes, dirigidas a las regiones de diagnóstico de la molécula de ARNr 16S, de los microorganismos tomados de la muestra de heces del paciente antes y después de consumir los azúcares prebióticos, de igual manera se realizó en el estudio con animales.

En cuanto a estudios importantes *in vitro* se encuentran los siguientes: Gibson y Wang (1994), confirmaron el efecto prebiótico de la inulina y la oligofructosa, mediante la fermentación en cultivo continuo de *Bifidobacterium*, en presencia de estos azúcares, comparado con el control, en presencia de glucosa. Los datos de crecimiento bacteriano, demostraron una preferencia por el



desarrollo de *Bifidobacterium*, mientras que poblaciones como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* se mantuvieron en niveles bajos. El estudio confirmó una mayor capacidad fermentativa de las bifidobacterias en el medio suplementado que en el medio que solo contenía glucosa.

Karppinen *et al.* (2000), realizaron la comparación de la fermentación *in vitro*, de bacterias encontradas en las heces fecales, utilizando como sustratos principales, los polisacáridos del centeno, trigo y salvado de avena, contra la fuente de carbono inulina. La inulina fue el sustrato que las bacterias degradaron con mayor rapidez en la fermentación, obteniéndose alta producción de butirato, la mayor disminución de pH, y la mayor formación de gas.

Kaplan y Hutkins (2000), hicieron una selección controlada de 24 bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, evaluando su habilidad de fermentar la inulina y la oligofruktosa en medio MRS, 12 de 16 cepas de *Lactobacillus* y 7 de 8 cepas de *Bifidobacterium* probadas, fueron capaces de fermentar los sustratos. Hopkins *et al.* (1998), documentan la actividad de 7 cepas de *Bifidobacterium*, aisladas de un proceso de fermentación en cultivo por lote, realizado con 15 diferentes fuentes de carbono. Sghir *et al.* (1998), utilizaron cultivo continuo y demostraron por medio de técnicas moleculares, que la inulina y la oligofruktosa, eran fermentadas selectivamente, no solo por *Bifidobacterium* también por *Lactobacillus*.

Con respecto al agave como fuente de inulina, la especie mas estudiada ha sido el *Agave tequilana* Weber, se ha empleado para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de inulina, a partir de piñas de agave azul por Salazar *et al.* (2008), trabajaron dos factores para evaluar la extracción, los cuales fueron, temperatura del medio de extracción (Te) y relación agua-sólido (a/s). Las Te probadas fueron 60, 80 y 85 °C y las a/s fueron 1, 2 y 4 (volumen de agua en mL/masa de sólido en gramos). Siendo 80 °C y la relación a/s=4, las condiciones que brindaron la mayor extracción de inulina, determinada como la diferencia de azúcares totales menos azúcares reductores.

Con respecto a otros agaves pulqueros, se han realizado estudios en *Agave atrovirens* Karw, donde se avaluó la deshidratación del extracto de maguey, para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructooligosacáridos, por Martínez *et al.* (2007). El propósito de esta investigación, fue obtener un producto deshidratado con alto contenido de fructooligosacáridos



(FOS), a partir del jugo de maguey extraído de la penca (*Agave atrovirens* Karw) mediante un proceso de secado por aspersion con temperaturas de entrada/salida del aire de secado: 90/50, 120/104, 150/125, 180/150 y 200/150 °C. A las muestras obtenidas se les evaluó: diámetro medio de partícula, morfología de la partícula; así como humedad, humectabilidad y densidad empacada. El rendimiento del polvo obtenido fue de 38 a 42%, con un Grado de Polimerización (DP, del inglés degree of polymerization) medio de 3.3 a 4.3. El extracto fue obtenido triturando muestra fresca de la piña de agave, se diluyó en agua y se agitó por 15 min a 80 °C, se aforó a 100 mL con agua destilada, se filtró y se determinó azúcares reductores totales libres (fructosa y glucosa), la conversión de azúcares reductores a inulina se lleva a cabo considerando el DP límite de una molécula con el mayor DP, considerando a este último como el DP de la inulina de *Dalia* que es 30. Martínez (1999), realizó la hidrólisis de inulina en el aguamiel del agave pulquero; *Agave atrovirens*. El objetivo de este trabajo fue determinar si en el aguamiel se encontraba la inulina en alta proporción. La cuantificación se realizó por hidrólisis enzimática y química, ambas hidrólisis permitieron constatar que la cantidad de fructosa liberada es mayor que la glucosa, por lo cual se deduce que en el aguamiel existen cadenas de fructosa o polifruktanos, es decir inulina



#### 4. JUSTIFICACIÓN

La inulina es considerada como un prebiótico potencial, ya que su conformación peculiar la mantiene intacta por el tracto intestinal, pudiendo llegar íntegra al colon, donde es aprovechada por bacterias lácticas como, Lactobacilos y Bifidobacterias, impulsando el desarrollo de las mismas, ya que es aprovechada como fuente de carbono por estos microorganismos. Las bacterias lácticas realizan funciones importantes en el organismo, dentro de las cuales destacan la regulación del sistema inmune, ya que mantienen en niveles bajos a la flora patógena, así como, favorecimiento de la absorción de nutrientes entre otras, fomentando de esta manera la salud del individuo en el que son huéspedes. La inulina es obtenida de fuentes vegetales, principalmente la raíz de Achicoria y Dalia y es utilizada como ingrediente funcional en Norteamérica y en la Unión Europea. Por provenir de fuentes vegetales se le considera un ingrediente alimenticio seguro: GRAS por sus siglas en inglés.

El aguamiel, es la savia que se obtiene después de 6 meses de realizado el proceso de castrado del agave, cuyos componentes son: agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas proteínicas, minerales, vitaminas, azúcares tales como xilosa, galactosa, arabinosa en proporciones mucho menores que la fructosa y la glucosa y sobre todo se ha caracterizado por su contenido de polifruktanos, es decir, inulina.

Considerando la importancia de la inulina y los FOS como prebióticos, así como, la posibilidad de aprovechar el agave pulquero, *A. salmiana*, para la obtención de estos carbohidratos, en el presente trabajo se decidió llevar a cabo la evaluación de la extracción del jugo de la cabeza de agave y de su producto principal; aguamiel, como posibles fuentes de carbono para el crecimiento de bacterias lácticas.





## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto prebiótico de la inulina obtenida del *A. salmiana* en bacterias lácticas.

#### 5.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener inulina de *Agave salmiana* utilizando diferentes métodos de extracción.
- Determinar el contenido de inulina de *Agave salmiana*
- Determinar el efecto prebiótico de la inulina extraída de *Agave salmiana*, bajo condiciones de fermentación en matraz, con bacterias lácticas del tipo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. ETAPAS.

Las etapas principales del proyecto se muestran en la Figura 2.

**Etapa I** Extracción y caracterización de la inulina obtenida a partir de la piña de *Agave salmiana*, y del aguamiel

#### Etapa II

Estudio del efecto prebiótico de la inulina obtenida de *Agave salmiana* en un cultivo de *Lactobacillus delbrueckii*

Figura 2. Etapas del proceso de extracción y evaluación del efecto prebiótico de inulina del *Agave salmiana*

### 6.2. MATERIAL BIOLÓGICO

- Se empleó aguamiel extraído de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave salmiana*) de la localidad de San Felipe Teotitlán, Municipio de Nopaltepec Estado de México, así mismo se utilizó la piña del agave, con una edad promedio de la planta de 9 años.
- Se trabajó la cepa de colección *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-B-734.

### 6.3. OPERACIONES DE ACONDICIONAMIENTO

La piña del maguey pulquero, se sometió a transporte, una vez en el laboratorio, se lavó, troceó y refrigeró para posteriormente utilizarla en los diferentes procesos de extracción y análisis.

### 6.4. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE LA PIÑA

#### 6.4.1. HUMEDAD

Se consideró una muestra de 200 g de piña de *Agave salmiana*, la cual se rebanó en tiras delgadas, se colocaron en una charola de aluminio, previamente pesada. La muestra una vez seca a 60 °C, durante 24 h, se molió en mortero de porcelana. La piña obtenida en polvo, se sometió a las determinaciones posteriores. Cada prueba se realizó por triplicado. La humedad del producto se determinó por triplicado y se expresó en porcentaje mediante la ecuación número 1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

m1: masa de la charola vacía (g)

m2: masa de la charola con la muestra antes del secado, (g)

m3: masa de la charola más la muestra desecada, en (g)



#### 6.4.2. CENIZAS

En una cápsula previamente pesada se colocaron 2 g de harina homogeneizada (Por triplicado). Se sujeto la cápsula con las pinzas y se pre calcinó bajo la flama de un mechero de bunsen, retirando ocasionalmente de la flama, para evitar que se inflamara la muestra. Se colocó la cápsula en la mufla, se incineró a 550 °C por 8 h, hasta cenizas blancas o grisáceas. Se pre enfrió en la mufla apagada. El porcentaje de cenizas se calculó mediante la ecuación 2.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

m<sub>2</sub>: masa de la cápsula con las cenizas (g)

m<sub>1</sub>: masa de la cápsula con la muestra (g)

m<sub>0</sub>: masa de la cápsula vacía (g)

#### 6.4.3. GRASA

Se pesó por triplicado 3 g de piña deshidratada obtenida en el paso 6.4.1., en el cartucho de extracción previamente pesado y tapado con algodón (ambos desengrasados). Se registró el peso del matraz balón, se colocó en el sistema Soxhlet, y el cartucho en el tubo de extracción, se adicionó el solvente (éter etílico) al matraz. Se extrajo la grasa de la muestra por reflujo del solvente, por 6 a 8 h, a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s Se recuperó el solvente por reflujo. Una vez que se evaporó el resto del solvente, se secó el matraz con la grasa en estufa a 103 °C por 5 min. Se enfrió en desecador, se pesó y registró el peso. El porcentaje de grasa se obtuvo mediante la ecuación 3.

$$\% \text{Grasa} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

m: peso de la muestra (g)

m<sub>1</sub>: tara del matraz solo (g)

m<sub>2</sub>: peso matraz con grasa (g)

#### 6.4.4. PROTEÍNAS

Se pesó 1 g de muestra homogeneizada y desengrasada en papel arroz, se depositó en un matraz de digestión Kjeldahl. Se agregó 3 perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio, 0.5 g de sulfato cúprico, 2 gotas ácido esteárico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se conectó el matraz a la trampa de absorción que contenía 250 mL de hidróxido de sodio al 15%. Se calentó en mantilla calefactora, una vez que la solución adquirió un color transparente, se dejó a ebullición 20 min más. Se enfrió y agregó 200 mL de agua. Se conectó el matraz al aparato de destilación, se agregó lentamente 100 mL de NaOH al 30%. Se destiló 150 mL en un matraz que tenía sumergido



el extremo del refrigerante en: 50 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, 5 gotas de rojo de metilo y 50 mL de agua destilada. Se aseguró un exceso de  $H_2SO_4$  para realizar la retrotitulación. Se tituló el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo. El porcentaje de proteína se calculó con la ecuación 4.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times \text{Factor}}{m \times 1000} \quad (4)$$

Donde:

N: normalidad del NaOH (0.1 N)

V: gasto NaOH 0.1 N

m: masa de la muestra, en gramos

Factor: 6.25

#### 6.4.5. FIBRA CRUDA

Se pesaron por triplicado 0.5 g de muestra seca y libre de grasa obtenida en el punto 6.4.3. Se colocó cada muestra en un vaso Berzelius distinto, al cual se le agregó 0.1 g de asbesto preparado y unas gotas de aceite mineral como antiespumante. Se adicionó a cada vaso, 20 mL de  $H_2SO_4$  al 1.25% y se colocaron en el extractor de fibra cruda. Se dejaron hervir durante 30 min. Se enfriaron y agregaron 50 mL de NaOH al 3.52% y se volvieron a calentar por 30 min. Se filtró cada vaso al vacío, usando papel filtro Whatman N° 5041, seco y pesado. Se realizaron lavados sucesivos con: agua caliente, hasta eliminar el álcali (utilizando papel pH para confirmarlo), después con  $H_2SO_4$  al 1.25% (hasta llevar la muestra a una ligera acidez), se lavó nuevamente con agua hasta librarla de la acidez, se lavó con alcohol etílico dos veces y después con éter etílico. Una vez evaporado el éter se secó a 110 °C, hasta peso constante y se registró el peso. El papel filtro con la muestra, se colocó en un crisol de porcelana, previamente puesto a peso constante y se incineró en la mufla a 500°C, durante 30 min, se enfrió en desecador y se pesó. El resultado de la pérdida de peso es la fibra cruda ecuación 5.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{(\text{Pr} - \text{Pv}) - (\text{Pf} - \text{Pc})}{m} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

Pr: peso del filtro con residuo (g)

Pv: peso del filtro vacío (g)

Pf : peso del crisol a peso constante con fibra (g)

Pc: peso del crisol a peso constante (g)

m: peso de la muestra desengrasada (g)



#### 6.4.6. CARBOHIDRATOS

En las tablas de composición de alimentos, el contenido de carbohidratos está comúnmente dado como carbohidratos totales por diferencia es decir, se resta a 100 el contenido de agua, cenizas, proteínas (nitrógeno total \* factor) y extracto etéreo ecuación 6.

$$\%Carbohidratos = \%Humedad - \%Cenizas - \%Proteína - \%Grasa \quad (6)$$

#### 6.4.7. ACIDEZ TITULABLE

La acidez es una medida de la concentración de iones de hidrógeno y se determina con el pH; mientras que la acidez titulable o normalidad del ácido se determina por titulación o valoración, mediante una base de normalidad conocida. La acidez titulable se puede determinar añadiendo suficiente álcali de normalidad conocida hasta neutralizar toda la acidez o llevar el pH al punto neutro. Para ello se resuspendió la harina en agua en una relación 1:10, se tomaron 5 mL de esta solución por triplicado, se agregaron 100 mL de agua destilada, unas gotas de fenoftaleina y se tituló con NaOH 0.1N y se determinó la acidez titulable con la ecuación número 7.

$$Acidez(g / L) = \frac{A \times N \times meq}{a} \times 1000 \quad (7)$$

Donde:

A: mililitros de hidróxido gastados

N: normalidad del hidróxido de sodio

a: alícuota

meq: miliequivalentes del ácido láctico (0.09)

#### 6.4.8. pH

El pH es una medida de la acidez o basicidad de una solución. El valor del pH se puede medir de forma precisa mediante un potenciómetro, también conocido como pH-metro, un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata/cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ión hidrógeno. Se consideró la misma relación de 1:10, se tomaron 5 mL de esta solución y se determinó el pH.



## **6.5. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES (En los extractos y en el aguamiel)**

### **6.5.1. AZÚCARES REDUCTORES MÉTODO DE DNS**

Los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Para esta prueba se agregaron 0.5 mL del extracto a evaluar, 0.5 mL del reactivo DNS posteriormente se colca en agua hasta ebullición durante 5 min a baño maría de agua fría 10 min y se agregan 5 mL de agua destilada, se homogeniza en el vortex y se determina la absorbancia a 540 nm. La concentración es medida a través de la curva estándar preparada (Miller, 1959).

### **6.5.2. AZÚCARES TOTALES MÉTODO FENOL-SULFÚRICO**

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos, puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados. Dando un color naranja muy estable cuando reaccionan con Fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado. La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad de carbohidratos presente. Esta absorbancia es medida a 490nm y la concentración determinada a través de la curva estándar preparada. Para esta prueba se utilizó Fenol al 5%. Se tomó una muestra de 200 µl del extracto a evaluar, se adicionaron 2 mL de agua y 200 µl de Fenol, más 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mantuvo la reacción por 10 min a temperatura ambiente. Después a baño maría 30°C durante 20 min (Dubois *et al.*, 1956).

## **6.6. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES**

### **6.6.1. PROCESO DE EXTRACCIÓN MECÁNICO**

La estrategia general para extraer los azúcares obtenidos es presentada en la Figura 3. Una vez lavada la piña del maguey, se corta en trozos pequeños. Los azúcares se extraen sometiendo los trozos a un proceso de trituración empleando un extractor Turmix (MR) de uso rudo. El jugo turbio obtenido se centrifugó (SicPat C3L000) a 5700 rpm durante 20 minutos, a la fase ligera se le denominó jugo. (Díaz, 2007; Ronkart *et al.*, 2007).

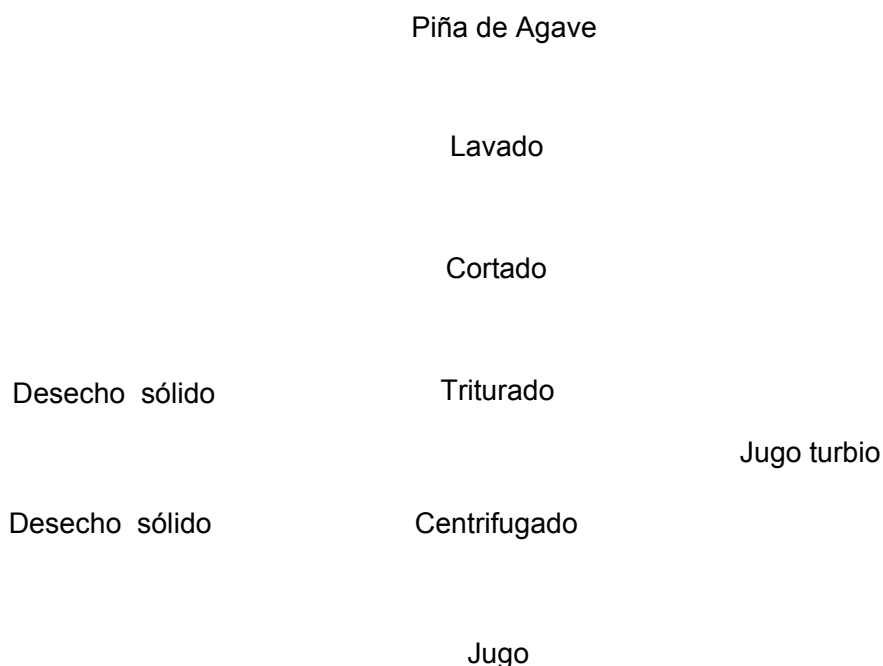


Fig. 3. Esquema del proceso de obtención de jugo de *A. salmiana*

### 6.6.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

Se realizó la extracción sólido-líquido en una relación 8:1 masa/volumen (Waleckx *et al.*, 2008). Se tomaron trozos de la piña de *A. salmiana* en forma de cubos de 1cm aproximadamente. Se pesó una muestra de 80 g y se colocó en 100 mL de agua destilada a 80 °C con agitación constante durante 1 h, posteriormente se filtro en un colador para retirar el sólido (Salazar *et al.*, 2008). Al líquido recuperado se le denominó extracto. Figura 4.

### 6.6.3. RASPADO TRADICIONAL

Se empleó aguamiel extraído de maguey pulquero, manso o de montaña (*Agave salmiana*) de la localidad de San Felipe Teotitlán, Municipio de Nopaltepec Estado de México, con una edad promedio de la planta de 9 años. La muestra fue tomada de una piña que estaba en su máximo de producción de aguamiel.

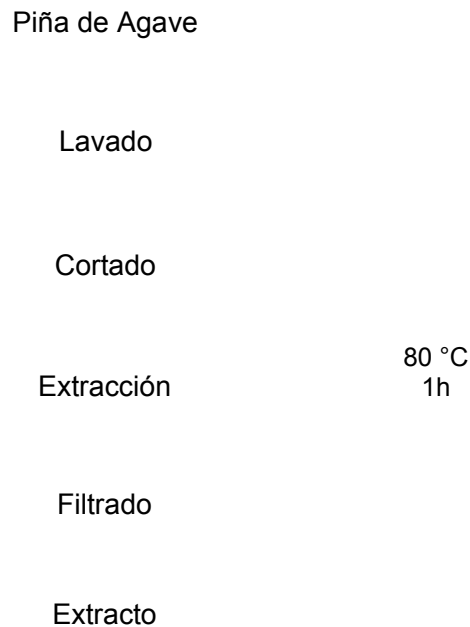


Fig. 4. Esquema del proceso de obtención del extracto de *A.salmiana*

### 6.7. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DIRECTOS

Los tres extractos obtenidos en los puntos, **6.6.1**, **6.6.2**, **6.6.3** se caracterizaron mediante un análisis físico-químico que incluye azúcares totales (método Fenol-Sulfúrico) y reductores (DNS). Se determinó el contenido de inulina por la diferencia entre azúcares totales (curva tipo realizada con inulina) y reductores directos (curva tipo realizada con fructosa) (Lingyun *et al.*, 2007), para seleccionar la fuente con mayor cantidad de azúcares.

### 6.8. PRETRATAMIENTO DEL AGUAMIEL DE *Agave salmiana*.

El aguamiel en su forma natural es una fuente rica en nutrientes para muchos microorganismos por lo que se decidió mejor emplearlo en forma deshidratada además de facilitar su almacenaje, conservación y manejo. Para lo cual se aplicaron tres procedimientos para obtener un producto en polvo que fueron: la liofilización, un tratamiento con etanol previo al proceso de liofilizado y el secado por aspersión.

#### ⚙️ APLICACIÓN DE UN PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

Se realizó la congelación previa de 500 mL de aguamiel en dos matraces quitazato (250 mL por matraz) en baño de hielo seco y acetona. Posteriormente se empleo el sistema de liofilización





FreeZone 4.5 Liter Benchtop (Labconco) a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  y una bomba de vacío de 86 L/min.

#### ✿ AGUAMIEL PRECIPITADO CON ALCOHOL Y LIOFILIZADO

Se realizó una cinética con aguamiel (10 mL) y etanol (1 mL hasta 10 mL) para determinar el contenido máximo de sólidos. Las diluciones correspondientes se colocaron en charolas de aluminio y se obtuvo el contenido de sólidos por diferencia mediante el método de secado en estufa (A.O.A.C.1990 /925.45). La relación de mayor contenido de sólidos fue la relación 10:1, aguamiel: etanol. Tomando esta relación como referencia se colocaron 50 mL de aguamiel más 5 mL de etanol, en una probeta de 100 mL. Se decantó, se recuperó el sólido y el sobrenadante se centrifugó a 500 rpm / 10 min (SicPat C3L000), nuevamente se recuperó el sólido y el sobrenadante se centrifugó bajo las mismas condiciones. Esto para tratar de recuperar la mayor cantidad de sólido y recuperar el etanol. El sólido recuperado se liofilizó una vez que se evaporó el solvente (24 h después), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (Tatdao *et al.*, 2007).

#### ✿ APLICACIÓN DE UN PROCESO DE ASPERSIÓN

Se empleó un secador por aspersión (Mini Spray Dryer B-290 BÜCHI) con flujo de alimentación: 2.7 mL/min, flujo de aire de aspersión: 157 mL/s y presión del aspersor:  $6.2 \text{ kg/cm}^2$ . Las variables de operación del secado por aspersión empleadas fueron temperatura del aire de entrada de  $130^{\circ}\text{C}$  y concentración de maltodextrina, 10% (p/v) (Rocha y Rojas, 2009).

## 6.9. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INULINA

### 6.9.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO

Se empleó esta técnica con la finalidad de detectar los grupos funcionales predominantes en las muestras que pudieran elucidar un patrón de los mismos en cuanto a Inulina se refiere. Se utilizó el espectrómetro de infrarrojo FT-IR SPECTRUM GX de Perkin Elmer. Las muestras líquidas de los extractos obtenidos, así como del aguamiel, se colocaron directamente en el dispositivo ATR del equipo y se determinó el espectro de cada muestra en el intervalo de  $450$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

### 6.9.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A PULSOS AMPEROMETRICOS HPEAC-PAD (Dionex, 2009)

Se empleó la columna CarboPac PA1 (Dionex, 250 x 4 mm), una pre columna (CarboPac PA1 guard, Dionex), un equipo cromatográfico iónico Dionex DX-500. Los datos fueron adquiridos mediante un software Millennium versión 2.10, conectado al equipo instrumental mediante un mo



dulo de interfase. Para la preparación de los eluyentes se utilizó una disolución de hidróxido sódico al 50% en peso. Las condiciones que se emplearon para la separación y detección de azúcares se detallan en el cuadro 5. La regeneración de la columna se realizó mediante lavado con disolución de hidróxido sódico 300 mM (100% C), a un flujo de 1 mL/min. Después del lavado, la columna fue re-equilibrada con una disolución de hidróxido sódico 16 mM a un flujo de 1 mL/min. Por este método se analizaron los productos obtenidos de los tratamientos del aguamiel descritos en el paso 6.8.

Cuadro 5. Condiciones utilizadas en el equipo de detección para la separación de azúcares

Eluyente A	50 mM NaOH
Eluyente B	100% agua
Eluyente C	300 mM NaOH
Gradiente:%A + %B + %C (tiempo)	5%A + 95% B (0-40 min), 100% C (45-50 min) 5%A + 95% B (55-65 min)
Flujo de eluyente	1 mL/min
Inyector de <i>loop</i> fijo	25 $\mu$ L
Detección	PAD
Modo de detección	Amperometría integrada
Tiempo de adquisición de datos	65 min

### 6.9.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMNH<sup>1</sup>)

Se empleó esta técnica para elucidar los hidrógenos unidos a los grupos funcionales detectados por RMN empleando una muestra de inulina pura que se comparó con el espectro de resonancias de las demás inulinas trabajadas. Se utilizó el equipo de resonancia Mercury de Varian a 300 MHz. Las muestras sólidas de inulina se disolvieron en agua deuterada, se introdujeron dentro de los tubos de resonancia y se colocaron en el equipo, se obtuvieron los espectros de resonancia para cada una de las muestras trabajadas.

## 6.10. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INULINA

### 6.10.1. DETERMINACIÓN DE INULINA POR HPLC

Para la determinación cuantitativa de las inulinas utilizadas, se utilizó un equipo Varian (serie 302423-0228), con la columna Aminex HPX-87C Bio-Rad (300\*7.8 mm), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.



Se estabilizó la columna a un flujo de 0.5 mL/min con agua tridestilada, la cual previamente se filtró (filtro milipore 0.2  $\mu$ m) al alto vacío con matraz kitazato y se mantuvo el matraz en una parrilla con agitación constante (a temperatura ambiente) para su desgasificación.

Se preparó una curva tipo empleando un patrón de inulina de achicoria, grado químico, a concentraciones de 0.8, 1.2, 1.9, 2.2, 3 g/L en agua tridestilada y para evaluar una cantidad determinada de la inulina problema, todas tanto las diluciones para la curva tipo como las muestras problema se hicieron pasar a través de un filtro para jeringa de 0.2  $\mu$ m, ya filtradas se almacenaron en viales de 3 mL y se refrigeraron para su análisis.

Una vez estabilizada la columna se corrió primero la curva tipo inyectando un volumen de muestra de 50  $\mu$ L, posteriormente se corrieron las inulinas problema y el espectro obtenido se interpoló con la curva tipo almacenada en el equipo mediante el programa Star versión 6.41. programa ya incluido en el mismo.

### 6.11. EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FRUCTOLIGOSACARIDOS DE AGUAMIEL EN BACTERIAS LÁCTICAS

El efecto prebiótico se evaluó mediante las cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* empleando el medio MRS cuya composición se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Componentes del medio MRS y su preparación

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	10	En medio preparado suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Agitar en parrilla con calor 5 min o hasta disolver y agregar 1 mL de Twen. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C y 15 lbs de presión
Extracto de carne	10	
Extracto de levadura	10	
Glucosa	20	
Twen 80	1 ml	
Fosfato dipotásico	2	
Acetato de sodio	5	
Citrato de amonio	2	
Sulfato de magnesio	0.2	
Sulfato de manganeso	0.05	
*Agar	20	
pH final: 6.4 $\pm$ 0.2		

\*Solo se agrega para preparar el medio sólido



### 6.11.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Se propuso un diseño estadístico de un factor con tres bloques, para lo cual en un sistema fermentativo con bacterias lácticas del tipo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, evaluando 3 concentraciones de inulina 4, 12 y 20 g/L y tres tipos de inulina: inulina grado alimentario, inulina grado químico e inulina de aguamiel secado por aspersion. Se tomaron dos colonias de la cepa y se sembraron en 100 mL de medio MRS, se incubaron a 37°C, 180 rpm, 24 h. Después de 24 h se tomo una alícuota de 1 mL y se resuspendió en 250 mL de medio MRS, de tal forma que por corrida se tenía, un matraz testigo sin inulina y otro con inulina a evaluar (Cruz, 2007). Se monitoreo el crecimiento microbiano por la técnica de cuenta en placa y el consumo de azúcares por diferencia de azúcares reductores y azúcares totales (Lingyun *et al.*, 2007). Las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado para cada concentración y tipo de inulina empleada. Se consideró el procedimiento llevado acabo anteriormente, solo excluyendo la adición de glucosa al formular el medio MRS.

### 6.11.2. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

La velocidad máxima de crecimiento de las BAL, en los diferentes medios de crecimiento, fueron evaluados por medio del software DMFit (2009). La interpretación de los parámetros fueron evaluados con el modelo de Baranyi y Roberts (1994), a través de la edición web de la modelización dinámica (DM), sistema en línea utilizado en el Institute of Food Research (Instituto de Investigación Alimentaria) para modelar la variación del logaritmo del número de células bacterianas de un cultivo en función del tiempo (Márquez *et al.*, 2007).

### 6.11.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó acabo con el programa SPSS versión 12 para ambas cinéticas (MRS con y sin glucosa). Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para determinar la presencia de diferencias estadísticas significativas entre los medios utilizados para el período de crecimiento de *Lactobacillus*. Posteriormente para detectar entre que medio de cultivo se presentaron diferencias se aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan. Los datos se analizaron con un 5% de significancia.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE LA PIÑA DE *Agave salmiana*

Los resultados del análisis proximal para la piña de *Agave salmiana* se presentan en el Cuadro 7, cabe destacar que el contenido de carbohidratos de la piña de *Agave salmiana* fue de 23.42% que se considera alto en relación con otras fuentes de origen vegetal como cebolla 4.8%, ajo 19.2%, espárrago 1.5%, plátano 13.7%, cuya concentración de inulina varía entre 1 y 11% (Worawuthiyanan *et al.*, 2006). Algunos productos vegetales tienen inulina en concentraciones particularmente altas, es por ello que son empleadas como fuentes de extracción a nivel industrial, tal es el caso de la alcachofa de Jerusalén, y la Achicoria (*Chichorium intybus*), con concentraciones entre 15 y 20% (Worawuthiyanan *et al.*, 2006). Con relación al agave, existe la evidencia generalizada de que la especie utilizada en la elaboración de tequila: *Agave tequilana* Weber tiene alto contenido de inulina en la piña entre un 20-24% (Arrazola, 1969).

Cuadro 7. Análisis químico proximal de la cabeza de *Agave salmiana*

Parámetro	Media $\pm$ DS*
Acidez (%)	0.17 $\pm$ 0.026
pH	6.23 $\pm$ 0.245
Humedad (%)	70.40 $\pm$ 1.446
Cenizas (%)	5.04 $\pm$ 0.016
Grasa (%)	1.06 $\pm$ 0.005
Proteína (%)	0.08 $\pm$ 0.003
Carbohidratos (%)	23.42 $\pm$ 0.367
Fibra cruda (%)	51.39 $\pm$ 1.924

\*Promedio de tres repeticiones  $\pm$  Desviación estándar

### 7.2 PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE INULINA

Se evaluaron dos tratamientos de extracción de azúcares de la piña: un proceso de extracción sólido-líquido (80 °C) y por un proceso de trituración empleando un extractor de discos. Las propiedades fisicoquímicas de los extractos fueron comparadas con el aguamiel obtenido por un raspado tradicional de la piña. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 8.



Cuadro 8. Análisis del extracto, jugo y aguamiel

Determinación	Extracto (80 °C)	Jugo (Triturador)	Aguamiel
Acidez (%)	0.083 ± 0.029	0.255 ± 0.026	1.567 ± 0.058
pH	7.637 ± 0.307	5.690 ± 0.070	6.845 ± 0.136
°Bx	3.000 ± 1.000	28.000 ± 2.646	22.000 ± 2.646
Azúcares Totales (g/L)	4.740 ± 0.141	10.856 ± 0.400	32.130 ± 1.608
Azúcares Reductores (g/L)	0.283 ± 0.020	1.334 ± 0.194	16.149 ± 0.114
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	1.012 ± 0.977	1.121 ± 0.019	1.112 ± 0.224
Viscosidad (poises)	0.015 ± 0.000	0.099 ± 0.003	0.3201 ± 0.001
*Inulina-Azúcares no libres (g/L)	4.457	9.522	15.981

Promedio de tres repeticiones ± Desviación estandar, el \* indica diferencia entre azúcares totales y reductores.

Se realizó el análisis físico-químico del aguamiel de *A.salmiana*, para ser comparado con la Norma Mexicana NMX-V-022-1972, en la cual se clasifica al aguamiel en dos I y II con un solo grado de calidad, cuyas especificaciones se indican en el Cuadro 9. Los resultados obtenidos en este estudio indican que los parámetros encontrados para *A.salmiana* no se alejan de la norma y que el aguamiel extraído de este agave es clasificado como tipo I.



Cuadro 9. Norma Mexica NMX-V-022-1972 para el aguamiel y valores obtenidos en este estudio

Especificaciones	Tipo I		Tipo II	Aguamiel <i>A. salmiana</i>
	Mínimo	Máximo	Menor de:	
pH	6.6	7.5	4.5	6.8
Densidad grados Baumé (Be)	5.0	7.0	4.5	5.6
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20 °C	59.0	100.0	27.0	ND
Sólidos totales g/100 mL	13.0	17.0	7.0	13.5
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 mL	8.0	12.0	6.0	10.2
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 mL	2.0	3.0	3.0	2.0
Gomas (en glucosa) g/100 mL	2.0	6.0	0.2	ND
Proteínas mg/100 mL	300.0	600.0	100.0	332.3
Cenizas mg/100 mL	300.0	430.0	180.0	419.0
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico)	0.9	1.0	4.0	0.9

ND: No determinado

El porcentaje de acidez obtenido para el extracto fue menor que la acidez determinada en el jugo, la acidez mayor se presentó en el aguamiel (Cuadro 8). Dicho porcentaje indica el contenido de ácidos libres expresado como el porcentaje del ácido predominante (López, 2003) y las diferencias entre estas muestras se deben principalmente a que la acidez en el extracto es una acidez desarrollada, que se ve afectada por el proceso térmico y el agua que se adiciona; la concentración de iones hidroxilos (OH<sup>-</sup>) que se liberan durante el proceso térmico, reaccionan con las moléculas de agua haciendo que la acidez disminuya (Jun *et al.*, 2006). Mientras que en el jugo, la acidez presente es la natural conferida por la composición inherente del maguey (Peter, 2002). El aguamiel es un medio complejo, cuya constitución afecta al ácido que se encuentra disuelto, por sus interacciones con los demás componentes como son: agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas, proteínas, minerales y vitaminas, los cuales se ven afectados por el proceso de castración, la edad, añejamiento, el tiempo en el que fue tomada la muestra (mañana o tarde), épo



ca del año, condiciones del suelo, clima de la región donde se cultiva entre otros, que le confieren una acidez peculiar, inclusive si se extrae de la misma especie, el proceso metabólico que efectúa uno y otro agave alteraría la composición del aguamiel (Goddy *et al.*, 2003).

El pH obtenido para los tres componentes obtenidos se encontró en un intervalo entre 6.8 a 7.6 por lo que se puede considerar que los valores indican un pH similar al reportado para el agua (Lehninger *et al.*, 2006). En relación al aguamiel se obtuvo un pH cercano al que la literatura reporta que es de 6.8 (Campos, 2002).

Los sólidos solubles ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) obtenidos para el extracto y aguamiel fueron bajos en relación al jugo, este último presentó la mayor cantidad de los mismos. Los sólidos solubles representan, principalmente azúcares (sacarosa), sin embargo, se sabe que existen ácidos y sales disueltas que afectan esta medición (López, 2002) de esta manera el jugo es el de mayor contenido de sólidos disueltos debido a que no presenta dilución como en caso de la extracción térmica o en el aguamiel. La edad del agave afecta principalmente en la cantidad de solubles totales que se obtienen en el aguamiel (García *et al.*, 1993).

Los azúcares totales obtenidos fueron menores para el extracto en relación al jugo, y la mayor concentración se encontró en el aguamiel. La dilución se hace presente en la extracción térmica más no en la mecánica. En el aguamiel la producción de azúcares tiene que ver con la época del año, la toma de muestra (mañana o tarde), la forma de practicar el castrado, condiciones meteorológicas, edáficas y manejo (Granados, 1993).

En el extracto la concentración azúcares reductores fue menor que en el jugo y que en el aguamiel. En el aguamiel la presencia de fructosa y glucosa ambos azúcares reductores provoca que la concentración de los mismos sea mayor. (Loyola, 1956; Cravioto *et al.*, 1953).

Se realizó un análisis de varianza para la densidad,  $F_{(2,6)} \alpha=0.05$  y no se encontró diferencia significativa entre la densidad del jugo, extracto y aguamiel.

La viscosidad para el jugo es 0.0048 poises mayor a la del agua, para el extracto es 9.9 veces mayor a la del agua y en el aguamiel es 32 veces mayor que la del agua. La viscosidad del agua





es 0.01002 poises (Merle y Wigger, 2002), esto indica que la presencia de sólidos solubles afecta la viscosidad del extracto y del jugo, ya que a medida que aumenta la presencia de sólidos solubles, (determinados como grados °Brix) aumenta la viscosidad (Vitali y Rao, 2006). En el aguamiel aunque los °Brix obtenidos (22°Brix) son menores que en el jugo (28°Brix) la viscosidad se ve afectada por la presencia de microorganismos autóctonos del maguey que afectan la viscosidad del aguamiel como levaduras, y bacterias del tipo *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Oenococcus oeni* y *Leuconostoc mesenteroides* productoras de exopolisacáridos (Escalante *et al.*, 2004) como  $\beta$ -glucanos y dextranos que generan un aumento en la viscosidad (Chellapandian *et al.*, 1988).

Los azúcares no libres fueron considerados como inulina, debido a que las fructosas no adheridas a la cadena de inulina (libres), son restadas de la cuantificación de inulina total, considerada como fructosas enlazadas (Lingyun *et al.*, 2007). De esta forma la concentración de las mismas varió, siendo en el extracto en el que se obtuvo la de menor concentración y la mayor concentración se encontró en el aguamiel. Los azúcares se ven afectados por el método de extracción y la fuente de obtención, el aguamiel extraído del agave, presenta mayor contenido de carbohidratos, mientras que en el extracto y en el jugo, la piña del agave fue cortada previamente, transportada, troceada y refrigerada, para después someterla a las evaluaciones correspondientes, factor que afecta el metabolismo del agave, debido a que se afecta su tasa de respiración y su reserva de nutrientes se consume a ritmo más rápido (Sánchez, 2007).

En función al proceso de extracción, la concentración de inulina puede modificarse, esto puede ser debido a que las fibras de agave están constituidas por varios filamentos concéntricos de celulosa, lignina y hemicelulosa (Cruz *et al.*, 1999). Las cadenas de celulosa (material de refuerzo principal) forman microfibrillas que se mantienen unidas por hemicelulosa y lignina agregadas en largas macrofibrillas de manera helicoidal enlazadas a lo largo de una fibra axial y embebidas en una matriz lignina-hemicelulosa (Iniguez *et al.*, 2001). Por observaciones bajo microscopio óptico, Figura 5-A, se sabe que la de fibra de agave presenta un radio mínimo de 50  $\mu\text{m}$  y un radio máximo 170  $\mu\text{m}$  y una densidad de 0.74  $\text{g}/\text{cm}^3$  (Bessadok *et al.* 2009). Los tratamientos a los que fue sometida la piña de agave tienen repercusiones directas en el material de constitución de las fibras, tanto en la superficie, como en las dimensiones de las fibras, las cuales se ven afectadas por la eliminación parcial de los materiales de cimentación, como las sustancias pécticas, lignina y



la cutícula cerosa amorfa, de manera que ocasiona cambios en la fibra. En la extracción sólido líquido, los cambios son causados por efecto de un disolvente que es el agua, esta es absorbida causando hinchazón de las fibras y agregados de varias moléculas; esto tiene lugar en el corazón de las fibras primarias, llamada luz, que aunado a la agitación y temperatura, aceleran el proceso de disolución de estos materiales de cimentación, Figura 5-B, mientras que en el tratamiento mecánico, se rompe el material de cimentación por una fuerza de extrusión de las fibras, Figura 5-C. Estas imágenes fueron tomadas de Bessadok *et al*, .2009 para ilustrar el cambio que ocasionan los tratamientos a las fibras.

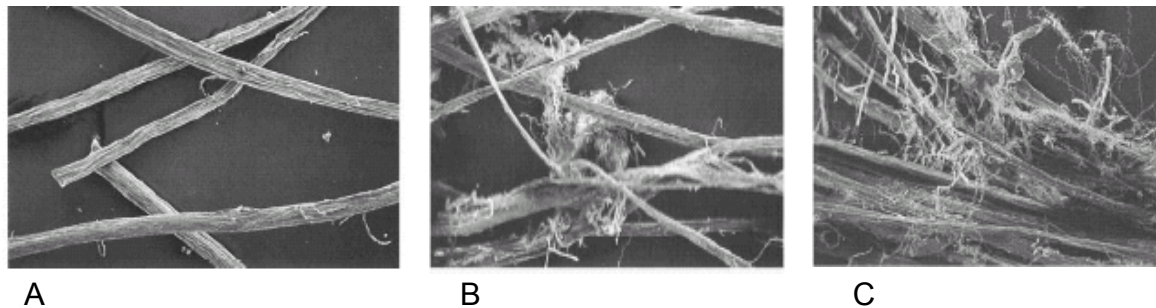


Figura 5. Fibra de Agave (*Americana L.*) Imagen A: Fibra sin tratamiento. B: Fibra después de un tratamiento de extracción sólido líquido. C: Fibra después de un tratamiento mecánico. (Tomada de Bessadok *et al.* 2009).

La extracción sólido líquido se ve afectada por la capacidad de adsorción del material que se utilice como adsorbente, presentándose una isoterma característica. La isoterma de las fibras como las del agave es de tipo IV (Jonquières y Fane, 1998). Este modelo supone que únicamente una fracción de las moléculas de agua puede ser adsorbida en sitios específicos de adsorción. Dicho comportamiento es el resultado de dos procesos: la adsorción en la superficie de micro-cavidades (volumen libre, microporos etc.) y la adsorción debido a la presencia de grupos hidrofílicos (grupos hidroxilo de la celulosa). Tales sitios específicos también existen en la periferia de los haces de fibras. Constan de las cargas negativas como las moléculas del ácido galacturónico y pectina. Con base a ello mediante isotermas de adsorción se han hecho cálculos para los sitios específicos de la capacidad de adsorción en la fibra de agave que es alrededor 0.015 g agua/g de celulosa que representa el contenido de grupos hidrofílicos, capaces de retener las moléculas de agua (Bessadok *et al.*, 2009). Este proceso limitará la capacidad de extracción ya que llegará a la saturación de agua de la fibra y estas moléculas queden retenidas de tal forma que no sea posible que se lleven a cabo procesos de difusión.



### *Evaluación del efecto prebiótico*

En cuanto a los procesos de difusión, los modelos consideran a los sólidos microestructurales, como un sistema mixto de células intactas o dañadas, la extracción del soluto puede concebirse como un proceso constituido por dos factores: uno representa la extracción rápida en las células con paredes celulares dañadas y el otro transferencia más lenta del soluto desde las células intactas (Ali, 1996; Hulbert y Biswal, 1998; Krasuk *et al.*, 1967). De esta manera la extracción sólido líquido esta limitada por el paso lento de deteriorar primero los materiales de constitución de las fibras, que aunque previamente fueron cortadas, el daño no es tan abrasivo como en el proceso de extracción mecánica, además del acceso de las moléculas de agua al soluto de interés, ya que se puede ver reducido por interacciones fuertes como puente de hidrógeno con otras moléculas presentes en la fibra de agave. Para conseguir una extracción rápida y completa del sólido, se tiene que ofrecer al disolvente superficies de intercambio grandes y recorridos de difusión cortos. Esto se puede lograr triturando el sólido a extraer, en partículas no muy pequeñas, ya que puede causar apelmazamiento que dificultaría el paso del disolvente. Mientras que en el proceso de extracción mecánico las fibras se dañan automáticamente, al pasar por las cuchillas facilitando así la extracción de azúcares dando un contenido más alto del mismo.

El Cuadro 10 presenta la comparación de la composición química del aguamiel obtenido de tres variedades (manzo, cenizo y amarillo) cultivadas en el Estado de Tlaxcala (Flores *et al.*, 2007) y los valores de los parámetros obtenidos en el presente estudio para *A. salmiana*.

*Cuadro 10. Características fisicoquímicas de aguamiel de cuatro tipos de maguey de México.*

Componentes del aguamiel	Tlaxcala			Estado de México
	Manzo	Cenizo	Amarillo	<i>A.salmiana</i>
Densidad g/cm <sup>3</sup>	1.298	1.268	1.231	1.112
pH	6.300	6.400	6.600	6.845
Índice de refracción	1.352	1.353	1.365	1.349
Sólidos solubles (°Brix)	11.440	11.010	12.670	22.000
Acidez (%)	1.650	1.410	1.470	1.567
Humedad (%)	87.000	87.900	86.000	87.400
Proteína (g/L)	3.410	3.110	2.490	3.323
Cenizas (g)	0.534	0.413	0.480	0.419
Azúcares totales (g/L)	8.650	10.021	8.069	32.130



Los sólidos solubles (°Brix) del aguamiel aumentan con la edad de las piñas del agave utilizadas para su extracción, así como, la especie utilizada y la época del año. Los valores más altos de sólidos solubles se presentan cuando hay sequía y disminuyen cuando se recolecta el aguamiel en época de lluvia (Saavedra *et al.*, 2002). Estos factores pudieron determinar la diferencia tan marcada en el aguamiel empleado para este estudio y el aguamiel obtenido de la zona de Tlaxcala.

El contenido de azúcares totales obtenidos puede, explicarse por el tamaño y peso de la piña, que es la parte donde se acumulan los carbohidratos presentes en el aguamiel, en el estudio realizado por González (1994) indica que especies como cenizo y amarillo reportan una diferencia de peso de 12.65% entre ellas considerando sólo la piña y meyote. Por otro lado, la capacidad de almacenar agua en agaves, está relacionada con el tamaño de éstos, afectando directamente la concentración de azúcares en el aguamiel (Nobel, 1998).

Otro factor importante que afecta el contenido de azúcares en el aguamiel, tiene que ver con la hora de recolecta, así en las mañanas es donde mayor producción se obtiene de aguamiel (Ruiz *et al.*, 2000). Otro factor posible de influencia en el contenido de azúcares, es la diferencia de temperaturas registradas en un mismo día, y a diferentes horas, la temperatura influye de manera directa en los procesos fisiológicos básicos de representantes de la familia *Agavaceae*, como fotosíntesis y respiración. La fotosíntesis en agaves se incrementa con temperaturas promedio frescas diurnas (22 a 25 °C) y nocturnas (14 a 16 °C), pero disminuye por temperaturas promedio cálidas durante el día (>28 °C) y la noche (>20 °C), al reducirse la fotosíntesis se incrementa la respiración. Ambos factores determinan en gran parte la cantidad de azúcares que se forman en las hojas y posteriormente se transportan y almacenan en el tallo, y por lo tanto también afecta el contenido de azúcares en el aguamiel (Pimienta *et al.*, 2000).

La época del año también afecta el volumen de producción de aguamiel, en *A. salmiana* la época de primavera es la más favorable lo cual puede deberse a que el período productivo, es más prolongado en primavera, además de que hace más calor, por lo tanto la planta tiende a acumular agua para realizar sus funciones vitales aumentando el volumen de producción (Ruiz *et al.*, 2000). Otro factor que influye en la producción es la ubicación geográfica (Mendoza, 1983).



### **7.3 PRETRATAMIENTO DEL AGUAMIEL DE *Agave salmiana*.**

Mediante el proceso de liofilización normal se obtuvo un caramelo, sumamente higroscópico, de difícil manejo, mientras que para la liofilización con tratamiento previo con etanol se obtuvo un producto más parecido a una goma. Se esperaba obtener un polvo en ambos casos al realizar la liofilización, la explicación para que esto no sucediera es por el efecto de las sustancias disueltas en el líquido a liofilizar, tales como proteínas, carbohidratos, grasas y sales en la formación de cristales de hielo antes de la eliminación del agua (Kessler, 1981). El aguamiel está compuesto de agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas, proteínas, minerales y vitaminas (Loyola, 1956; Cravioto *et al.*, 1953), que afectan el proceso de cristalización.

En los alimentos se pueden obtener distintas estructuras durante el proceso de congelación dentro de las que se encuentran cristales de hielo, mezclas eutécticas y zonas vítreas amorfas, en las cuales la viscosidad es tan alta que impide la cristalización del azúcar. Estas últimas son propiciadas por la presencia de azúcares, alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos, así mismo, como por las altas concentraciones de sólidos en el producto inicial, como ocurrió en el aguamiel sometido al método de precipitado con etanol (Fennema, 2000).

El estado vítreo es un estado poco estable que puede alcanzarse por congelación, concentración rápida o deshidratación de una solución, así como, por fusión térmica de algunos azúcares cristalinos seguida de un enfriamiento brusco, que impide que las moléculas se reorganicen y formen un cristal. Los azúcares en estado vítreo son higroscópicos, lo que contribuye a su inestabilidad pues aumenta la movilidad del agua y como consecuencia su cristalización. El ejemplo típico es el de los caramelos duros, ya que son soluciones sobresaturadas de sacarosa donde la cristalización se ve impedida por la alta viscosidad y por la presencia de otros azúcares como glucosa y fructosa, condiciones que se encuentran presentes en el aguamiel (Nuria *et al.*, 1999).

Este trabajo se realizó de manera conjunta con Rocha y Rojas (2009), quienes evaluaron el polvo obtenido en el proceso de secado por aspersion y obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 11.



Cuadro 11. Características del aguamiel en polvo

Humedad %	Solubilidad %	Aw	Rendimiento %	dp µm
1.99	90.49	0.18	45.1	9

Aw: actividad de agua dp: diámetro de partícula

Fuente: Rocha y Rojas, 2009

A las condiciones trabajadas en el presente estudio se logró obtener un rendimiento de 45.1%, que fue ligeramente mayor comparado con el de 42% obtenido para el aguamiel de *Agave atrovirens* Karw trabajado por Torres y Morales (2005), quienes utilizaron un flujo de alimentación 1.2 L/h, flujo de aire de aspersion 0.02 m<sup>3</sup>/s, temperatura de entrada 120 °C y maltodextrina al 10%. Sin embargo, ambos rendimientos son menores al rendimiento de 66.4% obtenido por Santillán *et al.* (2000), quienes emplearon un flujo de alimentación de 20 mL/min, la presión del aire generada por el compresor de 0.15 Mpa, temperatura de entrada 160 °C y una mezcla de maltodextrina y goma arábica a la concentración de 10% con aguamiel de *Agave salmiana* de San Luis Potosí.

Las maltodextrinas se usan para contribuir en el secado por aspersion sobre todo en muestras con alto contenido de azúcares para evitar que se hidraten demasiado rápido y evitan que pueda ocurrir una aglomeración de las partículas originando una pasta y no un polvo como ocurrió en el proceso de liofilización. De esta manera proporcionan una continuidad estructural durante la formación de la película encapsulante, mejorando con ello la eficiencia del proceso de secado (Lumdubwong, 2001). Dependiendo del tipo de agave empleado, la concentración de maltodextrinas, el equipo de secado y las condiciones de operación es el rendimiento obtenido. Así mismo, las interacciones que se presentan entre los agentes encapsulantes como la goma arábica y las maltodextrina influyen significativamente en el rendimiento del 66.4% reportado por Santillán *et al.* (2000).

## 7.4. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA

### 7.4.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Se realizó el análisis por espectroscopia infrarrojo para los productos obtenidos en los tratamientos de extracción, obteniéndose los espectros de las Figuras 6-8. En la Figura 9 se muestra el espectro de la inulina grado alimentario y en la Figura 10 el espectro de la inulina obtenida de la Achicoria, reportado en la literatura, con el fin de comparar los extractos con dichos estándares.

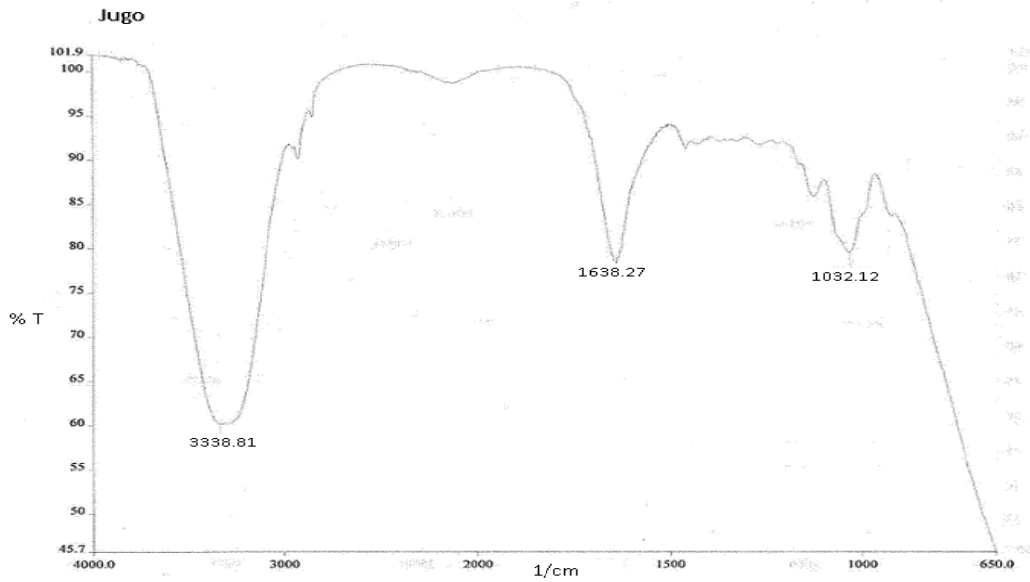


Figura 6. Espectro de IR del extracto obtenido por el proceso de extracción mecánica

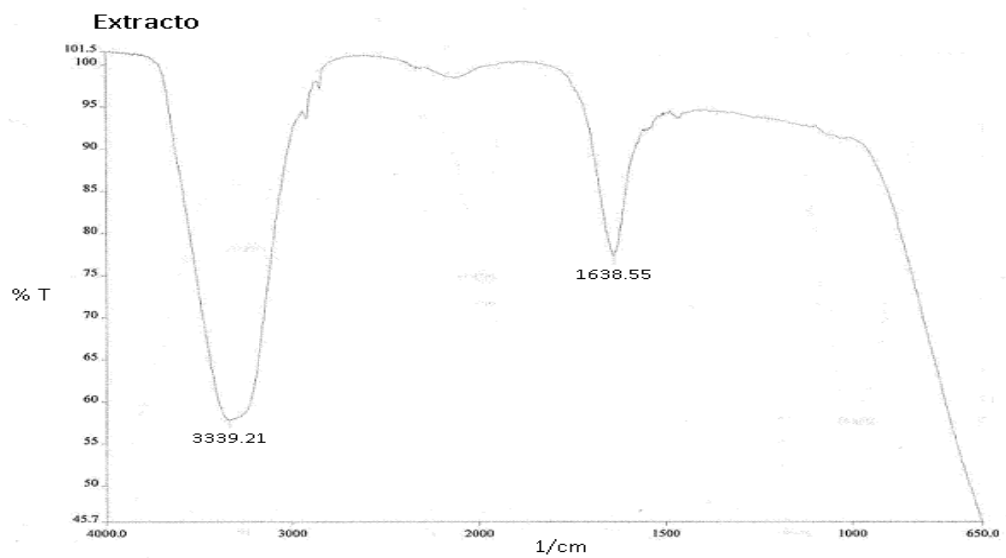


Figura 7. Espectro de IR del jugo obtenido por el proceso de extracción sólido-líquido

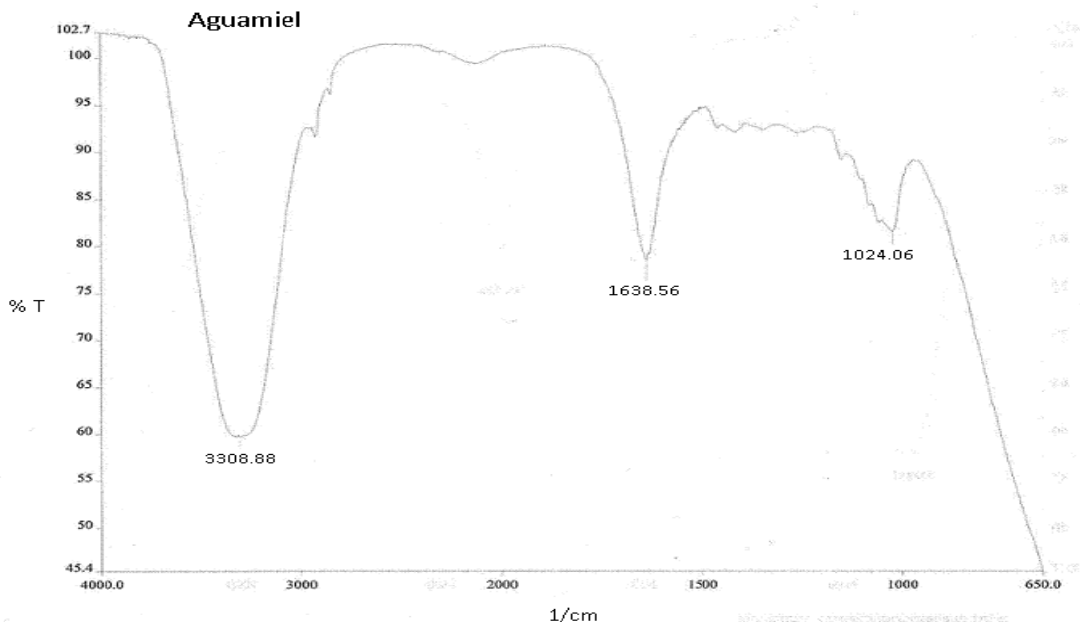


Figura 8. Espectro de IR del aguamiel

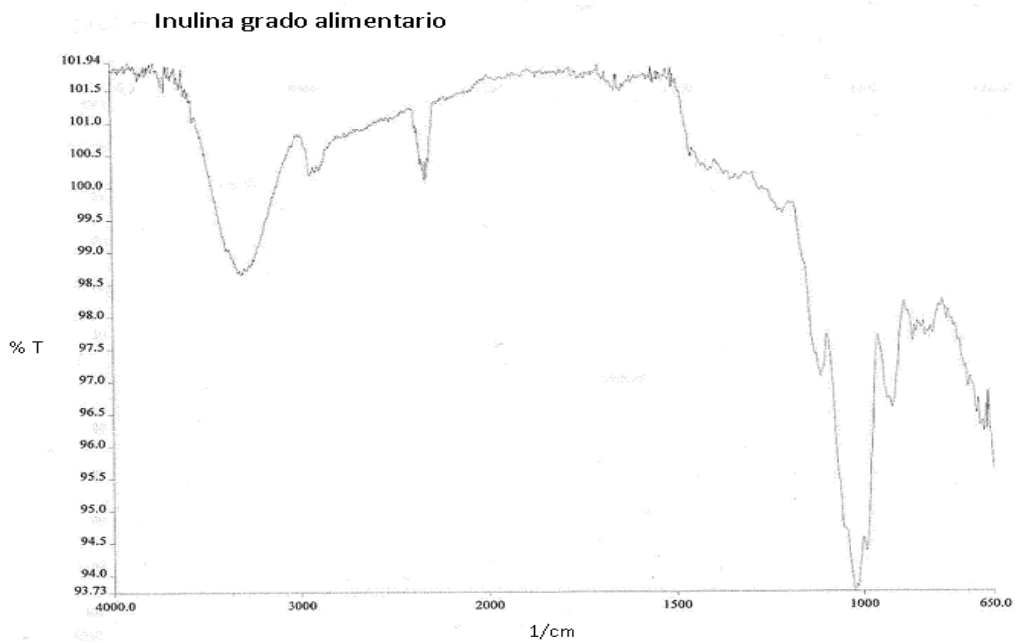


Figura 9. Espectro de IR de la inulina comercial grado alimentario



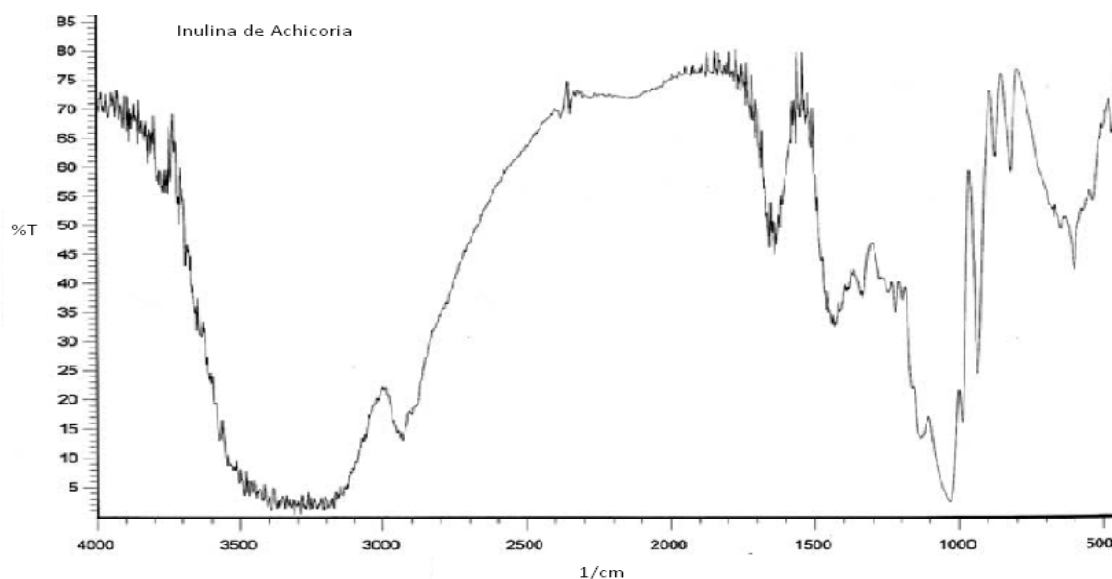


Figura 10. Espectro de IR de la Inulina obtenida de Achicoria (Molina, 2005)

La finalidad de utilizar esta técnica fue para comparar los espectros de IR de los compuestos obtenidos en los diferentes métodos de extracción, así como, del aguamiel, con los espectros de la inulina para poner de manifiesto la presencia de este compuesto en los productos de los tres procesos utilizados para la extracción de inulina. Lo primero que se observa es que los espectros de las Figuras 9 y 10, que corresponden a la inulina comercial grado alimentario y la inulina de la Achicoria, respectivamente, presentan picos característicos similares, a pesar de que se obtuvieron en laboratorios diferentes, lo que nos indica que es posible considerar estos espectros como representativos del compuesto denominado inulina. Molina *et al.*, 2005, al comparar el espectro de inulina de Achicoria con los obtenidos de la inulina de alcachofa y la inulina de Dalia, observaron un patrón esencialmente idéntico donde las bandas características aparecieron en  $3353\text{ cm}^{-1}$  y en  $1745\text{ cm}^{-1}$ . El primero pico fue identificado como un grupo O-H y el segundo como C=O (Wu and Lee, 2000).

Se observa que alrededor de la frecuencia  $3300$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  en los espectros de jugo, extracto y aguamiel, tenemos un pico particular, la frecuencia que abarca de  $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  es característica de enlaces N-H que pertenece al grupo funcional de las aminas o bien de H que pertenecen a un puente de Hidrogeno u O-H libre (McMurry, 2001). La frecuencia de  $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  corresponde a



los aromáticos y la de  $1640-1680\text{ cm}^{-1}$  corresponde a  $\text{C}=\text{C}$  es decir a los alquenos (McMurry, 2001), por lo que podríamos ubicar estos grupos funcionales en los espectros para jugo, extracto y aguamiel. Solo dos espectros presentan un pico alrededor de la frecuencia  $1020\text{ cm}^{-1}$  el de jugo y el aguamiel, esta frecuencia de  $1000-1500\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un enlace  $\text{C}-\text{O}$  que puede pertenecer a un éter. Los espectros de inulina grado alimentario y grado químico también presentan una banda característica alrededor de esta frecuencia ( $1000\text{ cm}^{-1}$ ). En la región  $1030-1230\text{ cm}^{-1}$  se encuentra el enlace  $\text{C}-\text{N}$  que también pertenece a las aminas. La diferencia es que el enlace  $\text{C}-\text{N}$  pertenece a una amina primaria y el  $\text{N}-\text{H}$  a una amina secundaria (Yúfera, 1996) en esta longitud solo se encuentran bandas en la inulina proveniente de Achicoria.

Con los espectros de IR, obtenidos para extracto, jugo y aguamiel se vislumbró que existe una gran posibilidad de que la inulina se encuentre presente en ellos.

#### 7.4.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A PULSOS AMPEROMETRICOS HPEAC-PAD

Los productos obtenidos del aguamiel fueron sometidos a una cromatografía iónica adaptada a un detector con pulsos amperométricos. Se generaron los cromatogramas que se presentan en las Figuras de la 11, 15, 16, y 17. En la Figura 11 se presenta el cromatograma obtenido para la inulina de la planta Dalia, que se corrió bajo las mismas condiciones, y en la cual se muestran los tipos característicos de estos carbohidratos con sus tiempos de retención.

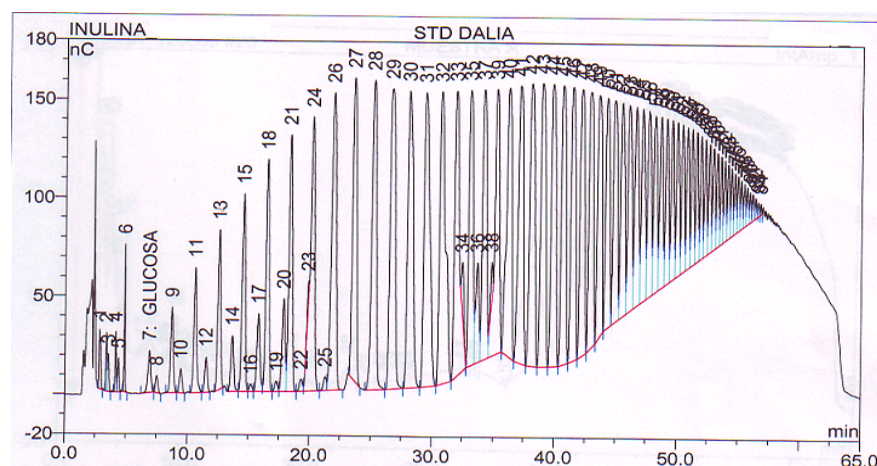


Figura 11. Cromatograma de la inulina utilizada como patrón (Dalia)



Al comparar la Figura 11 con el cromatograma obtenido para la inulina de Achicoria (Figura 12), se observa un patrón característico de bandeo de la inulina extraída de Dalia y Achicoria.

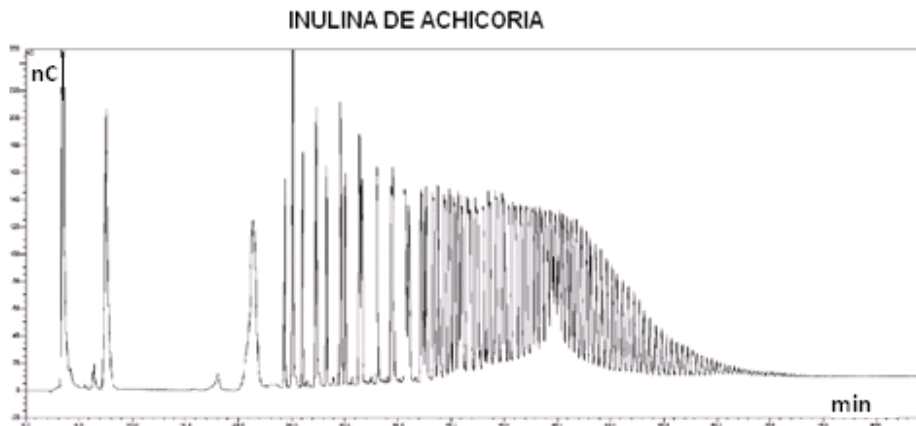


Figura 12. Cromatograma de la inulina de la Achicoria (Ravenscroft et al., 2009)

Así mismo, en la Figura 13 se presentan los picos característicos obtenidos en el cromatograma de la maltodextrina a dos concentraciones diferentes de hidróxido de sodio. Es importante notar que los picos de mayor tamaño se obtienen entre los 15 y los 30 minutos. Es elemental considerar este carbohidrato por que es utilizado en los procesos de secado por aspersion, que es le método más empleado en la obtención de inulina comercial.

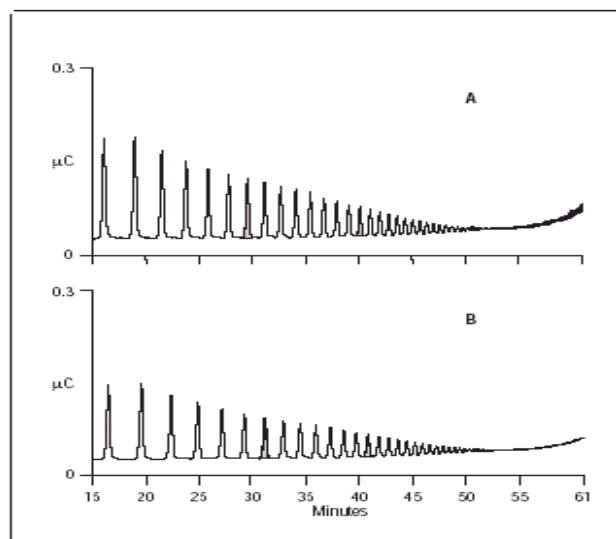


Figura 13. Cromatograma de la separación de maltodextrina con A: 100 mM y B: 150 mM de NaOH (Dionex 2009b)



En la Figura 14 se presenta el cromatograma obtenido para la inulina obtenida del *Agave americana*, en cual se presentan los picos típicos y se observa que se encuentran entre 30 y 50 minutos.



Figura 14. Cromatograma de la inulina de *Agave americana* (Ravencroft et al., 2009)

Con los cromatogramas presentados anteriormente es posible analizar los resultados obtenidos para las tres pretratamientos realizados empleando aguamiel. En la Figura 15 aparecen la bandas características obtenidas para el aguamiel liofilizado.

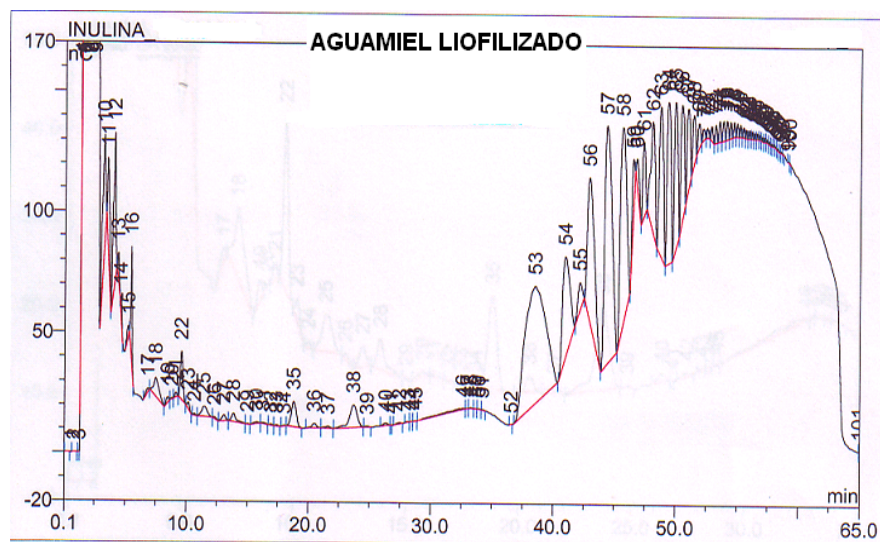


Figura 15. Cromatograma del aguamiel liofilizado



Se observa en esta figura que los picos característicos de la maltodextrina se encuentran entre los 15 y los 40 minutos, mientras que se presentan picos característicos de la inulina entre los 35 y 50 minutos, que son similares a los obtenidos para el *A. americana* (Ravenscroft *et al.*, 2009). También entre el tiempo 0.1 y 10 minutos se observan los picos característicos que se obtuvieron en la inulina de *Dalia*, *Achicoria* y de *A. americana*. Por lo que a pesar de que la textura del producto liofilizado no fue adecuada para su uso posterior, la inulina se encuentra presente en este compuesto.

El cromatograma típico para el aguamiel precipitado con alcohol y liofilizado posteriormente se presenta en la Figura 16.

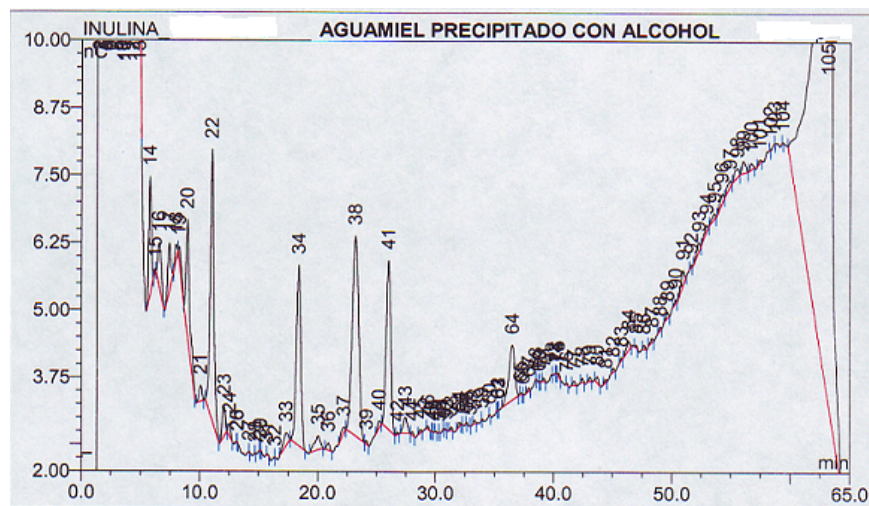


Figura 16. Cromatograma del aguamiel precipitado con alcohol previo al proceso de liofilización

A pesar de que en esta Figura se presentan los picos típicos en el intervalo de tiempo 0.1 a 10 minutos para las inulinas, los picos característicos para el intervalo de tiempo entre 35 y 40 minutos, aparecen disminuidos. En estudios recientes se sabe que la inulina y sus derivados son moléculas relativamente pequeñas (peso molecular aproximado de 6,000), en comparación con otros compuestos convencionalmente aceptados como fibra dietética (peso molecular entre 10,000 – 50,000), por lo tanto, estas inulinas no precipitan completamente en solución de etanol, pues son solubles o parcialmente solubles en dicho solvente (Madrigal y Sangronis, 2007), por lo que es probable que una parte de ellas se pierda durante la precipitación y por ello se vean parcialmente disminuidas en el producto final obtenido. Sin embargo aparecen algunos picos de gran tamaño en la zona de 10 a 28 minutos. Tal vez sean carbohidratos que presentan un menor peso molecular,



ya que en la Figura 11 se presenta el pico característico a la glucosa que se encuentra entre 0.1 y 10 minutos.

El producto obtenido para el aguamiel secado por aspersión se presenta en la Figura 17, podemos observar que la mayoría de los picos se presentan entre 0.1 y 20 minutos, debido que se utilizó maltodextrina, aparecen los picos característicos de esta compuesto entre 15 y 25 minutos y los primeros picos representan carbohidratos de bajo peso molecular.

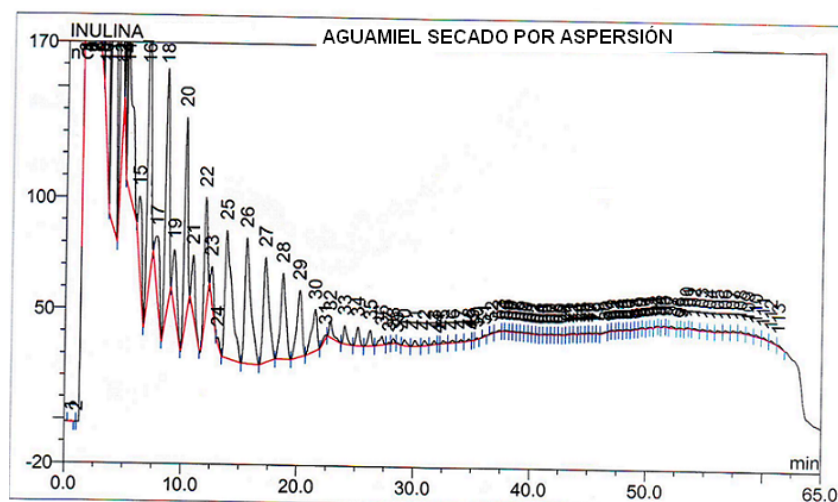


Figura 17. Cromatograma del aguamiel secado por aspersión

Debido a la facilidad de manejo y conservación, se decidió trabajar con el producto obtenido del secado por aspersión, ya que se obtuvo en forma de polvo y se pudo almacenar a temperatura ambiente con facilidad y sin riesgo de que se descompusiera.

#### 7.4.3. IDENTIFICACIÓN DE INULINAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA

Con la finalidad de caracterizar la inulina obtenida del aguamiel, al polvo obtenido en el proceso de secado por aspersión se le determinó su espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, NMRH<sup>1</sup> (Figura 18) y se comparó con las inulinas comerciales grado químico y alimentario.



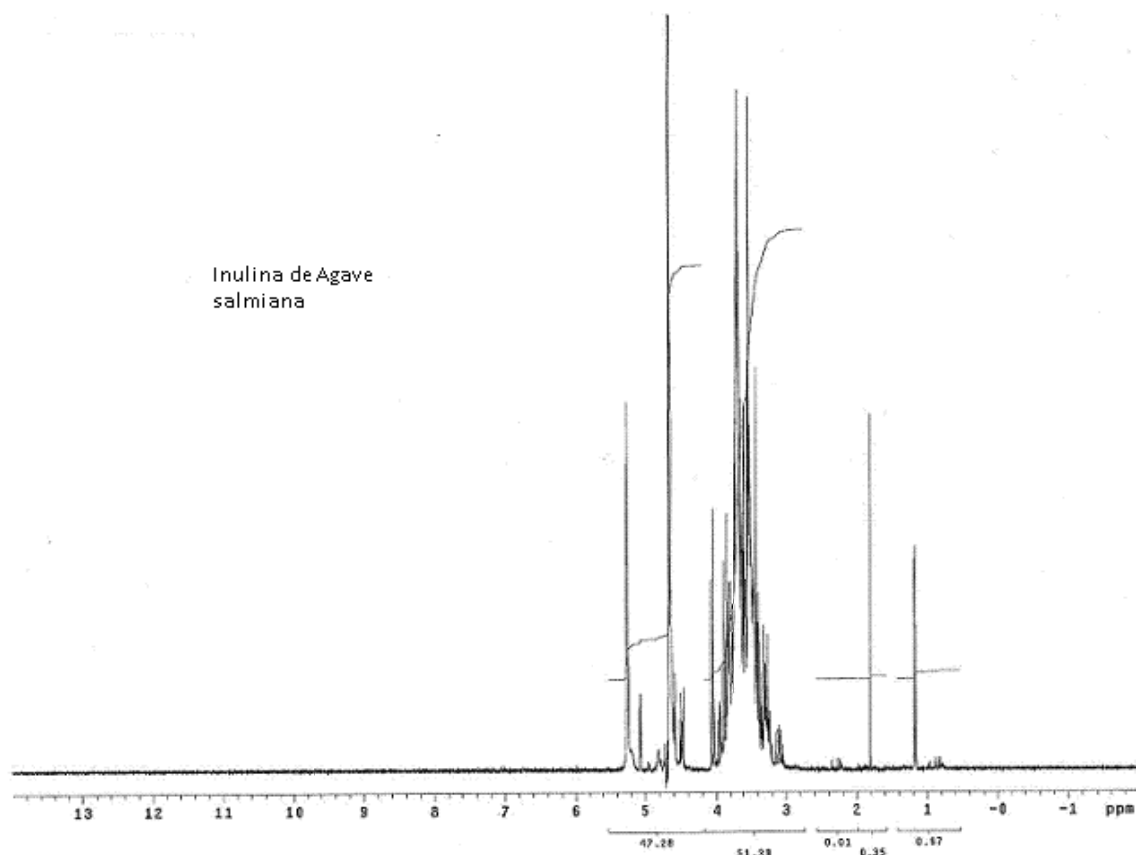


Figura 18. Espectro de RMN<sup>1</sup> de la inulina del aguamiel de *Agave salmiana*

Para realizar la discusión de los picos obtenidos se comparó con el cromatograma obtenido para la inulina extraída del agave *A. americana* (Ravenscroft *et al.*, 2009), que se muestra en la Figura 19, la composición esperada para inulina consiste en unidades de fructosa ligadas por enlaces  $\beta$  2-1 fructosil-fructosa o Fructopiranosil ( $\text{Fru}_f$ ), siendo el término “fructanos” usado para denominar este tipo de compuestos y una unidad de glucosa acoplada por un enlace  $\alpha$  1-2 residuo D-glucopiranosil o glucopiranososa terminal ( $\text{Glc}_p$ ) (Sims, 2003). Esta técnica nos permite encontrar los hidrógenos (H1, H2...Hn) unidos a los grupos funcionales principales. Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 19, se han indicado los picos característicos en los cuales se encuentran los hidrógenos que corresponden a Fructopiranosil y a glucopiranososa. Así en el intervalo de 3.4 a 4.3 ppm se encuentran ubicados la mayoría de los hidrógenos de Fructopiranosil y en menor grado a la glucopiranososa, es decir, los H2-H6 asociados a los residuos de  $\text{Glc}_p$  y  $\beta$ - $\text{Fru}_f$ . Entre 4.5 y 4.7 ppm se ubica el solvente que se utilizó, que en este caso fue DHO, y en 5.4 se encuentra el hidrógeno H1 asociado a de la gucopiranososa,  $\alpha$ -  $\text{Glc}_p$  (Ravenscroft *et al.*, 2009). Las señales complejas restantes entre 4.40 y 3.50 ppm presentes en la inulina de *Agave americana* se



atribuyen a la multiplicidad de los picos de Fru<sub>f</sub> lo que sugiere la presencia de vínculos adicionales y de ramificación asociados a residuos Fru<sub>f</sub> que conforman un polímero lineal con enlaces β 1-2 (Ravenscroft *et al.*, 2009).

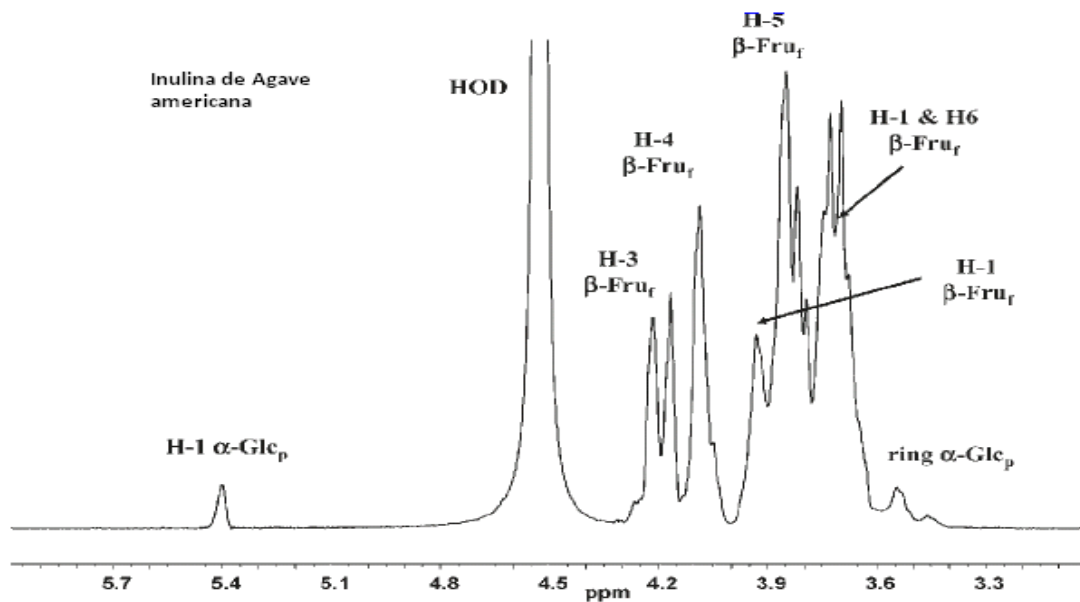


Figura 19. Espectro de RMN<sup>1</sup> para la inulina extraída de *Agave americana* (Ravenscroft *et al.*, 2009)

Tal como se ilustra en la Figura 20, la estructura A pertenece a la molécula lineal con enlaces β 1-2 característica de la inulina, mientras que la molécula B es propia del agave, y aunque también posee enlaces β 1-2, tiene ramificaciones adicionales originando un espectro más complejo, esta molécula recibe el nombre de agavina (Mancilla y López, 2006).

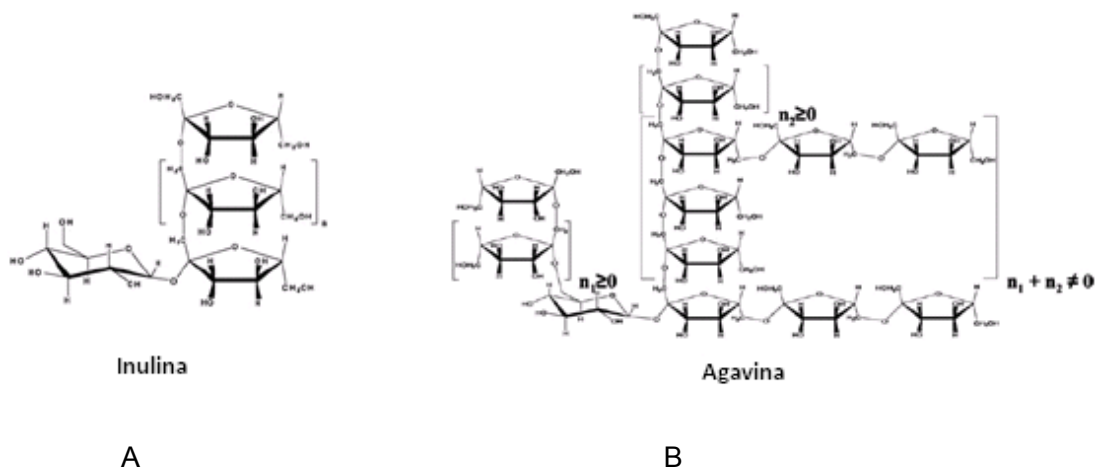


Figura 20. A: Molécula de inulina, B: inulina encontrada en el agave; Agavina (Mancilla y López, 2006)





Tomando únicamente el intervalo 1 a 5.5 ppm para el espectro de la inulina obtenida de aguamiel de *A. salmiana* (Figura 21) se observa que aparecen los picos descritos en el cromatograma de inulina de *A. salmiana*, en este caso, el agua deuterada  $D_2O$  presenta un pico característico en 4.6 ppm. Sin embargo se observa que aparecen varios picos entre 3 y 4.2 ppm, lo que indica la presencia de ramificaciones adicionales a la inulina. Asimismo, es probable que se presenten las señales correspondientes a la maltodextrina utilizada para el secado por aspersión.

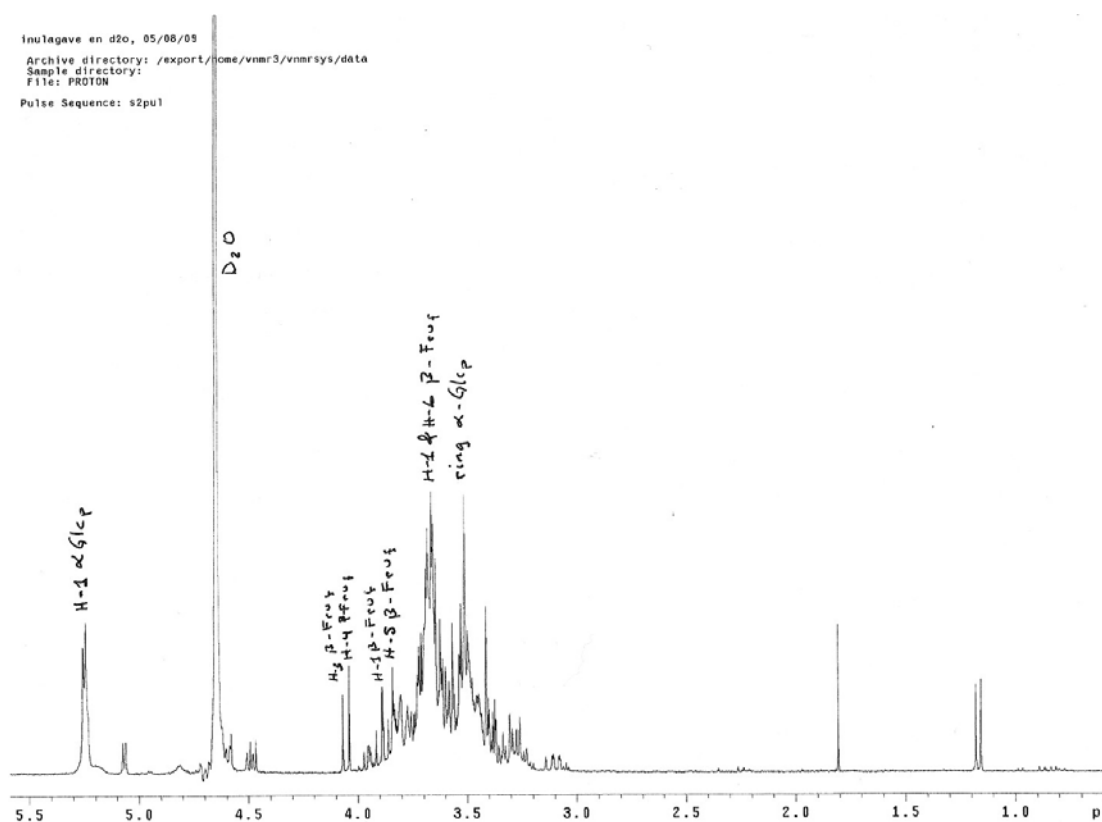


Figura 21. Ampliación del espectro de  $RMNH^1$  de la inulina del aguamiel de *Agave salmiana*

El espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno característico para la inulina comercial grado químico (sigma), se presenta en la Figura 22. Se observa un pico característico en 4.6 ppm que es el que se identifica como agua deuterada ( $D_2O$ ), que fue el solvente que se utilizó.

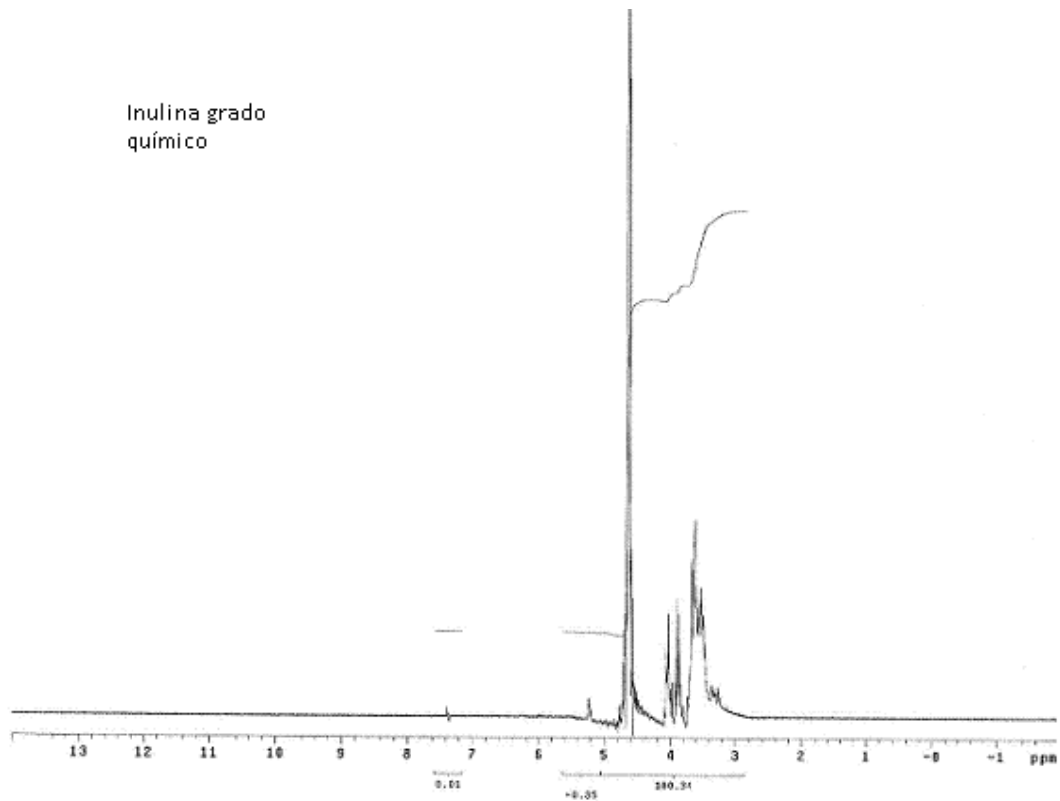


Figura 22. Espectro de RMNH<sup>1</sup> para la inulina comercial grado químico (sigma)

Para la inulina grado químico se presenta una serie de picos entre 3 y 4 ppm, los cuales aparecen en los espectros de resonancia, tanto de la inulina obtenida del aguamiel de *Agave salmiana*, así como, para el espectro tomado de la literatura que corresponden a inulina de *Agave americana*. Se presenta un pico en 5.2 ppm, que corresponde al pico de 5.4 ppm obtenido en este último espectro.

Comparando con los reportes bibliográficos, se tiene que la inulina extraída de la Achicoria presenta el espectro mostrado en la Figura 23, en el que se detectan en el intervalo de ppm de 3.4 a 4.3 la mayoría de los hidrógenos de Fructopiranosil y en menor grado a la glucopiranosil, es decir, los H1-H6 asociados a los residuos de Gluc<sub>p</sub> y β- Fru<sub>f</sub> que corresponden con los picos detectados en la Figura 19 y 21 que corresponden a las inulinas extraídas de *A. americana* (Ravenscroft *et al.*, 2009) y de *A. salmiana*, que se utilizó en este trabajo.



*Evaluación del efecto prebiótico*

También se determinó el espectro de resonancia de la inulina comercial grado alimenticio, en la Figura 24 se muestra dicho espectro, se pudo observar que aparecen los picos característicos para las inulinas antes estudias

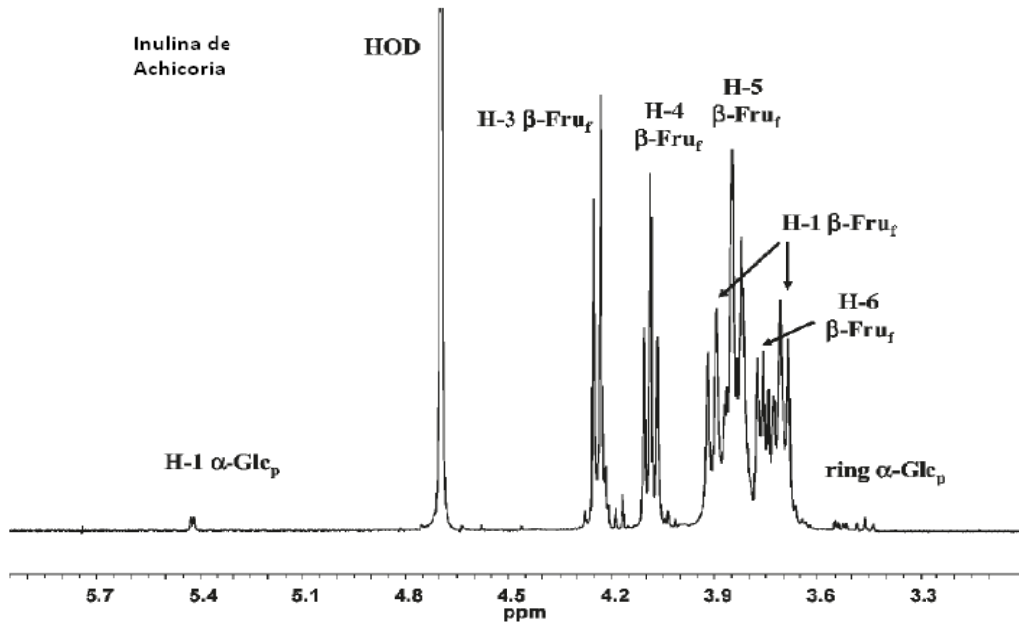


Figura 23. Espectro de  $RMNH^1$  de la inulina extraída de Achicoria (Ravenscroft et al., 2009)

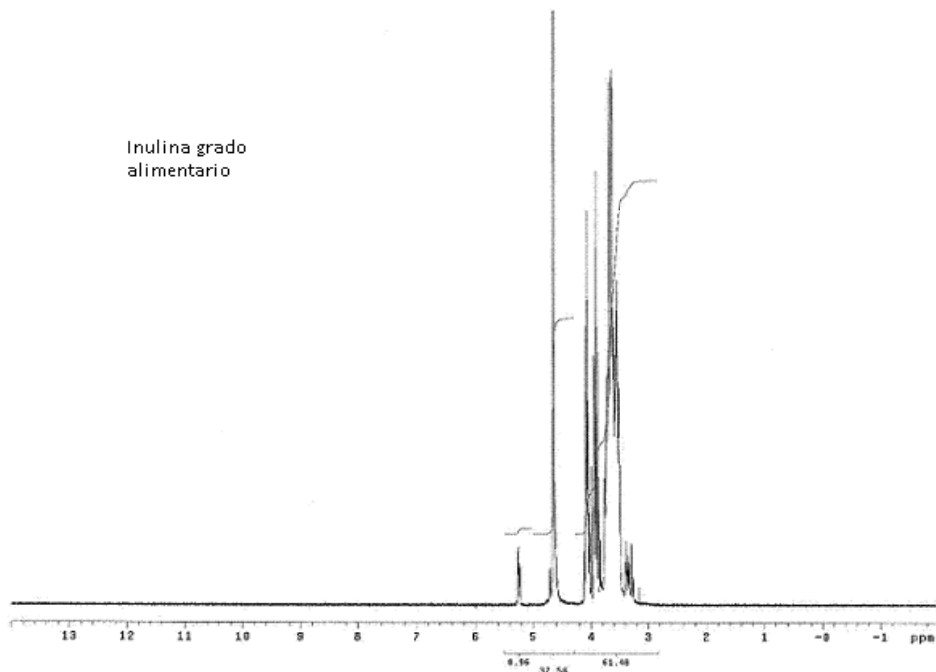


Figura 24. Espectro de  $RMNH^1$  de la inulina comercial grado alimentario.



Tanto para RMN como para IR se observa que el factor determinante es el método de obtención y purificación, así como, la fuente de la que es extraída la inulina. Las dos fuentes empleadas en el estudio como grado analítico, provienen de Achicoria (patrón en la determinación de HPLC) y Dalia (patrón en la determinación de HPLC-PAD), ambas son fuentes características para la obtención de inulina a nivel industrial, cuyo proceso de extracción es el siguiente: se lava y reduce su superficie, se realiza la extracción por agua caliente, posteriormente se trata el extracto con una mezcla de enzimas que incluye entre otras una sacarasa para destruir la sacarosa presente,  $\alpha$ -amilasa y maltasa de modo que éstas degraden todos los carbohidratos presentes menos los fructanos. Los azúcares resultantes se eliminan por una refinación mediante resinas de intercambio iónico, la inulina ahora obtenida se trata con una exoinulasa purificada o inmovilizada si se desea obtener fructanos menores, se purifica mediante filtración estéril, la concentración de producto final se logra por evaporación, principalmente empleando secadores de aspersion (Madrigal y Sangronis, 2007; Marquina y Santos, 2003; Utha State University, 2003).

La fuente grado alimentario se obtiene de la raíz de Achicoria donde se extrae por un método térmico, bajo inmersión en agua caliente, posteriormente se realiza una hidrólisis enzimática parcial, que no es tan específica como la de grado químico, (no se realiza la purificación con columnas de intercambio iónico), posteriormente se somete a secado por aspersion para obtener el producto final (Orafti, 2007).

La inulina obtenida de aguamiel no lleva un proceso de hidrólisis parcial, ni purificación posterior, únicamente se realizó el secado por aspersion, con la incorporación de un agente encapsulante la maltodextrina.

## **7.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INULINA**

### **7.5.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE INULINA POR HPLC**

Se realizó el análisis de las inulinas grado químico, alimentario e inulina extraída del aguamiel de *A. salmiana* sometido a un proceso de secado por aspersion, por medio de HPLC Figura 25. El tiempo de retención encontrado fue de 8.0972 min y las concentraciones de inulina para cada muestra se localizan en el Cuadro 12.

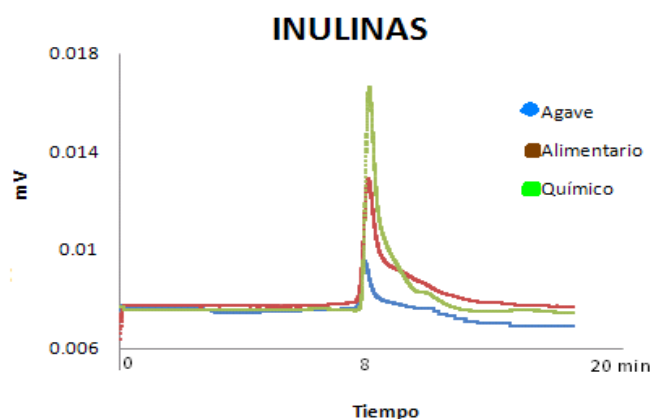


Figura 25. Espectro del análisis de las inulinas empleando HPLC.

Cuadro 12. Concentración de las inulinas empleadas en g/L

*Concentración g/L	
Aguamiel	15.6780
Alimentario	18.0920
Químico	20.0382

\* Concentración de inulina evaluada en polvo rehidratada en agua, no en el medio de cultivo

La inulina esta formada por unidades denominadas fructanos estos son polímeros de fructosa lineares y ramificados, que se sintetizan añadiendo mediante enlaces  $\beta$  2-1 unidades de fructosa a tres trisacáridos básicos (1-kestosa, 6-kestosa y neokestosa), éstos trisacáridos básicos se producen por la unión de una fructosa a uno de los tres grupos hidroxilo primarios de la sacarosa vacuolar, las elongaciones posteriores ocurren por enzimas específicas denominadas fructosiltransferasas, que transfieren fructosa desde la sacarosa para elongación de la cadena fructano. La variabilidad entre especies e incluso la especificidad de los tejidos en la estructura de los fructanos y su grado de polimerización, se puede atribuir a las diferencias en las fructosiltransferasas (Hellwege *et al.*, 2000; Pavis *et al.* 2001; Vergauwen *et al.*, 2003). El modelo básico para la síntesis de inulina involucra dos enzimas, la primera enzima Sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) cataliza la transferencia de un residuo fructosil de una molécula de sacarosa a otra molécula se sacarosa, formándose el trisacárido 1-Kestona, la segunda enzima  $\beta$  2-1 fructan-1-fructosiltransferasa (1-FFt) transfiere residuos de fructosa desde la molécula de fructano con un grado de polimerización  $\geq 3$  a otra molécula de fructano o a la sacarosa. La acción de estas dos



enzimas da como resultado una mezcla de fructanos con cadenas de distintas longitudes (Koops y Jonker, 1996, Lüscher *et al.*, 1996, Van den Ende *et al.*, 1996).

En contraste con el almidón, el que es almacenado en organelos especializados (plástidos), los fructanos son sintetizados y almacenados en las vacuolas de las células vegetales. En otras plantas, los fructanos se almacenan en órganos especializados, como por ejemplo en la raíz principal de Achicoria (*Cichorium intybus*), en los tubérculos de Dalia (*Dahlia variabilis*), y en los bulbos del tulipán (*Tulipa gesneriana*) y de la cebolla (*Allium cepa*) (Tognetti *et al.*, 1990).

En cuanto a la producción de inulina en la planta de achicoria se ha demostrado una correlación entre la iniciación de la síntesis de la misma y el estrés producido cuando se le somete a bajas temperaturas y a déficit hídrico, respectivamente (De Roverr *et al.*, 2001).

En el agave se lleva acabo el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) y como carbohidratos de reserva almacenan fructanos que también es por respuesta al estrés ambiental ya que se desarrolla en regiones con escasa disponibilidad de agua y de CO<sub>2</sub> por lo que los sintetiza para soporta la sequía (Taíz y Zeiger, 2002). A este respecto Mojica y López (2008), realizaron un estudio para ver como afectaba la edad de la planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul en la producción de fructanos y encontraron que el contenido de fructanos no mostró un crecimiento exponencial de acuerdo a la edad de la planta. Los cambios más notables se encontraron en las etapas que obedecen, ya sea al gasto energético, que implica el primer evento de reproducción asexual (hijuelos entre los 3 y 4 años de edad), madurez fisiológica de la planta (entre los 6 y 8 años) y/o al rápido desarrollo de la inflorescencia (después de los 8 años). Mediante cromatografía en capa fina (TLC) se observó que las plantas de 1 a 5 años de edad almacenan principalmente fructanos de bajo grado de polimerización (fructooligosacáridos) mientras que las plantas de 6 a 10 años almacenan fructanos de alto grado de polimerización. A través de HPAEC-PAD se confirmó la complejidad estructural de los fructanos de agave. La planta empleada para este estudio corresponde a la edad de 9 años donde se almacenan fructanos de grado de polimerización altos.

Esto demuestra que además de las diferencias morfológicas en las plantas existen también cambios fisiológicos, resultando en diferencias significativas tanto en el contenido de carbohidratos, como en la estructura y grado de polimerización de los fructanos afectando la concentración de los mismos en las inulinas empleadas.



## 7.6. EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FOS DE AGUAMIEL EN BACTERIAS LÁCTICAS

### 7.6.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MEDIO MRS CON GLUCOSA

Se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en medio MRS complementado con inulina en concentraciones de 4, 12 y 20 g/L , para la inulina grado químico, grado alimentario, y aguamiel. Las cinéticas obtenidas se muestran en las Figuras 26-28.

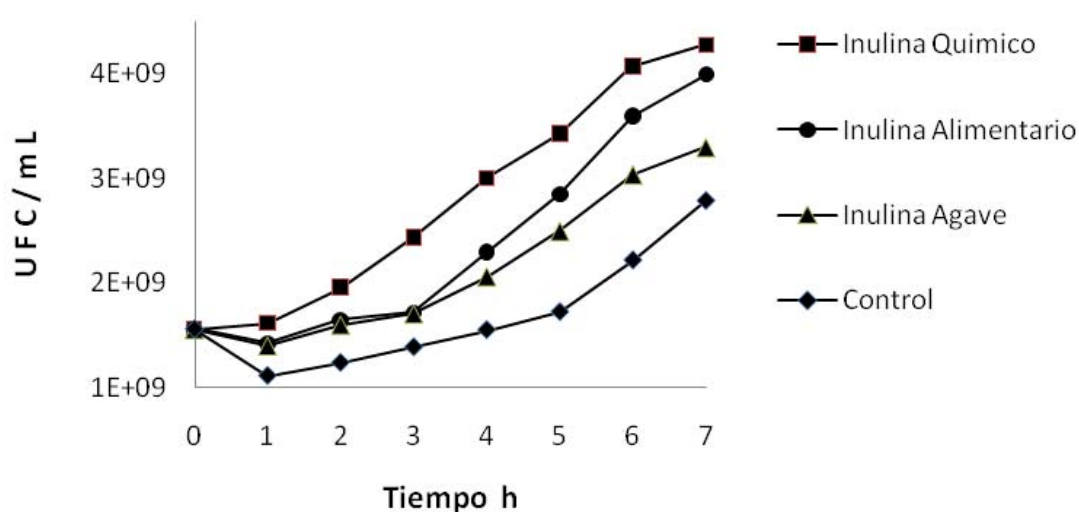


Figura 26. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (4g/L)

En la Figura 26 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS con glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 4 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 61.7, p < 0.0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

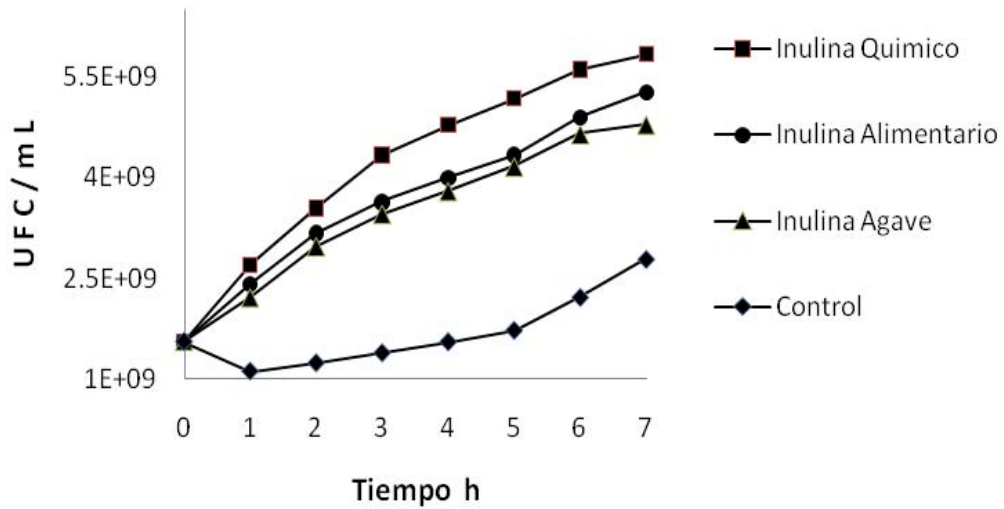


Figura 27. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (12g/L)

En la Figura 27 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS con glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 12 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 1688$ ,  $p < 0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

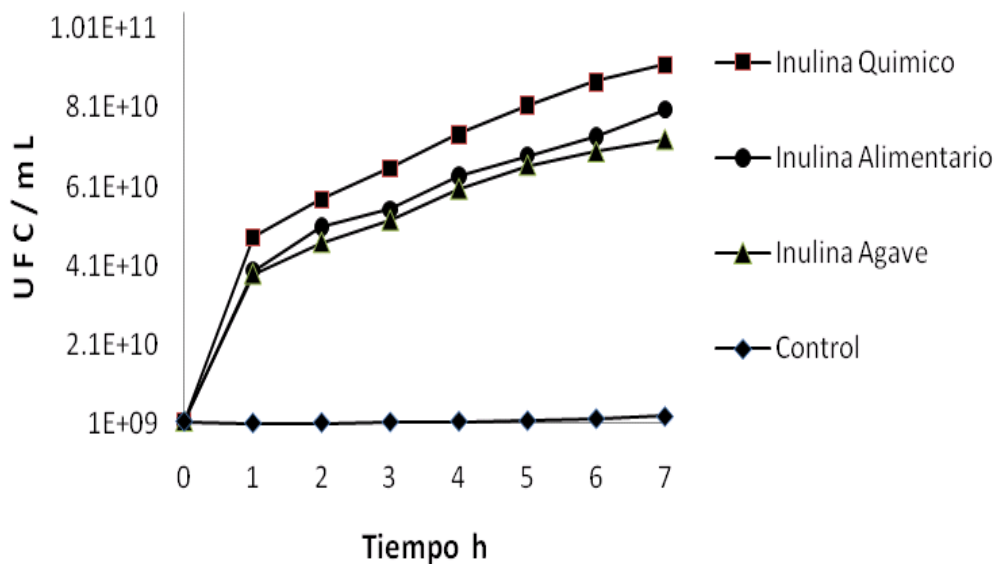


Figura 28. Cinéticas de crecimiento de BAL con glucosa e inulina (20g/L)





En la Figura 28 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS con glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 20 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 4670$ ,  $p < 0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

### 7.6.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MEDIO MRS SIN GLUCOSA

Se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en medio MRS sin glucosa complementado con inulina en concentraciones de 4, 12 y 20 g/L para la inulina grado químico, grado alimentario, y del aguamiel. Las cinéticas obtenidas se muestran en las Figuras 29-31.

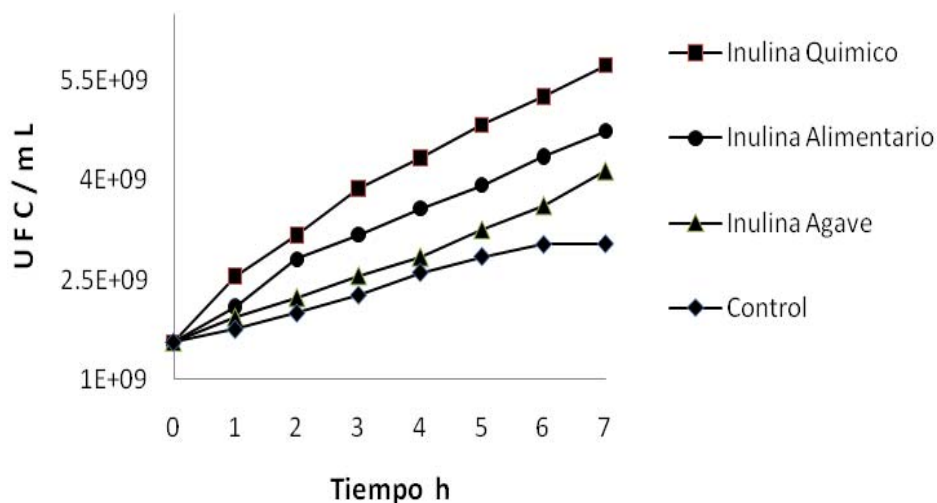


Figura 29. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (4g/L)

En la Figura 29 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS sin glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 4 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 5830$ ,  $p < 0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

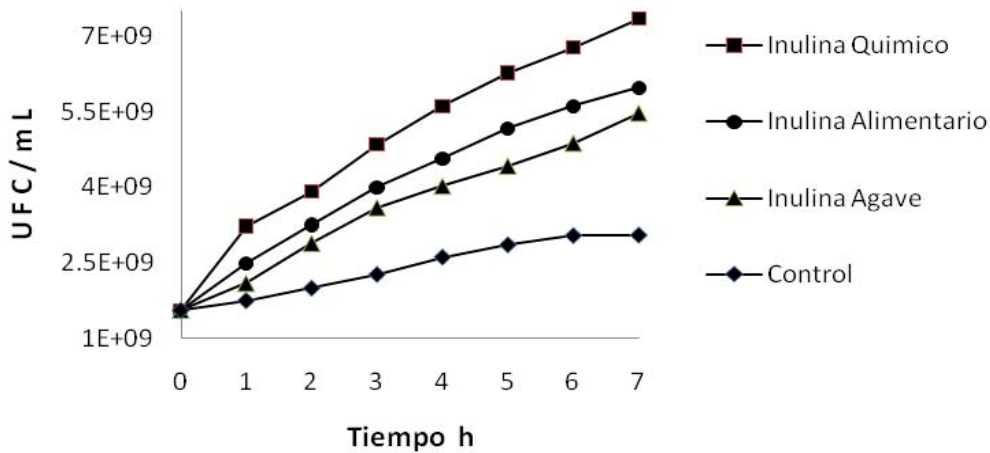


Figura 30. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (12 g/L)

En la Figura 30 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS sin glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 12 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 4845$ ,  $p < 0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

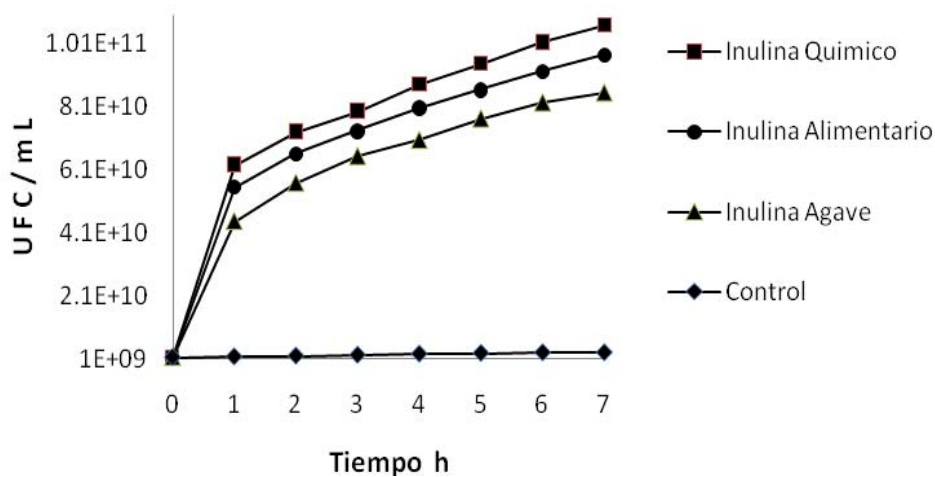


Figura 31. Cinéticas de crecimiento de BAL sin glucosa e inulina (20 g/L)



### *Evaluación del efecto prebiótico*

En la Figura 31 se presentan las cinéticas de crecimiento de las bacterias lácticas crecidas en medio MRS sin glucosa, adicionado con diferentes tipos de inulina a una concentración de 20 g/L, el ANOVA de medida repetidas indicó diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de las bacterias al ser crecidas en los diferentes sustratos empleados ( $F_{(3,8)} = 3772$ ,  $p < 0001$ ). La prueba a posteriori de Duncan mostro a la inulina grado químico como la que presentó el mayor crecimiento, posteriormente la inulina grado alimentario, subsiguientemente la inulina de aguamiel, siendo el control el que presentó el menor número de UFC.

Se realizó el ANOVA de dos factores para evaluar el efecto de la concentración y el tipo de inulina para las cinéticas en medio MRS con y sin glucosa. Se obtuvo lo siguiente: para las cinéticas con medio MRS con glucosa diferencias estadísticas significativas ( $F_{(2,24)} = 3750$ ,  $p < 0001$ ) y con la prueba a posteriori de Duncan se formaron tres grupos siendo la concentración 20g/L la que presentó el mayor número de UFC. Para el tipo de inulina ( $F_{(3,24)} = 2656$ ,  $p < 0001$ ) y con la prueba a posteriori de Duncan se formaron cuatro grupos, siendo la inulina grado químico la de mayor número de UFC y para la interacción inulina y concentración ( $F_{(6,24)} = 427$ ,  $p < 0001$ ) medio MRS con glucosa para diferentes inulinas.

Para las cinéticas con medio MRS sin glucosa se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ( $F_{(2,24)} = 1109$ ,  $p < 0001$ ) y con la prueba a posteriori de Duncan se formaron tres grupos siendo la concentración 20g/L la que presentó el mayor número de UFC. Para el tipo de inulina ( $F_{(3,24)} = 13387.3$ ,  $p < 0001$ ) y con la prueba a posteriori de Duncan se formaron cuatro grupos, siendo la Inulina grado químico la de mayor número de UFC y para la interacción inulina y concentración ( $F_{(6,24)} = 139$ ,  $p < 0001$ ) medio MRS con glucosa para diferentes inulinas.

Es importante considerar que la inulina comercial grado químico (Sigma) es obtenida de Achicoria ya que la especie de planta más utilizada para la extracción industrial de la inulina es la *Chicorium intybus* (Achicoria), y fue el complemento del medio de cultivo MRS que obtuvo los mejores crecimientos de bacterias lácticas en las cinéticas realizadas. En ambas fermentaciones tanto en la de medio MRS con glucosa como en MRS sin glucosa el consumo de inulina se ve determinado por la pureza, complejidad y concentración de la misma. Tanto la inulina grado químico como la inulina grado alimentario, se obtienen de la raíz de achicoria, la diferencia entre ellas es la composición, así la inulina grado alimentario contiene 90% inulina, 6% sacarosa, 4% glucosa-fructosa y en la inulina grado químico se eliminan las trazas de sacarosa y glucosa-fructosa mante



niendo solo las cadenas de inulina (Orafti, 2009). Ahora bien, la inulina obtenida en el proceso de secado por aspersión del aguamiel contiene maltodextrinas, por lo que su grado de pureza disminuye al compararlo con las inulinas comerciales utilizadas.

La complejidad de las inulinas comerciales utilizadas tienen un grado de polimerización que varía de 2-38 unidades de fructosa y que por lo regular presentan los tipos de enlace  $\beta$  1-2 en cadenas lineales (Mancilla y López, 2006; Ravenscroft *et al.*, 2009). Asimismo, se ha reportado que la inulina de agave (agavina) presenta un grado de polimerización entre 6-50 unidades de fructosa, con enlaces  $\beta$  1-2 en cadenas ramificadas (Mancilla y López, 2006). Por otro lado, en investigaciones realizadas por otros investigadores, se ha observado que el consumo de fructooligosacáridos generados en la hidrólisis de inulina de Achicoria, son aprovechados y metabolizados rápidamente por bacterias lácticas y que las tasas de metabolización para la inulina GF<sub>n</sub> (con un residuo de glucosa) y F<sub>n</sub> (sin glucosa residual) son similares, sin embargo la fermentación es lenta cuando el grado de polimerización es mayor a 10 (Roberfroid *et al.*, 1998).

Con respecto a la concentración de inulina utilizada, se observó que el incremento en la concentración produjo un incremento en el crecimiento bacteriano, estos resultados coinciden con los obtenidos por Miñana (2007), quien realizó un estudio donde evaluó diferentes concentraciones de FOS y encontró que el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias es directamente proporcional a la concentración. Con respecto a la inulina de agave en relación a la inulina obtenida de Achicoria, Carrillo *et al.* (2009), realizaron un estudio con *Lactobacillus* en presencia de fructanos de *Agave tequila* contra fructanos de Achicoria encontraron que los fructanos de Achicoria mostraron el mejor efecto con respecto a los de maguey de acuerdo con los resultados del análisis de varianza el efecto de los dos tipos de fructanos sobre el incremento en el desarrollo de *Lactobacillus* fue estadísticamente diferente, pero dependió significativamente de la fuente y concentración del fructano, observándose un efecto directamente proporcional a la concentración, siendo el mejor tratamiento el que incluía los fructanos provenientes de Achicoria en la mayor concentración utilizada que fue de 21 g/L. La interacción fuente vs concentración fue altamente significativa pero en dependencia de la fuente de fructano. Con respecto al crecimiento determinado por densidad óptica, los fructanos de Achicoria provocaron un mayor incremento ( $p > 0.001$ ) indicando un mayor desarrollo del microorganismo. Este efecto también fue demostrado en las cinéticas realizadas en el presente trabajo Figuras 26-31 donde se observa que el mayor crecimiento se obtuvo con la inulina grado químico seguida de la de grado alimentario (ambas



---

*Evaluación del efecto prebiótico*

provenientes de achicoria) posteriormente la inulina de aguamiel de *A. salmiana* y por último el testigo. Relación que también se observa en las cinéticas realizadas con *Lactobacillus delbrueckii* que a mayor concentración mayor crecimiento.

Las cinéticas con medio MRS con y sin glucosa presentaron un mayor crecimiento en la inulina grado químico, seguida de la inulina grado alimentario, ambas con un grado de polimerización menor que la inulina de agave, esta última mostrando un crecimiento reducido que las dos anteriores ya que el microorganismo tarda más en metabolizarla. Urias y López (2004), evaluaron los fructanos de diferentes agaves con respecto al crecimiento de *Bifidobacterium breve* y observaron que los fructanos de diferentes agaves tuvieron efectos distintos en estimular el crecimiento de *B. breve*. Los fructanos de cadena más corta estimularon mejor el crecimiento bacteriano. De esta manera, los fructanos de hoja de *A. angustifolia* Oax., *Dasyrillion spp.* y *A. tequilana* Gto. fueron los que presentaron mayor efecto comparado con los de inulina comercial marca Orafiti que utilizaron (Raftilose®Synergy1), la cual tienen mayor grado de polimerización. A su vez, también fue mayor el crecimiento bacteriano al compararlo utilizando fructosa. La fructosa es absorbida antes de entrar al intestino grueso, no llegando a estimular el crecimiento de las bacterias colónicas, caso contrario a los fructanos, los cuales se ha reportado que aproximadamente el 88% alcanza el colon.

Serrato *et al.* (2005), evaluaron el crecimiento de *Lactobacillus delbruecki* en un medio compuesto principalmente por sacarosa y extracto de levadura observaron que la concentración de sustrato al final de la evaluación después de 150 h se mantiene estable, llegaron a la conclusión de que *Lactobacillus delbruecki* limita su consumo por los niveles de concentración de ácido láctico alcanzado que causan la inhibición del crecimiento y del consumo de sustrato. El tipo de sustrato puede modificar la concentración del ácido láctico u otros ácidos como ácido acético, propiónico y butírico ocasionando que *Lactobacillus delbruecki* asimile de manera distinta cada uno de ellos viéndose reflejado en el crecimiento del mismo, es probable que sea uno de los factores que influyan en el bajo crecimiento cuando se emplea glucosa e inulina juntas dentro del medio de cultivo.

Un crecimiento lento debido a la presencia de glucosa como fuente principal de carbono, fue observado por Escalante *et al.* 2006, al evaluar tres diferentes fuentes de carbono: glucosa, inulina y almidón resistente tipo II en *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentarum* en medio MRS, se obtuvo un mayor crecimiento al utilizar almidón resistente e inulina. En el medio con glucosa como



fuelle de carbono, se observó una disminución en la concentración durante las tres primeras horas de cultivo. Efecto mostrado también en *Lactobacillus delbruecki* el mayor crecimiento se observó en las cinéticas sin glucosa. Gibson y Wang (1994) emplearon inulina y oligofruetosa para evaluar el crecimiento de *Bifidobacterium* el estudio confirmó la mayor capacidad fermentativa de *bifidobacterium* en el medio suplementado que en medio que solo contenía glucosa. En otro estudio realizado por Donkor *et al.*, (2007) se demostró que la inulina es mejor estimulante con respecto al almidón de maíz, ya que se requirieron más bajas concentraciones de inulina que de almidón para obtener un efecto considerable en el crecimiento de *Lactobacillus*. Factor que se evidencia en las cinéticas realizadas en este trabajo aunque no se evaluó almidón se evalúa inulina contra glucosa y se observa que la inulina (sin la presencia de glucosa) esta siendo mejor estimulante que la glucosa, y como se menciona anteriormente en el estudio de Urias y López. (2004), los fructanos de agave son mejores estimulantes que la fructosa. Tanto la glucosa como la fructosa son monosacáridos que al unirse para formar oligosacáridos pueden adquirir una configuración especial que los hace tener un efecto prebiótico (Solange y Ismael, 2006) en estos estudios se evidencia que por si solas no estimulan el desarrollo de las bacterias lácticas pero una vez que estas moléculas (glucosa y fructosa) entran en la vía de síntesis de polifruetanos descrita con anterioridad se observa que generan enlaces  $\beta$  2-1 que las hace especiales y no fermentables por cualquier microorganismo solo aquellos que poseen las enzimas necesarias para desdoblar el enlace y aprovechar dichas fuentes de carbono. El efecto prebiótico esta siendo demostrado por las cadenas de polifruetanos y no por las moléculas simples de glucosa y fructosa. Esta observación origino el concepto de prebiótico siendo Weston y Brocklenbank los que llegaron a la conclusión de que los azúcares que provocaban el efecto prebiótico eran los oligosacáridos no las moléculas simples que los conforman.

En los cultivos con menor cantidad de inulina 4 y 12 g/L se registraron crecimientos menores hasta de  $10^2$  UFC de magnitud con respecto a los que contenían cantidades mayores de este sustrato (20 g/L), siendo que las cuentas viables mas elevadas fueron las de los cultivos con inulina grado químico lo cual sugiere que para las concentraciones de 4 y 12 g/L existe una limitante de nutrientes para la proliferación de esos cultivos. En consecuencia, los resultados obtenidos en el medio a 20 g/L ofrecen la disponibilidad de mayor cantidad de material fermentable.



### 7.7. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO

Los parámetros cinéticos del crecimiento de BAL con y sin glucosa en presencia de inulina se presentan en el Cuadro 12. Se observa que el crecimiento de las mismas es favorable en el medio estándar de referencia (MRS), sin embargo, la inulina grado químico presentó la mayor velocidad de crecimiento, seguida por la inulina grado alimentario y posteriormente por la inulina de aguamiel de *Agave salmiana*. Las velocidades máximas más altas se obtuvieron en las cinéticas con inulina y sin glucosa, esto evidencia que las BAL tienen mayor afinidad por la inulina que por la glucosa. Con relación al tipo de inulina prefiere la de grado químico, en segundo lugar se encuentra la de grado alimentario, y finalmente la inulina de agave.

La concentración de inulina es la que proporciona el material disponible para el metabolismo y desarrollo de *Lactobacillus*, siendo ésta la que le confiere mayor capacidad fermentativa en comparación con el medio con glucosa e incluso que en el que no tiene glucosa, este efecto también fue observado por Gibson y Wang en *Bifidobacterium* (1994).

Cuadro 13. Velocidad máxima (Log UFC/mL/h), medio con y sin glucosa

Inulina	Concentración de Inulina(g/L)	Velocidad máxima(Log UFC/mL/h) Medio MRS con glucosa	Velocidad máxima(Log UFC/mL/h) Medio MRS sin glucosa
Testigo	0	0.0752±0.0071	0.0580±0.0012
Agave	4	0.0841±0.0040	0.0625±0.0020
Alimentario	4	0.0903±0.0057	0.0899±0.0127
Químico	4	0.0912±0.0243	0.1151±0.0183
Agave	12	0.1091±0.0147	0.1076±0.0122
Alimentario	12	0.1109±0.0179	0.1226±0.0155
Químico	12	0.1796±0.0372	0.1551±0.0309
Agave	20	1.4515±0.1348	1.5147±0.1160
Alimentario	20	1.4555±0.1330	1.6343±0.1206
Químico	20	1.5535±0.1407	1.6972±0.1290



## 8. CONCLUSIONES

El análisis bromatológico de la piña de *Agave salmiana* reveló que es una fuente valiosa para extracción de carbohidratos y fibra.

El proceso de extracción mecánico generó una extracción de azúcares mayor que el extracto obtenido mediante proceso térmico por los diferentes procesos de difusión y de transferencia que tienen lugar principalmente en las fibras de agave. El aguamiel se considero como una fuente potencial de inulina, al presentar mayor contenido de carbohidratos.

El aguamiel obtenido de *Agave salmiana* cubre con las especificaciones de la NMX-V-022-1972 siendo clasificado por la misma como de tipo I.

El aguamiel obtenido de *Agave salmiana* presenta un contenido de azúcares totales superior con relación a otros agaves reportados (manzo, cenizo y amarillo provenientes de la zona de Tlaxcala).

El proceso de liofilización no permitió la deshidratación total del aguamiel, mientras que la incorporación de un agente encapsulante (maltodextrina) mediante secado por aspersion permitió la deshidratación total llegando a un producto final en polvo con facilidad de manejo, transporte y conservación semejante a las fuentes comerciales empleadas.

La espectroscopia infrarroja reveló la presencia cualitativa de inulina en el jugo, extracto y aguamiel.

Por medio de la cromatografía HPAEC-PAD se identificó cualitativamente la inulina en el producto liofilizado y el agente de recubrimiento en el aguamiel secado por aspersion.

La técnica de RMNH<sup>1</sup> permitió identificar de forma cualitativa la pureza de las inulinas utilizadas. Así mismo, elucidar los perfiles de los componentes mayoritarios en inulina de agave resaltando que la fructosa se encuentra en mayor proporción que la glucosa, siendo el aguamiel de *Agave salmiana* una fuente rica en fructosa que puede proporcionar inulina como fuente de carbohidratos para su uso como prebiótico en bacterias lácticas.





---

*Evaluación del efecto prebiótico*

La concentración de inulina obtenida por HPLC para el aguamiel de *A.salmiana* fue de 15.67 g/L bajo las condiciones de trabajo empleadas.

De manera general, la cantidad de UFC/mL en medio MRS suplementado con inulina grado químico, grado alimentario e inulina obtenida de aguamiel de *Agave salmiana*, estuvo directamente relacionada con la concentración de sustrato utilizado en el medio. El mejor crecimiento fue encontrado con inulina grado químico a la concentración de 20 g/L.

La afinidad por la inulina fue mayor que por la glucosa y que la interacción de glucosa-inulina para la cepa empleada en el presente estudio (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)



## 9. REFERENCIAS

- Abundis V. (2007). Cadena Agroalimentaria de Agave pulquero. Puebla. Edo. México. Secretaría de Desarrollo rural del estado de Puebla. 1-26.
- Aggett P., Agostini C. and Axelsson I. (2003). Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: A commentary by ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 36:329-337.
- Alfaro G., Juan P., Legaría S. y Juan E. (2007). Diversidad Genética en agaves pulqueros del noriente del estado de México. *Fitotecnía Mexicana*. 30(1):1-12.
- Ali S. (1996). Evaluation of the diffusion, coefficient of rapessed oil during solvent extraction with hexane. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73(5):669-671.
- Arazola D. (1969). Estudio del Contenido de Azúcares en la piña de *Agave tequilana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Universidad Autónoma de Puebla. México. 4-5.
- Association of Official Analytical Chemists. (1990). **Official Methods of Analysis**. 15ª Edición. USA: Ed. Association of Official Analytical Chemists. 1422.
- Baghurst P., Baghurst K., and Record S. (1996). Dietary fiber, nonstarch polysaccharides and resistant starch: a review. *Food Australia*. 48(3):1S-36S.
- Bailey J., Blankenship L. and Cox N. (1991). Effect of fructooligosaccharide on Salmonella colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*. 70:2433-2438.
- Baranyi J. and Roberts T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23: 277-294.
- Bessadok A., Langevin D., Gouanvé F., Chappey C., Roudesli S. and Marais S. (2009). Study of water sorption on modified Agave fibres. *Carbohydrate Polymers*. 76:74-85.
- Campos M. (2002). Obtención de una bebida funcional de bifidobacterias utilizando aguamiel como base. Tesis Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México.
- Carrillo M., Flores J., Huerta R. y Portales D. (2009). Efectos prebióticos de los fructanos de maguey. Universidad autónoma de Coahuila. Universidad autónoma de san luis potosí. [www.coecytcoah.gob.mx/206%5C1873%5C350%5C2009%5C2%5C19%5CUAdeC%20Mar](http://www.coecytcoah.gob.mx/206%5C1873%5C350%5C2009%5C2%5C19%5CUAdeC%20Mar). Consultado el mes de Octubre, sábado 3.
- Chellapandian M., Larios M., Gonzalez S., and Lopez M. (1988). Production and properties of a dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from pulque a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21:51-56.
- Cravioto O., Figueroa F., Cravioto R. y Massieu H. (1953). Estudio sobre las proteínas y aminoácidos en dietas mexicanas. *Ciencia*. 13:65-70.
- Crittenden R. (1999). Prebiotics. In: Tannock J., editor. Probiotics: A critical review. Norfolk, England: Horizon Scientific Press. 141-156.
- Crittenden R. and Playne M. (1996a). Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*. 7:353-361.



*Evaluación del efecto prebiótico*

- Crittenden R. and Playne M. (1996b). Commercially available oligosaccharides. *International Dairy Bull Federation*. 313:10-22.
- Cruz P. (2007). Inmovilización celular por atrapamiento, como vehículo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*. Tesis de Maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, México.
- Cruz R., Mendoza A., Calado V., and Heinze T. (1999). Studies on grafting of cellulosic materials isolated from *Agave lechuguilla* and fourcroydes. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 273(1):86-90.
- Cortés L. y Basurto P. (2007). Jardín Botánico de Biología. Universidad Autónoma de México. GELA Grupo Etnobotánico Latinoamericano. <http://www.ibiologia.unam.mx/gela/pp1html>. Consultado el mes de Septiembre, martes 11.
- Danone Vitapole. (2002). "The World of Microbes". Congreso Internacional de Bacteriología y Microbiología Aplicada. París. 18-22 de Febrero. 10.
- De Roverr., Vandenbraden K., Van Laere A., and Van den Ende W. (2001). Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). *Planta*. 210:808-814.
- Diaz C. (2007). Oligosacaridos en formulas infantiles. La Inulina y la Oligofructosa. Nuevos Ingredientes Funcionales en Alimentos. NEOLAC. [www.uanl.mx](http://www.uanl.mx). Consultado el mes de Octubre, martes 22.
- Dionex Corp. (2009). Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). *Dionex*. Technical Note 20:1-13.
- Dionex Corp. (2009b). Determination of Plant-Derived Neutral Oligo- and Polysaccharides. *Dionex*. Technical Note 67:1-11.
- DMFit. (2009). Software de modelamiento dinámico edición on-line. Disponible en: <http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMFit.aspx>. Consultado el mes de Octubre, domingo 11.
- Donkor O., Henriksson A., Singh T., Vasiljevic T. and Shah N. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17(11):1321-1331.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., and Smith F. (1956). Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. *Nature*. 28(3):350-356.
- Englyst H., Quigley M. and Hudson G. (1995). Definition and measurement of dietary fiber. *European Journal of Clinical Nutrition*. 49(3):S48-S62.
- Escalante A., Rodriguez M., Martinez A., Munguia L., Bolivar F. and Gosset G. (2004). Characterization of bacterial Diversity in Pulque a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 235:273-279.
- Escalante R., Hernández S. y Jiménez R. (2006). Efecto del almidón resistente tipo II de malanga en bacterias Probióticas y patógenas. Memorias de la Semana de Divulgación y Video Científico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 22 al 26 de Mayo. 298.
- Fennema O. (2000). **Química de los alimentos**. Ed. Acribia. 1069.
- Flores M., Olvera H., y Martín C. (1996). Obtención de una miel a partir de aguamiel producido por tres especies de *Agave spp* que se cultivan en el estado de Tlaxcala y su evaluación físico-química en su composición. XXVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Monterrey N. L. México. 8-12 de Abril. 23.



- Flores M., Mora E. y Romero A. (2007). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de Maguey pulquero (*Agave spp*). Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Km 7.5 Carretera Federal San Martín Texmelucan-Tlaxcala. C.P. 90122. Tlaxcala, Tlax. Departamento de Graduados en Alimentos.
- Fooks J., Fuller R. y Gibson G. (1999). Prebiotics, probiotics and human gutmicrobiology. *International Dairy Journal*. 9:53-61.
- García M. (1994). Colección Nacional de *Agaváceae*. Primer Simposio Internacional Sobre Agaváceas. Instituto de biología Universidad Nacional Autónoma de México. 9-11 de Noviembre. 5.
- García C. et al. (1993). Agave studies in Yucatán, México. Past and present germplasm diversity and uses. *Exonomic Botany*. 47(3):312-327.
- Gibson G. and Roberfroid M. (1995a). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125:1401-12.
- Gibson G. and Wang X. (1994) Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*. 118:121-128.
- Gibson G., Wang X. and Cummings J. (1995b). Selectives timulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108:975-982.
- Gomes M. and Malcata F. (1999). *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties. *Food Science and Technology*. 10(4):139-157.
- González G. (1994). Valor nutricional de dos especies de maguey (*Agave salmiana* y *Agave atrovierens Karw*) forrajeras, utilizadas en las zonas áridas del norte de México en relación a sus características fenológicas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México. 36
- Granados S. (1993). **Los Agaves en México**. México D.F: Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. 252.
- Goddy A., Herrera T., Ulloa M. (2003). **Mas allá del Pulque y el Tepache**. Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto de Investigaciones Antropológicas. México: Ed. Fondo de Cultura Económica. 68.
- Heaney R. (1996). Bone mass, nutrition, and other lifestyle factor. *Nutrition Reviews*. 54:S3-S10.
- Hellwege E., Czapla S., Jahnke A., Willmitzer L. and Heyer A. (2000). Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tuber syntesize the full espectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceeding of the National Academy Sciences*. 97:8699-8704.
- Hipsley E. (1953). Dietary 'fibre' and pregnancy toxoemia. *British Medical Journal*. 2:420-422.
- Hopkins M., Cummings J. and Macfarlane G. (1998). Interspecies differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*. 85:381-386.
- Hulbert G. and Biswal R. (1998). Solid/Liquid extraction of caffeine from guarana with methylene chloride. *Food Science and Technology International*. 4(1):53-58.



*Evaluación del efecto prebiótico*

- Iniguez C., Diaz T., Sanjuan D., Anzaldo H. and Rowell R. (2001). Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: Potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource Technology*. 77: 101–111.
- Isolauri E. (2004). Future Aspects of probiotics in health. *Journal of Food Science*. 69(5):M135-M143.
- Itsaranuwat P., Khawla S. and Robinson R. (2003). The potential therapeutic benefits of consuming health-promoting fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy technology*. 4(56):203-208.
- Jonquière A. and Fane A. (1998). Modified BET models for modeling water vapor sorption in hydrophilic glassy polymers and systems deviating strongly from ideality. *Journal of Applied Polymer Science*. 67:1415–1430.
- Jun L., Xiang L., Feng X., Zhan W. and Fei W. (2006). Effect of hydrothermal treatment on the acidity distribution of g-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> support. *Applied Surface Science*. 253:766–770.
- Kaplan H. and Hutkins R. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2682-2684.
- Karppinen S., Liukkonen K., Aura A., Forsell P. and Poutanen K. (2000). *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1469-1476.
- Kaur N. and Gupta A. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*. 23:703-714.
- Kessler H. (1981). **Food engineering and dairy Technology**. 5<sup>a</sup> Edición. Alemania: Ed. Verlags Kessler. 654.
- Koops A. and Jonker H. (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tuber of *Helianthus tuberosus* Colombia. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan. 1-fructosyltransferase. *Plant physiology*. 110:1167-1175.
- Krasuk J., Lombardi J. and Ostrovsky C. (1967). Diffusion extraction of oil containing materials. *Journal of Environment and Development Process*. 6(7):187-195.
- Lehninger A., Cox M., Nelson D. (2006). **Bioquímica**. Capítulo 2. España: Ed. Omega.
- Lilly D. and Stillwell R. (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science Direct*. 147(3659):747-748.
- Lingyun W., Wang J., Zheng X., Teng D., Yang Y., Cai C., Feng T. and Zhang F. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of food Engineering*. 79:1087-1093.
- López C. (2003). **Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas Del campo al mercado**. Capítulo 5. Argentina: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Depósito de documentos de la FAO.
- López M., Mancilla-Margalli N. and Mendoza D. (2003). Molecular structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:7835-7840.
- López B. (2002). **Cultivos industriales**. Barcelona: Ed. Aedos. 220-223.
- Loyola M. (1956). **La industria del Pulque**. México: Ed. Banco de México. 247.



- Lumdubwong N. (2001). Low and medium-DE maltodextrins from waxy wheat starch: preparation and properties. *Starch/Staerke*. 53(12):605-615.
- Lüscher M., Erdin C., Sprenger N., Hochstrasser U., Boller T. and Wiemken A. (1996). Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters*. 385:39-42.
- McMurry J. (2001). **Química Orgánica**. 5ª Edición. México: Ed. Thomson. 458
- Madrigal L y Sangronis E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes clave en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57(4):387-396.
- Mancilla-Margalli N. and López M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:7832-7840.
- Márquez G., Karen P., Carrascal A., Bernardo C., Clavijo D. y Balkis Q. (2007). Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicrotróficas aisladas de leche cruda. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 5(7):14-24.
- Marquina D., y Santos A. (2003). Probióticos, prebióticos y salud. *Revista Actualidad*. 32:24-27.
- Martínez T., Morales D. y Morales U. (2007). Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de Fructooligosacáridos. Escuela Nacional de Ciencias de Biológicas IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala. Col. Casco de Santo Tomás. México. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos.
- Martínez G. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Matarese L. y Gottschlich M. (2004). **Nutrición clínica práctica**. 2ª Edición. España: Ed. Elsevier imprint. 114-117.
- Mendoza. H. (1983). Diagnóstico climático para La zona de influencia inmediata de la UAAAN. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Departamento de Fitomejoramiento. 618.
- Merle C. and Wigger D.(2002). **Mecánica de fluidos**. 3ª Edición. México: Ed. Thomson. 27-31.
- Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426-428.
- Miñana V. (2007). Oligosacáridos en nutrición infantil: fórmula infantil, alimentación complementaria y del adolescente. *Acta Pediátrica*. 65(4):175-179.
- Mojica E. y López M. (2008). Variaciones en el contenido y estructura de los fructanos Almacenados en *A. tequilana* Weber var. azul a diferentes edades. CINVESTAV-IPN Campus Guanajuato. Km. 9.6 Lib. Norte Carretera Irapuato-León. Irapuato; Gto. México. Departamento de Biotecnología y Bioquímica.
- Molina D., Martínez D., Melgarejo R., Hiner A., Chazarra S. and López J. (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*. 66:1476–1484.
- Montañez J., Barragán E., y Cruz M. (2002). Propiedades Físicoquímicas de las maltodextrinas a partir del punto crioscópico de sus soluciones. *Centro de Información Tecnológica*. 13(3):77.





*Evaluación del efecto prebiótico*

- Moreno V.(2008). Prebióticos en las fórmulas para lactantes ¿Podemos modificar la respuesta inmune?. *Anales de pediatría*. 68(3):286-294.
- MoshFegh A., Friday J., Goldman J. and Chug A. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *Journal of Nutrition*. 129(7S):1407S-1411S.
- Nagendra P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(17):1262-1277.
- NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hydromel. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Nobel P. (1998). **Los incomparables agaves y cactus**. México D.F: Ed. Trillas. 37-58.
- Nuria M., Grau A., Chiralt B. y Fito P. (1999). **Termodinámica y cinéticas de sistemas alimento entorno**. México: Ed. IPN.372.
- Orafti. (2009). Inovación natural nutritiva y deliciosa. *www.BENEO-Orafti.com*. Consultado el mes de Junio, viernes 26.
- Ouwehand C., Kirjavainen V., Shortt C. and Salminen. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 42-52.
- Pavis N., Boucaud J., Prud M. (2001). Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist Journal*. 251:185-192.
- Pimienta B., Zañudo J., García G. (2006). Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia*. 40:699-709.
- Peter S. (2002). **Mecanismos de reacción en química orgánica**. España: Ed. Reverte. 54-56.
- Peña A., Díaz L., Medina A., Labastida C., Cabella S. y Vera L. (2004). Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraccion-gas chromatography –mass spectrometry. *Journal Chromatography*. 1027:131-136.
- Ramírez F. (2009). Alimentos funcionales: inulina, oligofructosa y povidexrosa como prebióticos. *El portal de la salud*. 30:1-9.
- Ramírez P. y Gentry. (1982). **El maguey: árbol de las maravillas**. México, D.F: Ed. Museo Nacional de Culturas Populares. 178.
- Ravenscroft N., Cescutti P., Hearshaw M., Ramsout R., Rizzo R. and Timmeelizabeth E. (2009). Inulin Determination for Food Labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:3995–4003.
- Reddy B., Hamid R. and Rao C. (1997). Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis*. 18:1371-1374.
- Roberfroid M., Van L. and Gibson G. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*. 128:11-19.
- Rocha S. y Rojas I. (2009). Caracterización del proceso de secado por aspersión del aguamiel. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, Av. Acueducto de Guadalupe s/n, Barrio la Laguna Ticomán. México. Departamento de Bioingeniería.
- Ronkart N., Blecker S., Fourmanoir H., Fougnes C., Deroanne C., Herck V. and Paquot M. (2007). Isolation and identification of inulooligasacarides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*. 604:81-87.



- Ruiz R., Nava C., Pérez R. et al. (2000). Aspectos poblacionales y productivos de los ecocultivos de maguey en el norte de zacatecas. *Agraria*. 16(2):59-79.
- Salazar L., Aarón J., González F., Osuna R. Susana, Osuna R. Idalia. (2008). Determinación de las condiciones óptimas de extracción de inulina a partir de piñas de Agave azul (*tequilana* Weber). V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Tuxtla Gutiérrez Chiapas. 10-14 de Marzo. 1-15.
- Sánchez M. (1979). **Los agaves de México en la industria alimentaria**. México: Ed. CEESTEM. 1-79.
- Sánchez P. (2007). **Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales**. Madrid: Ed. Aula Magna. 99-102.
- Santillán A., Vilet L., Cuello M., Lagunes G. and Ruiz C. (2000). Obtención de un producto en polvo con alto contenido de Fructooligosacáridos a partir del jugo de maguey mezcalero Potosino (*Agave salmiana*). Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria 78210. México. Facultad de Ciencias Químicas.
- Sanz Y., Collado M. y Dalmau J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 61(9):476-482.
- Saavedra A., Magdub M. y Cáceres F. (2002). Proceso para la fabricación de bebida alcohólica a partir del henequén (*Agave Fourcroydes*). Patente de invención 219235 otorgada por el IMPI. CICY. <http://www.fpy.org.mx/index.php?id=piasdehehquen>. Consultado en el mes de septiembre, martes 8.
- Schrezenmeir J. and Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73:361S-364S.
- Scott G. (2004). **Agaves of Continental North Americana**. Arizona USA: Ed. The University Arizona Press. 8-12.
- Serrato B., Caicedo J., Caicedo M. and Luis. A. (2005). The effect on lactic fermentation of concentrating inert material with immobilised cells in a calcium alginate biocatalyser. *Ingeniería e Investigación*. 25(2):78-82.
- Sghir A., Chow J. and Mackie R. (1998). Continuous cultura selection of bifidobacteria and *lactobacilli* from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. *Journal of Applied Microbiology*. 85:769-777.
- Silos E. et al. (2007). Chemical composition and in *vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 82:355-359.
- Simmering M. and Blaut M. (2001). Pro-and prebiotics-the tasty guardian angels?. *Applied Microbiology biotechnology*. 55:19-28.
- Sims I. (2003). Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. *Phytochemistry*. 63:351-359.
- Solange I. and Mussato I. (2006). Non-digestible oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 68(9):587-597.
- Solis D. (2008). Inulina: Un prebiótico natural. *Mundo Alimentario*. 18-19.





*Evaluación del efecto prebiótico*

- SymbioPharm. (2007). Nuevas perspectivas para el mantenimiento de un medio intestinal sano. [www.symbiopharm.de](http://www.symbiopharm.de). Consultado el mes de Noviembre, jueves 15.
- Taíz L. and Zeiger E. (2002). **Fisiología vegetal**. 3ª Edición. USA: Ed. Plant Physiology. 297.
- Tatdao P., Darryl S., and Frank S. (2007). Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Food Chemistry*. 104:73-80.
- Tognetti J., Salerno G., Crespi M. y Pontis H. (1990). Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Plant Physiology*. 78:554-559.
- Torres R. y Morales D. (2005). Estudio de la deshidratación del maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructooligosacáridos. Tesis Licenciatura. E.N.C.B., I.P.N. México.
- Urías S. y López M. (2004). Efecto prebiótico de los fructanos de agave. Memorias 1er Encuentro Participación de la mujer en la ciencia. León Guanajuato. 21 Mayo. 9-12.
- Utah State University Biotechnology Center. (2003). "Biotechnology in the News: Plants as Factories". [www.usu.edu/~biotech/extnews/extnew25.html](http://www.usu.edu/~biotech/extnews/extnew25.html). Consultado el mes de Julio, jueves 30.
- Van den Ende W., Mientiens A., Speleers H., Onuoha A. Van Laere A. (1996). The metabolism of fructan in roots in *Chichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist Journal*. 132(4):555-563.
- Van L., Coussement P., Leenheer L., Hoebregs H. and Smits G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. 35:526-552.
- Vergauwen R., Van Laere A., Van den Ende W. (2003). Properties of fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from *Cichorium intybus* L. and *Echinops ritro* L., two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant physiology*. 133:391-401.
- Vitali A. and Rao M. (2006). Flow Properties of Low-Pulp Concentrated Orange Juice: Serum Viscosity and Effect of Pulp Content. *Journal of food Science*. 49(3):876-881.
- Waleckx E., Gschaedler A., Colonna-Ceccaldi B. and Monsan P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*. 108(1):40-48.
- Wang N. and Nobel P. (1998). Phloem transport of fructans in ten CAM species *Agave deserti*. *Plant Physiology*. 116(3):709 -714.
- Weston R. and Brocklebank L. (1999). The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*. 64:33-37.
- Worawuthiyanan N., Sarote S. and Wirat V. (2006). Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 56(3):1150-1156.
- Wu X. and Lee P. (2000). Preparation and characterization of inulin ester microspheres as drug carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 77:833-840.
- Yúfera P. (1996). **Química Orgánica Básica y Aplicada de la molécula a la Industria**. Barcelona: Ed. Reverté. 429.