

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

6
43

OBTENCION DE FRUCTOSA A PARTIR DE LA
HIDROLISIS DE INULINA DE AGAVE POR
DIVERSOS METODOS
(TEMA MANCOMUNADO)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

GERARDO BLANCO SANCHEZ

~~EDUARDO~~ DURAZO BELTRAN.

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979
LAB _____
ADG M. C. 43
FECHA _____
PROC _____



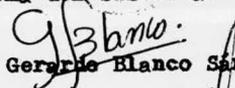
Jurado asignado
originalmente
según el tema .

Presidente Prof. HECTOR MANUEL LOPEZ HERRERA
Vocal Prof. NINFA GUERRERO DE CALLEJA S
Secretario Prof. RUBEN BERRA GARCIA-COSS
1er. Suplente Prof. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ
2o. Suplente Prof. ALEJANDRO GARDUÑO TORRES

Sitio donde se desarrolló el tema :

División de estudios superiores. Dpto. de Ali-
mentos.

Nombre completo y firma del sustentante :


Gerardo Blanco Sánchez

Nombre completo y firma del asesor del tema :


M. en C. Ruben Berra Garcia-Coss

Nombre completo y firma del supervisor técnico :

Ing. Francisco Arjona G.

CON TODO RESPETO Y CARINO :

A MIS PADRES Y HERMANOS.

A PATRICIA Y PAOLA.

A MIS MAESTROS.

A MIS AMIGOS.

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION - - - - -	1
GENERALIDADES - - - - -	2
MATERIAL Y METODOS - - - - -	27
RESULTADOS Y DISCUSION - - - - -	36
CONCLUSIONES - - - - -	75
BIBLIOGRAFIA - - - - -	77

INTRODUCCION .

No obstante que el Agave tequilana es la principal materia prima para la elaboración de Tequila, existe en nuestro país poca información acerca de su composición y carbohidratos que lo componen .

Los carbohidratos fermentecibles de las variedades del Agave tequilana los --- constituyen en su gran parte unos polisacáridos denominados FRUCTOSANAS, por estar constituidos por unidades de fructosa y en muy pequeña proporción glucosa .

Una mejor comprensión de la formación y composición de las fructosanas puede traer consigo un aprovechamiento más amplio de éste género de agave como es su uso para la obtención de fructosa .

La fructosa, es un monosacárido que posee el poder edulcorante y solubilidad --- más alta de todos los azúcares naturales, por lo cual su utilización es muy --- factible en industrias de manufactura y elaboración de medicamentos o alimentos .

Este trabajo, tiene como finalidad la de aportar datos sobre las fructosanas que constituyen al Agave tequilana como es la INULINA por medio de su obtención por precipitación con diversos agentes físicos y químicos; para obtención de fructosa se plantean tres hidrólisis con distintos ácidos con el objeto de observar su acción hidrolítica sobre las fructosanas contenidas en el jugo de agave, comprobándose ésta por medio de la cuantificación de fructosa y reductores que se generan durante la reacción .

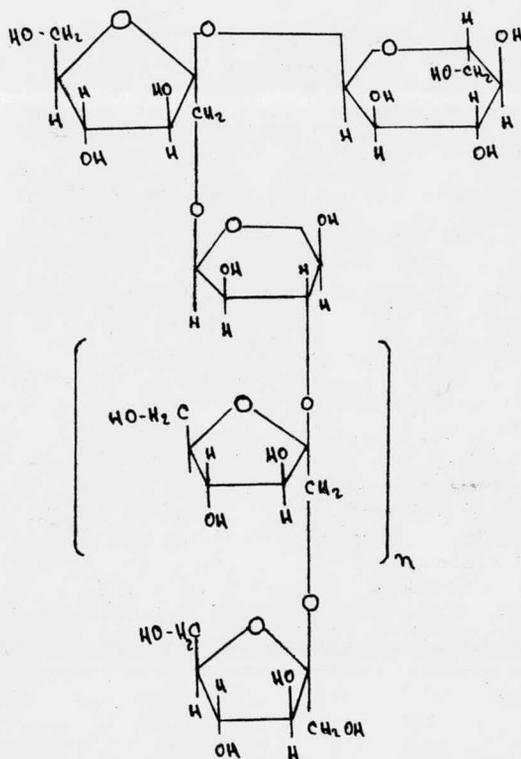
Todas las muestras que se analizaron provienen de la región de los Altos de --- Jalisco y fueron proporcionadas por la razón social Eucario Gonzalez S.A. a --- quienes agradecemos su atención .

GENERALIDADES.

INULINA.

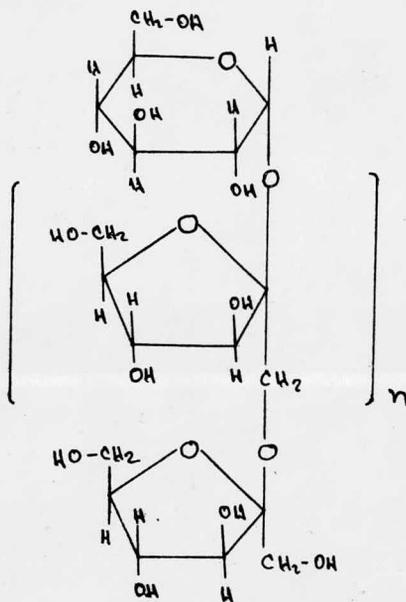
La inulina fue descubierta en 1804 por Rose quien la separo de extractos de tuberculos de Alcachofa de Jerusalem . El nombre de inulina fue primeramente usado por Thompson en 1811 y se deriva de que fue encontrada también en plantas de *Inula helianium* . Estudios realizados sobre inulina obtenida de *Dahlia tuber* la cual fue metilada en una atmosfera de nitrógeno con hidróxido de sodio y sulfato de metilo y posteriormente hidrolizada con ácido oxálico, analizando los productos resultantes por cromatografía concluyen que la molécula de inulina está constituida por unidades de fructosa con uniones β -2 \rightarrow 1 y que la cadena es terminada por una molécula de glucosa unida mediante un enlace tipo sacarosa, (Hirst E.L., McGilvray D.I., and Percival E.G., 1950), como se aprecia en la figura 1 :

FIGURA 1 .



En estudios efectuados sobre Alcachofa de Jerusalem para observar los carbohidratos presentes en los tubérculos de ésta, mediante el empleo de cromatografía en papel y polarimetría, se observó la presencia de polisacáridos de fructosa, que se caracterizan por medio de precipitación con diversos agentes como etanol, acetona e hidróxido de calcio. En base a los resultados obtenidos se plantea la siguiente estructura para inulina (Bacon J.S.D. and Edelman J., 1951) .

FIGURA 2



Estudios estructurales sobre inulina de *Inula helenium* confirman la presencia de derivados de glucosa en los hidrolizados de inulina metilada y argumentan que ésta se encuentra en una proporción de 2.9 moles por 100 radicales de hexosa, teniendo la molécula de inulina una longitud de cadena de 35 unidades y peso molecular de 5600, (Bell D.J. and A. Palmer, 1952) .

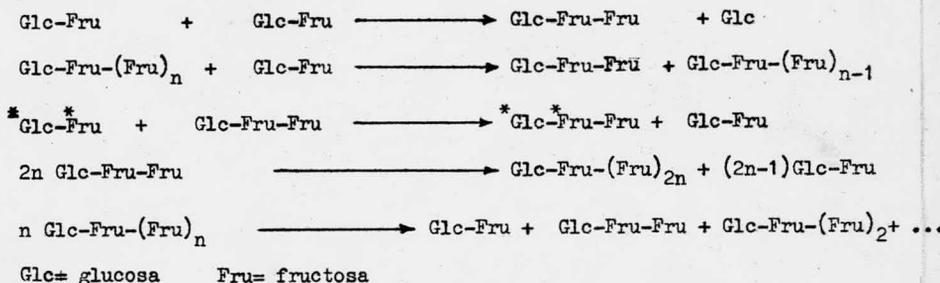
Investigaciones realizadas sobre los carbohidratos de Agave veracruz reportan la presencia de fructosanas similares a inulina, precipitandolas con etanol al 60 y 88% y ácido acético glacial, (Srinivasan M. and Bhatia I.S., 1, 1953) .

Posteriores estudios sobre un hidrolizado parcial de inulina de Alcachofa de Jerusalem reportan la presencia de sacarosa, inulobiosa (1- β -fructosilfructosa), inulo triosa (1- β -fructosilulinobiosa) y concluyen que la molécula de inulina es terminada en un residuo glucopiranosido en la configuración de sacarosa, (Feingold E. and Avigad I. , 1956) .

Metabolismo de polimeros de fructosa en plantas .

Trabajos efectuados para dilucidar la biosíntesis de fructosanas en plantas han reportado la existencia de una enzima presente en el tronco principal de Agave veracruz capaz de construir glucofructosanas a partir de sacarosa, (Bhatia I. S., Satyanarayama S. and Srinivasan M. , 1955) .

En Alcachofa de Jerusalem se han detallado algunas características de la enzima capaz de construir fructosanas, la transfructosilasa, reportandose las siguientes actividades de ésta :



En estudios efectuados sobre síntesis de fructosanas empleando el marcaje con isótopos radioactivos se encontro que :

a).- Una transfructosilasa fue separada del extracto de Alcachofa de Jerusalem .

- b).- La enzima fue altamente específica para residuos terminales fructofuranosilos unión β -2 \rightarrow 1 .
- c).- El más activo donador de fructosa fue encontrado ser 1-fructosil-sacarosa; sacarosa fue inactiva .
- d).- Sacarosa y polimeros de alto grado de polimerización, mayor de 20, fueron los más eficientes aceptores de residuos fructosilos .
- e).- Diferentes variedades de actividad transferasa fueron catalizadas por la enzima y son las siguientes :

1.- Transferencia así mismo .

Existe cuando un compuesto actua como donador y aceptor de fructosa el más -- grande rango de transferencia existe con el trisacárido como sustrato (1-fru-ctosilsacarosa) .

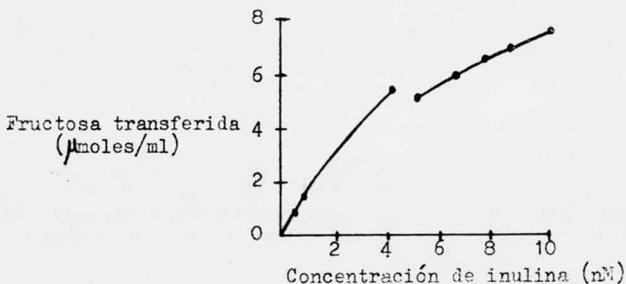
Enzima activa con ; oligosacáridos de grado de polimerización de 3 a 9 , --- (1-fructosil)₂-fructosa .

Enzima inactiva con ; 1-fructosilfructosa, sacarosa, maltosa, melibiosa y ra- finosa .

2.- Transferencia a polimeros .

Se observó que existía preferencia para transferir fructosa de fructosilsaca-rosa hacia el polimero como se observa en la siguiente figura .

FIGURA 3



3.- Transferencia a sacarosa .

i.- Trisacárido como fructosil donador: 1-fructosil-sacarosa y (1-fructosil)₂-sacarosa .

ii.- Oligo y polisacáridos como donadores . La especificidad de la transferencia esta dada en la tabla

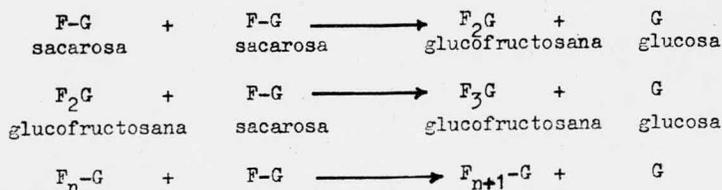
TABLA 1

Grado de polimerización del donador	Fructosa transferida (moles/hr/ml mezcla de reacción)
3	46.7
4	2.34
5	3.71
6	3.09
7	8.40
8	17.4
9	16.2

El curso de las reacciones anteriores esta condicionado por la naturaleza y concentraciones de los sustratos donadores y aceptores; partiendo de una molécula sencilla (Sacarosa, 1-fructosilsacarosa) la situación se torna rapidamente compleja debido a la formación de moléculas de mayor número de hexosas y por consecuencia, al formarse oligosacáridos comienza una disminución en el tipo de transferencia así mismo y a sacarosa desarrollandose una preferencia para transferir fructosa a compuestos de alto grado de polimerización, (Edelman J. and Dickerson A.G., 1966) . Así mismo se encontró en el tronco principal de Agave veracruz una enzima transfructosidasa capaz de construir glucofructosanas a partir de sacarosa. La enzima fue parcialmente purificada y concentrada por precipitación con sulfato de amonio y diálisis. La enzima actuó sobre sacarosa como sustrato único sin requerir la interacción de fructosanas de agave o intermediarios. Fosfato inorgánico no tiene influencia sobre la actividad enzimática. Las condiciones óptimas para la actividad

enzimática fueron : pH de 5.6 a 5.8; temperatura 37°C y 30% de concentración de sacarosa, la enzima es inactivada a 55°C . La acción de la enzima fue observada in vitro (Bhatia I.S., Satyanarayama S. and Srinivasan M., 1953) .

En cambios bioquímicos en los carbohidratos solubles en agua durante el desarrollo de Achicoria se ha detectado la presencia de fructosa, glucosa, sacarosa y 5 oligosacáridos por medio de cromatografía de partición en papel utilizando n-butanol: ácido acético: agua (4:5:5, v/v) . En raíces tiernas la fructosa y oligosacáridos están presentes en pequeñas cantidades en relación a las raíces maduras. Los oligosacáridos hidrolizados con ácido o invertasa dan solamente glucosa y fructosa indicando que están compuestos solamente de éstos azúcares y la fructosa está unida a la glucosa por un enlace $\beta(2 \rightarrow 1)$. Datos cuantitativos indican que inicialmente las raíces contienen cerca del 50% de azúcares no reductores que casi totalmente se componen de sacarosa y la cantidad de glucosa y fructosa unida es la misma. Cuando las raíces maduran un gradual aumento en el rango de la concentración de la fructosa y glucosa unida es observado indicando que fructosanas de alto peso molecular son sintetizadas a expensas de sacarosa y posiblemente otras glucofructosanas actúan como intermediarios en el proceso de elongación de la cadena, de una manera análoga a lo descrito para Agave veracruz y Alcachofa de Jerusalem por otros autores (Bhatia I.S., Mann S.K. and Rangi S., 1974) .



Cambios en carbohidratos durante el almacenamiento en frío de tubérculos -
que contienen inulina .

Se ha observado que almacenamiento en frío a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$ causa el rompimiento de polisacáridos insolubles acompañado por un incremento correspondiente de azúcares solubles , La mayor parte de este cambio ocurre durante las primeras cinco semanas de almacenamiento como es mostrado en las tablas 2 y 3 .

TABLA 2

Porcentaje de azúcares (sobre base en materia seca) de raíces de Achicoria* .

Azúcares	Periodo de almacenaje (Semanas)							
	0	2.1	4.3	6.3	10.3	16	22	25
Fructosa	0.33	10.47	10.40	11.26	18.30	12.61	11.52	20.41
Glucosa	0.17	0.98	1.55	0.75	3.85	1.40	1.56	0
Sacarosa	2.53	6.90	7.58	20.44	8.60	14.71	26.74	21.5
Trisacáridos	0.29	4.17	4.86	5.25	5.42	6.03	7.55	10.3
Tetrasacáridos	0.37	3.43	4.25	4.06	5.18	3.03	4.61	7.91
Pentasacáridos	0.11	2.77	3.40	2.55	3.95	2.04	2.68	4.89
Hexasacáridos	0.21	2.24	3.11	1.59	3.02	1.18	1.82	3.62
Altos azúcares	7.76	7.05	14.60	1.18	4.86	1.60	1.61	4.30

* ; *Cichorium intybus* L. .

TABLA 3

Porcentaje de azúcares (sobre base materia seca) en raíces de Diente de León* .

Azúcares	Periodo de almacenaje(Semanas)							
	0	2	4	5.6	7.9	14	18.1	
Fructosa	0.10	5.82	8.04	8.25	8.00	10.93	8.75	
Glucosa	0	0.85	1.20	0.69	0.41	1.04	0.95	
Sacarosa	9.10	6.04	9.49	8.95	8.29	10.26	9.44	
Trisacáridos	4.00	3.26	4.94	4.23	4.46	6.44	5.60	
Tetrasacáridos	3.41	3.18	3.00	4.68	3.48	7.32	6.45	
Pentasacáridos	1.95	2.83	4.15	4.42	3.20	6.34	4.69	
Hexasacáridos	1.71	2.51	3.79	3.73	2.78	5.49	4.52	
Altos azúcares	10.54	11.39	6.26	7.44	6.06	2.00	16.47	

* ; *Taraxacum officinale* Weber .

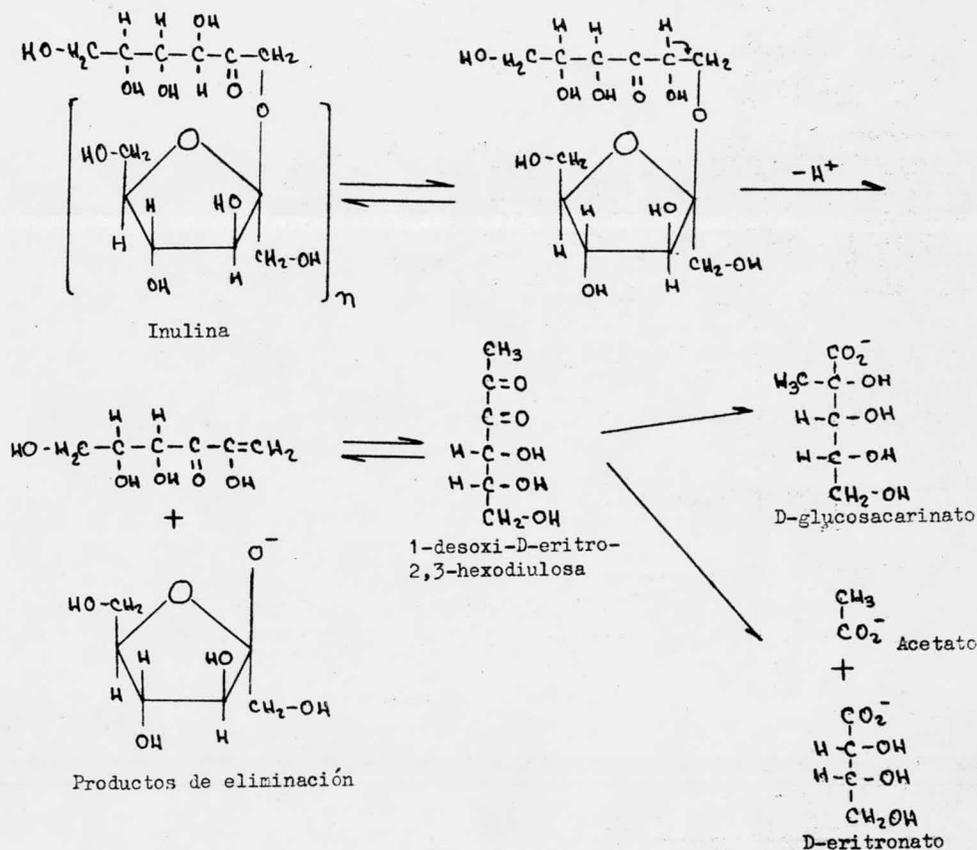
Los porcentajes de los azúcares solubles individuales fueron obtenidos por examinación cromatográfica de un número de muestras seleccionadas a diversos intervalos de almacenaje en frío como se observa en las tablas anteriores (Rutherford P. P. and Weston E. W. , 1968) .

Degradación alcalina de inulina .

Observando los efectos de soluciones alcalinas sobre inulina aislada de tuberculos de Dahlia tuber e inulina comercial se encontro que hidróxido de sodio e hidróxido de calcio degradan entre un 5.9 y 24% al polisacárido a diversos tiempos (0, 10, - 20, ... , 120 minutos) a una temperatura de 98-100°C .

Tratando inulina comercial con solución saturada de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 100°C por espacio de 60 minutos se produce un 12.5% de degradación ; tratamiento con NaOH 4N a 100°C -- por 60 minutos da lugar a un 20% de degradación (Bemiller J.N. Steinheimer T.R. -- and Allen E.E., 1967), el mecanismo de degradación se plantea como sigue :

FIGURA 4 :



FRUCTOSA.

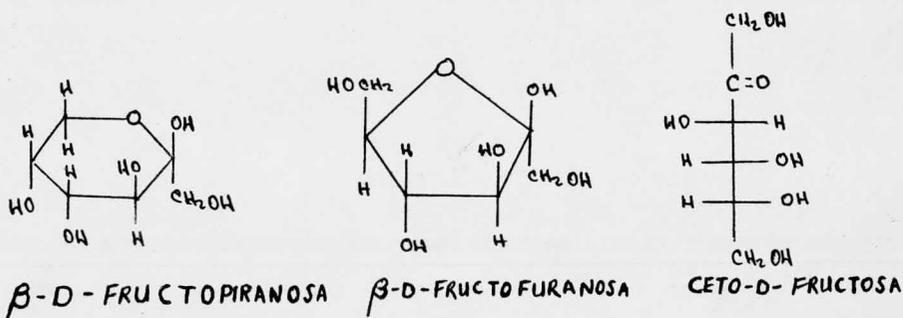
La fructosa, también llamada levulosa o azúcar de frutas (Del latín , fructus : fruta) es uno de los más comunes azúcares naturales. Se encuentra en algunos vegetales como la papa y cebolla, y esta ampliamente distribuido en frutas donde puede estar presente en forma libre o combinada como disacárido o polisacárido. En la miel la fructosa constituye cerca de la mitad del total de azúcares presentes. Los polímeros de fructosa o fructosanas también se encuentran en muchas plantas que han sido usadas como material para obtener fructosa pura, es el caso de inulina, fructosana encontrada en las raíces de Dahlia tuber, en los tubérculos de Alcachofa de Jerusalem (Aspinall G.O., 1970) y en el tronco principal de Agave tequilana (Sanchez Marroquin A. and Hope H.P., 1953) .

Propiedades físicas .

Tenemos que la fructosa es un monosacárido estructurado en configuración cetosa, que cristaliza como cristales anhidros de β -D-fructopiranososa. La rotación óptica en solución acuosa es $-132.2^{\circ} \rightarrow -92.3^{\circ}$ a 20°C y $-102.6^{\circ} \rightarrow -89.2^{\circ}$ a 17°C , — (Verstraten L.M.J., 1967) .

El poder edulcorante en solución acuosa al 10% si se compara con sacarosa (100) es mayor para fructosa (120). En solución establece un estado de equilibrio de de sus varios anómeros (Figura 5) de los cuales β -D-fructofuranosa es el más importante .

FIGURA 5 .



La configuración furanosa es más dulce que la configuración piranosa y dependiendo del medio, estas dos configuraciones son generalmente predominantes en el estado de equilibrio .

La fructosa es el más soluble en agua de todos los azúcares y se disuelve rápidamente aún en medio frío, lo cual lo hace un excelente humectante en confitería . El contenido de fructosa, dextrosa y sacarosa de soluciones saturadas a varias temperaturas es mostrado en la siguiente tabla .

TABLA 4 .

Temperatura °C	Fructosa		Dextrosa		Sacarosa	
	%	g ⁱ	%	g ⁱ	%	g ⁱ
20	78.94	374.78	66.60	87.67	47.11	199.4
30	81.54	441.70	68.18	120.46	54.64	214.3
40	84.34	538.63	70.01	162.38	61.84	233.4
50	86.94	665.58	72.04	243.76	70.91	257.6

gⁱ : gramos/100 gramos de agua .

La viscosidad de las soluciones de fructosa es marcadamente menor que la de soluciones de sacarosa. Soluciones de fructosa en agua son así técnicamente más fáciles de manejar en un rango amplio de temperaturas y concentraciones. La viscosidad de una solución líquida de fructosa al 70% es comparada con las de sacarosa y glucosa en la tabla 5 :

TABLA 5 .

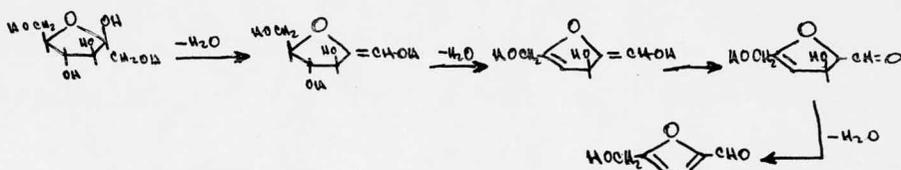
Temperatura °C	Fructosa (Poise)	Dextrosa (Poise)	Sacarosa (Poise)
-10	40.17	-	-
-5	21.13	-	-
0	11.62	-	36.28
10	4.05	-	12.06
20	1.76	10.36	4.82

ReF. (Doty E. T. and E. Vanninen, 1975) .

Propiedades químicas .

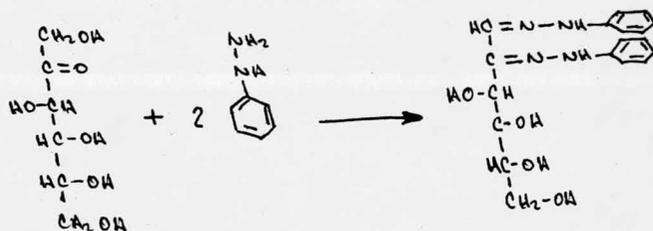
La fructosa en medio ácido fuerte y condiciones severas de temperatura da lugar a la formación de derivados de furano como el hidroximetilfurfural (Newth F.H. , 1951) como se ilustra en la figura 6 .

FIGURA 6 .



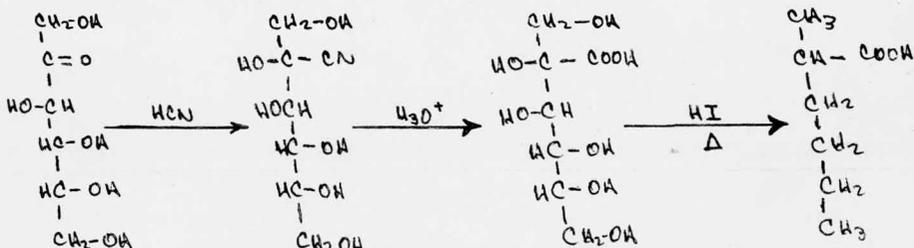
La D-fructosa cuando se trata con fenilhidrazina en exceso da lugar a la formación de la fenilosazona de la D-fructosa (Rakoff and Rose, 1966) según se aprecia en la figura 7 .

FIGURA 7 .

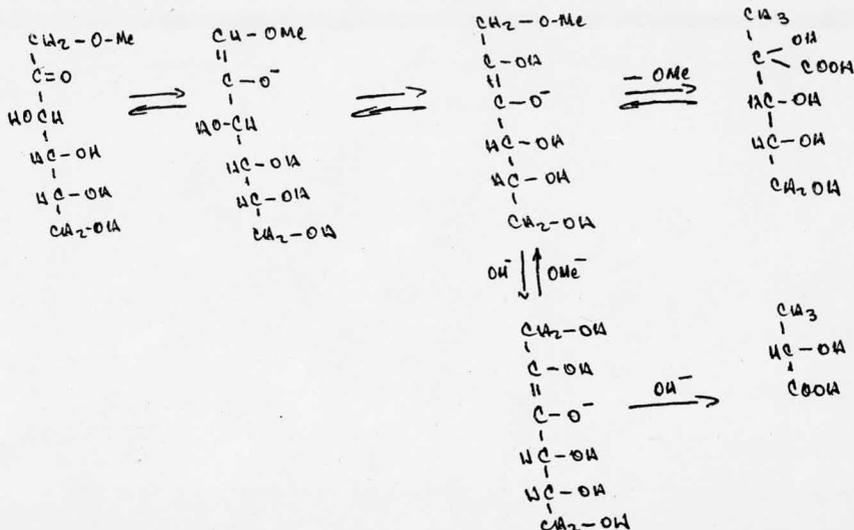


La diferenciación entre la presencia del grupo cetona en la fructosa se constata con la obtención del ácido α -metil-caproico (Morrison and Boyd, 1974) según se aprecia en la figura 8 .

FIGURA 8 .



En la figura 9 se aprecia el mecanismo de degradación alcalina que sufre la 1-metil-fructosa dando como resultado la formación de ácido láctico y ácido D-glucosacarinico ;
 FIGURA 9 .



En la tabla 6 se observan los valores en eq./mol de ácido láctico y ácidos sacarínicos formados en solución de fructosa (0.783 g) en 250 ml de hidróxido de calcio 0.0396 N a 25°C .
 TABLA 6 .

Tiempo (horas)	Acidez total (eq./mol)	Ácidos sacarínicos (eq./mol)	Ácido láctico (eq./mol)
0.25	0.013	0	0.013
1.0	0.046	0.003	0.043
2.0	0.072	0.013	0.059
4.0	0.13	0.03	0.10
7.0	0.22	0.045	0.18
24	0.56	0.10	0.46
193	1.34	0.32	1.02
625	1.52	0.32	1.20

Ref. (Kenner S. and Richards R., 1954).

Propiedades bioquímicas .

Se ha observado que un mecanismo de transporte activo está relacionado en la absorción de fructosa en el intestino y en el hombre la mayor parte de la fructosa absorbida pasa inalterada, vía vena porta, para su ulterior mecanismo en el hígado . La fructosa contenida en disacáridos, sacarosa, es hidrolizada en el borde de la pared intestinal por sacarasa . Esta enzima puede ser inducida por alta concentración de sacarosa, fructosa y por una baja de glucosa en la dieta. Este incremento adaptativo en la actividad de sacarasa por alimentación de fructosa es usado para estimular dicha actividad en niños con intolerancia de sacarosa dada por una deficiencia sacarasa-isomaltasa .

En individuos normales después de alimentación con fructosa, del 80-90% de este azúcar entra, pasando por las células del epitelio intestinal en la sangre hacia el hígado . El remanente 10-20% es transformado por la enzima fructoquinasa en fructosa-1-fosfato . Una pequeña cantidad de la fructosa puede ser convertida por hexoquinasa en fructosa-6-fosfato en la mucosa intestinal .

En el hígado de sujetos normales y de diabéticos con deficiencia severa de insulina, fructosa es rápidamente tomada y metabolizada a el nivel de triosas . El periodo de conversión de fructosa administrada intravenosamente, llevado por la rápida utilización en el hígado, es aproximadamente 50% de la de glucosa . Esta rápida utilización de fructosa es asociada con correspondientes incrementos en los niveles sanguíneos de piruvato, lactato, α -cetoglutarato y citrato .

En el hígado la primer reacción llevada con fructosa es la conversión por la específica cetohecoquinasa (fructoquinasa) para dar fructosa-1-fosfato . La actividad de fructoquinasa diferente de glucoquinasa es independiente de insulina.

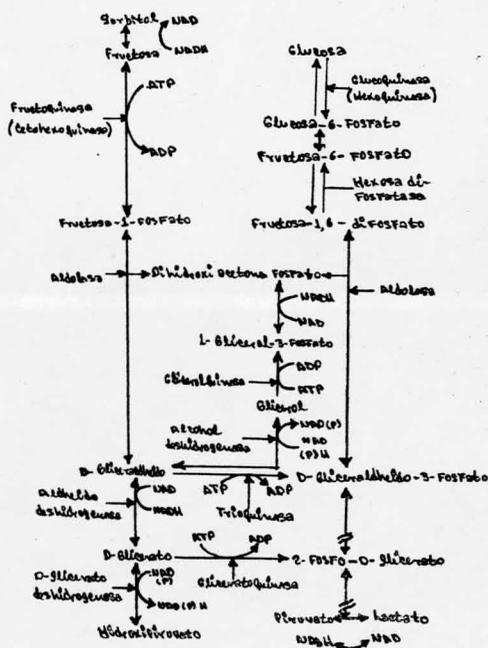
La fructosa-1-fosfato es dividida por la aldolasa B del hígado en dos partes equivalentes de dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído. La dihidroxiacetona fosfato es unida con triosas formadas en el proceso y metabolizada más adelante

hasta piruvato o hasta glucosa y glicógeno dependiendo del estado metabólico del sujeto y los requerimientos para glicólisis o glucogénesis .

En hígado, formación de glicógeno de fructosa es a diversos tiempos más eficiente que de glucosa y este proceso es menos dañino en diabetes, enfermedades del hígado y después de intervenciones quirúrgicas que la formación de glicógeno de glucosa .

En la FIGURA 10 se observa el camino que sigue el metabolismo de fructosa en el hígado (Pawan G.L.S. , 1974) .

FIGURA 10 .



AGAVE.

Esta planta pertenece a la familia de las Amarilidáceas estando comprendida en la tribu Agavacidae, alcanza una altura de 70 cm a 1 m normalmente . Tiene hojas angostas de color verde o azul . La raíz es bulbosa y fibrosa, la parte cortical — esta bien desarrollada y presenta pequeñas escamas cónicas entre las cuales se encuentran unos botones que constituyen el embrión de la planta .

Existen varios géneros del Agave entre los que tenemos principalmente : Agave tequilana (Maguey tequilero), Agave atrovirens (Maguey pulquero) y Agave fourcroydes (Maguey henequenero) .

Dentro del género Agave tequilana tenemos muchas variedades siendo las más importantes ; Carpintero, Pata de Mula, Azul, Sihuin, Bermejo y Azul 2 que vegetan en los estados de Zacatecas, Guanajuato, Queretaro y principalmente en la zona de los Altos de Jalisco, en donde es objeto de cultivo intensivo para la elaboración de tequila .

El Agave florece una sola vez y muere poco después. Generalmente llega a su madurez de los 8 a los 10 años de edad, a los dos años de cultivo en unos casos se corta el quiote cuando empieza a brotar o bien se impide su crecimiento con el objeto de evitar que consuma en su desarrollo parte de los azúcares que son fermentecibles posteriormente . Cuando la planta ha alcanzado su máximo desarrollo está lista para ser procesada conteniendo más del 15% de azúcares , (Arrazola Domínguez F. del C. , 1969) .

Análisis efectuados sobre la porción central de plantas productoras de tequila de 8 a 9 años de edad reportan los siguientes resultados ; materia fibrosa 11-11.5% ; cenizas 2.4-4.0% ; azúcares fermentecibles libres 1.0-1.5% ; inulina fue el polisacárido encontrado en estos Agaves, el cual se hidroliza en azúcares fermentecibles ; la presencia de almidón no fue demostrada ; gomas estan presentes en forma de pentosas ; aldosas fueron detectadas también en baja proporción.

Los resultados de análisis de composición general de los principales Agaves tequileros se muestran en la tabla 7 :

TABLA 7 .

COMPOSICION DEL TRONCO PRINCIPAL DE PLANTAS DE AGAVE. Resultados en % .							
Nombre común	H ₂ O	Fibra cruda	Inulina	Azúcares red. tot.	Nitrógeno protéico	cenizas	pH
Carpintero	70	11	15.4	1.03	0.021	3.9	5.5
Pata de Mula	63	12	19.8	1.00	0.019	2.9	5.0
Bermejo	65	12.5	18.1	1.06	0.022	2.5	5.0
Azul	62	11.8	20.1	1.03	0.024	2.5	5.5
Zopilochino	70	12	14.3	1.03	0.023	2.7	4.5
Sihuil	65	12.5	17.5	1.09	0.021	2.5	4.5
Chato	68	12.5	15.6	1.23	0.020	2.4	5.0
Azul 2	60	11	24.1	1.50	0.020	2.7	4.5

El contenido de azúcares reductores totales del jugo de Agave, después de hidrólisis ácida varía del 16 al 27%, de acuerdo a la variedad de la planta . El contenido de fructosa varía del 13 al 25% y las aldosas del 1 al 4% . Estos resultados -- confirman la presencia de inulina como el principal polisacárido en la planta de Agave , segun se muestra en la tabla 8 :

TABLA 8 .

AZUCARES EN JUGO HIDROLIZADO DE AGAVE. Resultados en % .			
Nombre común	Azúcares reductores	Fructosa	Aldosas
Carpintero	17.2	15.9	1.3
Pata de Mula	22.0	18.8	3.2
Bermejo	20.0	17.8	2.2
Azul	22.3	21.0	1.3

TABLA 8 (Continuación) .

Nombre común	Azúcares reductores	Fructosa	Aldosas
Zopilochino	16.0	13.7	2.2
Sihuil	19.5	15.6	3.9
Chato	17.2	15.1	2.1
Azul 2	26.8	25.5	1.3

Ref. (Sanchez Marroquin A. and Hope H.P., 1953) .

Estudios desarrollados sobre la identificación de carbohidratos del jugo de diferentes Agaves por cromatografía en papel, hidrolizando en baño maría a 70°C usando -- ácido sulfúrico durante una hora y neutralizando con hidróxido de sodio, muestran los siguientes resultados descritos en la tabla 9 :

TABLA 9 .

IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS.

	Jugo sin hidrolizar	Jugo hidrolizado
Agave tequilana (Tequilero)	Acido D-glucurónico	Glucosa
	Glucosa	Fructosa
	Fructosa	
	Ramposa	
Agave atrovirens (Pulquero)	Fructosa	Glucosa
	Arabinosa	Fructosa
Agave fourcroydes (Henequenero)	Glucosa	Glucosa
	Fructosa	Fructosa
	Arabinosa	

Ref. (Perez Peña F. , 1953) .

Utilizando métodos cromatográficos para el estudio de los carbohidratos de Agave - veracruz se encontraron los siguientes : fructosa, glucosa, sacarosa, cuatro oligo sacáridos y dos polifruetosanas. Observandose también una variación en el contenido de carbohidratos en tronco principal de éste Agave relacionando esto con la ---

edad y madurez de la planta. Se sugiere además que estos carbohidratos se incrementan con la madurez de la planta (Srinivasan M. and Bhatia I.S., 1, 1953) .

Estudios posteriores sobre la distribución de carbohidratos en el tronco principal y quiote de Agave veracruz demuestran que las fructosanas se encuentran más altamente concentradas en el tronco y que están uniformemente distribuidas en esta sección, habiendo una disminución gradual de fructosanas a través del quiote.

Se reporta en base a los azúcares presentes en los sólidos del tronco la siguiente composición dada en la tabla 10 :

TABLA 10 .

Carbohidratos	Porcentaje
Fructosanas	70
Oligosacáridos	14
Fructosa, glucosa y sacarosa	15 (Glucosa en la menor concentración)

Utilizando métodos colorimétricos se determinó que la fructosa está presente en un 90% del total de carbohidratos (Srinivasan M. and Bhatia I.S., 2, 1953) .

HIDROLISIS DE POLISACARIDOS. FRUCTOSANAS.

La hidrólisis de polisacáridos es probablemente afectada por la configuración, el tamaño del anillo y conformación anomérica de la uniones glicosídicas, la posición de la unión [(1--2), (1--3), (1--4) y (1--6)]. la presencia de grupos funcionales en la molécula y la intensidad de interacciones intra e intermoleculares.

Se observa que existe un rango superior de hidrólisis de uniones terminales, — comparado con uniones internas en polisacáridos. En la siguiente tabla se dan algunos parámetros de cinética de hidrólisis de algunos polisacáridos :

TABLA 11 .

Compuesto	E(Kcal mol ⁻¹)	S(Cal mol ⁻¹ grado ⁻¹)
Acido algínico	28.0	+ 7.37
Dextranas	34.3	+ 15.6
Glicógeno	26.95	+ 3.7
Inulina	29.4	+ 13.4

Ref. (Bemiller J.N., 1967) .

Siendo a grado de descomposición, K = constante de velocidad, K_0 = constante de velocidad en el tiempo cero y K_∞ constante de velocidad en el tiempo infinito; se ha propuesto que la curva de K vs a y el valor K_∞/K_0 sean usados como un criterio de el tipo de combinación de polisacáridos. Cuando la rotación de los enlaces es restringida, la curva K - a es exponencial, K_∞/K_0 es grande y la hidrólisis es difícil; cuando la rotación es relativamente libre, la curva K - a es lineal, K_∞/K_0 es pequeña y la hidrólisis es fácil, (Ryoichi S. and Motohiro S. , 1953) .

La diferencia en el rango de hidrólisis de los D-Fructofuranosidos y D-Fructopiranosidos es en mucho menor que las diferencias observadas para los dos semejantes de aldósidos. Las energías de activación son muy similares para furanoide y piranoide derivados y se concluye que la pequeña diferencia entre estas energías o en

as constantes de rangos de hidrólisis no pueden ser usadas para distinguir entre dos tipos de estructura del anillo, (Green W.J. , 1966) .

Hidrólisis ácida .

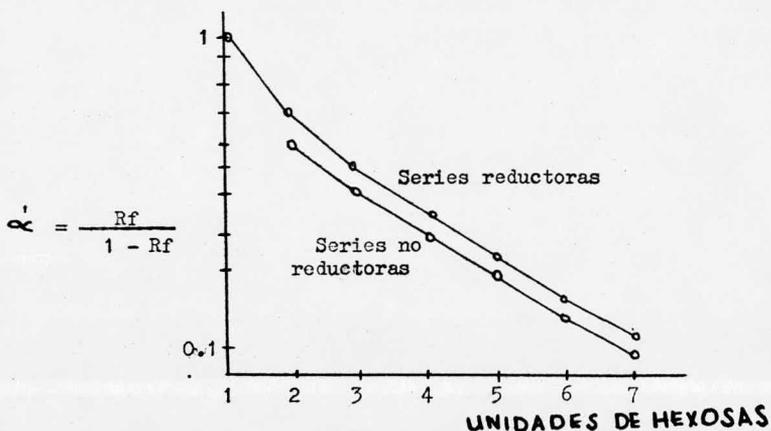
En la hidrólisis de inulina existen tres diferentes reacciones, especialmente, la hidrólisis de la unión glicosídica, el rompimiento del monosacárido y la rever- sión . La hidrólisis es un proceso muy complejo . Esta puede ser considerada como el resultado de al menos dos procesos, marcados por **variación de constantes**; de las cuales la más lenta es la ruptura de las uniones no terminales. Este proceso es principalmente debido a que al inicio de la hidrólisis son tan largas que el número de enlaces terminales puede ser ignorado . Con el progreso de la reacción sin embargo, el número de uniones terminales se incrementa continuamente con lo cual el valor de las constantes determina que el rompimiento de éstas ligaduras juega un papel más importante. Los valores de las constantes cambian de acuerdo a la temperatura y concentración de ácido de diferentes formas, de modo que no es constante la relación que se puede encontrar entre ellas. El valor de la constante de hidrólisis de las uniones no terminales incrementa más rápidamente con el incremento de la concentración de ácido y alta temperatura, que la de las uniones terminales, porque en aquella los exponentes determinan la dependencia de la concentración del ácido y la energía de activación de la reacción es más grande . En inulina, la situación es diferente a la de amilosa, ya que con un aumento de la concentración de ácido la formación de complejos de protones es condicionada por las uniones terminales , (Hollo J. , Szejtli J. , Toht M. and Kun A. , 1964) . La hidrólisis según las condiciones en que se lleve a cabo se puede dividir en parcial o total .

a).- Parcial . Se puede llevar a cabo bajo las siguientes condiciones :

i.- Acido sulfúrico 0.01N durante 15 minutos a 70°C para la identificación -

de residuos reductores y no reductores de inulina por cromatografía en papel, observando la influencia de la longitud de cadena y terminación de ésta sobre las movilidades respectivas en el cromatograma (Figura 11); series reductoras; fructosa, inulobiosa, inulotriosa, etc.; series no reductoras; sacarosa, 1- β -fructofuranosil-sacarosa, 1- β -inulobiofuranosil-sacarosa, etc.

FIGURA 11 .



Ref. (French D. and G.N. Wild, 1953).

ii.- Acido sulfúrico 0.01N a 70°C por 15 minutos e inulina al 5% obteniendo una mezcla de di, tri y tetrasacáridos identificados por cromatografía en papel, (Feingold E. and Avigad I. , 1956) .

iii.- Acido oxálico 0.01N a 60°C por 30 minutos obteniendo una mezcla de - 1-Fructosilfructosa y (1-fructosil)₂Fructosa que son identificados por cromatografía de elución en columna, (Edelman J. and Dickerson A.G., 1966) .

A continuación se observan en las figuras 12 y 13 los compuestos formados durante la hidrólisis parcial de inulina, siendo respectivamente las series reductoras y no reductoras .

FIGURA 12 .

Series reductoras .

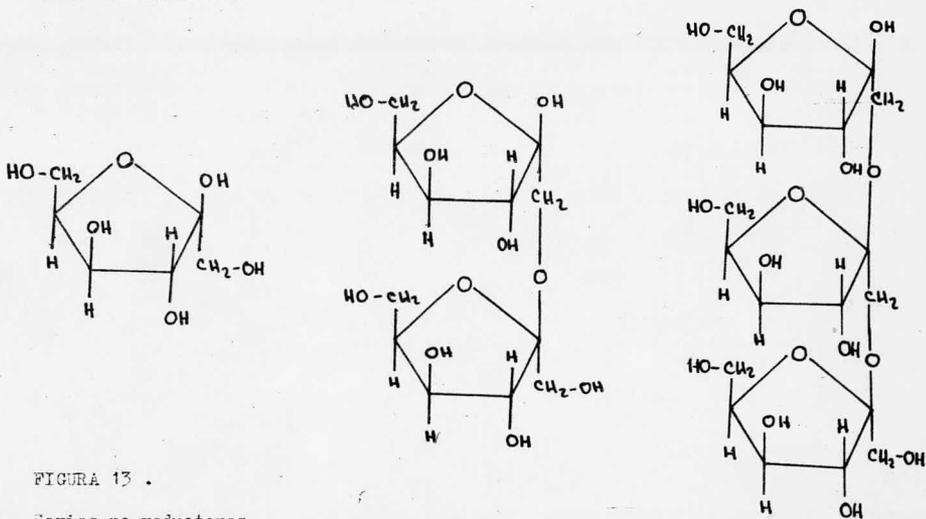
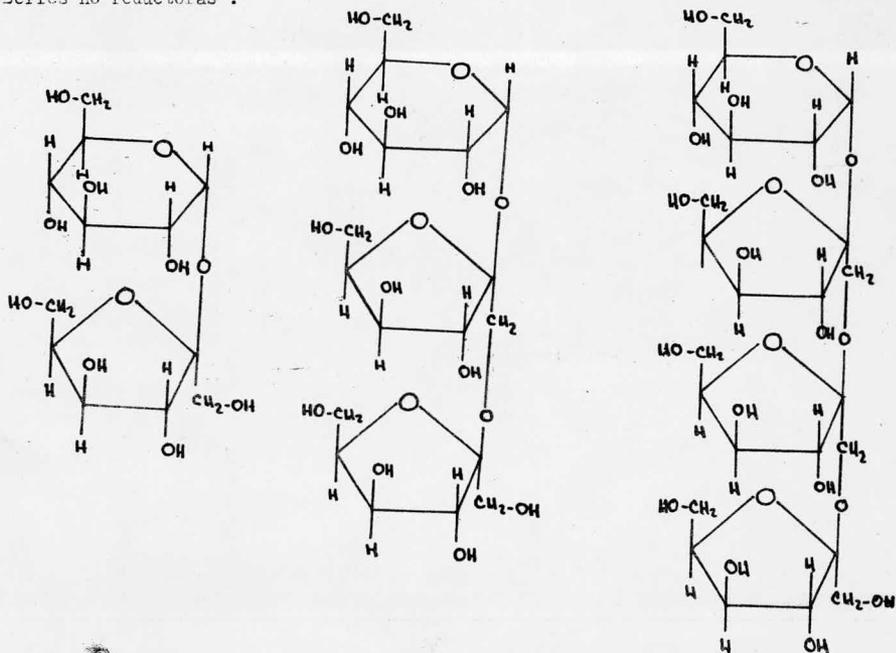


FIGURA 13 .

Series no reductoras .



b).- Total . Se han reportado las siguientes condiciones de reacción :

- 1.- Acido oxálico al 2.5 % a 80°C por 18 horas en estudios sobre la estructura de inulina de Dahlia tuber , (Hirst and Co. , 1950) .
- 2.- Acido sulfúrico 0.05N a 95-100°C por 4 horas en hidrólisis de inulina de Inula helenium , (Bell D.J. and Palmer A. , 1952) .
- 3.- Soluciones conteniendo 1.4 a 10 g de inulina por litro fueron completamente hidrolizadas usando ;
 - HCl 1.48% a 80°C por 30 minutos ,
 - HCl 2.74% a 67-70°C durante 2.5 minutos,
 - H₂SO₄ 1.24% a 80°C por una hora .
 El tipo de ácido y las condiciones no tuvieron efecto sobre los resultados, (Golovin P.V., 1958) .
- 4.- Acido sulfúrico a pH 3-4 a 70°C por 30 minutos como las condiciones óptimas para la hidrólisis de fructosanas del jugo de Agave tequila azul . En la siguiente tabla se observan datos acerca de jugo, -- jarabe y fructosa obtenidos por diferentes métodos .

TABLA 12 .

Método usado en la obtención del jarabe .	Gramos de maguey	Jugo crudo ml	Jarabe obtenido en gramos	Fructosa en el jugo crudo gramos	Fructosa en el jarabe gramos	Rendimiento . %
Fructosato de calcio	996	442	144.2	135.70	104.73	77.1
Subacetato de plomo	1616	712	270.6	218.60	180.00	82.3
Sulfato de zinc	1960	635	247.8	180.16	151.85	84.3
Adsorción No. 1	1269	525	252.3	167.73	166.77.	99.3
Adsorción No. 2	1269	525	245.9	167.73	162.79	97.1

Ref. (Marino Flores L. , 1961) .

5.- Acido sulfúrico 0.05N a 77-80°C durante 5 horas como las condiciones óptimas de hidrólisis sin que la glucosa o fructosa formadas sean degradadas en el proceso . Se encontro que un 66% de fructosa es degradada por ácido sulfúrico 1N en 3 horas a reflujo y glucosa no fue -- significativamente afectada, (Lewis B.A., 1967) .

Hidrólisis enzimática .

Estudios efectuados sobre hidrólisis enzimática de inulina con enzima inulinasa producida extracelularmente por *Saccharomyces fragilis*, muestran como - los productos de reacción de inulina tratada con ésta a fructosa como el primero y único azúcar producido, excepto que en las últimas etapas de la hidrólisis una pequeña cantidad de glucosa pudo ser detectada. Se observó también que la enzima ataca grupos finales en base a la ausencia de oligosacáridos en cualquier fase de la hidrólisis y que el ataque a inulina se inicia - de la fructosa final siguiendo una hidrólisis secuencial de las moléculas de fructosa . La degradación de inulina ocurre ampliamente por un mecanismo de enlace simple, es decir la enzima hidroliza completamente una molécula de -- sustrato antes de atacar otra; se determinó un rango de fructosa/glucosa de 35 , (Snyder H.E. and Phaff H.J., 1962) .

Investigaciones sobre el modo de acción de la enzima β -fructofuranosidasa - obtenida de raíces de "Diente de León" (*Taraxacum officinale* W.), sobre inulina reportan que después de una hidrólisis completa, el tipo de acción de la enzima es "exo" o sea en grupos terminales y solamente por la fructosa final ocurriendo esto de una manera secuencial a través de la molécula de inulina, (Rutherford P.P. and Deacon A.C. , 1972) .

MATERIAL Y METODOS.

Para los análisis respectivos y determinaciones correspondientes se utilizaron -- muestras de Agave tequilana azul, con edad de 8 a 10 años, proporcionadas gentilmente por la razón social Eucario Gonzalez S.A.

1.- Determinación de humedad.

1.1.- Material :

vasos Berzelius de 100 ml, desecador, estufa, balanza analítica y pinzas .

1.2.- Técnica. Se determinó por el método de la A.O.A.C. (1975) :

pesar de 2 a 3 g de muestra en un vaso Berzelius a peso constante, secar en la estufa a 100-110°C por espacio de 3 horas, enfriar a continuación a temperatura de cuarto y pesar. Introducir nuevamente el vaso en la estufa por 30 minutos, enfriar y pesar, hasta que no varíe la tercera cifra decimal de las dos últimas pesadas. Calcular el porcentaje de humedad .

2.- Determinación de cenizas .

2.1.- Material :

crisoles de porcelana, mufla, desecador, balanza analítica, pinzas, mechero Bunsen, tripie y triángulo de porcelana .

2.2.- Técnica. Se determinó por el método de la A.O.A.C. (1975) :

pesar 5 g de muestra en un crisol a peso constante a 550°C. Carbonizarla con el mechero en seguida meterla a la mufla cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar que los cloruros se volatilicen. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises homogéneas. Enfriar en el desecador y pesar . Calcular el porcentaje de cenizas .

3.- Determinación de proteínas .

3.1.- Material :

matraces microKjedhal de 100 ml, digestor, probeta de 100 ml, espátula, matraz Erlenmeyer de 100 ml, aparato de destilación microKjedhal, soporte uni-

versal, pinzas para bureta y bureta de 50 ml .

3.2.- Reactivos :

ácido sulfúrico concentrado (93%), óxido rojo de mercurio, sulfato de potasio, ácido bórico al 4%, hidróxido de sodio acuoso 1:1, ácido clorhídrico 0.01N e indicador de rojo de metilo y azul de metileno 2:1 al 0.2% .

3.3.- Técnica . Se determino por el método de la A.O.A.C. (1975) :

pesar 100 mg de muestra en un pedazo de papel glassine, introducirlo en el matraz microKjedhal; añadir 2 g de sulfato de potasio, 40 mg de óxido rojo de mercurio y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocar el matraz en el digestor y calentar hasta la total digestión de la materia orgánica, o sea hasta que el contenido del matraz esté completamente claro. Dejar enfriar, disolver el residuo en la menor cantidad de agua posible (5-10 ml) pasar esta al aparato de destilación y enjuagar el matraz tres veces más con 2 ml de agua añadiendo estos lavados al aparato. A la salida del condensador del destilador colocar un matraz Erlenmeyer de 100 ml con 15 ml de ácido bórico y 5 gotas de indicador. Añadir 20 ml de hidróxido de sodio 1:1 al aparato de destilación y calentar hasta que se obtengan 50 ml de destilado. Retirar el matraz del aparato y titular con ácido clorhídrico 0.01N hasta la aparición primera del color violeta .

Efectuar un blanco utilizando un peso de papel igual al que se utilizó para la muestra y proceder de la misma manera que para ésta .

Calcular el porciento de nitrógeno y proteínas .

4.- Determinación de fibra cruda .

4.1.- Material :

vasos Berzelius sin pico 600 ml, espátula, probeta de 100 ml, embudo de cola corta de filtración rápida, gasa, piseta de plástico, agitador de vidrio, asbesto, balanza analítica, digestor, estufa, mufla, quitasato de 1 l, bomba de vacío y filtro Gooch .

4.2.- Reactivos :

ácido sulfúrico 1.25%, hidróxido de sodio 1.25% y rojo de metilo 0.5% .

4.3.- Técnica . Se determinó por el método de la A.O.A.C. (1975) :

pesar de 2 a 5 g de muestra, colocarla en un vaso de 600 ml y añadir 0.5g de asbesto preparado más 200 ml de solución hirviente de ácido sulfúrico al -- 1.25%. Calentar inmediatamente y reflujar durante 30 minutos filtrar a través de una tela previamente lavada, con la piseta lavar el residuo hasta que no de reacción ácida al rojo de metilo las aguas de lavado; el residuo se pasa cuantitativamente al vaso limpio y se repite la operación con solución hirviente de hidróxido de sodio al 1.25% . Después de reflujar 30 minutos y lavar perfectamente el residuo filtrando a través de un filtro Gooch preparado con asbesto digerido, se enjuaga con alcohol y el filtro se lleva a la estufa a 100°C durante 2 horas, enseguida enfriar y pesar. Calcinar a 900°C en la mufla por espacio de 2 horas, enfriar y pesar después . Por la diferencia de pesos calcular la fibra cruda .

Preparación del asbesto .

Digerir a ebullición con hidróxido de sodio al 5% durante 8 horas; lavar con agua caliente hasta que no de reacción alcalina, digerir nuevamente a -- ebullición con ácido clorhídrico 1:3 durante 8 horas, lavar hasta que no de reacción ácida, secar y calcinar al rojo brillante .

5.- Determinación cualitativa de fructosa. Prueba de Seliwanoff .

5.1.- Material :

tubos de ensayo, gradilla metálica, pipeta graduada de 5 ml, mechero Bunsen, agitador de tubos y cronómetro .

5.2.- Reactivos :

Resorcinol y ácido clorhídrico acuoso 1:2 .

5.3.- Técnica . Se utilizo la referida por (Shahidullah M. and Khorasani S., 1972).

Colocar en tubos de ensayo 5 ml de solución al 0.05% de resorcinol en ácido clorhídrico 1:2, adicionar de 1 a 5 gotas de la solución problema calentar rápidamente sobre la flama directa del mechero con agitación . Parar el calentamiento después de 100 segundos y comparar contra un blanco hecho con agua similarmente tratado . Un color rojo indica la presencia de fructosa .

6.- Determinación colorimétrica de fructosa .

6.1.- Material :

tubos de ensayo, pipetas volumetricas de 2 ml, pipetas graduadas de 5 ml, matraces aforados de 50, 100, 150, 250, 500 y 1000 ml; mechero Bunsen, agitador de tubos, espectrofotómetro, balanza analítica, celdas de vidrio, gradilla metálica y piseta de plástico .

6.2.- Reactivos :

ácido fosfórico al 85%, p-anisidina y fructosa cristalina .

6.3.- Técnica . Para esta determinación se utilizó el método citado por Hessler E. L. (1959) que hace reaccionar p-anisidina en ácido fosfórico con la fructosa presente .

a).- Curva estandard . Cantidades conocidas de fructosa que van desde 0.04 mg/ml a 0.2 mg/ml fueron preparadas en solución . Un mililitro de la solución de fructosa se coloca en un tubo de ensayo adicionandosele 4 ml de p-anisidina al 0.05% en ácido fosfórico al 85% y un mililitro de agua destilada. Un blanco con agua es hecho simultaneamente. Los tubos son calentados a ebullición sobre la flama directa del mechero. Después de 30 minutos de enfriamiento se leen los tubos a una longitud de onda de 450 nm .

b).- Muestra problema . se sigue la técnica antes descrita sustituyendo la solución estandard de fructosa por las muestras clarificadas del jugo crudo e hidrolizado de agave .

7.- Determinación de azúcares reductores .

7.1.- Material :

matraces aforados de 500 ml, pipetas volumetricas de 5 ml, matraz aforado de 100 ml, matraces Erlenmeyer de 250 ml, bureta de 50 ml, soporte universal, - pinzas para bureta, mechero Bunsen, tripie, tela de asbesto, perlas de vidrio, gotero de 25 ml, matraz quitasato de 1 l, crisol Gooch, alargadera de hule, balanza analítica, espátula, papel filtro, vaso Berzelius de 250 ml y cronómetro .

7.2.- Reactivos :

solución de Fehling modificación de Soxhlet, que se prepara mezclando volumenes iguales de las soluciones A y B antes de su empleo .

Solución A : disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, aforar a -- 500 ml y filtrar a travez de asbesto preparado y guardar en un frasco ambar.

Solución B : disolver 173 g de tartato de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en agua destilada, aforar a 500 ml, dejar reposar dos días y filtrar a travez de asbesto preparado guardando la solución en un frasco ambar.

Solución de fructosa al 0.2% y azul de metileno acuoso al 0.25% .

7.3.- Técnica. Se utilizó el método de Lane y Eyon de la A.O.A.C. (1975) .

Mezclar en un matraz Erlenmeyer 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B medidos con pipeta volumétrica, agregar 50 ml de agua destilada y perlas de vidrio, calentar a ebullición y añadir con bureta solución estandard de fructosa hasta efectuar la casi reducción total del cobre; mantener la ebullición moderada y agregar 4 ó 5 gotas de solución de azul de metileno, se continua la titulación, gota a gota hasta la total reducción del cobre (se observa un color anaranjado característico, acompañado de un precipitado rojo ladrillo). De esta forma valoramos la solución estandard; para la solución problema se sigue la técnica antes descrita sutituyendo la solución estandard por la problema efectuando las diluciones correspondientes si es necesario . En la titulación no se deben de gastarse menos de 15 ml ni más de 50 ml y el tiempo de titulación no debe ser mayor de 3 minutos .

8.- Obtención de jugo de agave crudo .

8.1.- Material :

tabla de madera, cuchillo, vaso Berzelius de 600 ml, baño de agua con control de temperatura, pinzas de tres dedos, licuadora, probeta de 250 ml, termómetro, cronómetro, espátula, soporte universal, prensa hidráulica, gasa, - bolsas de polietileno y balanza granataria.

8.2.- Técnica :

una muestra de penca de Agave tequilana azul se corta en trozos pequeños (1 cm²) y se pesan 200 g de estos; enseguida se desgarran en la licuadora por 3 minutos. El producto desintegrado se pasa cuantitativamente a un vaso Berzelius en el cual se macera por espacio de 15 a 20 minutos con 125 ml de agua destilada a una temperatura de 60-70°C en un baño maría. Posteriormente se extrae el jugo del macerado decantando el líquido del vaso y colocando el residuo fibroso envuelto en gasa en el cilindro de la prensa y aplicando una presión de 20000 psi por 60 segundos, el jugo extraído se recibe en bolsas - de polietileno que se junta con el decantado inicial .

9.- Clarificación del jugo de agave crudo .

9.1.- Material :

matraz quitasato de 1 l, embudos Buchner de 12 y 15 cm de diámetro, agitador de vidrio, papel filtro Whatman y pliego, bomba de vacío, manguera de hule, papel pH escala 3-5, matraz Erlenmeyer de 500 ml y vaso Berzelius de 600 ml.

9.2.- Reactivos :

Solución acuosa saturada de subacetato de plomo y solución acuosa al 10% de ácido oxálico .

9.3.- Técnica :

a 200 ml aproximadamente de jugo de agave crudo se le adicionan 35 ml de solución saturada de subacetato de plomo y se agita vigorosamente, se deja reposar por espacio de dos horas con el fin de promover una mejor separación -

de la materia insoluble. Posteriormente se filtra y al filtrado se le adiciona ácido oxálico al 10% hasta la completa neutralización del exceso de subacetato. Se filtra nuevamente hasta obtener un licor cristalino .

10.- Hidrólisis de jugo de agave .

10.1.- Material :

matraces Erlenmeyer de 100 ml, pinzas de tres dedos, soportes universal, baño con control de temperatura, pipetas graduadas de 5 ml, vasos ^Berzelius de 100 ml, bureta de 50 ml, cronómetro, termómetro, papel pH escala 3-5, vasos de aluminio de 500 ml y refrigerador .

10.2.- Reactivos :

ácido sulfúrico 1.5%, ácido clorhídrico 1.47%, ácido oxálico 10% e hidróxido de sodio 0.1N .

10.3.- Técnica :

se colocan en un baño maría a 70-80°C una serie de matraces Erlenmeyer de -- 100 ml conteniendo 25 ml del jugo clarificado de agave, se acidifican las _ muestras a un pH de 3-3.5 con el ácido respectivo segun se desee . Cuando la temperatura en las muestras es de 70-80°C se procede a tomar el tiempo de hidrólisis sacando éstas a diversos tiempos y neutralizando con hidróxido de - sodio 0.1N de inmediato, bajando a continuación la temperatura en el matraz a unos 10°C en un baño de hielo .

11.- Obtención de fructosanas . Estas se obtuvieron por medio de tres métodos:

11.1.- Precipitación con alcohol .

11.1.1.- Material :

probeta de 250 ml, matraz Erlenmeyer de 500 ml, refrigerador, rotavapor, baño maría, parrilla eléctrica, centrifuga, estufa con sistema de vacío, vi---drios de reloj, tubos para centrifuga, balanza granataria, espátula, matraz de bola de boca esmerilada de 500 ml y vasos ^Berzelius de 250 ml .

11.1.2.- Reactivos : etanol al 90% .

11.1.3.- Técnica. Se utilizó el método descrito por Srinivasan M. and Bhatia I.S.

(1953), para la obtención de fructosanas de *Agave veracruz* .

A 350 ml de jugo clarificado de agave se le adiciona un volumen igual de etanol al 90% y se almacena a una temperatura de 4°C durante dos horas, posteriormente este volumen se concentra en rotavapor a vacío a una temperatura de 50-60°C hasta la mitad del volumen original del jugo. Se adiciona nuevamente etanol al 90% v/v a la muestra y se refrigera por espacio de dos horas, el precipitado obtenido se separa por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos. El precipitado es secado sobre un vidrio de reloj durante 4 horas a 40-45°C en estufa con sistema de vacío a 10 psi .

11.2.- Precipitación con ácido acético glacial .

11.2.1.- Material ; el citado en 11.1.1 .

11.2.2.- Reactivos : ácido acético glacial .

11.2.3.- Técnica. La citada en 11.1.3. y :

al líquido sobrenadante obtenido después de la centrifugación se le adiciona un volumen igual de ácido acético glacial, dejándose reposar después durante 12 horas a temperatura de cuarto. Posteriormente se separa el precipitado obtenido por centrifugación a 10,000 rpm por 15 minutos y se lava con abundante agua fría y se seca sobre un vidrio de reloj a 40-45°C por espacio de 4 horas en estufa con sistema de vacío a 10 psi .

11.3.- Precipitación por tratamiento con hidróxido de calcio .

11.3.1.- Material ;

baño con control de temperatura, termómetro, vasos Berzelius de 600 ml, agitador de vidrio, espátula, papel indicador pH escala 6-8, matraz quitasato de 1 l, matraz Erlenmeyer de 250 ml, refrigerador, papel filtro Whatman, embudo Buchner, piseta de plástico, vidrios de reloj, estufa con sistema de vacío y bomba de vacío .

11.3.2.- Reactivos :

hidróxido de calcio como lechada de cal, tierra diatomáceas y ácido oxálico al 10% .

11.3.3.- Técnica. Se utilizó el método de tratamiento con lechada de cal descrito por Emma Mc. Donald (1946) .

Se calientan 350 ml de jugo clarificado de agave a 60-70°C, se añade lechada de cal hasta pH de 8 y se filtra en caliente, se ajusta el pH del filtrado alrededor de 7 con ácido oxálico. Se calienta de nuevo a 70-80°C y se añade tierra de diatomáceas filtrando en caliente, el filtrado se mantiene por una noche a temperatura de congelación (0°C) y se descongela posteriormente a temperatura de cuarto. El precipitado obtenido es separado por filtración con vacío y se lava con abundante agua fría. Se efectúan sucesivas recristalizaciones disolviendo con agua caliente, tratando con diatomáceas, filtrando y procediendo a obtener el precipitado por congelación y descongelación, el cual es secado sobre un vidrio de reloj en la estufa a 40-45°C por 4 horas a 10 -- psi de vacío .

12.- Análisis de espectroscopía de infrarojo de fructosanas .

12.1.- Material :

espectrómetro Perkin Elmer 137 Infracord .

12.2.- Reactivos : bromuro de potasio .

12.3.- Técnica . Las muestras se corrieron en el Departamento de Química Analítica de la División de Estudios Superiores .

Se utilizaron para estos análisis las muestras obtenidas por los métodos 11.1, 11.2 y 11.3 con bromuro de potasio en forma de pastillas, como muestra de referencia se utilizó Inulina (E. Merck) .

RESULTADOS Y DISCUSION .

I.- Composición general de la materia prima .

De los análisis bromatológicos para determinación de composición general de --
 Agave tequilana azul, se obtuvieron los resultados dados en la tabla 13 :

TABLA 13 .

<u>Componente</u>	<u>Porcentaje</u>
Agua	62
Fibra cruda	11
Proteínas	0.2
Carbohidratos	25
Cenizas	1.8

Los carbohidratos se obtuvieron por diferencia de los cuatro análisis restantes.

Estos resultados son similares a los reportados para esta variedad por (Sanchez _
 Marroquin A. and Hope H. P., 1953; y Arrazola Domínguez F. del C., 1969) .

II.- Obtención de jugo de agave crudo

Los datos de las extracciones para la obtención del jugo de agave crudo se citan en la tabla 14

TABLA 14 .

Gramos de muestra	200	200	200	300	300	300
Gramos de bagazo	68	63	67	95.7	114	107.1
ml de agua adicionada	125	125	125	200	200	200
ml de jugo obtenido	218	220	190	350	340	340
% de extracción	66	68.5	66.5	68.1	62	64.3

La extracción del jugo se vió grandemente influida por el tamaño de partícula, - por lo cual la muestra fue desgarrada perfectamente para facilitar la maceración y extracción la cual se realizó con una prensa hidraulica de cilindro; después - en orden de importancia tenemos la temperatura del agua utilizada en la maceración que estuvo en el rango de 60-70°C que se reporta como el óptimo de solubilidad para inulina (Mc Donald E., 1946); para aumentar su eficiencia se llevo a - cabo con agitación por espacio de 15 minutos .

La extracción del jugo en muestras cortadas en cuadros pequeños sin maceración fue mínima .

III.- Determinación cualitativa de fructosa en jugo de agave .

Una prueba sencilla pero significativa para identificación cualitativa de fructosa la constituye la prueba de Seliwanoff, la cual consiste en hacer reaccionar resorcinol al 0.05% en HCl:H₂O (1:2, v/v) con la muestra problema y observar si se desarrolla un cambio de color, la aparición de un amarillo pálido o rojo indica que la prueba es positiva y por ende la presencia de fructosa .

En la tabla 15 se observan la relación entre la cantidad de fructosa e inulina con el tiempo para la aparición del color significativo de la prueba positiva - según (Shahidullah M. and Khorasani S.S., 1972) .

TABLA 15 .

Fructosa	Cantidad µg	Tiempo para cambio de color (seg.)	Color final	Observaciones
" " "	50	45	rojo	color 24 hs. estable.
" " "	40	60	rojo	idem
" " "	30	90	rojo	idem
" " "	20	90	rojo	idem
" " "	10	95	amarillo pálido	idem
<u>Inulina</u>	2.75	85	rojo	se desarro-- lla muy len-- tamente el color .
" " "	2.20	140	rojo	

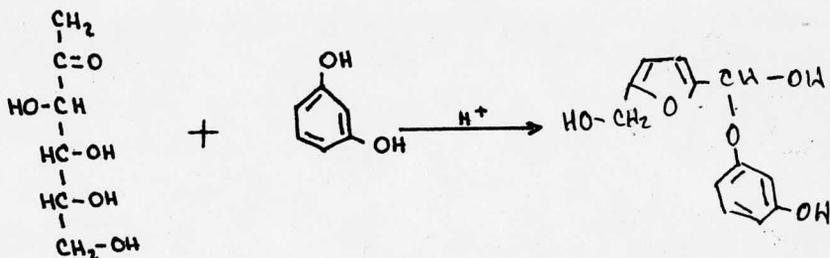
En muestras de jugo de agave previamente clarificadas se efectuó ésta prueba y los resultados obtenidos se observan en la tabla 16 :

TABLA 16 .

	pH	Prueba Seliwanoff	Tiempo (Seg.)
Jugo de agave (Pencas)	5	+	30-45
Jugo de agave (Pencas)	4.5	+	30-45
Jugo de agave (Corazón)	5	+	30-45

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 16 se observa la presencia _ de fructosa en forma libre en una cantidad mayor a 50 μ g en todas las muestras _ examinadas de jugo de agave crudo. El rango de la reacción y el tiempo tomado pa ra el desarrollo del color dependen directamente de la concentración de fructosa y no se ven influenciados por la presencia de aldohexosas como glucosa .

La reacción en que se fundamenta esta determinación se plantea como sigue:



Color rojo



IV.- Hidrólisis ácida de jugo de agave .

1.- Hidrólisis con ácido sulfúrico a pH 3 del jugo obtenido de 200 g de pencas

(68 g bagazo) , a una temperatura de 70-80°C .

TABLA 17

Tiempo min.	Fructosa g/l	Reductores g/l	Glucosa g/l	Fructosa moles/l	Glucosa moles/l
0	47	48	1	0.26	0.006
5	63	69.5	1.5	0.37	0.008
10	98	101	3	0.54	0.016
15	116	120	4	0.64	0.022
20	137	143	6	0.70	0.032
30	154	161	7	0.85	0.038
40	160	169.5	9.5	0.88	0.052
45	161	170.2	9.2	0.89	0.051

2.- Hidrólisis con ácido clorhídrico a pH 3 del jugo obtenido de 200 g de pencas

(63 g bagazo) , a 70-80°C .

TABLA 18

Tiempo min.	Fructosa g/l	Reductores g/l	Glucosa g/l	Fructosa moles/l	Glucosa moles/l
0	52	53.2	1.2	0.28	0.006
5	69	70.8	1.8	0.38	0.010
10	92	94.5	2.5	0.51	0.013
15	111	115	4	0.61	0.022
20	130	134.5	4.5	0.72	0.025
30	152	159	7	0.84	0.038
40	157	165.7	8.7	0.87	0.048
45	159	168	9	0.88	0.050

5.- Hidrólisis con ácido oxálico a pH 3 del jugo obtenido de 200 g de pencas (67 g de bagazo) , a 70-80°C .

TABLA 19 .

Tiempo min.	Fructosa g/l	Reductores g/l	Glucosa g/l	Fructosa moles/l	Glucosa moles/l
0.	46	46.9	0.9	0.25	0.005
5	53	54.1	1.1	0.29	0.006
10	63	64.3	1.3	0.35	0.007
15	74	75.5	1.5	0.41	0.008
20	82	83.7	1.7	0.45	0.009
30	96	98	2	0.53	0.011
40	103	106	3	0.57	0.016
45	110	113.7	3.7	0.61	0.020

La cantidad inicial de fructosa presente en los jugos de agave puede deberse a la facilidad de hidrólisis que presentan las fructosanas y a que pudo haber ocurrido una hidrólisis térmica parcial durante la extracción y maceración .

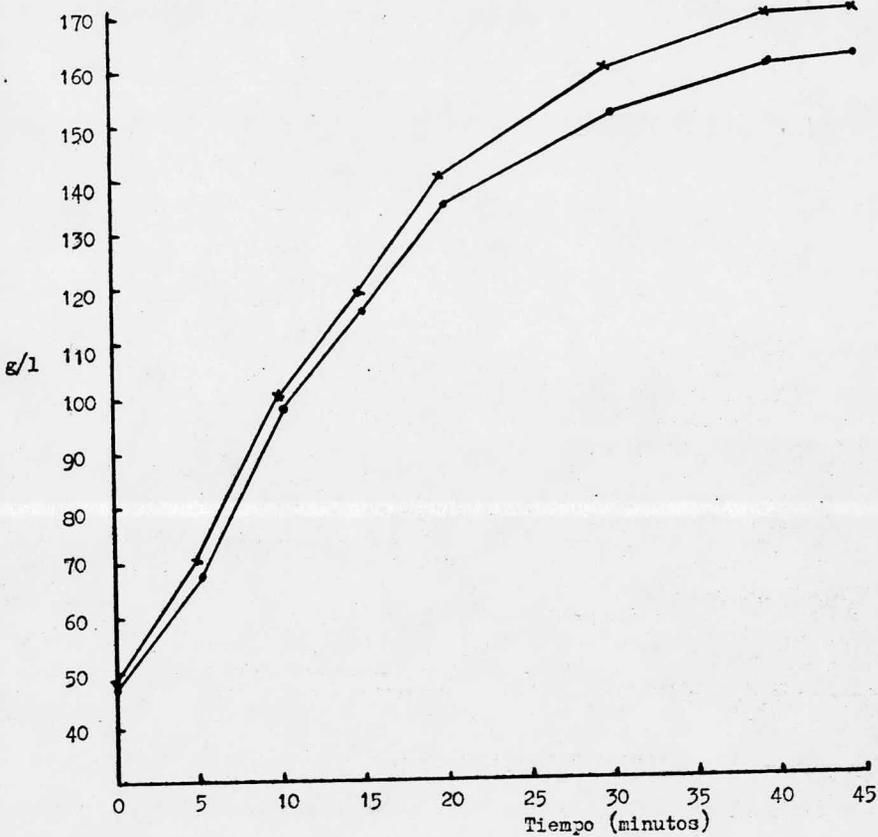
Las gráficas de las hidrólisis con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico nos muestran una semejanza en sus velocidades de hidrólisis observandose además que a los 45 minutos es total a diferencia con el ácido oxálico donde se observa una velocidad de reacción menor atribuible esto a que es un ácido débil en relación a los primeros .

La mayor cantidad de fructosa se produce durante los primeros 20 minutos de reacción y después tiende a ser constante, similar comportamiento se observa con glucosa . La relación fructosa/glucosa al inicio de la reacción es alta y tiende a disminuir con la progresión de la hidrólisis .

La proporción de fructosa-glucosa al final de las hidrólisis con ácido sulfúrico y clorhídrico se observe ser de 88 moles de fructosa por 5 de glucosa para las fructosanas (Inulina) presentes en el jugo de agave .

Figura 14 .

Hidrólisis de jugo de agave con ácido sulfúrico



x Reductores

• Fructosa

Figura 15.

Hidrólisis de jugo de agave con ácido clorhídrico .

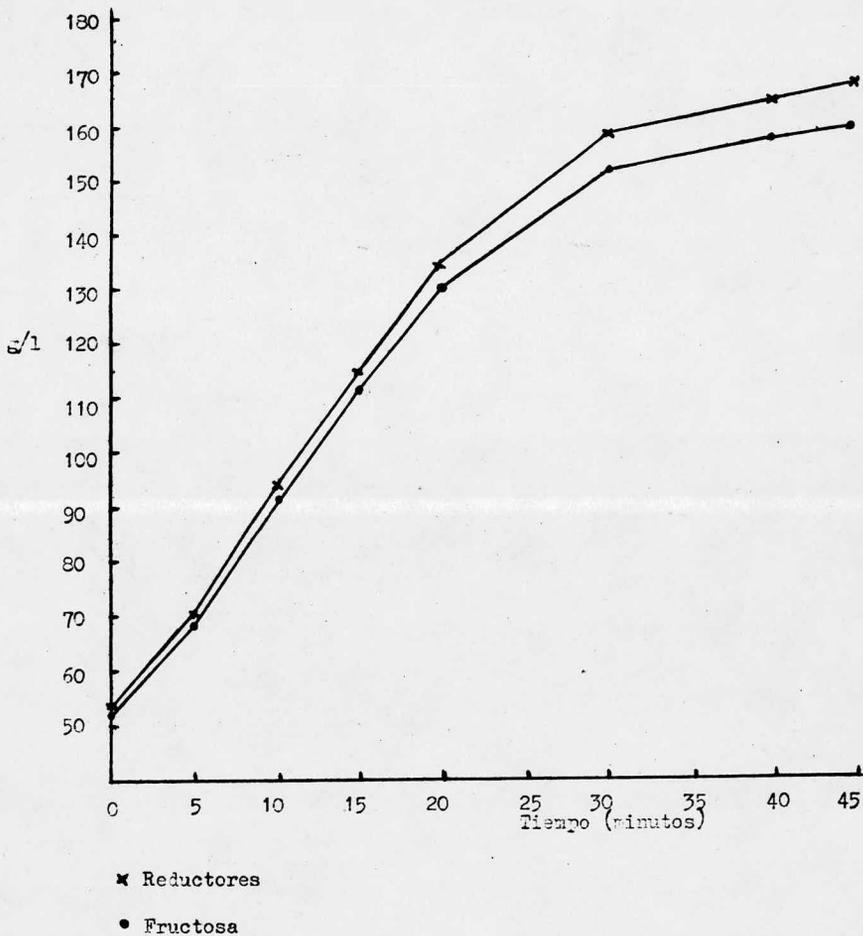
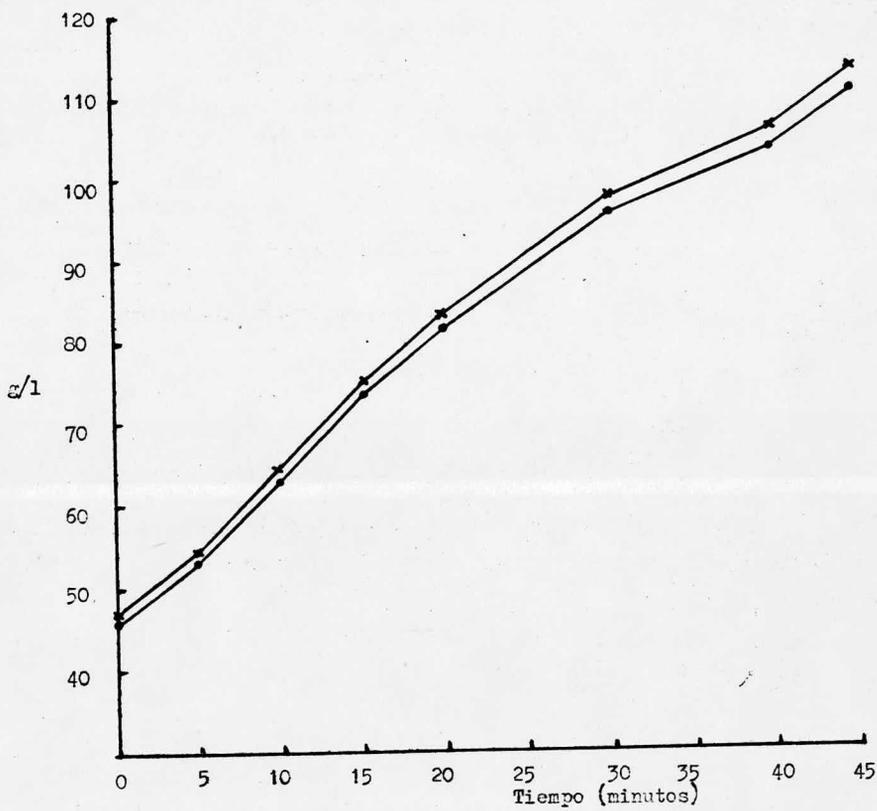


Figura 16 .

Hidrólisis de jugo de agave con ácido oxálico.



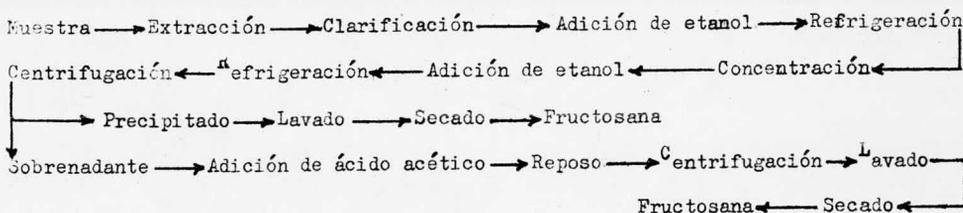
x Reductores

• Fructosa

V.- Obtención de fructosanas de agave .

En la figura 17 se observan los pasos seguidos para la obtención de fructosanas por medio de precipitación con alcohol y ácido acético.

FIGURA 17



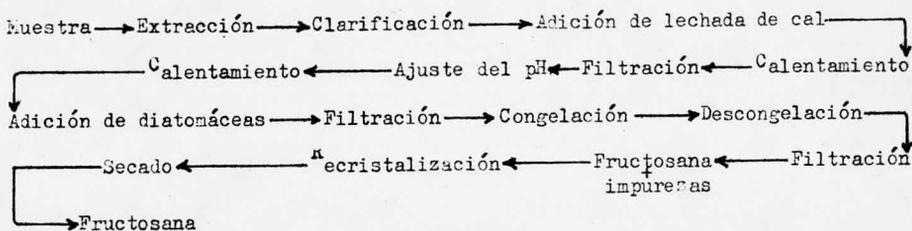
En la obtención de fructosanas por precipitación con alcohol los rendimientos de éstas con respecto al peso de muestra oscilaron entre 0.30 y 0.42% .

Se observó que a concentraciones bajas de alcohol había más dificultad en precipitar las fructosanas ya que tendían a redisolverse. El precipitado seco se presenta como un polvo fino de color blanco opaco .

Para la obtención de fructosanas con ácido acético glacial se utilizó el sobrenadante del centrifugado del método con alcohol y el rendimiento en relación al peso de muestra fue del 0.15%, obteniéndose un polvo de color un poco más oscuro que el obtenido con alcohol .

En la figura 18 se aprecian los pasos seguidos para la obtención de fructosanas con el método de la lechada de cal .

FIGURA 18 .



Las fructosanas obtenidas con el método de la lechada de cal tuvieron un rendimiento de 0.38-0.46% con relación al peso de muestra.

En éste método es de especial interes el control adecuado de las temperaturas y variaciones del pH. Cuando el pH por un exceso en la adición de lechada de cal se tornaba arriba de 9, el precipitado inicialmente obtenido presentaba un color amarillo tenue que se decoloraba a blanco opaco con las recrystalizaciones .

VI.- Análisis de espectroscopía de infrarojo de fructosanas de agave .

Con objeto de una interpretación adecuada de los resultados y espectros de infrarojo **es necesario** tener claros entre otros conceptos que:

la relación de la energía absorbida por una molécula con la frecuencia de la luz incidente, longitud y número de onda esta dada por las siguientes expresiones :

$$E = h \nu = c/\lambda$$

$$K = 1/\lambda$$

E= energía

h= 6.64 erg seg= Cte, Planck

ν = ciclos por seg= Frecuencia de la luz incidente.

λ = longitud de onda= cm

c= 2,998 x 10¹⁰cm/seg= velocidad de la luz .

K= número de onda = cm⁻¹

La región infraroja normal se extiende de 2.5 a 15 μ (4000 a 667 cm⁻¹).

Hay dos clases fundamentales de vibraciones para las moléculas: stretching o estiramiento que puede ser simétrico o asimétrico, en la cual la distancia entre dos átomos aumenta o disminuye pero los átomos permanecen en el mismo eje de enlace; y bending o deformación que puede ser en el plano tipo tijera y sacudida y fuera del plano tipo balanceo y torsión, en la cual la posición de los átomos varía en relación al eje de enlace original .

Una fuente de luz normal para radiaciones infrarojas es la lampara incandescente de Nernst, una varilla que contiene una mezcla de óxido de circonio, óxido de itrio y óxido de erbio, calentada por medio eléctrico alrededor de 1500°C .

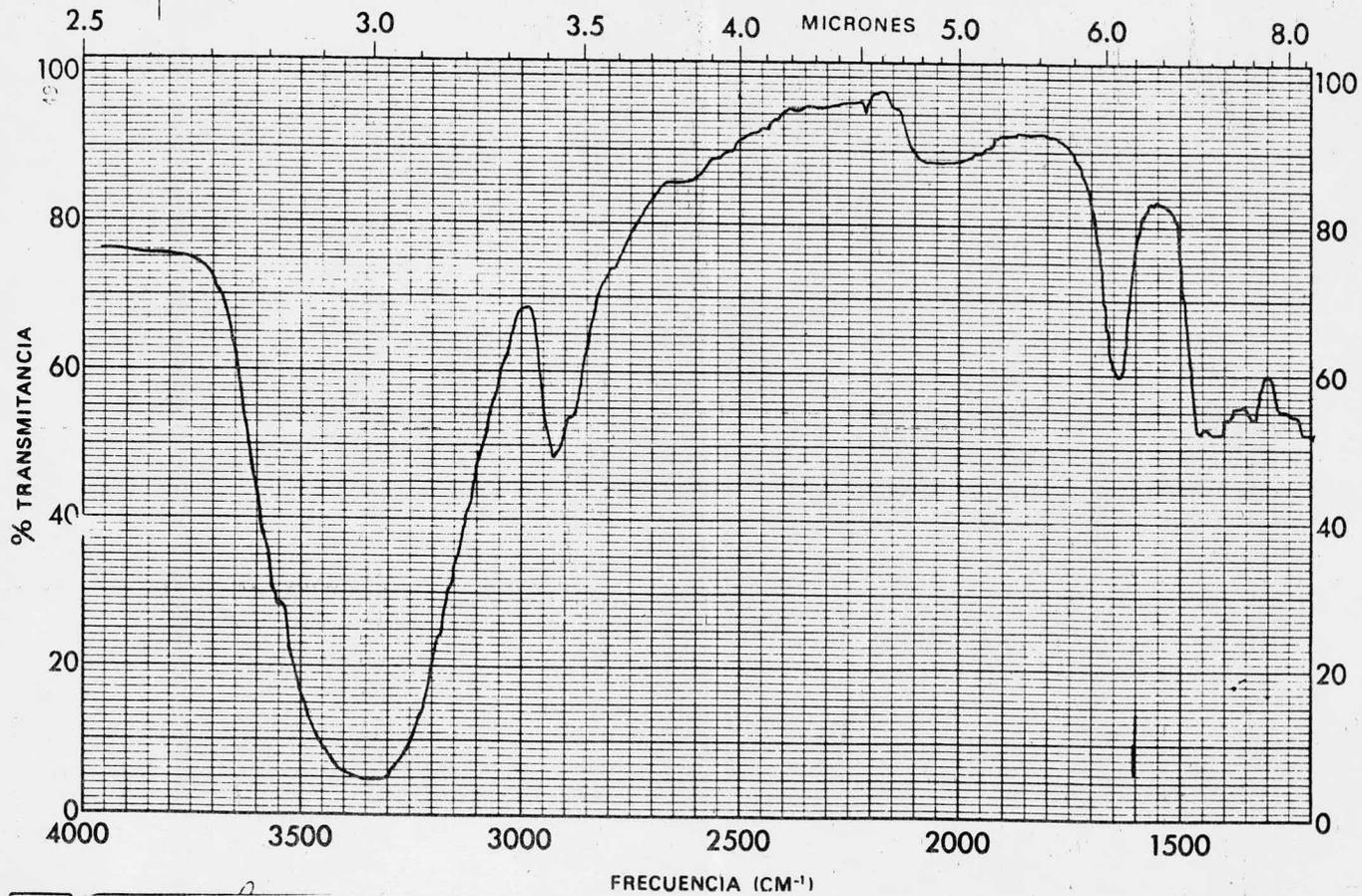
El espectro de una muestra sólida se determina con mayor precisión, bajo forma de una pastilla de halogenuro de álcali, bromuro de potasio es el más empleado ya que no absorbe en la región 2.5 a 15 μ (Willard, Merrit and Dean, 1975) .

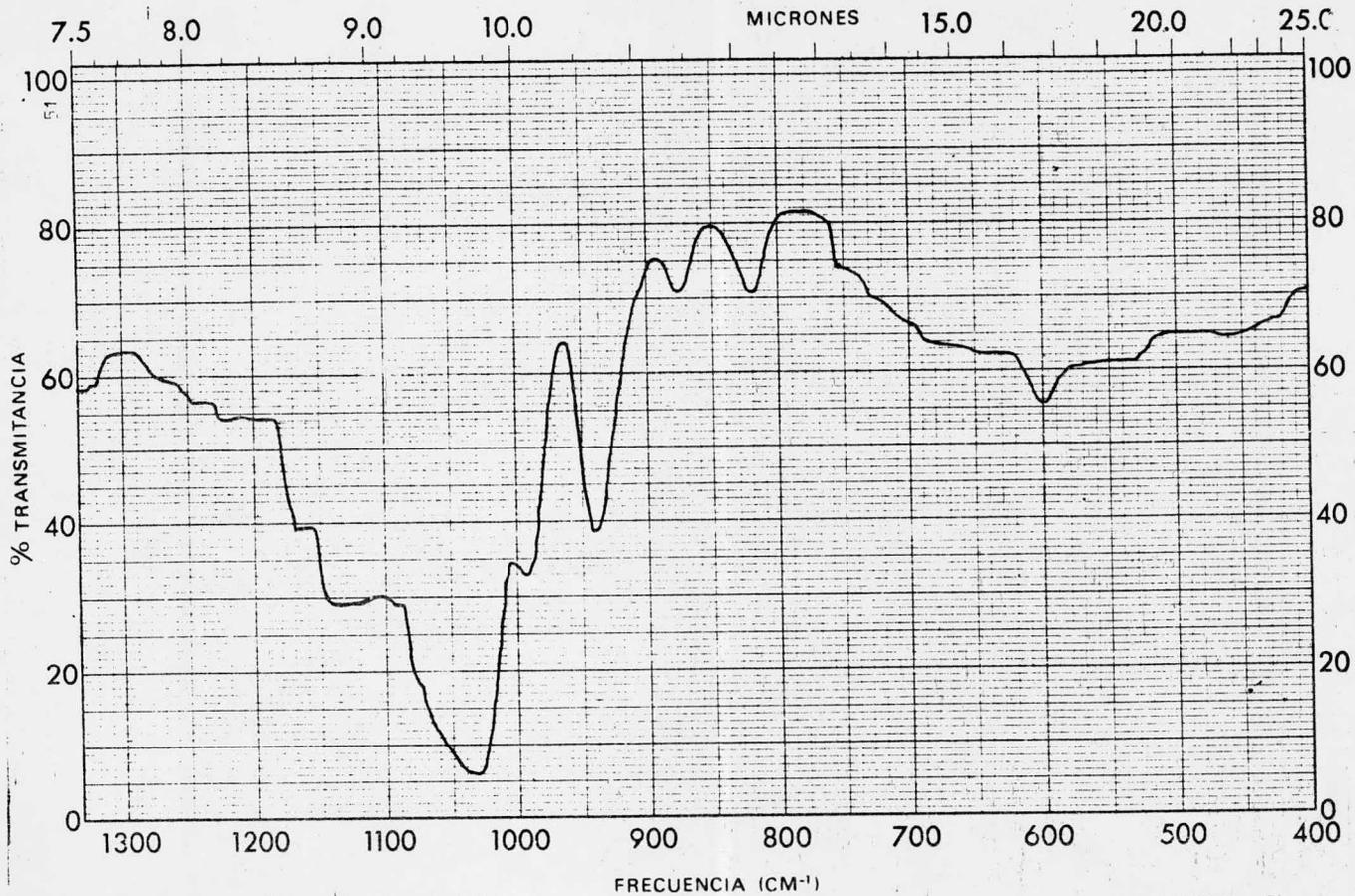
A continuación se da la resolución de los espectros obtenidos de las muestras de fructosanas de Agave tequilana azul y de fructosana standard (Inulina, E. - Merck) en base a los datos de número de onda, absorciones, vibraciones y grupos funcionales citados por (Barker and Stephens, 1954; Brock N.W. , 1957; Creswell and Co., 1972 y Dyer J.R. 1973) .

FRUCTOSANA STANDARD. INULINA . ESPECTRO No. I

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
600	d	C-H Deformación (bending) tipo sacudida del hidrógeno .
820	d	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} > \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$ Deformación (bending) del hidrógeno de un C contiguo a un O de anillo de furanosa
875	d	C-H Vibración de oscilación (rocking vibration) del grupo metilén .
940	m	 Vibración simétrica (symmetrical ring breathing) del anillo de furanosa .
1030	f	O-H Unido, deformación (Bending) del hidrógeno .
1140	d	C-O Estiramiento (stretching) del enlace carbono-oxígeno .
1330	d	C-H Deformación bending del hidrógeno en metil hidrógeno .
1450	d	O-H Primario, deformación (bending) del hidrógeno .
1485	d	C-H Deformación (bending) del hidrógeno, de -CH ₂ - saturado .
1650	m	C=O Estiramiento (stretching) de la doble ligadura .
2050	d	C≡X Estiramiento (stretching) de triple ligadura en alquinos e isocianuros. Vibración de SiH .
2925	m	C-H Estiramiento (stretching) del hidrógeno en aldeído .
3350	f	O-H Unido en asociación polimérica, estiramiento (stretching) del hidrógeno no unido intermolecularmente .

d: débil ; m: media y f: fuerte .





ESPECTRO No. I



DISCUSION DE RESULTADOS DEL ESPECTRO No. I .

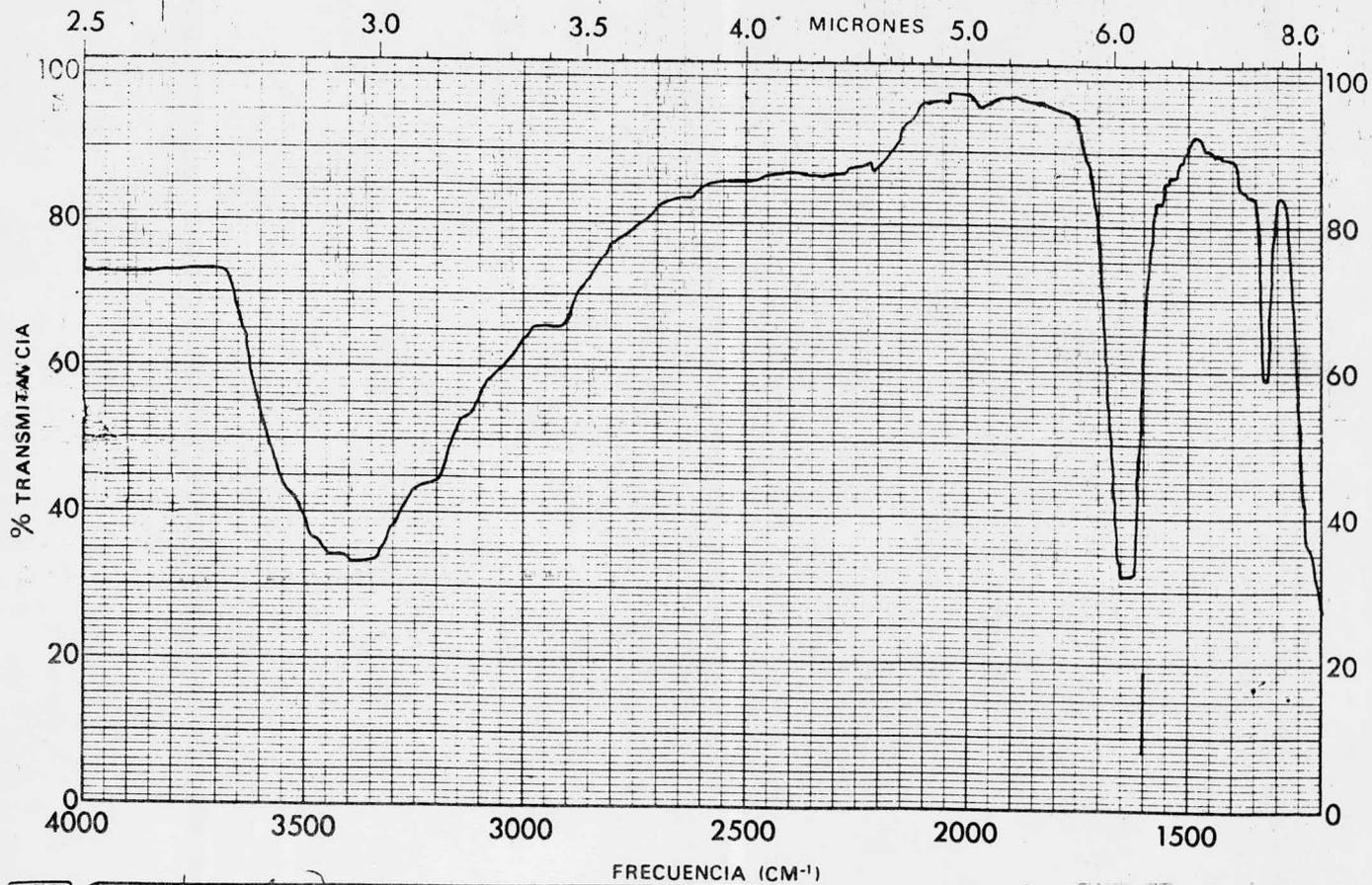
Se aprecian absorciones de intensidad débil a 600, 820, 875, 1140, 1330, 1450, 1485 y 2050 cm^{-1} ; de intensidad media a 940, 1650 y 2925 cm^{-1} y de intensidad fuerte a 1030 y 3350 cm^{-1} .

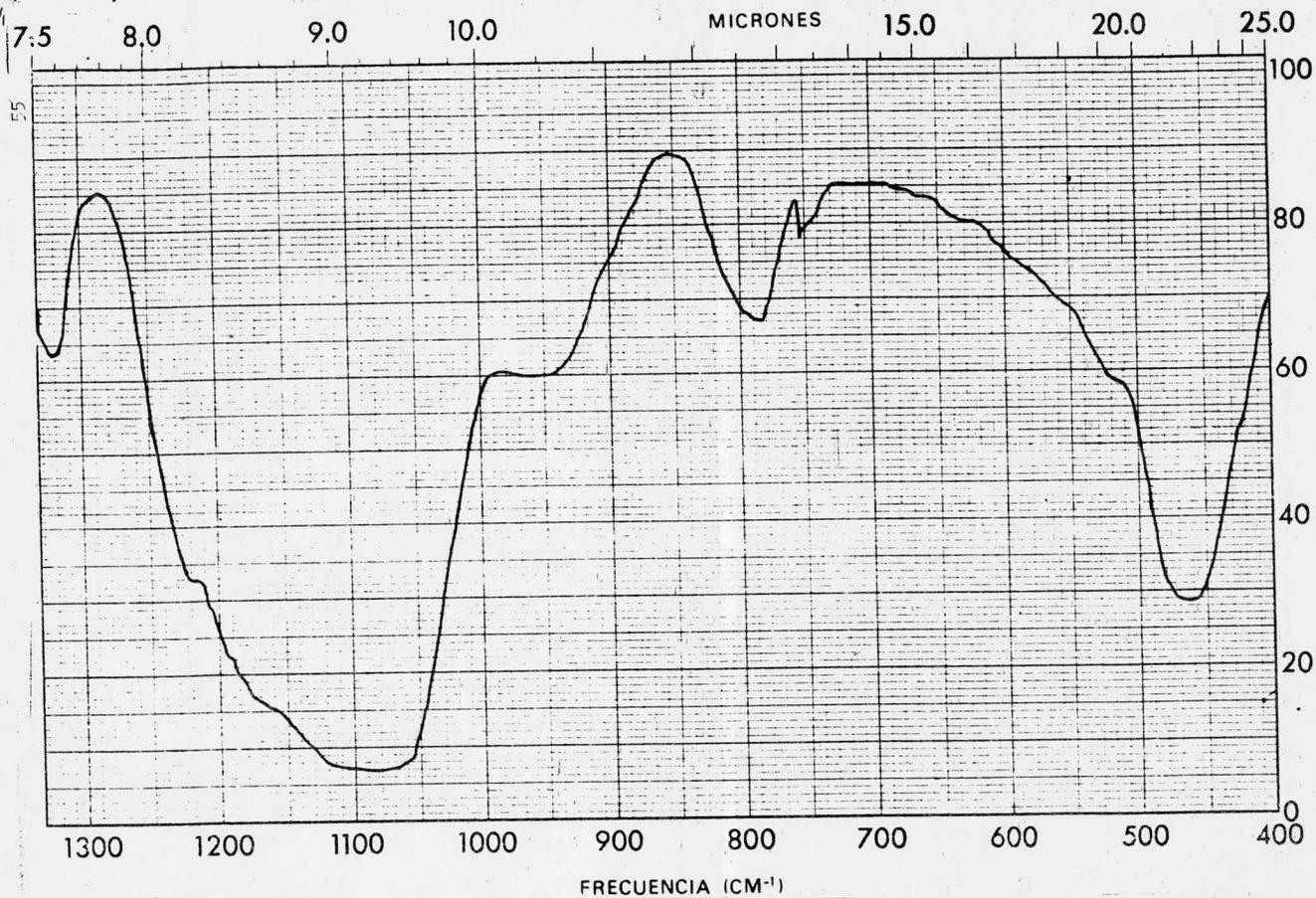
Todas las absorciones se presentan debido a vibraciones de sustituyentes o -- grupos funcionales presentes en la molécula de inulina de formula $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, - excepto una absorción débil a 2050 cm^{-1} que se reporta en la literatura como - originada en esa región por compuestos con triple ligadura y puede deberse a.- alguna impureza en la muestra, solvente o ser definitivamente característica - de inulina .

FRUCTOSANA . METODO DE OBTENCION CON LECHADA DE CAL . ESPECTRO No. II

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
465	m	<p>⊖ Vibración de aromáticos mono y disustituidos orto-meta .</p> <p>SO₄⁻ Vibración del enlace oxígeno-azufre en el sulfato iónico .</p>
750	d	⊖ Vibración de un anillo de piranosa. C-H Deformación(bending) tipo sacudida del hidrógeno .
785	d	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{C} \end{array}$ Deformación(bending) del hidrógeno del carbono adyacente al oxígeno de una furanosa .
1080	f	Característica de inulina .
1320	d	Característica de inulina .
1630	f	Absorción de agua líquida y característica de inulina de intensidad media .
3400	f	Característica de inulina .

d ; débil ; m ; media y f ; fuerte .





ESPECTRO No. II .

DISCUSION DE RESULTADOS .

En este espectro se observa la ausencia de absorciones típicas en inulina a 600, -- 820, 875, 940, 1140, 1450, 1485, 2050 y 2925 cm^{-1} ; encontrándose una absorción de in intensidad media a 465 cm^{-1} dada por vibración de aromáticos sustituidos y sulfato iónico. Se observan además dos absorciones de intensidad débil a 755 y 785 cm^{-1} atribuibles a vibración de un anillo de piranosa y deformación de hidrógeno del carbono adyacente a un oxígeno de furanosa . En 1080 cm^{-1} se localiza una absorción de inten sidad fuerte más redondeada que para la característica de inulina, en 1320 cm^{-1} se observa una absorción debil y aguda que en inulina es débil y no aguda .

A 1630 cm^{-1} debido al estiramiento de la doble ligadura de l grupo carbonilo se apre cia una absorción fuerte aunada a que también aquí absorbe el agua líquida . Característica absorción a 3400 cm^{-1} se aprecia pero de menor intensidad en relación al espectro estandard de inulina .

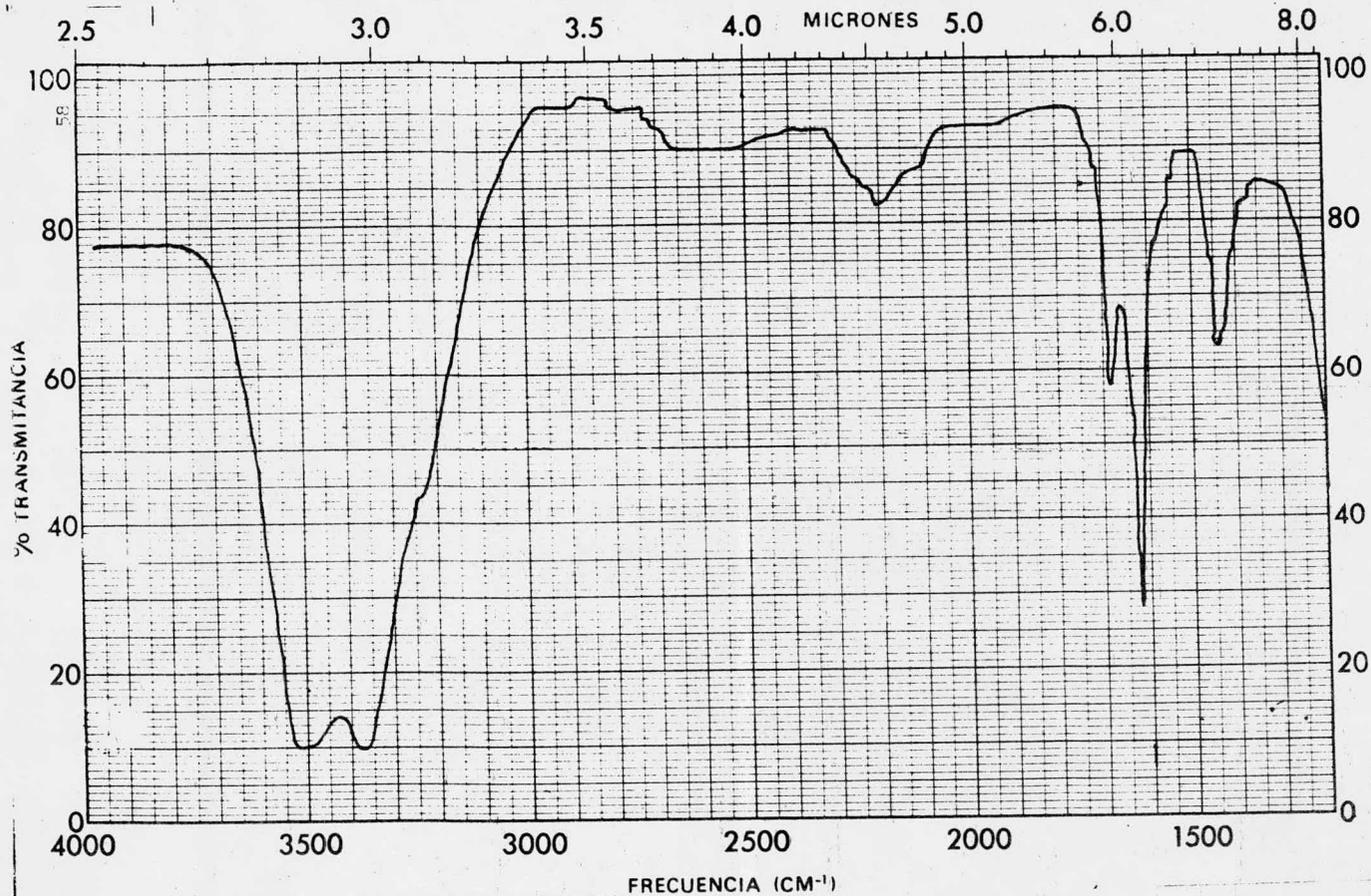
En base a estos resultados podemos deducir que este espectro corresponde a una muestra que contiene humedad e impurezas, productos de degradación de fructosanas, oligo sacaridos y fructosanas de alto peso molecular en baja proporción .

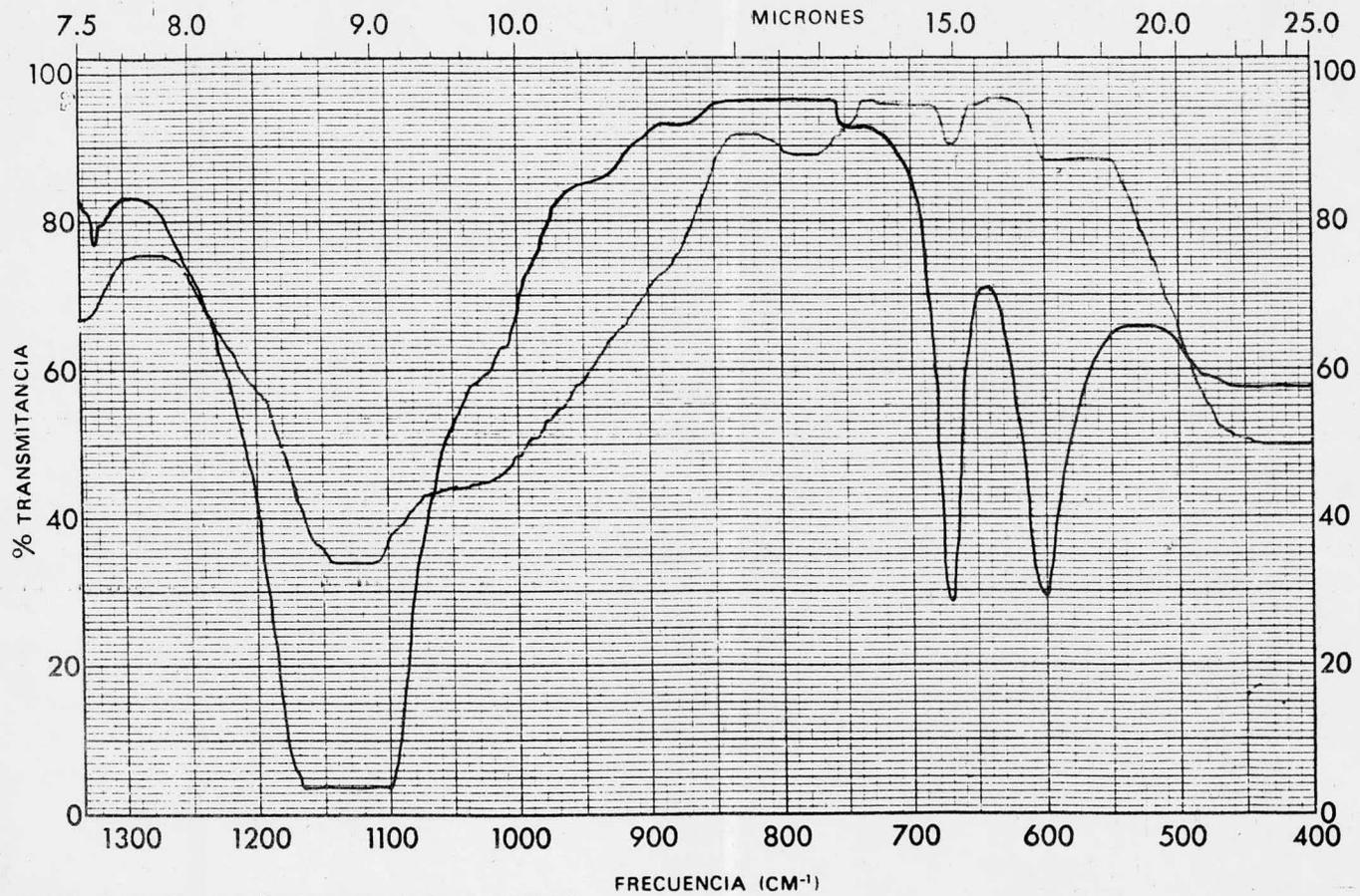
ESPECTRO No. III.

FRUCTOSANA . METODO DE OBTENCION CON LECHADA DE CAL .

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
600	m	C-H Deformación(bending) tipo sacudida del hidrógeno. Absorción débil característica de inulina .
670	m	C-H Deformación(bending) tipo sacudida del hidrógeno en compuestos aromáticos y alquenos .
1130	f	Característica de inulina .
1440	d	Característica de inulina .
1620	m	Característica de inulina y H ₂ O líquida.
1680	d	C=O Estiramiento(stretching) en cetonas cíclicas de 6 miembros o más .
1720	d	C=O Estiramiento(stretching) en cetonas α - β insaturadas de anillo de 5 miembros .
2200	d	C \equiv X Estiramiento(stretching) de triple ligadura en alquinos, isocianuro y nitrilo . Vibración del SiH .
3395	f	O-H Asoc. polimérica, estiramiento(stretching) del hidrógeno unido intermolecularmente. Característica de inulina .
3485	f	O-H Asoc. simple, estiramiento(stretching) del hidrógeno unido intermolecularmente.

d : débil ; m ; media y f ; fuerte .





DISCUSION RESULTADOS

En la primera corrida de 400 a 1335 cm^{-1} se observan dos líneas de absorción la más débil fue obtenida con la muestra muy diluida por lo que se hizo necesario **adicionar** más muestra para obtener la resolución deseada dada por la segunda línea de absorción . A 600 cm^{-1} se presenta una absorción de intensidad media aguda presente en inulina pero de intensidad débil , otra absorción de intensidad media aguda a 670 cm^{-1} no presente en inulina se aprecia debido a deformación - C-H del hidrógeno en compuestos aromáticos y alquenos .

Se observa la ausencia de absorciones presentes en inulina a 820, 875, 940 y 1030 cm^{-1} . Las absorciones correspondientes a 1030 y 1140 cm^{-1} características de inulina en éste espectro se encuentran desplazadas a una sola absorción de intensidad fuerte a 1130 cm^{-1} y menos aguda que para inulina . A 1440 cm^{-1} absorción de intensidad débil aguda se observa siendo no aguda para inulina , no se presentan absorciones típicas de ésta en 1485, 2050 y 2925 cm^{-1} . Absorciones debidas a agua líquida y estiramiento de C=O en cetonas a 1620, 1680 y 1720 cm^{-1} se observan . A 2200 cm^{-1} se aprecia una absorción débil que se presenta en compuestos con triple ligadura y SiH .

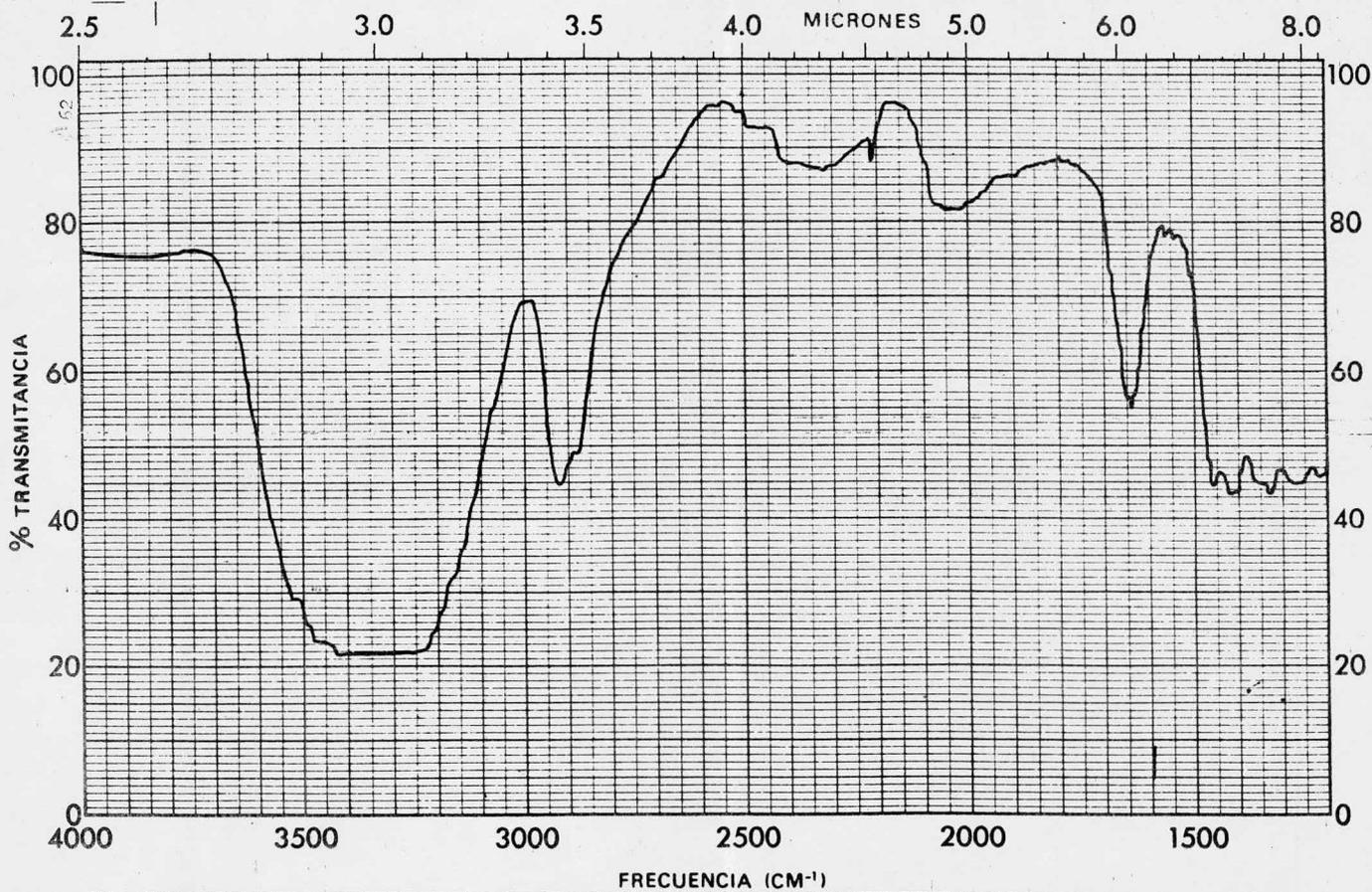
La absorción redondeada fuerte a 3350 cm^{-1} característica en inulina se aprecia en este espectro en una absorción con dos picos redondeados de intensidad fuerte lo que denota la presencia de O-H asociación polimérica y simple .

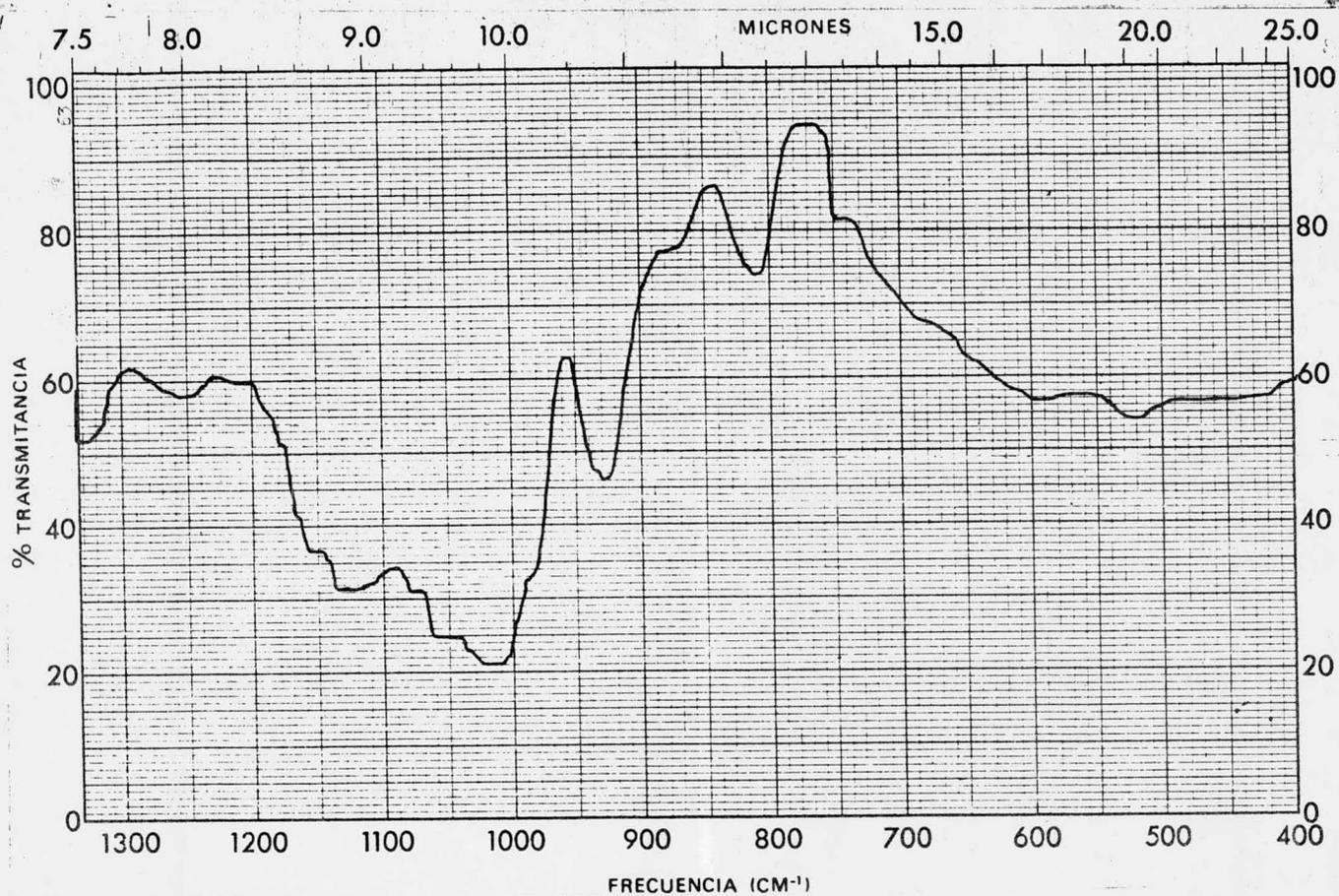
En base a estos resultados podemos inferir que la muestra se encontraba un poco húmeda, que contiene posiblemente compuestos de degradación alcalina de fructosanas y monosacáridos, presencia de oligosacáridos y di y monosacáridos así como fructosanas de alto grado de polimerización del tipo de inulina .

FRUCTOSANA . METODO DE OBTENCION CON ETANOL . ESPECTRO No. IV .

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
520	d	-CH ₂ -O-CH ₂ - Estiramiento(stretching) del enlace carbono-oxígeno .
810	d	Característica de inulina .
930	m	Característica de inulina .
1015	f	Característica de inulina .
1130	d	Característica de inulina .
1325	d	Característica de inulina .
1420	d	O-H Primario, deformación(bending) del hidrógeno .
1460	d	Característica de inulina .
1640	m	Característica de inulina .
2050	d	Característica de inulina .
2320	d	-C≡N Estiramiento(stretching) de triple enlace en nitrilo .
2920	m	Característica de inulina .
3350	f	Característica de inulina .

d: débil ; m: media y f: fuerte .





DISCUSION RESULTADOS .

Se aprecia una absorción muy débil a 520 cm^{-1} que se asocia al estiramiento del enlace C-O en los éteres . Absorción a 810 cm^{-1} de intensidad débil y a 930 cm^{-1} de intensidad media presentes también en inulina se observan, las absorciones típicas de ésta a 1030 y 1140 cm^{-1} se aprecian a 1015 y 1130 cm^{-1} con un poco menos de intensidad y más redondeadas .

Se observa a 1420 cm^{-1} una débil absorción debida a deformación del hidrógeno en O-H primario, las características absorciones a $1330, 1450, 1650, 2050, 2925$ y 3350 cm^{-1} de inulina se aprecian en este espectro a $1325, 1420, 1460, 1640, 2050, 2920$ y 3350 siendo ésta última menos redondeada que la del estandar .

Una absorción a 2320 cm^{-1} que compuestos con triple ligadura como nitrilo originan se observa también .

En esta muestra se aprecia que contiene fructosanas de alto grado de polimerización del tipo inulina por las absorciones que presenta tan similares a ésta y una baja proporción de compuestos de bajo grado de polimerización o impurezas .

FRUCTOSANA . METODO DE OBTENCION CON ETANOL . ESPECTRO No. V .

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
810	d	Característica de inulina .
930	d	Característica de inulina .
1020	f	Característica de inulina .
1130	d	Característica de inulina .
1400	d	Característica de inulina .
1640	m	Característica de inulina .
2900	m	Característica de inulina .
3350	f	Característica de inulina .

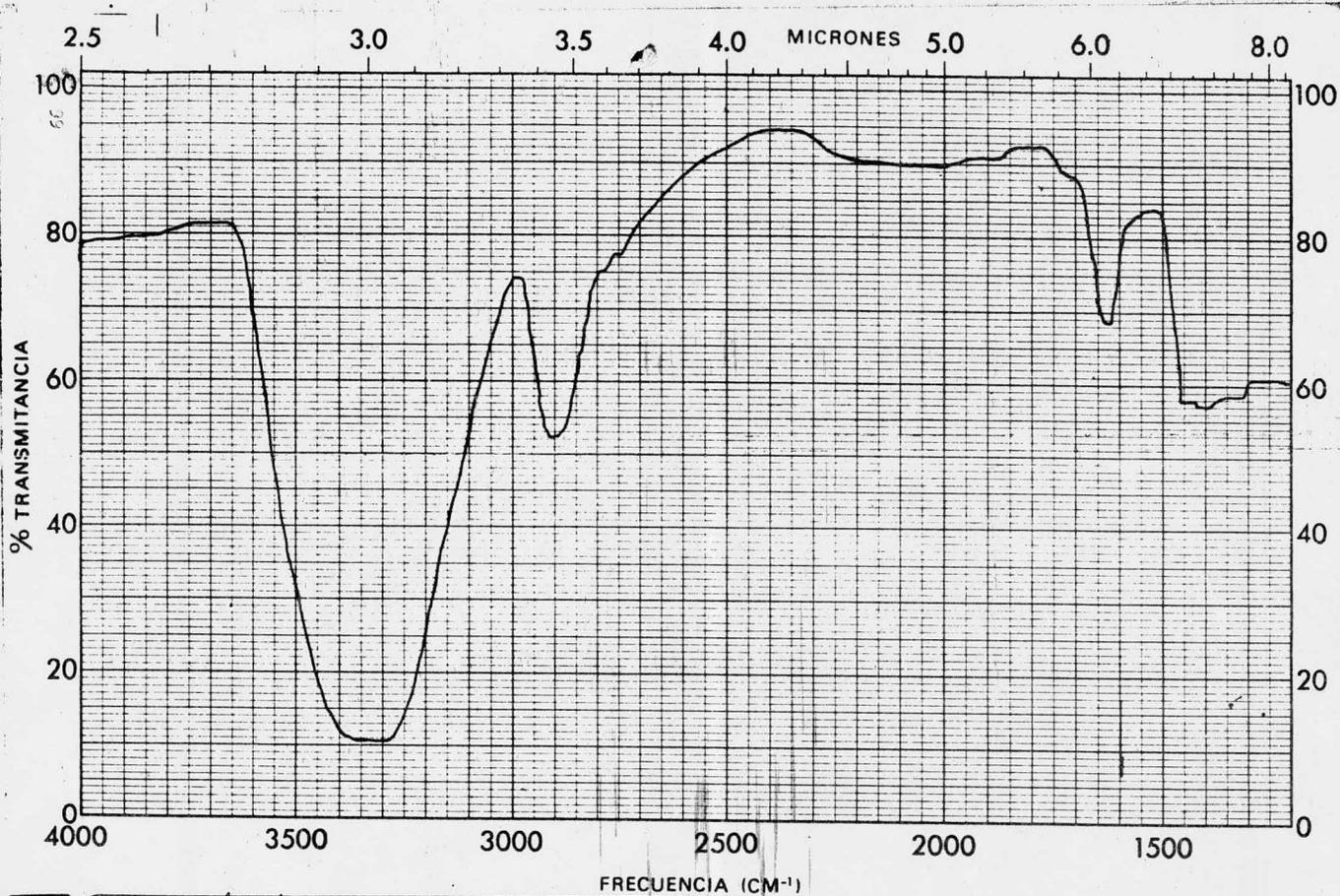
d : débil ; m : media y f : fuerte .

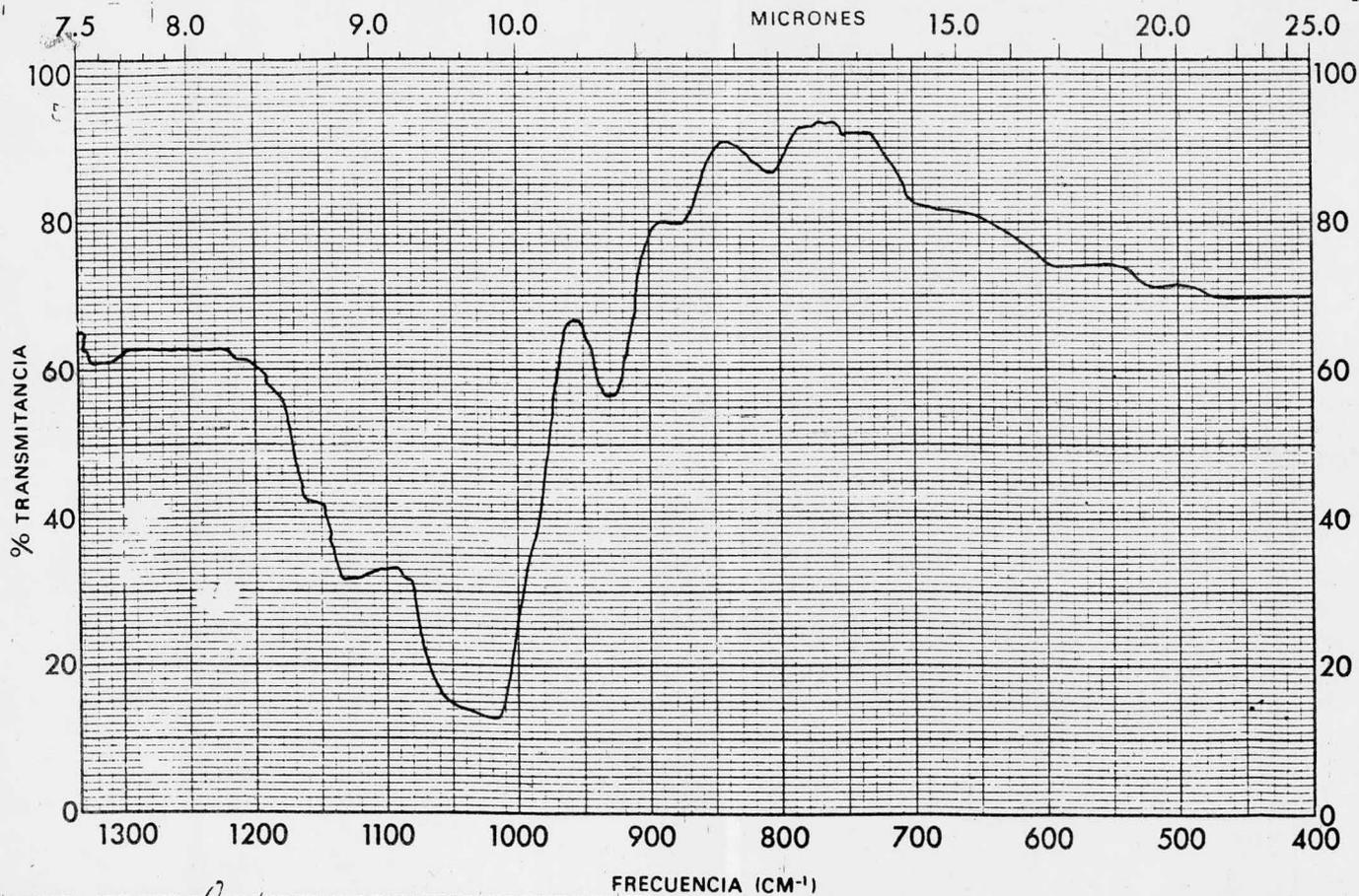
DISCUSION RESULTADOS ESPECTRO No. V .

Este espectro presenta todas sus absorciones como características de inulina - siendo estas a 810, 930, 1020, 1130, 1400, 1640, 2900 y 3350 cm⁻¹ y en el estandar a 820, 940, 1030, 1140, 1450, 1650, 2925 y 3350 cm⁻¹ .

No se observan absorciones a 600, 875, 1330, 1485 y 2050 cm⁻¹ presentes en inulina .

La intensidad de las absorciones en todos los casos es muy similar a el espectro de inulina y podemos deducir en base a los datos obtenidos que éste espectro corresponde a fructosanas de alto grado de polimerización del tipo inulina y que compuestos disimilares a fructosanas no son presentes o se encuentran en muy pequeña concentración .



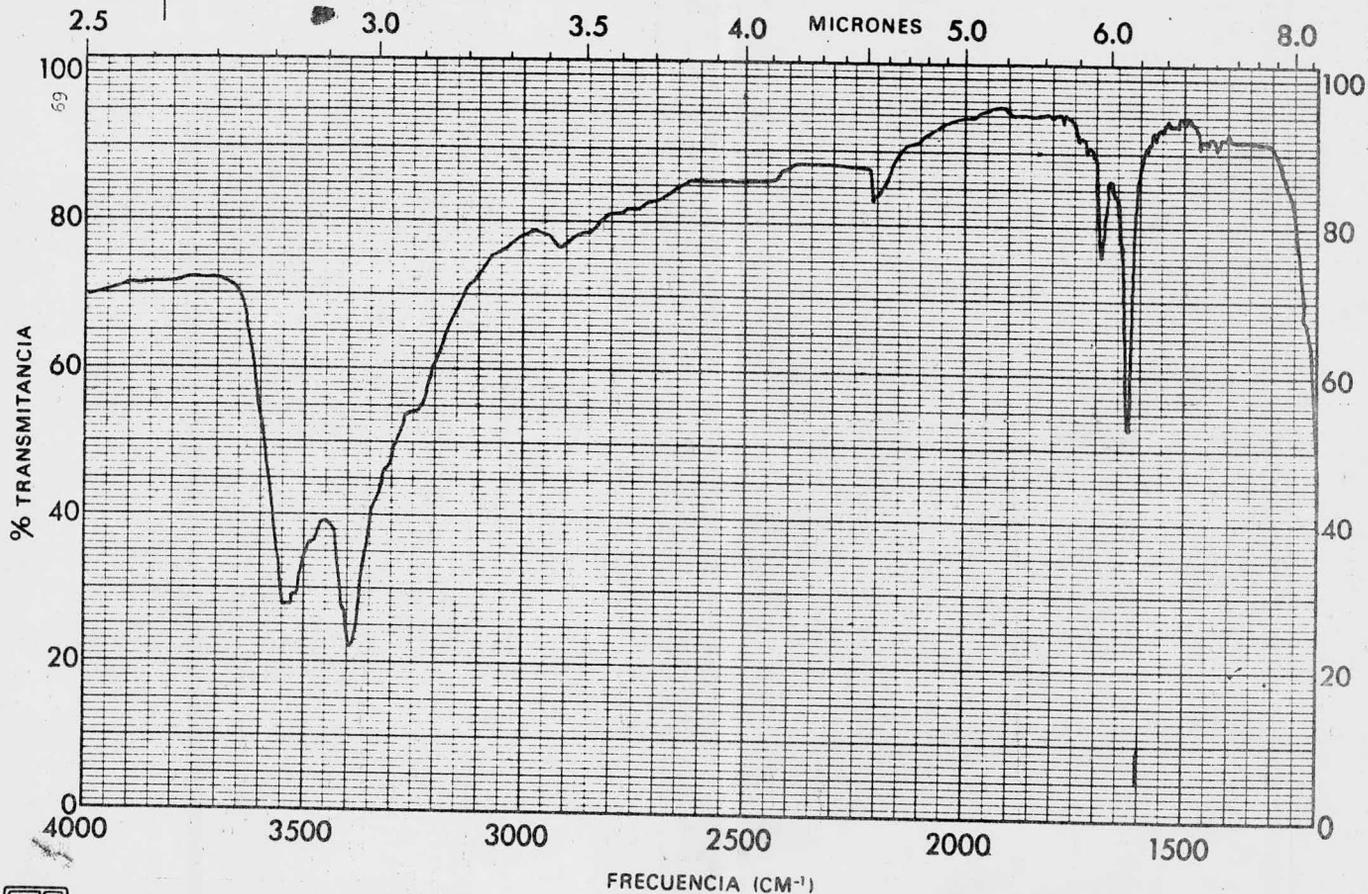


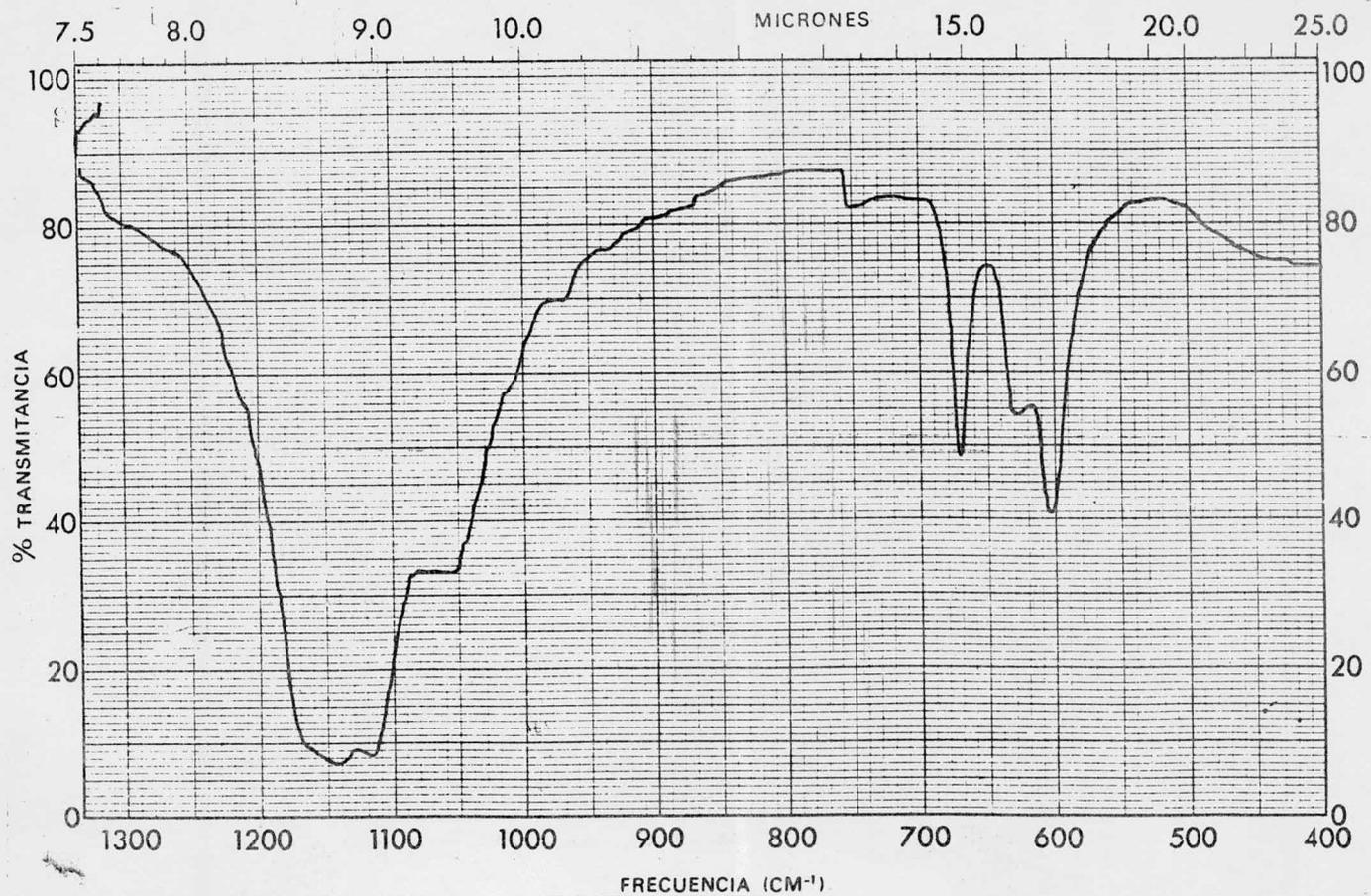
ESPECTRO No. VI.

FRUCTOSANA . METODO DE OBTENCION CON ACIDO ACETICO .

No. de onda cm ⁻¹	Intensidad de absorción	Grupo funcional y tipo de vibración
605	m	C-H Deformación(bending) tipo sacudida del hidrógeno . Absorción débil característica de inulina .
670	d	C-H Deformación(bending) tipo sacudida asociada a aromáticos sustituidos y alquenos.
1140	f	Característica de inulina .
1625	d	C=O Estiramiento(stretching) en β -dicetona (enólica) y vibración de H ₂ O líquida.
1680	d	C=O Estiramiento(stretching) en cetonas cíclicas de 6 miembros o más .
2200	d	C \equiv X Estiramiento de triple ligadura en alquinos e isocianuro .
2900	d	Característica de inulina .
3400	m	O-H Asoc. polimérica, estiramiento(stretching) del hidrógeno unido intermolecularmente . Absorción fuerte característica de inulina .
3540	m	O-H Asoc. simple, estiramiento(stretching) del hidrógeno unido intermolecularmente.

d ; débil ; m ; media y f ; fuerte .





DISCUSION DE RESULTADOS .

Una absorción de intensidad media se presenta a 605 cm^{-1} siendo de intensidad débil en inulina. Se observa la presencia de una absorción débil a 670 cm^{-1} que se asocia con compuestos aromáticos y alquenos, absorciones débiles a 820 y 875 cm^{-1} y media a 940 cm^{-1} presentes en inulina no se observan . La absorción fuerte debida a deformación del O-H y estiramiento del enlace C=O se presenta a 1140 cm^{-1} desplazandose en relación a inulina .

No se presentan absorciones a 1330, 1450, 1485 y 2050 cm^{-1} propias de inulina, se observan absorciones a 1625 y 1680 propias del grupo carbonilo, una absorción débil a 2200 cm^{-1} asociada con vibraciones de triple ligadura se presenta. A 2900 cm^{-1} la absorción de estiramiento de hidrógeno se encuentra desplazada e en relación a inulina .

La absorción fuerte característica a 3350 cm^{-1} en inulina dada por O-H asociación polimérica, en esta muestra se observan dos picos a 3400 y 3540 cm^{-1} de intensidad media denotando la presencia de O-H asociación simple y polimérica .

Dados estos resultados podemos inferir que tenemos en la muestra oligosacáridos, trisacaridos y posiblemente di y mono sacáridos y en baja proporción fructosanas de alto grado de polimerización como es inulina, ya que sus absorciones características o no se presentan o se encuentran desplazadas .

VII.- Determinación de la curva estándar de fructosa con p-anisidina .

Se determinaron las siguientes lecturas de absorbancia contra concentración según se observa en la tabla 20 :

TABLA 20 .

Fructosa mg/ml	Absorbancia (450 nm)	
	I	II
0.04	0.080	
0.05	0.106	0.126
0.06	0.125	
0.10	0.208	0.250
0.13	0.265	
0.20	0.395	0.540

I ; observada .

II ; citada por (Hessler E.L., 1959) .

Para concentraciones arriba de 0.2 mg/ml de fructosa los valores de absorbancia se apartan de la curva estándar y por lo tanto de la Ley de Lambert y Beer, por lo cual valores arriba de 0.2 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ son considerados no confiables por caer fuera de la curva (Figura 19) .

La absorbancia o densidad óptica se define por :

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, e I , la intensidad de la luz transmitida. El valor de la absorbancia comúnmente es registrado de 0 a 2.0 . El cálculo de la intensidad de una banda de absorción implica la aplicación de las leyes de Lambert y Beer . La ley de Lambert afirma que la intensidad de la luz transmitida a través de un medio homogéneo disminuye geométricamente a medida que el espesor de la muestra aumenta aritméticamente. La ley de Beer afirma que cada molécula de soluto absorbe la misma fracción de luz incidente, independientemente de la concen

tracción, en un medio no absorbente. Esta ley no se refiere a todo tipo de soluciones, sino a soluciones diluidas y por lo tanto las desviaciones son mínimas.

Estas leyes pueden formularse mediante la siguiente relación :

$$\mathcal{E} = \frac{A}{c \cdot l}$$

donde \mathcal{E} es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración molar y l es el espesor en centímetros. Los resultados experimentales se entregan en términos de coeficiente de extinción molar \mathcal{E} o de su logaritmo, $\log \mathcal{E}$. Cuando el peso molecular de la sustancia es desconocido la intensidad de absorción se expresa convenientemente con el valor $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ó $A_{1\text{cm}}^{1\%}$, o sea la absorbancia de una solución al 1% de la sustancia en una celda de 1 cm. Este valor se relaciona fácilmente con el coeficiente de extinción molar, mediante la expresión :

$$10 = E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{peso molecular}$$

La reacción para ésta determinación se basa en la reactividad del grupo amino de la p-anisidina con el grupo carbonilo de la fructosa, en presencia de aldohexosas como, glucosa, la interferencia es mínima y el coeficiente de variación de la determinación es de 2.67%. La reacción se plantea como sigue:

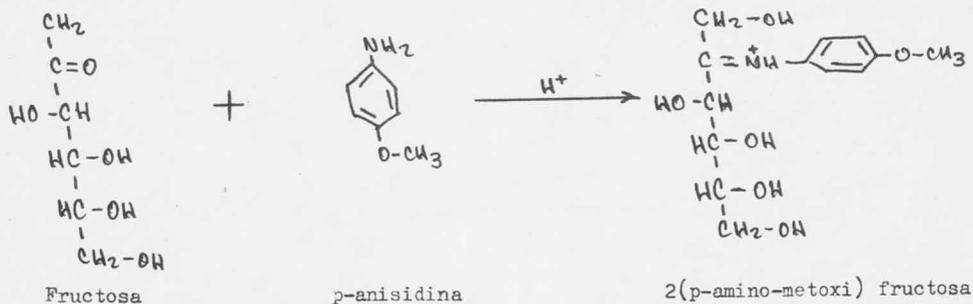
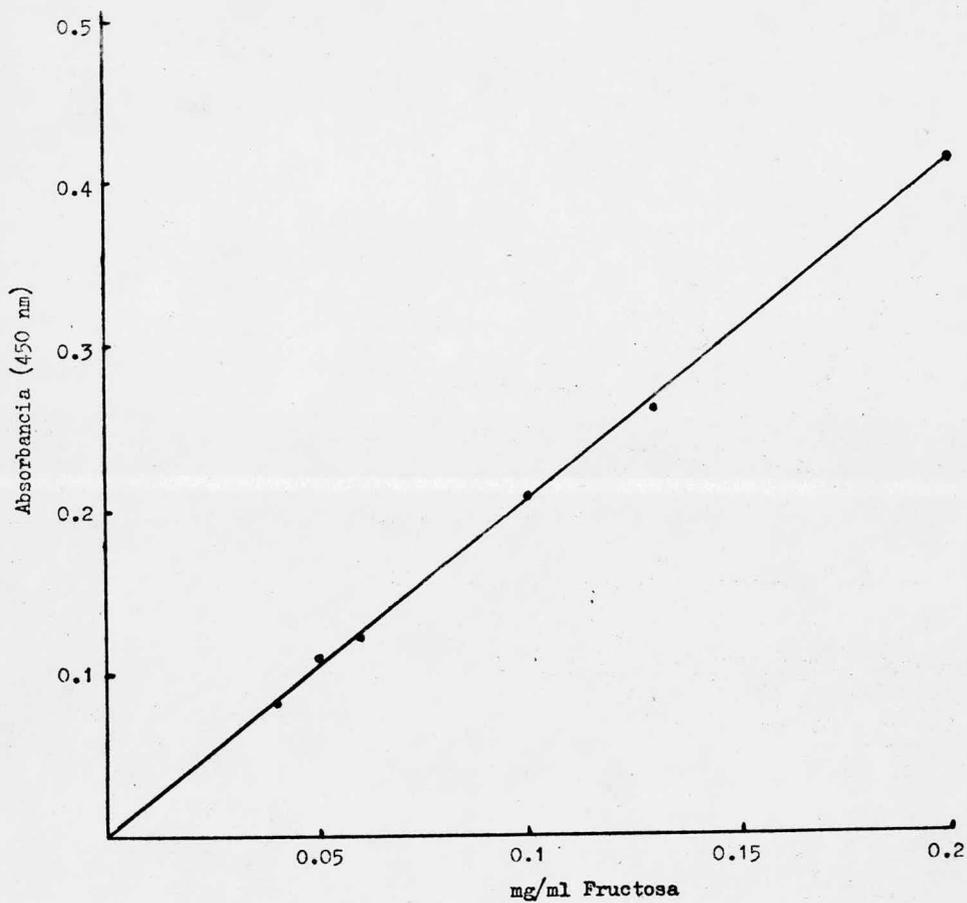


Figura 19 .

Curva estandard de fructosa con p-anisidina .



CONCLUSIONES .

- 1.- El tamaño de partícula, temperatura y tiempo de maceración influyen en la extracción de carbohidratos y fructosanas solubles de Agave tequilana azul .
Con un tamaño de partícula grande y sin maceración el porcentaje de extracción es muy bajo. Los óptimos de temperatura y tiempo son de 60-70°C y 15 minutos. Utilizando una presión de 1406 kg/cm² para la extracción, el porcentaje de ésta vario de 62 a 68.5 % .
- 2.- En todas las muestras de jugo de agave crudo obtenidas se encontró por medio de determinación cualitativa, la presencia de fructosa libre . Esto puede atribuirse a que durante la maceración los oligosacáridos o fructosanas se desdoblaron en tal medida que dan lugar a fructosa o sus residuos reductores .
- 3.- De los métodos utilizados para la obtención de fructosanas se observó que el mayor rendimiento correspondió al de lechada de cal (0.46%), etanol (0.42%) y ácido acético (0.15%) respectivamente. Si no se lleva a cabo una descongelación lenta en el método con lechada de cal la precipitación de fructosanas es aún menor, similar situación se observa en el método con etanol si la concentración de la muestra y etanol no son las adecuadas. Debido a la lenta precipitación que se lleva a cabo con ácido acético de las fructosanas, es necesario dejar reposar por espacio de 12 horas o más .
En general los rendimientos obtenidos son muy bajos y se atribuye esto a que las fructosanas son muy lábiles y desde la extracción tenemos desdoblamiento a fracciones de oligosacáridos o azúcares menores solubles que aumentan bajo las condiciones de temperatura, pH, acidez y tiempo utilizados en la obtención de fructosanas, por lo cual al final de ésta la fracción correspondiente a polisacáridos insolubles es baja y se refleja en los rendimientos respectivos .
- 4.- Los análisis de infrarrojo nos arrojan que fructosanas del tipo de inulina estén presentes en el tronco principal de Agave tequilana azul y que además se encuentran también fracciones de oligosacáridos formando parte de su composición .

La fructosana más similar a inulina correspondió a la obtenida por precipitación con etanol al 90% (Espectro No. V) que tuvo todas sus absorciones características. Las fructosanas más disímiles correspondieron a las obtenidas con lechada de cal (Espectros No. II y III) y con ácido acético glacial (Espectro No. VI), atribuible esto a la presencia de fracciones de oligosacáridos e impurezas en las muestras .

5.- La hidrólisis ácida de las fructosanas y oligosacáridos de Agave tequilana azul es completa a los 45 minutos con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico e incompleta con ácido oxálico a un pH de 3 y temperatura de 70-80°C .

Se observó que en los primeros veinte minutos de la hidrólisis con ácido sulfúrico y clorhídrico la velocidad de ésta es mayor que en los 25 minutos restantes, debido a la disminución en la concentración del ácido y fructosanas y al aumento de fructosa y glucosa libres .

De los datos obtenidos de las hidrólisis se concluye que la relación existente entre fructosa y glucosa en las fructosanas de Agave tequilana es de por cada 88 moles de fructosa se nos generan 5 moles de glucosa .

6.- En la determinación de fructosa con p-anisidina el rango de confiabilidad del método queda comprendido de 0 a 0.2 mg/ml de fructosa por muestra, a concentraciones mayores no es aplicable .

7.- Fructosa se observó ser el principal azúcar producido de la hidrólisis de fructosanas (Inulina) de Agave tequilana azul. Este azúcar posee propiedades físicas y químicas que lo hacen satisfactorio para diversos usos, por lo cual se hace necesario efectuar posteriores investigaciones sobre su uso, aplicación y producción a nivel industrial .

BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Association on Official Analytical Chemists. Methods of analysis .
12 Edition . Washington D.C. (1975) .
- 2.- Arrazola Domínguez Flor del Monte . Estudio del contenido de azúcares en la pifia del Agave tequilana .
Tesis . Universidad Autónoma de Puebla , (1969) .
- 3.- Aspinall G. O. . Polysaccharides .
Pergamonn Press . Oxford , Great Britain , (1970) .
- 4.- Bacon J. S. D. and Edelman J. . The carbohydrate of the Jerusalem artichoke and other compositae .
Biochemical Journal . Vol. 48 . 114-125, (1951) .
- 5.- Barker S. A. and Stephens R. . Infra-red spectra of carbohydrates . Parte IV .
Characterisation of furanose derivatives .
J. Chem. Soc. , 4550-4555 , (1954) .
- 6.- Bell D.J. and Anne Palmer . Structural studies on Inulin from Inula helenium and on Levans from Dactylis glomerata and Lolium italicum .
J. Chem. Soc. . 3763-3770 , (1952) .
- 7.- Bemiller J. N. . Acid catalized hydrolysis of glycosides .
Adv. Carb. Chem . . Vol 22 . 85-91 , (1967) .
- 8.- Bemiller J. N., Steinheimer T. R. and Allen E. E. Jr. . Alkaline degradation of Inulin and its structural implications .
J. of The Amer. Assoc. of Clin. Chem . . Vol. 13, No. 4. (1967) .
- 9.- Bhatia I. S. , Satyanarayama S. and Srinivasan M. . Transfructosidase from Agave veracruz Mill .
Biochemical Journal . Vol. 66 . 171-174 , (1955) .

- 10.- Bhatia I. S. , Mann S. K. and Rangji Singh . Biochemical changes in the water - soluble carbohydrates during the development of Chicory roots .
J. Science Food Agricultural . Vol. 25 . 535-539 , (1974) .
- 11.- Clifford J. Creswell, Olaf Runquist and Malcolm M. Campbell . Spectral analysis of organic compounds .
Burgess Publishing Co. . Second edition . Minneapolis, (1972) .
- 12.- De Bruyne C. K. and Wouters Leysen J. . The influence of acids on the hydrolysis of glupyranosides .
Carbohydrates Research . Vol. 17 . 45-46 , (1971) .
- 13.- Doty E. Theodore and Esko Vanninen . Crystalline fructose: use as food ingredient expected to increase .
Food Technology . November . 34-38 , (1975) .
- 14.- Dutton G. G. S. . Hydrolysis of polysaccharides .
Adv. Carbohyd. Chem. and Biochem. . Vol 28 . 14-23 , (1973) .
- 15.- Dyer J. R. . Aplicación de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos .
Prentice-Hall International . Madrid , (1973) .
- 16.- Edelman J. and Dickerson A. G. . The metabolism of fructose polymers in plants.
Biochemical Journal . Vol. 98 . 787-794 , (1966) .
- 17.- Feingold E. and Avigad I. . Isolation of sucrose and other related oligosaccharides from partial acid hydrolysis of inulin .
Biochim et Biophys . Vol. 22 . 196-197 , (1956) .
- 18.- French Dexter and Gene M. Wild . Correlation of carbohydrate structure with mobility in papergram .
J. Amer. Chem. Soc. . Vol. 75 . 2612-2616 , (1953) .
- 19.- Golovin P. V. and Gerasimenko A. A. . Hydrolysis of inulin with mineral acids .
Chemical Abstracts . Vol. 52 . 1659-1660 , (1958) .
- 20.- Green W. Jhon . Acid hydrolysis of glycofuranosides .
Adv. Carbohyd. Chem. . Vol. 21 . 129-131 , (1966) .

- 21.- Hessler E. Lyle . Sensitive colorimetric method for determination of fructose.
Analytical Chemistry . 1234-1236 , (1959) .
- 22.- Hirst E. L. , McGilvray D. I. and Percival E. G. V. . Studies on fructosans .
Inulin from Dahlia tubers .
J. Chem. Soc. . 1297-1302 , (1950) .
- 23.- Hollo J. , Szejtli J. , Toth M. and Kun A. . Acidic hydrolysis of glycosidic
bonds . Hydrolysis of inulin .
Chemical Abstracts . Vol. 61 . 9657-9658 , (1964) .
- 24.- Kenner S, and Richards R. . The degradation of carbohydrates by alkali .
J. Chem. Soc. . 1784-1789 , (1954) .
- 25.- Lewis B. A. . The constitution of the fructan produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain C .
Carbohydrate Research . Vol. 5 . 194-201 , (1967) .
- 26.- Marino Flores Leonor . Obtención de la fructosa del maguey tequilero .
Tesis . Instituto Politécnico Nacional . Esc. Nal. Cien. Biol. , (1961).
- 27.- Mc Donald Emma . The polyfructosans and difructose anhydrides .
Advan. Carbohyd. Chem . . Vol 2 . 254-256 , (1946) .
- 28.- Morrison R. T. and Boyd R. N. . Organic Chemistry .
Allyn and Bacon . Third edition . Boston , (1974) .
- 29.- Newth F. H. . The formation of furan compounds from hexoses
Advan. Carbohyd. Chem . . Vol. 6 . 84-95 , (1951) .
- 30.- Pawan G. L. S. . Fructose .
Conference . The Middlesex Hospital Medical School.
London, England , (1972) .
- 31.- Perez Peña Francisco . Identificación de carbohidratos del jugo de diferentes
agaves por cromatografía en papel .
Tesis . Instituto Politécnico Nacional. Esc. Nal. Cien. Biol. , (1953) .



- 32.- Rakoff H. and Rose N.C. . Organic Chemistry .
The Macmillan Company . USA , (1966) .
- 33.- Rutherford P. P. and Deacon A. C. . The mode the action of Dandelion roots --
 β - fructofuranosidases on inulin .
Biochemical Journal . Vol. 129 . 511-512 , (1972) .
- 34.- Rutherford P. P. and Weston E. W. . Carbohydrate changes during cold storage
of some inuling-containing roots and tubers .
Phytochemistry . Vol. 7 . 175-180 , (1968) .
- 35.- Ryoichi Senju and Motohiro Shimizu . Hydrolysis of inulin with 0.1 N oxalic --
acid .
Chemical Abstracts . Vol. 47 . 7872-7873 , (1953) .
- 36.- Sánchez Marroquin Alfredo and Hope H. P. . Agave juice, fermentation and chemical
composition . Studies of some species .
Agricultural and Food Chemistry . Vol. 1 . 246-249 , (1953) .
- 37.- Shahidullah M. and Khorasani S. S. . The sensitivity and selectivity of the
Seliwanoff test for fructose .
Analytica Chimica Acta . Vol. 61 . 317-319 , (1972) .
- 38.- Snyder H. E. and Phaff H. J. . The pattern of action of inulinase from ---
Saccharomyces fragilis on inulin .
J. of Biological Chemistry . Vol. 237 . 2438-2441 , (1962) .
- 39.- Srinivasan M. and Bhatia I. S. . The carbohydrates of Agave veracruz mill , (1).
Biochemical Journal . Vol. 55 . 286-289 , (1953) .
- 40.- Srinivasan M. and Bhatia I. S. . The carbohydrates of Agave veracruz mill , (2).
Biochemical Journal . Vol. 56 . 256-259 , (1953) .
- 41.- Verstraeten L. M. J. . D-fructose and its derivatives .
Adv. Carbohyd. Chem . Vol . 22 . 230-249 , (1967) .

3,4

