



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“APROVECHAMIENTO INTEGRAL DEL AGAVE MEDIANTE ENZIMAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y FRUCTOSA”**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

DANIELA LIZETH MORENO SOLIS



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Arturo Navarro Ocaña
VOCAL: Dra. Gloria Díaz Ruíz
SECRETARIO: Dra. Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE: Dr. Francisco Ruíz Terán
2º SUPLENTE: Dr. Oscar Hernández Meléndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314. EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

DR. CARMINA MONTIEL PACHECO

SUSTENTANTE:

DANIELA LIZETH MORENO SOLIS

INDICE

I. INDICE DE FIGURAS	iii
II. INDICE DE TABLAS	v
III. ABREVIATURAS	vi
IV. RESUMEN	viii
OBJETIVO GENERAL	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1
JUSTIFICACIÓN	1
CAPÍTULO 1. EL AGAVE	2
1.1 ¿QUÉ ES EL AGAVE?.....	2
1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	2
1.3 METABOLISMO	5
1.4 TAXONOMÍA Y COMPOSICIÓN	7
1.5 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA.....	7
1.6 PRINCIPALES USOS DEL AGAVE	9
1.7 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL TEQUILA, MEZCAL, PULQUE Y BACANORA.....	10
1.8 APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL AGAVE	12
CAPÍTULO 2. FRUCTANOS.	17
2.1 ¿QUÉ SON LOS FRUCTANOS?	17
2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS FRUCTANOS	18
2.3 PRODUCCIÓN DE LOS FRUCTANOS EN PLANTAS Y MICROORGANISMOS	24
2.4 EXTRACCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS FRUCTANOS	27
CAPÍTULO 3. INULINA.	30
3.1 ¿QUÉ ES LA INULINA?	30
3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA INULINA.....	33
3.3 OBTENCIÓN DE LA INULINA.....	34

3. 4 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA INULINA	34
CAPÍTULO 4. ENZIMAS.....	36
4.1 HIDRÓLISIS DE LA INULINA	36
4.2 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN INULINASAS	43
4.2.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	46
4.3 PURIFICACIÓN DE LA INULINASA	52
4.4 ESTRUCTURA QUÍMICA Y CRISTALÓGRAFICA DE LA INULINASA.....	53
4.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INULINASA	54
CAPÍTULO 5. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y FRUCTOSA.....	56
5.1 ¿QUÉ SON LOS FOS?	56
5.2 PRODUCCIÓN DE FOS	58
5.3 FRUCTOSA.....	60
CAPÍTULO 6. EFECTO PREBIÓTICO Y APLICACIONES.....	63
6.1 ¿QUÉ ES UN PREBIÓTICO?	63
6.2 EFECTOS PREBIÓTICOS	65
6.3 POTENCIAL PREBIÓTICO.....	68
6.4 MECANISMO PREBIÓTICO DE LOS FOS	68
6.5 TRACTO GASTROINTESTINAL	70
6.6 EXPERIMENTOS REALIZADOS CON FOS	75
6.7 APLICACIONES DE LOS FRUCTANOS	79
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	84
V. BIBLIOGRAFÍA.....	86

I. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del Agave en México.....	4
Figura 2. Metabolismo CAM utilizado por los Agaves.....	6
Figura 3. a) Esquema de anatomía del Agave (Academia Mexicana del Tequila), b) <i>Agave tequilana</i> (CONABIO, Mezcales y diversidad).....	8
Figura 4. Composición del bagazo (Abreu-Sherrer, 2013).....	14
Figura 5. Estructuras de los fructanos. a) Inulina, b) Levano.....	20
Figura 6. a) Estructura de las neoserias de inulina, b) Estructura de las neoserias de levano, c) Estructura del graminano d) Estructura de la agavina de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul (Moreno-Vilet <i>et al</i> , 2016 y Waleckx <i>et al</i> , 2008).....	22
Figura 7. Biosíntesis de fructanos en plantas. Sac: sacarosa, 6-SFT: sacarosa-fructan-6-fructosiltransferasa, 1-SST: sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa, 1-FFT: fructan-fructan-1-fructosiltransferasa, 6G-FFT: fructan-fructan-6-glucosa-fructosiltransferasa (Diagrama modificado a partir de Olvera-Carranza <i>et al</i> , 2015. Figuras de Ritsema y Smeekens, 2003 y Banguela y Hernández, 2006).....	26
Figura 8. Estructura de la inulina.....	33
Figura 9. Reacciones de generación de a) furfural y b) hidroximetilfurfural.....	35
Figura 10. Mecanismo de hidrólisis de una glicosidasa.....	36

Figura 11. Acción de las enzimas exo y endoinulinasas sobre la inulina (Naveen y Sumat, 2011).....	42
Figura 12. a) Efecto del pH en la actividad de la inulinasa de <i>K. marxianus</i> MTCC 3995. b) Efecto de la temperatura en la actividad de la inulinasa de <i>K. marxianus</i> MTCC 3995 (Jain <i>et al</i> , 2012).....	48
Figura 13. a) Perfil de concentración de fructosa y glucosa en función del tiempo en el proceso de hidrólisis enzimática de fructooligosacáridos del agave. b) Perfil en HPLC del proceso enzimático con la inulinasa de <i>K. marxianus</i> en fructooligosacáridos del agave (el acetonitrilo es el disolvente) (García-Aguirre <i>et al</i> , 2009).....	51
Figura 14. Estructura de la inulinasa de <i>Aspergillus awamori</i> y fructosa unida a la enzima, junto con los residuos catalíticos (Nagem <i>et al</i> , 2004).....	54
Figura 15. Mecanismo de reacción, interviniendo Asp41 y Glu241 en la hidrólisis de la R= unidades de fructosa de la inulina (Nagem <i>et al</i> , 2004).....	55
Figura 16. Estructura química de las moléculas de FOS (Banguela y Hernández, 2006; Ritsema y Smeekens, 2003).....	57
Figura 17. FOS producidos a partir de la transfructosilación de la sacarosa.....	59

Figura 18. Reacciones de la invertasa para producir fructosa.....	61
Figura 19. Fermentación de los ácidos grasos de cadena corta en el colon.....	72
Figura 20. Fermentación bacteriana para producir ácidos grasos de cadena corta (García-Peris, 2002).....	73

II. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de Agave y las bebidas que se producen a partir de ellas.....	9
Tabla 2. Principales usos socioeconómicos y agroecológicos del <i>Agave</i> spp.....	15
Tabla 3. Plantas que contienen inulina.....	32
Tabla 4. Ejemplos de proceso y productos obtenidos en la transformación de azúcares.....	38
Tabla 5. Características de inulinasas extraídas de algunos microorganismos.....	40
Tabla 6. Peso molecular de la inulinasa de diferentes microorganismos.....	45
Tabla 7. Experimentos con FOS.....	75
Tabla 8. Propiedades funcionales de la inulina y derivados.....	80
Tabla 9. Ventajas de los fructanos.....	83

III. ABREVIATURAS

Asp	Ácido aspártico
Aw	Water activity / Actividad de agua
CAM	Crassulacean acid metabolism
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
Co A	Coenzima A
CO₂	Dióxido de carbono
DNS	Dinitrosalicílico
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Fructooligosacáridos
FOSHU	Food for Specified Health Use / Alimentos para Uso Específico de Salud
Glu	Ácido glutámico
GP	Grado de polimerización
GRAS	Generally Recognized as Safe
HCl	Ácido clorhídrico
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía líquida de alta eficacia
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics / Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry / Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Kcal/g	Kilocalorías por gramo
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
kHz	Kilohertz
m	Metro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTCC	Microbial Type Culture Collection
N	Concentración normal
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
OH	Hidróxido
PEP	Fosfoenolpiruvato
pH	Potencial de hidrógeno
QPS	Qualified Presumption of Safety

rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
vvm	Volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto
% p/p	Porcentaje peso a peso
% p/v	Porcentaje peso a volumen
% v/v	Porcentaje volumen a volumen

IV. RESUMEN

Gracias a las características climáticas de México, una gran cantidad de especies de Agave sp. crece dentro del territorio nacional, es por ello que nuestro país es considerado como el lugar de origen de esta planta. El agave se ha utilizado en gran manera, por ser una fuente de nutrientes y brindar innumerables beneficios y productos al hombre, como medicamentos, materiales para la construcción y uso doméstico, entre otros. Tiene gran importancia económica debido a sus aplicaciones en alimentos, bebidas y biocombustibles, además de ser una fuente de fructanos y fibra natural. Se ha despertado el interés por parte de la industria alimenticia en aprovechar los carbohidratos de esta planta por su potencial prebiótico para ser utilizada en varios productos denominados “alimentos funcionales”, tales como lácteos, productos horneados, entre otros.

Los fructanos son el principal producto fotosintético del agave y son acumulados como carbohidratos de reserva. Dependiendo de la especie de la planta estos fructanos pueden cambiar su composición. En la naturaleza estos compuestos pueden clasificarse de acuerdo al tipo de enlace entre las unidades de fructosa y por la posición de la glucosa. Estos son: inulina β -(2-1) y levanos β -(2-6). Los fructanos presentes en el agave contienen ambos tipos de enlace, formando una estructura altamente ramificada, dándole el nombre de agavina. Los fructanos se pueden encontrar también en plantas como la achicoria, alcachofa de Jerusalén, dalia, entre otras, estas plantas presentan un arreglo de enlaces β -(2-1) en forma

lineal. Tanto la inulina como los fructooligosacáridos son los principales ingredientes en alimentos funcionales con propiedades prebióticas.

El presente trabajo tiene como finalidad analizar el aprovechamiento integral del agave, desarrollando ampliamente las aplicaciones de la inulina y los fructooligosacáridos, las enzimas que actúan en la hidrólisis de la inulina para la producción tanto de fructosa como de fructooligosacáridos, las fuentes de producción de estas, así como el mecanismo de reacción. Finalmente se detallarán los beneficios del consumo de este tipo de compuestos.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis bibliográfico del aprovechamiento de los residuos generados a partir del uso de la planta de agave para la obtención de fructooligosacáridos y fructosa vía enzimática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características del agave, el proceso de los productos más importantes a partir del mismo y los residuos generados.
2. Describir las características de los fructanos: la inulina, los fructooligosacáridos y la fructosa.
3. Describir el proceso enzimático para la obtención de los fructanos y los microorganismos que sintetizan estas enzimas con fines industriales.
4. Justificar el beneficio prebiótico de los FOS, describir ejemplos experimentales que se han llevado a cabo para probar lo anterior y las aplicaciones que tienen en diversos alimentos.

JUSTIFICACIÓN

El agave, planta endémica de México, es utilizado en nuestro país para producir principalmente bebidas. Debido a la alta demanda de dicha producción, es importante destacar que los residuos generados contaminan, tomando en cuenta la cantidad que se produce es necesario aprovechar la mayor parte de estos residuos. Con ese principio y debido a la necesidad que existe de mejorar la alimentación del ser humano, se han producido la inulina, los FOS y la fructosa con fines prebióticos.

CAPÍTULO 1. EL AGAVE.

1.1 ¿QUÉ ES EL AGAVE?

El agave o maguey es una planta endémica de México, se encuentra especialmente en las zonas áridas y semiáridas, considerándose una especie clave en dichas regiones debido a su abundancia y cantidad de recursos que proporcionan a los hombres así como alimentación a animales de vida silvestre (García-Mendoza, 2007). Representa uno de los recursos naturales de mayor importancia en el país desde el punto de vista económico, social y agroecológico.

Desde tiempos remotos, el agave ha sido utilizado y aprovechado en gran manera como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, abono, e incluso para construcción de viviendas. Por sus características presentan dos grupos diferentes agroeconómicos: el henequén, que es sólo productor de fibra, y el segundo, el maguey, que es un cultivo tanto industrial como alimenticio y del cual se producen bebidas fermentadas como el pulque y destiladas como el mezcal y el tequila. Actualmente se reconocen dentro de la familia *Agavaceae* nueve géneros y cerca de 200 especies (García-Mendoza, 2015).

1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La distribución de los géneros abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela y de las aproximadamente 200 especies que existen, el 75% se encuentran en México, lo cual muestra la gran importancia biológica del territorio nacional para los agaves. Así mismo, la planta se encuentra en más de tres cuartas partes del territorio del país.

Las especies son diversas en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, sin embargo su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Son abundantes en el centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano Mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental. Debido a su capacidad de adaptación a condiciones ambientales severas, estas plantas crecen en distintas regiones del país (Figura 1) (García-Mendoza., 2007).

Los agaves son plantas perennes, es decir, que vive más de dos años. Sus características metabólicas, fisiológicas y morfológicas les permiten sobrevivir en condiciones extremas. Es una planta monocárpica, lo cual quiere decir que florece una vez y posteriormente muere. Se les puede encontrar en valles, llanuras, colinas, cerros pedregosos, incluyendo lugares montañosos con una altitud de más de 3000 msnm. Las plantas crecen en suelos con pH neutro o ligeramente alcalino. Forman grupos o conglomerados dispersos dentro de la vegetación de pastizal y se les encuentra combinado con nopaleras y matorral micrófilo (García-Herrera *et al*, 2010).



Figura 1. Distribución geográfica del Agave en México (CONABIO).

1.3 METABOLISMO

Las plantas de las zonas áridas o semiáridas, almacenan la mayor parte de sus productos de la fotosíntesis en las raíces, por lo que requieren de un sistema radicular extenso para absorber la mayor cantidad posible de agua, puesto que el sitio donde se encuentran es de escasa disponibilidad de dicho recurso. El agave utiliza el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), el cual es una adaptación al estrés ambiental y es su manera de subsistir.

El ciclo se divide en fase nocturna y diurna y consiste en lo siguiente (Andrade *et al*, 2007):

- En la nocturna: los estomas se abren para tomar el bióxido de carbono, se forma el aceptor primario del CO₂ (PEP, fosfoenol-piruvato) a partir de carbohidratos no estructurales, como glucosa y fructanos, en las células fotosintéticas. La enzima PEP carboxilasa fija al CO₂ en el citosol, en una reacción que convierte al piruvato en oxalacetato, y este se reduce a malato, almacenándose en la vacuola.
- En el día, los estomas se cierran, el malato se libera de la vacuola hacia el citosol y es descarboxilado por la malato deshidrogenasa para obtener piruvato y CO₂, el cual, seguido por el ciclo de Calvin-Benson y mediante la acción de más enzimas, la planta utiliza para la producción de carbohidratos (Figura 2).

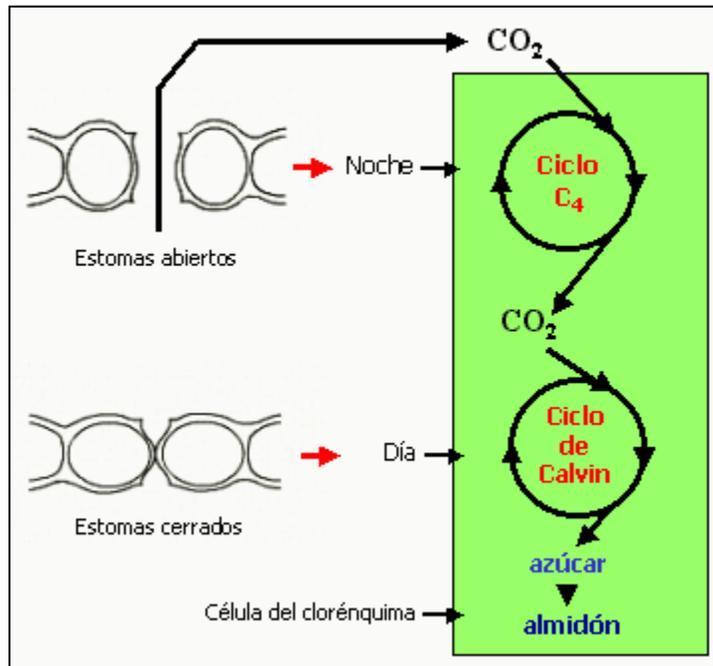


Figura 2. Metabolismo CAM utilizado por los agaves (www.biologia.edu.ar/botanica, Facultad de Ciencias Agrarias)

Las plantas que crecen en ambientes áridos son las que usan este tipo de metabolismo y la ventaja de ello es que la absorción de CO₂ es durante la noche, permitiendo obtener ganancias de carbono con una pérdida mínima de agua. Por esto, el agave puede acumular mono y polisacáridos que funcionan como energía de reserva, sin embargo también son utilizados como osmoprotectores (Nava-Cruz *et al*, 2014; Velázquez-Martínez *et al*, 2014). Estos carbohidratos son procesados para convertirse en azúcares fermentables por microorganismos, tales como las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013).

1.4 TAXONOMÍA Y COMPOSICIÓN

Su nombre en náhuatl es *Metl*. La palabra *Agave*, que proviene del griego “noble” y de latín “admirable”, fue utilizada por Charles Linneo para describir a este género de plantas, refiriéndose y destacando así su notable habilidad para crecer en ambientes secos (López y Mancilla-Margalli, 2007).

El *Agave* pertenece al orden de las *Asparagales* y a la familia de las *Agavaceae*, con más de 200 especies, de las cuales 135 son endémicas de México.

La composición general de la planta de agave es: humedad 60%, carbohidratos 25%, fibra y médula (corteza de las fibras) 10%, sales minerales 2.5% y otros componentes 2.5%. Destacando que el polisacárido predominante de la planta es la inulina, y representa del 85 al 90% de los carbohidratos (Huerta-Alcocer *et al*, 2014). .

La composición varía dependiendo la especie del agave, de la edad, el tamaño e incluso el lugar en donde se encuentra.

1.5 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

La forma que adquiere con sus hojas o pencas es como una roseta; sus pencas son verdes, gruesas y carnosas, y terminan con una punta afilada. Están conformadas de dos partes: hojas largas con espinas, de donde es posible la extracción de fibra, y la segunda parte se le llama piña (Figura 3), es el corazón del agave y el cual contiene la mayor cantidad de carbohidratos de toda la planta, la piña se cocina para obtener el jugo y producir las diferentes bebidas (tequila, mezcal, pulque).

Pueden crecer hasta 1.8 m de altura, llegando a pesar 250 kg. El tallo es grueso y fibroso, la flor crece con el tallo y la base de las hojas.

Las raíces penetran aproximadamente 30 cm en el suelo, cuando el ciclo de crecimiento del *Agave* se acerca a su final, la flor aparece y la esperanza de vida es de 8 a 20 años (Nava-Cruz *et al*, 2014).

Su sistema de raíz ayuda a la absorción del agua de lluvia, lo que les permite sobrevivir algún tiempo en escasez, de esta manera la supervivencia de una roseta depende del volumen de agua, que ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y favorece la apertura de estomas para la asimilación del CO₂ y de los carbohidratos almacenados (García-Mendoza, 2007). Las fibras en los tejidos de las hojas ayudan a mantener la rigidez, impidiendo deformaciones durante las temporadas de sequía.

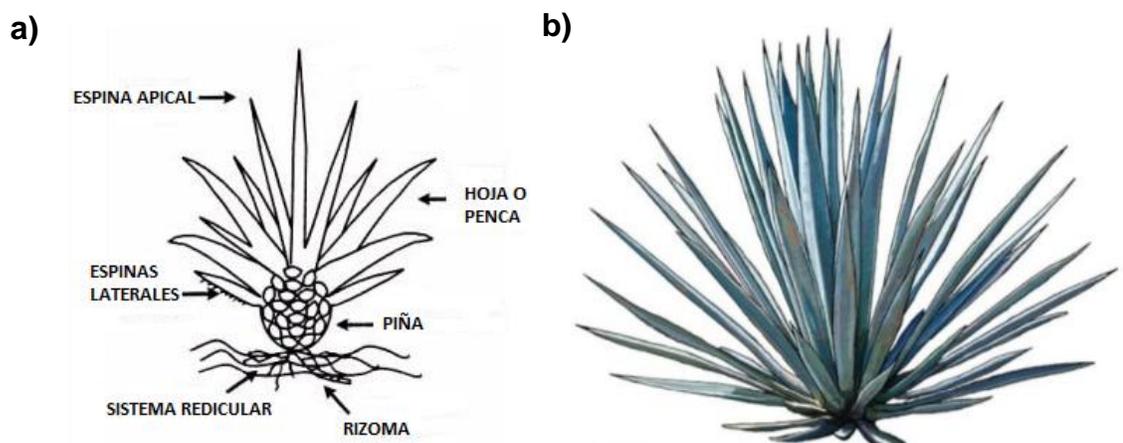


Figura 3. a) Esquema de anatomía del Agave (Academia Mexicana del Tequila), b) *Agave tequilana* (CONABIO, Mezcales y diversidad).

1.6 PRINCIPALES USOS DEL AGAVE

El Agave es una planta de la cual los carbohidratos han sido usados desde tiempos remotos en diversas aplicaciones, actualmente son utilizados principalmente para la elaboración de bebidas fermentadas: tequila, mezcal, pulque y bacanora (Tabla 1). La piña se somete a cocimiento para obtener azúcares fermentables a través de hidrólisis, posteriormente se realiza la formulación del mosto y se inocula con levaduras para obtener el etanol. El residuo de este proceso es el bagazo, constituido principalmente por celulosa.

Las especies de *Agave* pueden ser utilizadas ya sea en alimentos, como fibra, endulzantes, suplementos e incluso para material de construcción, entre otras aplicaciones.

Tabla 1. Especies de Agave y las bebidas que se producen a partir de ellas.

Tipo de bebida	Especie
Tequila	<i>Agave tequilana</i> Weber var. azul
Mezcal	<i>Agave angustifolia</i> <i>Agave potatorum</i> Zucc <i>Agave salmiana</i> <i>Agave weberi</i>
Pulque	<i>Agave salmiana</i> <i>Agave angustifolia</i> <i>Agave mapisaga</i> <i>Agave americana</i>
Bacanora	<i>Agave angustifolia</i> <i>Agave potatorum</i> <i>Agave pacifica</i>

Tabla elaborada a partir de Castro y Guerrero, 2013 y Gutiérrez *et al*, 2007.

La característica del género *Agave* más apreciada por la industria alimenticia es su contenido de carbohidratos solubles, de los cuales entre el 60% y 85% de ellos se constituyen por fructanos (López y Mancilla-Margalli, 2007), mismos que son procesados y transformados en azúcares fermentables y éstos a etanol mediante microorganismos como levaduras y bacterias.

1.7 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL TEQUILA, MEZCAL, PULQUE Y BACANORA

Como ya se ha mencionado, el agave es una fuente de nutrientes y tiene una alta importancia económica debido a sus aplicaciones industriales. A continuación se describen brevemente los procesos de las bebidas más importantes.

El tequila es la bebida alcohólica que se consume en mayor cantidad en México, su nombre proviene de las palabras “tequitl” y “tlan”, que significan trabajo y lugar respectivamente, por lo que se refiere al lugar o sitio donde se trabaja. Esta bebida es un destilado obtenido de la fermentación de los azúcares de *Agave tequilana* Weber var. azul (Nava-Cruz et al, 2014). La piña del agave tequilero es la materia prima para elaborar el tequila, siendo que la concentración de azúcares de la piña está entre el 16 y el 28%, contrario a las hojas que su contenido es de 3 y 16%, dependiendo de la edad de la planta y el tamaño de la hoja. El tequila se obtiene de la planta madura de 10 años, que es cuando mayor porcentaje de azúcares tiene. Para iniciar, las pencas son eliminadas y la piña se cuece en autoclave durante 12 horas o en horno de mampostería durante 48 horas, proceso en el cual se convierte la inulina en fructosa y sacarosa para fácil fermentación. La piña, ya cocida, se

muele y se aplica agua a presión para extraer la mayor cantidad de azúcares de la fibra. La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, esto dura de 2 a 7 días. Posteriormente se destila en dos etapas: destrozamiento, cuando se eliminan las vinazas y rectificación, en la cual se concentra el etanol y se obtiene un producto de mayor pureza. El contenido final de alcohol debe ser entre 35-45% de alcohol (Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013; Nava-Cruz *et al*, 2014).

La segunda bebida más común del *Agave* es el mezcal, producto de la fermentación de los azúcares de la piña cocinada de *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. weberi* por mencionar algunos. La madurez de la planta para la producción de esta bebida debe ser entre 7 y 12 años. El proceso de elaboración es artesanal y es similar al del tequila. Para iniciar, se cuece la piña en un horno de roca durante 3 días para hidrolizar a los fructanos y obtener azúcares simples, posteriormente se muele para realizar la fermentación de 1 a 2 semanas y se coloca en un alambique para la destilación mediante evaporación y condensación y obtener un líquido cristalino. Esto último se realiza una segunda vez, y al final lo que se obtiene es el mezcal con un grado alcohólico entre 45 y 50% (Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013; Nava-Cruz *et al*, 2014).

El pulque es una bebida de consistencia muy viscosa, lechosa y espumosa, contiene de 4 a 9% de alcohol. Para producir esta bebida el *Agave* debe tener 12 años, cada planta tiene una producción total de 500 a 1000 litros. La flor del agave se corta de la parte basal de la planta para que ahí se acumule la savia o aguamiel

(glucosa, fructosa, sacarosa, proteínas, gomas y sales minerales durante) y esto es fermentado para producir el pulque, iniciándose en la planta y continuando en los tinacales, el tiempo para esto es de 12 a 48 horas a 25°C. La acción microbiana transforma bioquímicamente la savia, lo cual favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas, como *Leuconostoc* y levaduras como *Saccharomyces*, mismas que producen la fermentación (Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013; Nava-Cruz *et al*, 2014).

El bacanora es un destilado hecho 100% de agave, es un licor claro y cristalino. El quiote o la floración se remueve para evitar el florecimiento y que la planta aumente la reserva de azúcares. Después de 2 años se remueven las hojas hasta dejar la piña, esta se cuece en hornos bajo tierra previamente preparados con leña y piedras, lo cual le confiere un aroma y sabor único. Después de 2 a 4 días la piña se extrae, se desfibran y se colocan en tinas con agua para iniciar la fermentación que dura de 5 a 10 días dependiendo de la temperatura y humedad ambiental. La destilación se produce en un alambique y el producto obtenido se somete nuevamente a este último proceso. El bacanora contiene de 40 a 50% de alcohol (Gutiérrez-Coronado *et al*, 2007).

1.8 APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL AGAVE

Durante algunos procesos agroindustriales, como es el caso de la producción del tequila, se generan subproductos o residuos, muchos de ellos no son reciclados ni procesados, lo que provoca problemas ambientales. Se puede decir que los residuos agroindustriales son materiales que se generan a partir de un proceso y

que ya no son de utilidad para el mismo, pero son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, comercial y/o social (Saval, 2012) . Algunos residuos se queman, o se vierten en rellenos sanitarios, produciendo de esta manera la liberación de dióxido de carbono, contaminación de agua, malos olores y proliferación de insectos, entre otros (Huerta-Alcocer *et al*, 2014).

Los subproductos del *Agave* son fuentes muy importantes gracias a su contenido de azúcares y fibra (lignina, celulosa, hemicelulosa). Con una transformación química o microbiológica pueden llegar a ser productos de elevado valor añadido (Barragán-Huerta *et al*, 2008). Además del interés económico que estos procesos añaden a las industrias, también inciden en la preservación del ambiente utilizando transformaciones sustentables de los recursos naturales. En la producción del tequila a partir del *Agave tequilana*, se desechan las pencas, que representan alrededor del 50% de la planta. De acuerdo con información del Consejo Regulador del Tequila, por cada litro de esta bebida que se produce en México, se generan 12 litros de desechos orgánicos como aguas residuales, hojas de agave y bagazo. Señaló que en 2013 se produjeron 226.5 millones de litros de destilado, lo cual representó la generación de 3 mil 397.5 millones toneladas de desechos de esta actividad (CONACYT prensa, 2014).

El desarrollo de la industria del agave ha generado una gran cantidad de residuos: bagazo, vinazas y hojas, mismos que ocasionan problemas de contaminación. En Oaxaca, como ejemplo, se producen anualmente 2.95 millones de litros de mezcal,

lo que representa el 66% de la producción nacional, generando 23.5 miles de toneladas de fibra residual o bagazo que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña. En el proceso artesanal se usan en promedio 10 kg de materia prima de agave y se generan de 6 a 8 kg de bagazo por cada litro de mezcal. El bagazo está compuesto por un entramado de microfibrillas de celulosa en su mayor parte, lignina y hemicelulosa (Figura 4), las cuales le confieren resistencia a la degradación por los microorganismos presentes en el ambiente (Chairez-Aquino *et al*, 2015 y González-García *et al*, 2005). Este residuo representa aproximadamente el 40% del agave procesado, el material lignocelulósico que constituye al bagazo es considerado como fuente de energía renovable en la producción de biocombustibles utilizando la fermentación (Abreu-Sherrer, 2013).

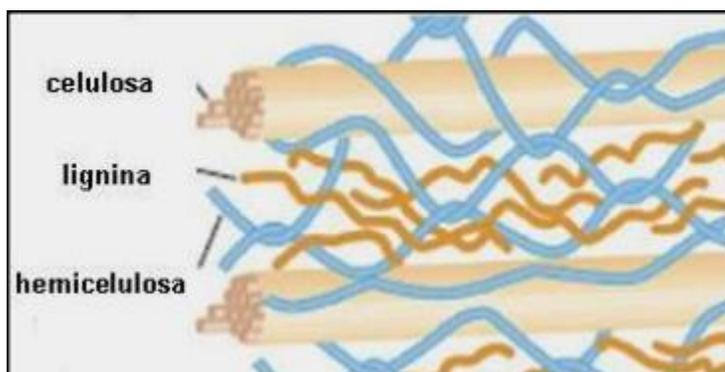


Figura 4. Composición del bagazo (Abreu-Sherrer, 2013).

Otro residuo de la producción de bebidas a partir del agave son las vinazas: líquidos que se generan al final de la destilación. En la producción del tequila, por cada litro se producen de 10 a 12 litros de vinazas. Aproximadamente el 80% de las vinazas no reciben un tratamiento adecuado y son desechados en cuerpos de agua, o en el suelo directamente, por lo que debido a su bajo pH (3.5-4.5) perjudican los cultivos,

además su pigmentación es muy alta y es difícil su descomposición por procesos biológicos. Por su alto contenido en fructosa y glucosa se pueden utilizar para producir biogás por digestión anaeróbica (Abreu-Sherrer, 2013).

Las hojas son el residuo agrícola que representa del 45-50% del peso de la planta. Esta parte del agave es la principal fuente de fructanos, mismos que son utilizados por la industria alimentaria, como se mencionará en los próximos capítulos.

El estudio “Aplicación industrial de la planta de *Agave* sp.” organiza las áreas de negocio que se benefician de esta planta: medicina, agricultura, química y manejo integral de residuos.

En la siguiente tabla se muestran algunos de los usos que los agricultores le han dado a los desechos.

Tabla 2. Principales usos socioeconómicos y agroecológicos del *Agave* spp.

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimento	Azúcar	Tallo (piña)
	Dulce	Flor y fruto
	Envoltura para barbacoa	Quiote
	Mixiotes	Hojas
	Gusanos rojos (chinicuiles)	Hojas
	Pan de pulque	Tallo (piña)
	Tortillas	Perianto de flores + nixtamal
Bebidas	Aguamiel, miel, atole, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre, jarabe	Tallo (piña)
Agrícola	Cerca viva	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
Forraje	Bovinos, caprinos, porcinos	Hojas, escapos florales, flores, bagazo

Construcción	Cercas, casas, corrales Tejas	Quiote Hojas
Fibras	Lazos, ropa doméstica Cepillos para limpieza, escobetillas	Fibras de hojas, raíces
Medicinal	Cura golpes, lesiones internas, prevención de escorbuto, antiinflamatorio	Hojas, mieles y pulque
Ornamental	Aretes, collares Adornos	Semillas Planta completa
Doméstico	Jabón, detergente Macetas/recipientes Tapaderas de cazuelas, ollas barriles	Hojas, tallos, raíces Hojas y tallo Espina terminal de hojas
Otros usos	Industria química, farmacéutica, medicamentos, Celulosa para papel Etanol, glucósidos	Hojas (pulpa y residuos de desfibramiento), raíces, tallo, semilla

Fuente: Centro de propagación de Agave del Estado de Guanajuato.

En la actualidad se aprovecha principalmente la piña de la planta, mientras que las hojas son tratadas como desecho industrial. Por esto mismo, el estudio de estas plantas ha ido aumentando con el fin de darles una aplicación a los residuos generados.

CAPÍTULO 2. FRUCTANOS.

2.1 ¿QUÉ SON LOS FRUCTANOS?

La fructosa es un monosacárido presente en un gran número de frutas, de ahí su nombre, es probablemente el de mayor impacto en la sociedad y se considera como el azúcar más potente. Se pueden encontrar en sus formas D-fructosa y L-fructosa, esta última no se encuentra en la naturaleza. El doble enlace al oxígeno permanece en posición β , por esta razón D-fructosa y L-fructosa son frecuentemente llamadas β -D-fructosa y β -L-fructosa respectivamente (Ricca *et al*, 2007).

Los fructanos son polisacáridos con un grado de polimerización que varía entre 2 y 70 moléculas de fructosa en la cadena (Chacón-Villalobos, 2006), son derivados de la molécula de sacarosa y contienen una glucosa terminal, son solubles en agua y su estructura puede ser lineal o ramificada. El término fructano es usado para nombrar a las moléculas que tienen, en su mayoría, residuos de fructosa, sin importar el número.

Funcionan como carbohidratos de reserva en alrededor del 15% de las plantas superiores como la cebolla, el ajo, el espárrago, la chicoria, la alcachofa o las plantas de la especie *Agavaceae* (Banguela y Hernández, 2006). También son producidos por algunas especies de bacterias como *Bacillus subtilis*. En el caso de los agaves, los fructanos se encuentran almacenados en el tallo. El valor del agave es estimado de acuerdo al contenido de estos compuestos. Después del almidón, los fructanos son la fuente de reserva de energía más común (Olvera-Carranza *et al*, 2015).

Es importante mencionar que al menos 40 000 especies de plantas almacenan fructanos en sus hojas, raíces, tubérculos o bulbos, una de las razones es que la síntesis de fructanos puede realizarse a temperaturas por debajo de los 12°C, mientras que a estas temperaturas el metabolismo del almidón es inhibido (Olvera *et al*, 2007). Las principales familias de plantas que incluyen fructanos en su composición son *Liliaceae*, *Amarillydaceae*, *Poaceae*, *Solanaceae* y *Compositae* (Chacón-Villalobos, 2006). Además de cumplir la función como carbohidratos de reserva, la síntesis de fructanos regula la concentración de sacarosa en la vacuola y ayuda a la planta a tolerar el estrés por sequía o frío (Vijn y Smeekens, 1999; Banguela y Hernández, 2006).

Los fructanos ocupan un papel importante en la nutrición moderna, al haberse reconocido su función como fibra soluble y prebiótico (Olvera *et al*, 2007). Además, los fructanos aportan un valor calórico reducido (1.5 kcal/g) al compararse con los carbohidratos digeribles (4 kcal/g) (Madrigal y Sangronis, 2007).

2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS FRUCTANOS

Estos compuestos principalmente son de origen vegetal y no exceden las 200 unidades de fructosa, en cambio las bacterias sintetizan fructanos de hasta 100,000 unidades, siendo estos últimos un 15% más ramificados que los de origen vegetal (Chacón-Villalobos, 2006; Shoaib *et al*, 2016).

La complejidad y heterogeneidad en las estructuras de los fructanos del *Agave* se debe a la presencia de enzimas glucosiltransferasas con determinada especificidad y actividad, con lo que resulta una composición en particular para cada especie.

Alrededor del 60-85% de los carbohidratos solubles son fructanos, del total de los enlaces existentes en ciertas especies de *Agave*, el β -(2-6) corresponde al 20% de ellos (López *et al*, 2003).

Los fructanos se clasifican dependiendo del grado de polimerización, de las ramificaciones, del tipo de enlace entre las unidades de fructosa y la posición de los residuos de glucosa. Hay dos clases estructurales de fructanos, estas son:

- a) Inulina, tiene enlaces β -(2-1) entre las moléculas de fructosa con una glucosa terminal. Se ha estudiado en la achicoria, en alcachofa de Jerusalén, en diente de león, dalia y yacon (Figura 5a).
- b) Levano, la fructosa se une mediante enlaces β -(2-6) con una glucosa terminal, ocasionalmente se presenta una ramificación cuando al carbono 1 de una fructosa se le agrega otra fructosa, enlazándose con su carbono 2 y creando un enlace tipo β -(2-1) (Olvera *et al*, 2007). En general, las bacterias productoras de fructano presentan este tipo de estructura (Figura 5b).

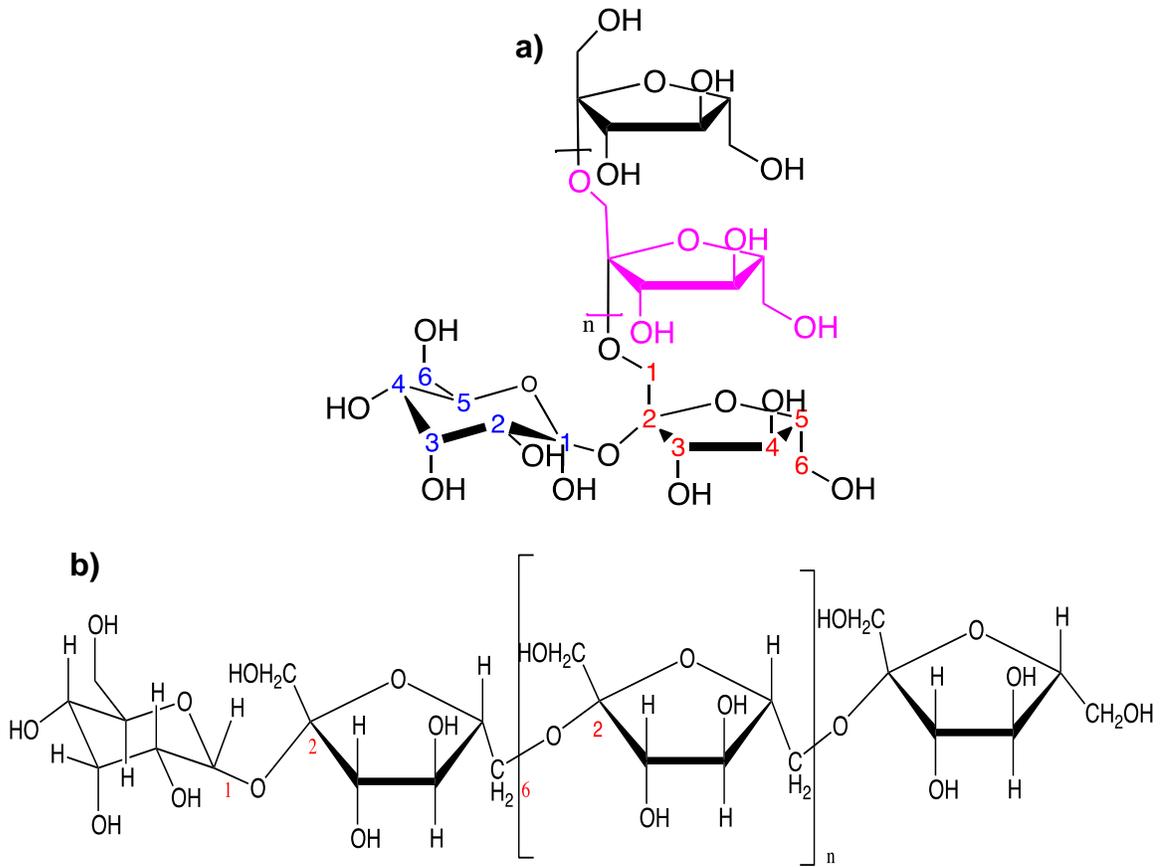


Figura 5. Estructuras de los fructanos. a) Inulina, b) Levano.

Otras 4 clases que se denominan como subcategorías son: neoserias de inulina y levano, graminanos y agavinas (Vijn y Smeekens, 1999).

- a) Inulina neoserie, contienen unidades de fructosa con enlaces β -(2-1), unidas tanto al carbono 1 como al 6 de la molécula de glucosa. Contienen un residuo de glucosa entre dos cadenas, es decir, su residuo de glucosa se encuentra en una posición central resultando dos cadenas de inulina a los lados. Estos fructanos se construyen a partir de la sacarosa pero haciendo crecer la cadena ya sea a partir de la fructosa o de la glucosa presentes en la sacarosa

que la planta obtiene mediante la fotosíntesis (Olvera *et al*, 2007). Se encuentran comúnmente en especies de las familias *Alliaceae* y *Asparagaceae*, como en cebolla y espárrago respectivamente; también se encuentran en la mayoría de las especies del género *Agave* (Figura 6a) (López y Mancilla-Margalli, 2007).

- b) Levano neoserie, similar a la inulina neoserie pero con enlaces tipo β -(2-6), es el fructano menos común, se presenta en especies como avena (*Avena sativa*) (Figura 6b).
- c) Los graminanos, las estructuras más complejas, presentan ambos tipos de enlace, β -(2-1) y β -(2-6), esta característica resulta en un polímero ramificado que se conforma por residuos de fructosa y uno de glucosa terminal. Estos son comunes en pastos y cereales de la familia *Poaceae*, conocidos como gramíneas o poáceas, de ahí su nombre, como trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) (Chacón-Villalobos, 2006) (Figura 6c).
- d) Las agavinas, otro tipo de fructanos, son más complejas debido a sus ramificaciones y a la presencia de ambos tipos de enlace, lo que las diferencian de los graminanos es la posición de la glucopiranosas, encontrándose en las agavinas en una posición central. Su nombre se debe a que están presentes en especies del género *Agave*, como *A. tequilana* y *A. Veracruz* (López y Mancilla-Margalli 2007). Su grado de polimerización es de 3-29 monómeros, y cambia en función de la edad de la planta (Figura 6d).

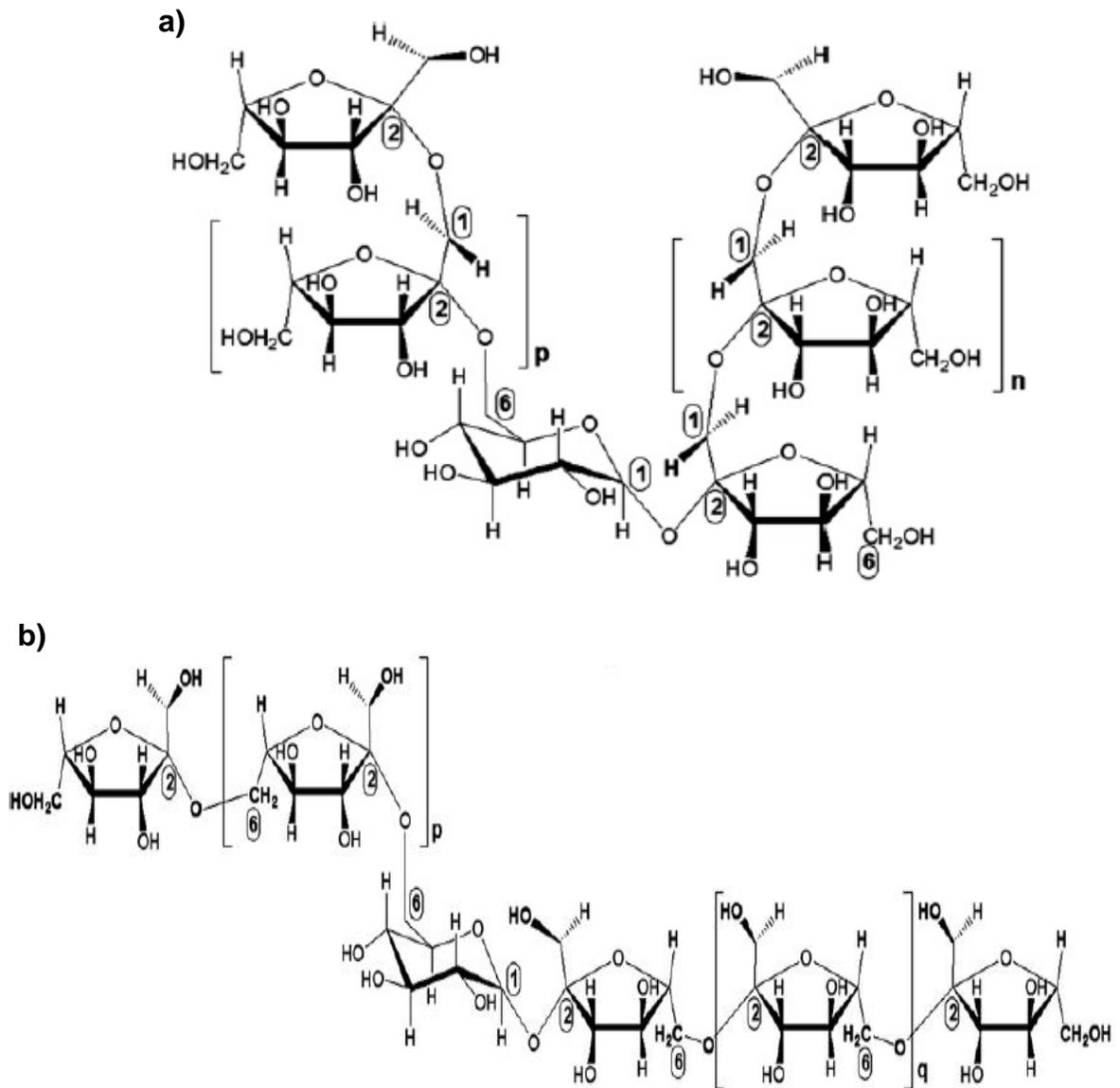


Figura 6. a) Estructura de las neoserias de inulina b) Estructura de las neoserias de levano, c) Estructura del graminano d) Estructura de la agavina de *A. tequilana* Weber var. azul (Moreno-Vilet *et al*, 2016 y Waleckx *et al*, 2008).

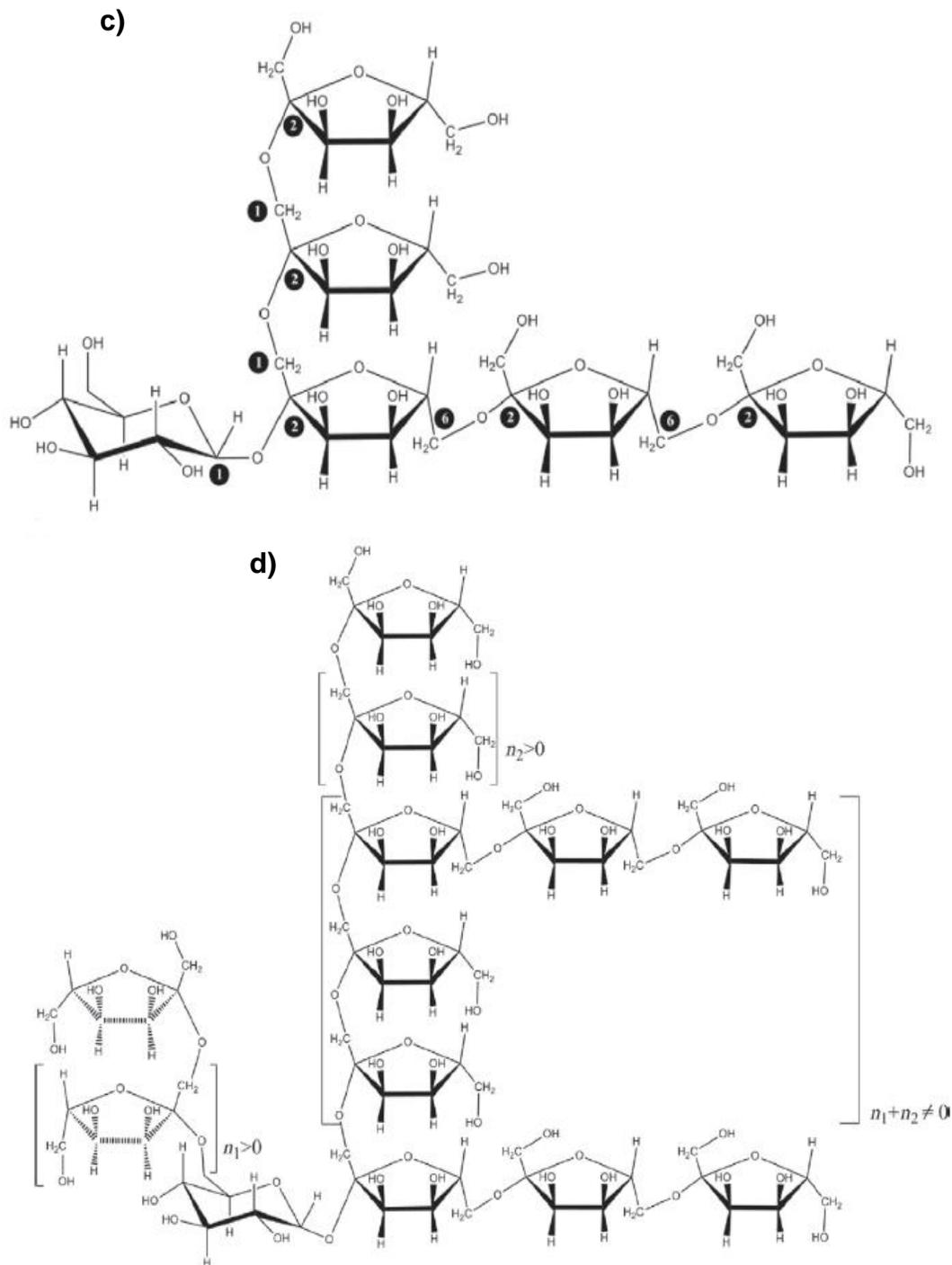


Figura 6. a) Estructura de las neoserias de inulina, b) Estructura de las neoserias de levano, c) Estructura del graminano d) Estructura de la agavina de *A. tequilana* Weber var. azul (Moreno-Vilet *et al*, 2016 y Waleckx *et al*, 2008).

2.3 PRODUCCIÓN DE LOS FRUCTANOS EN PLANTAS Y MICROORGANISMOS

En las plantas, la síntesis de fructanos es mediante la acción de al menos dos enzimas, este proceso tiene lugar en las vacuolas, que ocupan alrededor del 70% del volumen de las células. En la primera etapa, la sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) cataliza la síntesis del trisacárido 1-cestosa a partir de dos moléculas de sacarosa al transferir un residuo fructosilo de una sacarosa a otra, liberando a la glucosa y formando la 1-cestosa. En la siguiente etapa, actúa la fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT), la cual transfiere reversiblemente un fructosilo de un fructano, con un grado de polimerización mayor o igual a tres, a otro, generando la inulina (Olvera *et al*, 2007; Mutanda *et al*, 2014; Chacón-Villalobos, 2006). Dependiendo de la especie de la planta, en esta etapa puede actuar una sola enzima o una combinación con otras: fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT), fructano-fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) y la sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) (Banguela y Hernández, 2006). A partir de la 1-cestosa y sacarosa, la enzima 6G-FFT produce neocestosa, la cual se elonga con la 1-FFT o la 6-SFT para producir neoserias de inulina o levano, respectivamente. De la sacarosa y la 1-cestosa, la 6-SFT produce bifurcosa, si se elonga ya sea por la 1-FFT o la 6-SFT, resultan mezclas de levanos. Cuando la sacarosa es el único sustrato, la 6-SFT produce 6-cestosa, y posteriormente levano, el cual también puede producirse a partir de la bifurcosa por la misma enzima o con la 1-FFT (Figura 7) (Vijn y Smeekens, 1999).

En la síntesis de fructanos en microorganismos interviene una enzima, la fructosiltransferasa, debido a su alta especificidad, transfiere selectivamente un fructosilo de la sacarosa a la posición 1-OH de otra sacarosa, formando de esta manera fructanos basados en la 1-cestosa (Chacón-Villalobos, 2006). Las enzimas son la sacarosa-1F-fructosiltransferasa o inulosacarasa, para la inulina, y la sacarosa-6F-fructosiltransferasa o levansacarasa, para el levano. Este proceso da lugar a las cadenas de inulina o levano (Olvera *et al*, 2007). De manera general, los microorganismos producen fructanos del tipo levano (enlaces β -2,6), los cuales pueden presentar un grado de polimerización de 10^6 . Entre las bacterias productoras de estos carbohidratos destacan especies Gram positivas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Lactobacillus reuteri*, la función de los fructanos de origen bacteriano se relaciona en la protección de las células contra la deshidratación o como auxiliar en procesos de adhesión celular (Olvera *et al*, 2007). De las especies fúngicas productoras destacan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Banguela y Hernández, 2006).

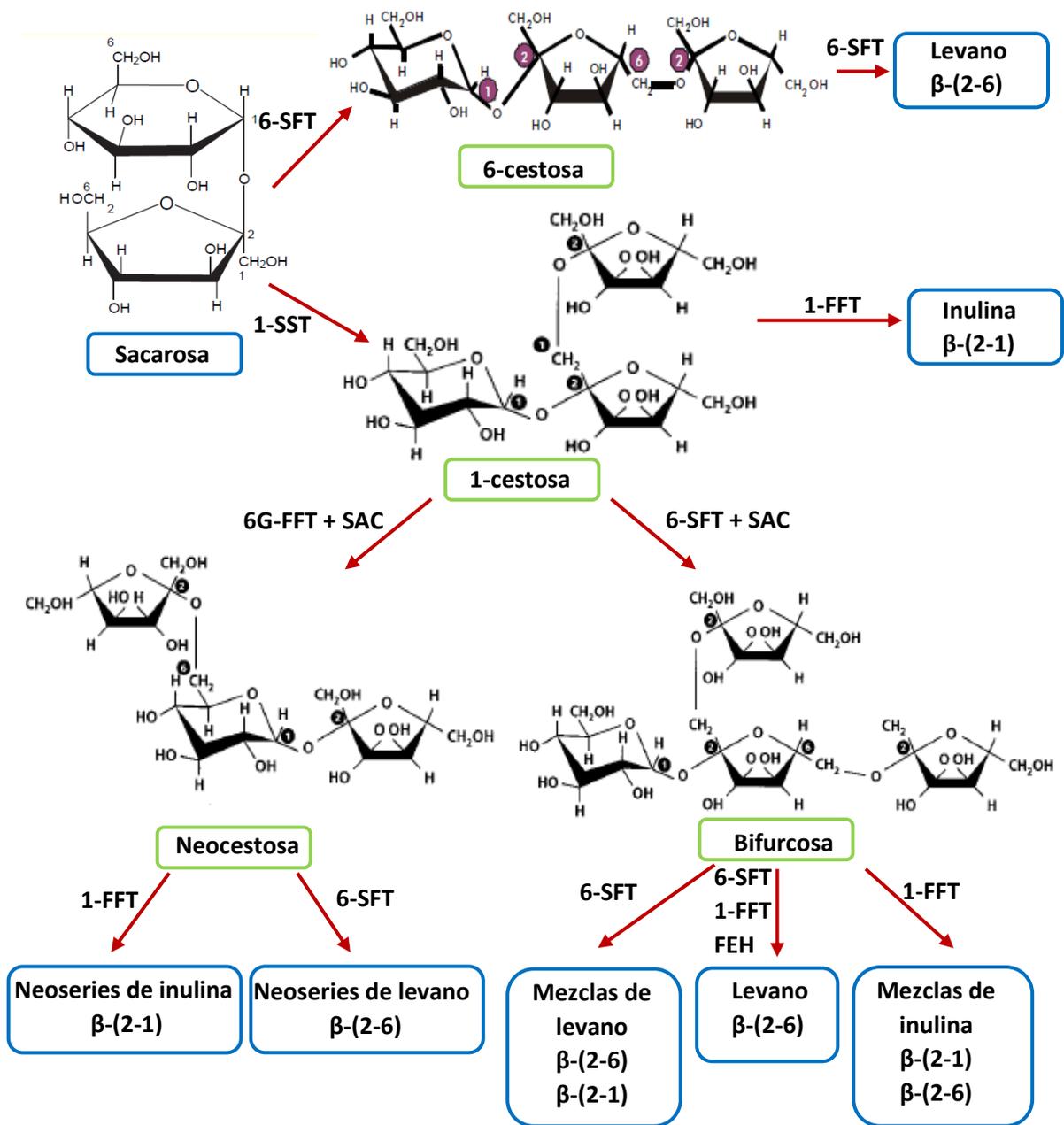


Figura 7. Biosíntesis de fructanos en plantas. Sac: sacarosa, 6-SFT: sacarosa-fructan-6-fructosiltransferasa, 1-SST: sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa, 1-FFT: fructan-fructan-1-fructosiltransferasa, 6G-FFT: fructan-fructan-6-glucosa-fructosiltransferasa. (Diagrama modificado a partir de Olvera-Carranza *et al*, 2015. Figuras de Ritsema y Smeekens, 2003 y Banguela y Hernández, 2006).

2.4 EXTRACCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LOS FRUCTANOS

Las principales fuentes utilizadas por la industria alimenticia para la extracción de fructanos y producir inulina son: el agave, la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), la achicoria (*Cichorium intybus*), siendo esta la más importante, debido a que su raíz contiene hasta un 17-30% de fructanos, de los cuales entre un 8 y 14% es inulina con un grado de polimerización no mayor a 60 unidades (Chi *et al*, 2011; Chacón-Villalobos, 2006; Sosa-Herrera y Delgado-Reyes, 2016). La achicoria y la alcachofa contienen fructanos lineales, mientras que los del agave son ramificados.

El contenido de fructanos en la achicoria suele ser constante, en cambio en el agave la acumulación puede tomar desde 3 hasta 8 años. Estas plantas acumulan entre 13 y 17% (p/p) en plantas maduras, similar a la cantidad en la achicoria, 15-21% (p/p) (Sosa-Herrera y Delgado-Reyes, 2016).

Se han buscado métodos para establecer las condiciones óptimas de extracción con el fin de encontrar mejoras, siendo los factores más importantes que influyen en el rendimiento la temperatura, el tiempo de extracción y la relación disolvente/sólido. La solubilidad de los fructanos aumenta con la temperatura, alcanzando el 35% (p/v) a 90°C, por lo que el proceso de extracción industrial se basa en utilizar agua caliente (Sosa-Herrera y Delgado-Reyes, 2016).

La pureza de los oligosacáridos es sumamente importante para la potenciación de los efectos fisiológicos y que sean viables para producirse de manera comercial.

Algunos métodos para la producción de estas sustancias, por ejemplo: a partir de azúcares simples como sacarosa o lactosa mediante reacciones de transglicosilación o utilizando hidrólisis enzimática de almidón o de xilano, generan monosacáridos, los cuales deben eliminarse mediante el uso de membranas o por cromatografía. La reducción de la cantidad de dichas sustancias es importante, puesto que de esta manera incrementa la calidad del producto para ser utilizado con fines prebióticos (De Moura *et al*, 2014; Mussatto y Mancilha, 2007).

Cabe mencionar que los efectos fisiológicos de los oligosacáridos, así como las características para ser utilizados como ingredientes alimenticios, dependen de la composición de los monosacáridos, del grado de polimerización, del peso molecular y de la pureza. Por ejemplo, los fructanos de cadena corta son el mejor sustrato para un rápido crecimiento de bifidobacterias, mientras que aquellos que poseen un grado de polimerización alto, como la inulina, son ideales para la producción de jarabe de alta fructosa debido a su bajo contenido de glucosa (Banguela y Hernández, 2006).

La extracción directa se realiza por molienda y solubilización en agua caliente. El extracto se trata con una mezcla de enzimas: sacarasa, α -amilasa y maltasa entre otras, estas degradan los carbohidratos presentes, exceptuando los fructanos y los azúcares que restan se eliminan por elusión con una columna de intercambio iónico. La inulina obtenida se trata con inulinasas para ser transformada en moléculas de menor peso molecular y grado de polimerización. La concentración del producto final se realiza con secadores de aspersion (Chacón-Villalobos, 2006).

Conforme a Montañez-Soto *et al* (2011), en un estudio de *A. tequilana*, la cabeza o piña del agave representa la fracción más importante de la planta, gracias a que en ella se almacena la mayor cantidad de azúcares.

Existe una patente, la WO 2002066517 A1, que detalla un proceso de extracción de productos de fructanos, en donde las piñas se someten a distintas etapas: molido, dilución con agua a 80-99°C, tratamiento con carbón activado, con intercambiadores iónicos, eliminación de calcio y quelatos. El resultado es una solución de fructanos altamente puros, la cual se puede someter a un proceso de secado y obtenerlos en forma de polvo (Legorreta y Ogura, 2002; Sosa-Herrera y Delgado-Reyes, 2016).

CAPÍTULO 3. INULINA.

3.1 ¿QUÉ ES LA INULINA?

La inulina es un polisacárido soluble, con enlaces β -(2-1), constituido de unidades de fructosa y un residuo terminal de glucosa, perteneciente al grupo de los carbohidratos no digeribles llamados fructanos, en las plantas funciona como reserva, encontrándose en las hojas, raíces y tubérculos.

Se aisló por primera vez en 1804 a partir de un extracto con agua caliente de una planta de la especie *Inula helenium*, por un científico alemán de apellido Rose.

Posteriormente en 1818, un científico británico, Thomson, le dio su nombre actual.

Actualmente, su presencia en productos alimenticios hace que a estos se les considere como “alimentos funcionales”, debido a que confiere efectos fisiológicos adicionales a su valor nutricional (Madrigal y Sangronis, 2007; Shoaib *et al*, 2016).

Comúnmente la inulina se ha utilizado como prebiótico, sustituto de grasa y azúcar en alimentos procesados, para impartir otras características se usa como modificador de textura, y para el desarrollo de alimentos funcionales se usa para mejorar la salud dado el beneficio que aporta al intestino al estimular el crecimiento o actividad de una o varias especies de la microbiota intestinal, lo que otorga un efecto benéfico en la salud del consumidor. El nivel de dulzura es aproximadamente el 10% de la sacarosa, por lo que se usa como ingrediente de bajo contenido calórico (<2 kcal/g) (Karimi *et al*, 2014; Shoaib *et al*, 2016).

FODMAP, (oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables) por sus siglas en inglés, es un grupo de carbohidratos que son fáciles de digerir en el

colon, dentro de los cuales está la inulina (Shoaib *et al*, 2016). El consumo de estos determina efectos gastrointestinales como el aumento del volumen del bolo fecal, mejoría en la absorción de minerales, aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta y estimulación de bifidobacteria en el tracto digestivo. La inulina tiene otros efectos fisiológicos que incluyen el aumento en la absorción del calcio, mejora en resistencia a infecciones, estimulación del sistema inmune así como aumento de la sensación de saciedad (Roberfroid *et al*, 2010; Tian, 2013).

Este fructano es uno de los más utilizados como prebiótico y su consumo en los alimentos se considera seguro, por lo que entra en la categoría GRAS por la FDA, reconocida así en 1992. Esto indica que pueden utilizarse tanto la inulina como sus derivados, en formulaciones alimenticias, incluso en las destinadas para infantes (Madrigal y Sangronis, 2007; González-Herrera *et al*, 2015).

En la tabla 3 se muestran las especies de plantas más utilizadas por la industria y que almacenan inulina.

Tabla 3. Plantas que contienen inulina

Fuente	Parte de la Planta	Contenido (g/100g)
Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	Raíz	35
Hoja dulce (<i>Stevia rebaudiana</i>)		18-23
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Bulbo	14-23
Cebada	Granos	18-20
Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)	Raíz	11-20
Alcachofa de Jerusalén (<i>Helianthus tuberosus</i>)	Tuberculo	12-19
Espárrago (<i>Asparagus sp.</i>)	Raíz	15
Agave (<i>Agave sp.</i>)	Piña, raíz, hojas	12-15
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	Raíz	12-15
Dalia (<i>Dahlia pinnata cav.</i>)	Tubérculo	10-12
Cebolla (<i>Allium cepa, Allium sp.</i>)	Bulbo	5-9
Bardana (<i>Arctium sp.</i>)	Raíz	8.3-9.9

Fuente: Shoaib et al, 2016.

La inulina es de color blanco y sin olor, tiene un sabor ligeramente dulce, y su solubilidad depende de la temperatura. Así mismo, entra en dos categorías, tanto fibra soluble como insoluble, lo cual depende del grado de polimerización, es decir, entre más corta sea la cadena mayor solubilidad tendrá (Karimi et al, 2014).

Por ejemplo, para su uso en la industria normalmente se requiere que la inulina se disuelva para producir geles que dan textura y volumen a los alimentos.

3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA INULINA

Los enlaces de la inulina son de tipo lineal β -(2-1) D-fructosil-fructosa entre los residuos de fructofuranosa, con un residuo de glucopiranososa terminal (Figura 8). La configuración β del carbono anomérico hace que las moléculas sean indigeribles en el intestino del ser humano, sin embargo puede ser fermentada por la microflora y es considerada fibra dietética, por tanto, promueve los movimientos intestinales.

Los fructanos del tipo de las inulinas inicialmente presentan una molécula de glucosa a partir de la cual se le unen por lo menos dos residuos de fructosa (Urías-Silvas, 2008).

En la inulina de origen vegetal, las unidades de fructosa enlazados a la glucosa terminal puede variar de 2 hasta 70, definiéndose como un polifrufructano con grado de polimerización mayor a 30 unidades (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010; Ricca *et al*, 2007). La 1-cestosa y la neocestosa corresponden a las moléculas más cortas de la inulina y neoserie de inulina, respectivamente (Vijjn y Smeekens, 1999).

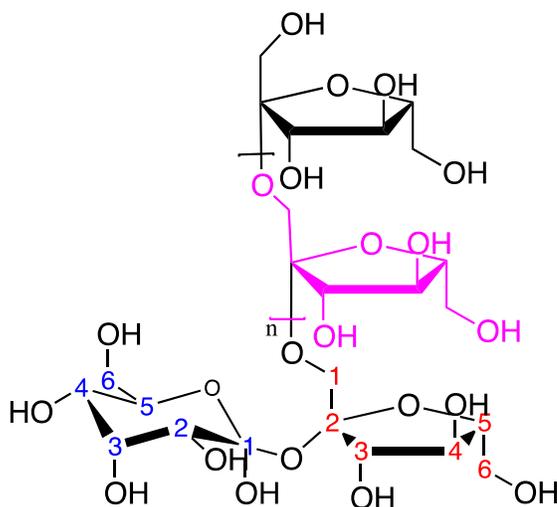


Figura 8. Estructura de la inulina.

3.3 OBTENCIÓN DE LA INULINA

Para obtener la inulina a partir de la alcachofa Flores *et al*, (2016), describen el siguiente procedimiento: la planta se lava y se pela, para posteriormente ser cortada en trozos pequeños, este material se seca, muele y tamiza para obtener un polvo fino, el cual puede usarse directamente como fuente de carbono sin necesidad de otro tratamiento. Sin embargo, para obtener la inulina más pura, se puede obtener a partir de agua hirviendo, ajustando su pH a 9.5 con NaOH, después se realiza un filtrado y a una temperatura de 65°C se neutraliza. El material filtrado se concentra, a esto se le aplica un lavado con acetona y se seca. Para una purificación adicional, el polvo obtenido en el paso anterior se disuelve en agua caliente y se enfría a una temperatura de 4°C. El precipitado generado se recupera por medio de una filtración, se lava varias veces con acetona y se realiza otro secado para obtener el polvo de inulina. Con el proceso descrito se obtuvo un rendimiento de 16.5%, con un 91% de pureza y un grado de polimerización de 33 unidades.

3. 4 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA INULINA

La hidrólisis ácida es un método sencillo y no es caro, además la reacción se controla con la neutralización del medio. Los ácidos que se utilizan a nivel industrial para llevar a cabo la despolimerización de los polisacáridos son: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido trifluoroacético. Generalmente, este proceso se realiza a altas temperaturas, arriba de los 60°C, y con un tiempo de entre 2 y 6 horas. Las desventajas de este método son el rendimiento bajo de fructooligosacáridos y la generación de compuestos tóxicos como: el furfural, formado a partir de la

degradación de las pentosas (fructosa, xilosa, arabinosa) y el HMF, el cual se genera a partir de las hexosas (glucosa, manosa, galactosa) (Figura 9). Además, la longitud de las cadenas varía mucho, lo cual es un factor para monitorear de manera constante la concentración del ácido, temperatura y tiempo de reacción (De Moura *et al*, 2014).

Ávila-Fernández *et al*, (2011), realizaron una reacción con ácido clorhídrico 0.54 N, a 60°C para producir fructooligosacáridos del agave, sin embargo este proceso tuvo desventajas, como baja producción de oligosacáridos y la degradación de polisacáridos con la subsecuente formación de estas sustancias tóxicas. Una alternativa a la hidrólisis química es la hidrólisis enzimática, en donde se emplean enzimas como catalizadores. Estas reacciones se llevan a cabo a condiciones suaves de reacción (temperatura y pH) sin la generación de subproductos adicionales.

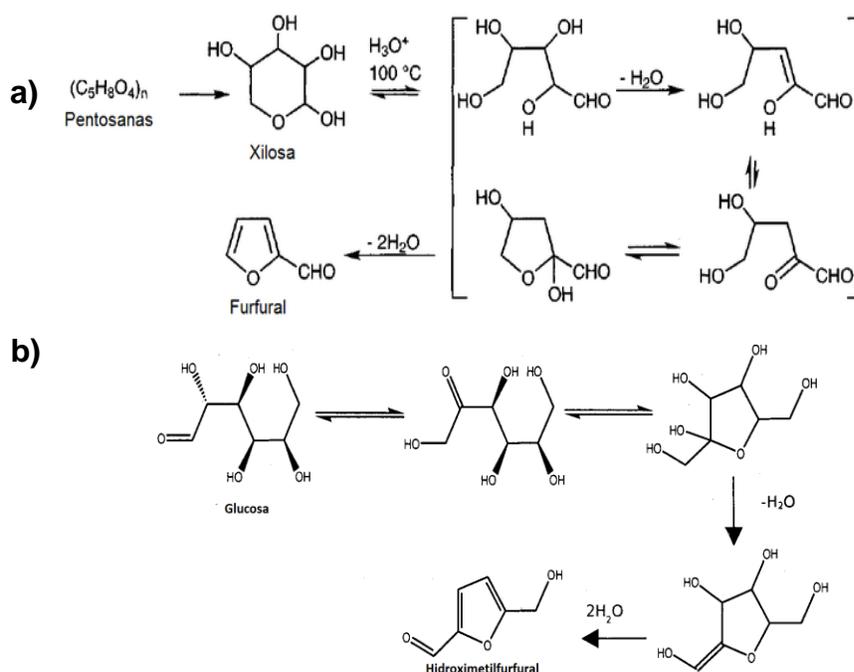


Figura 9. Reacciones de generación de a) furfural y b) hidroximetilfurfural.

CAPÍTULO 4. ENZIMAS.

4.1 HIDRÓLISIS DE LA INULINA

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de las reacciones químicas. Se clasifican en 6 grupos dependiendo de su función catalítica específica: 1) oxido-reductasas, 2) transferasas, 3) hidrolasas, 4) liasas, 5) isomerasas y 6) ligasas.

Las hidrolasas catalizan las reacciones en las que el agua participa en la ruptura de enlaces covalentes de un sustrato con la adición de elementos del agua a los elementos de ese enlace (Figura 10).

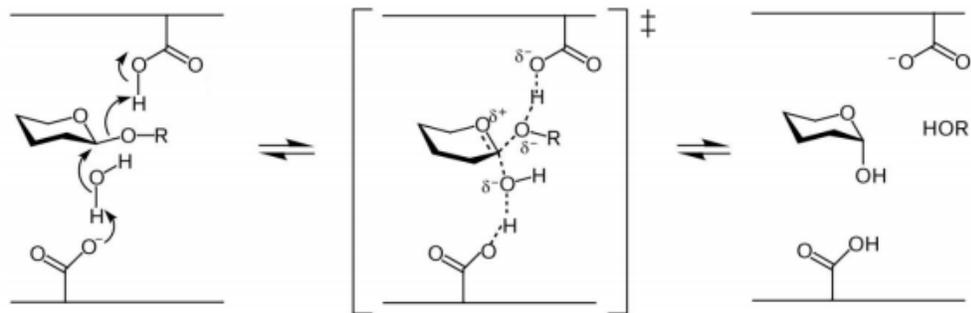


Figura 10. Mecanismo de hidrólisis de una glucosidasa.

Como ya se ha mencionado, tanto la fructosa como los fructooligosacáridos son de gran importancia para las industrias de alimentos. La fructosa es considerada como un endulzante alternativo por sus beneficios, uno de ellos es aumentar la absorción de hierro en niños, además de tener un poder edulcorante alto, en cambio la sacarosa se relaciona por ser cariogénica. La fructosa es más soluble y menos

viscosa que la sacarosa y a niveles bajos puede ser metabolizada sin la necesidad de la insulina.

La enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces β -D-(2-1)-fructosídicos en la inulina se le denomina inulasa o β -D-(2-1)-fructano-fructohidrolasa, conocida mejor como inulinasa, esta enzima pertenece al grupo de las fructofuranosidasas, a la familia de las glicosil hidrolasas (Holyavka *et al*, 2016).

Las inulinasas han sido producidas con microorganismos que utilizan como fuente de carbono a carbohidratos como la inulina, sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, xilosa, rafinosa y maltosa o residuos agro-industriales como harina de maíz y de avena, bagazo y salvado de trigo, estos últimos son mejores para la industria porque son de bajo costo, además que su contenido de azúcares es mayor que aquellos sustratos puros. Los principales productos de reacción son los fructooligosacáridos, la fructosa y la glucosa (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010; Neagu y Bahrim, 2011; Naveen y Sumat, 2011).

Los productos a partir de este proceso pueden ser transformados en etanol, ácido cítrico, 2,3-butanediol, manitol, y sorbitol (Tabla 4). De esta forma, se considera que la inulina tiene un enorme potencial para ser utilizada en industrias de alimentos, farmacéuticas y de biocombustibles (Neagu y Bahrim, 2011; Tian, 2013; Flores *et al*, 2016).

Tabla 4. Ejemplos de proceso y productos obtenidos en la transformación de azúcares.

Producto	Proceso	Usos	Fuente
Etanol	A partir de glucosa y sacarosa utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Combustible Potenciador de gasolina	Zhang <i>et al</i> , 2010.
Ácido cítrico	Fermentación sumergida de sacarosa o glucosa con los hongos <i>Aspergillus niger</i> , y <i>Yarrowia lipolytica</i> .	Saborizante Acidificante Conservador Estabilizante Blanqueador en detergentes	Liu <i>et al</i> , 2010.
2,3-butanodiol	Fermentación de materia lignocelulósica, por la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Químico de base biológica y combustible líquido	Liu <i>et al</i> , 2010.
Manitol	Hidrogenación catalítica de jarabes de fructosa o glucosa/fructosa. Fermentación bacteriana de fructosa por <i>Lactobacillus</i> o <i>Leuconostoc</i> .	Polioles usado en industrias de alimentos, farmacéuticas y químicas. Edulcorante.	Saha, 2006.
Sorbitol	Hidrogenación catalítica de jarabes de fructosa o glucosa/fructosa.	Edulcorante Absorbente de humedad.	Saha, 2006

Para la síntesis enzimática de FOS se utilizan las β -fructofuranosidasas y frucosil-transferasa, la primera hidroliza los carbohidratos mientras que la segunda transfiere grupos fructosilo a otra molécula. De acuerdo a esto, los mecanismos

catalíticos se dividen en dos: 1) hidrólisis enzimática de fructanos con un proceso de endo o exodegradación y 2) síntesis enzimática a partir de sacarosa, la primera es llevada a cabo por las hidrolasas y la segunda por las transferasas, debido a esto las inulinasas entran en estos dos grupos de enzimas. Cuando el agua actúa como nucleófilo la enzima actúa como una hidrolasa para liberar glucosa y fructosa, y cuando la sacarosa es el nucleófilo la enzima actúa como fructosiltransferasa. Los microorganismos producen enzimas que tienen tanto actividad de hidrolasa como de transferasa, como las de *A. niger* (Mutanda *et al*, 2014). Las inulinasas pueden derivarse a partir de plantas y microorganismos, siendo estos últimos capaces de producir suficiente enzima para aplicaciones industriales (Ricca *et al*, 2007).

Por esta razón, se han realizado muchos estudios en las últimas tres décadas con el fin de encontrar la mejor fuente microbiana para la producción de inulinasas, ya sean hongos, levaduras o bacterias (Tabla 5) (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010). Ricca *et al* (2007) y Neagu y Bharim (2011), mencionan que los microorganismos más estudiados pertenecen a la especie *Aspergillus* spp. para hongos y a *Kluyveromyces* spp. para levaduras, esto por ser los que mejores rendimiento han dado, tema que se detalla más adelante.

La actividad y estabilidad depende de la respuesta de la enzima a los cambios de pH y temperatura, siendo los valores más altos generalmente para bacterias y levaduras. Desde el punto de vista industrial, los intervalos de estos parámetros son muy importantes porque significa mayor flexibilidad en las condiciones de

producción, sin embargo también son de importancia otros factores como la estabilidad y solubilidad de la enzima (Tabla 5) (Ricca *et al*, 2007).

Tabla 5. Características de inulinasas extraídas de algunos microorganismos.

Procedencia	Nombre	Tipo de enzima	T (°C)	pH	Actividad (U/mL)	Referencia
Bacterias	<i>Streptomyces</i> spp.	Exo-inulinasa	60	---	89 U/gds	Ricca <i>et al</i> , 2007 Neagu y Bahrim, 2011
	<i>Bacillus</i> spp.	Exo-inulinasa	60	7	42	Gavrailov e Ivanova, 2014
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	Exo-inulinasa	55	4.3	60	Neagu y Bahrim, 2011 Ricca <i>et al</i> , 2007
	<i>Aspergillus ficuum</i>	Exo y endo-inulinasa	40	4.5	194 U/gds	Chen <i>et al</i> , 2011
Levaduras	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Exo-inulinasa	60	3.5	194	Neagu y Bahrim, 2011
	<i>Cryptococcus aureus</i>	Exo-inulinasa	28	5	63	Naveen y Sumat, 2011

Esta enzima hidroliza a la inulina produciendo fructosa prácticamente pura, la cual es usada ampliamente en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1.5 a 2 veces la sacarosa (Ricca *et al*, 2007).

Las inulinasas se clasifican también en dos de acuerdo al efecto que tienen sobre los enlaces de la molécula de inulina, ya sea que produzcan oligofruktanos o fructosa. De esta forma se dividen en endo y exo-inulinasas.

Las exo-inulinasas o β -D-fructan-fructanohidrolasa, hidrolizan los enlaces β -(2-1) terminales, comenzando con la separación de la primera molécula de la D-fructosa del extremo no reductor y continúa una por una hasta romper el último enlace, con esto se obtienen moléculas libres de D-fructosa y una de D-glucosa por cada molécula de inulina, estas pueden ser utilizadas para la producción de jarabe de alta fructosa (sacarificación). Los sustratos naturales para las exo-inulinasas son la inulina, levanos y sacarosa (Nagem *et al*, 2004).

Las endo-inulinasas o 2,1- β -D-fructan-fructanohidrolasa, hidrolizan los enlaces β -(2-1) dentro de la molécula produciendo FOS de varios tamaños, principalmente inulo-triosa, inulo-tetrosa e inulo-pentosa (Gavrailov e Ivanova, 2014), son utilizadas para la producción de inulo oligosacáridos de diferentes longitudes (Figura 11).

Una mezcla de endo y exo-inulina podría resultar en una mejor conversión de inulina a fructosa comparando con el uso de una sola de ellas, es decir, de una enzima aislada pura. Esto es, las endo-inulinasas rompen las moléculas en oligosacáridos, aumentando los puntos de ataque para las exo-inulinasas y resultaría así un incremento en la velocidad de reacción de inulina a fructosa (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

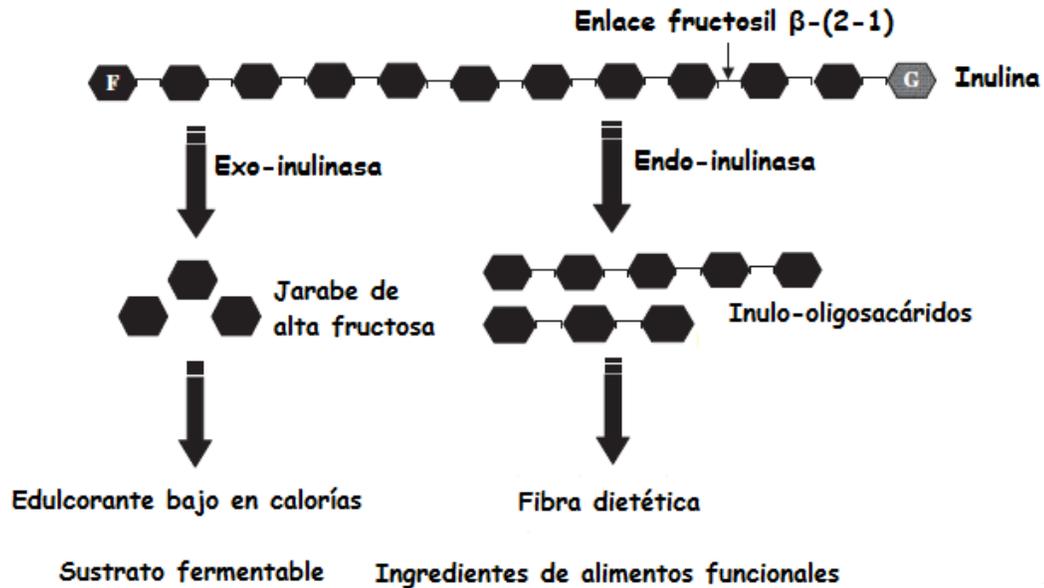


Figura 11. Acción de las enzimas exo y endoinulinasas sobre la inulina (Naveen y Sumat, 2011).

Las exo-inulinasas ejercen también actividad catalítica sobre la sacarosa, hidrolizándola en glucosa y fructosa, a esto se le conoce como actividad invertasa. De acuerdo con Ricca *et al* (2007), este tipo de actividad es mayor en enzimas producidas por levaduras que las de mohos. En este mismo artículo hacen mención que dependiendo del pH la enzima puede tener dos modos de acción: de cadena simple o múltiple, es decir, a pH 3 la enzima ataca aleatoriamente el final de la cadena de diferentes polisacáridos, mientras que a pH entre 5 y 7 la enzima actúa sobre una sola molécula de inulina, esto termina cuando se ha degradado por completo en fructosa y glucosa.

Los FOS producidos por la hidrólisis a partir de las endo-inulinasas se asemejan a su síntesis a través de la catálisis por la fructosil-transferasa en la transfructosilación de la sacarosa, exceptuando que el producto no siempre contiene el residuo de glucosa (Tian, 2013).

4.2 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN INULINASAS

Recientemente, se han buscado nuevas inulinasas que toleren condiciones extremas para su aplicación a nivel industrial. La hidrólisis de fructanos llevada a cabo con fructosidasas microbianas se puede dividir en tres clasificaciones (Muñoz-Gutiérrez *et al*, 2009):

- a) β -fructofuranosidasas no específicas, hidrolizan enlaces β -(2-1) o β -(2-6) terminales. Un ejemplo de esta enzima es la exoinulina.
- b) Endoinulinasas, específicas de enlaces internos β -(2-1) de la inulina.
- c) Endolevanasas, específicas de enlaces internos β -(2-6).

Las enzimas producidas por distintos microorganismos se distinguen entre sí por el rendimiento obtenido, el cual se mide en unidades de actividad enzimática/mL de caldo de cultivo (U/mL) o unidad de actividad/mg de células (U/mg) y sus propiedades, que dependen del tipo de microorganismo empleado, el modo de fermentación, el medio de cultivo y condiciones de incubación. Estas enzimas se diferencian entre sí por su peso molecular, siendo las exo-inulinasas de aproximadamente 74 kDa y las endo-inulinasas de 64 kDa (Ricca *et al*, 2007).

La propiedad de actuar de manera exo o endo de la enzima depende del origen del microorganismo, las inulinasas provenientes de hongos son generalmente de actividad exo (Ricca *et al*, 2007).

El uso de inulinasas provenientes de microorganismos se ha propuesto como uno de los métodos más eficientes para la producción de fructooligosacáridos (Prabhjeet y Kaur-Gill, 2006). Esto debido a que son de fácil cultivo y el rendimiento de enzima obtenido es alto.

Se han reportado varias cepas microbianas con actividad de esta enzima, siendo las más comunes las levaduras *Kluyveromyces* spp. (176 U/mL), *Pichia* spp. (60 U/mL) y *Candida* spp. (40 U/mL) y los hongos *Penicillium* spp. (50 U/mL) y *Aspergillus* spp. (75 U/mL) (Ricca *et al*, 2007; Tian, 2013; Gavrailov e Ivanova, 2014). En este último microorganismo se han identificado los dos tipos de enzimas, tanto la endo como la exo (Goosen *et al*, 2008).

La información de biosíntesis de inulinasas a partir de bacterias es escasa, pues su producción no es comparable con las levaduras y hongos. Sin embargo, dada la habilidad de las bacterias para sobrevivir a altas temperaturas, se han buscado aquellas que producen inulinasas. Unos buenos productores de dicha enzima es *Streptomyces* spp (32 U/mL) y *Bacillus* spp, con esta última se obtuvo un rendimiento de 42.36 U/mL, utilizando sacarosa como sustrato (Gavrailov e Ivanoca, 2014). Ricca *et al*, (2007) reporta también a *Pseudomonas* sp. (15 U/g), *Staphylococcus* (0.634 U/mL) y *Xanthomonas* sp. (15 U/mL) (Naveen y Sumat, 2011) como cepas bacterianas productoras de inulinasas.

Cabe mencionar que las levaduras tienen la ventaja sobre los mohos de tener mayor velocidad de generación celular y adaptabilidad a distintas condiciones y modos de cultivo.

El peso molecular de la inulinasa supera los 50 kDa, y depende del microorganismo de procedencia, si es extra o intracelular, de su modo de acción y los sustratos utilizados durante la fermentación. El peso de las inulinasas producidas por bacterias es similar a las de levaduras (endo-inulinasas). Para las enzimas producidas por hongos, el peso varía entre 50 y 300 kDa (Tabla 6) (Ricca *et al*, 2007).

Tabla 6. Peso molecular de la inulinasa de diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso Molecular kDa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	58
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	250
<i>Cryptococcus aureus</i>	60
<i>Pichia guilliermondii</i>	50-54
<i>Arthrobacter</i> spp.	75
<i>Aspergillus niger</i>	70
<i>Penicillum</i> spp.	68
<i>Fusarium oxysporum</i>	300

Fuente: Neagu y Bahrim, 2011.

4.2.1 *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus fue descrita por primera vez en 1888 por E.C. Hansen, quien la aisló de uvas (Graciano *et al*, 2008). Ha sido aislada de una gran variedad de ambientes, productos lácteos, bebidas fermentadas y material vegetal en descomposición, como consecuencia de esto, ha sido investigada para la producción de las enzimas β -galactosidasa, β -glucosidasa, inulinasa y poligalacturonasa, pues para sobrevivir a dichos ambientes debe producir estas enzimas (Huerta-Alcocer *et al*, 2014).

Para la producción de la enzima, es de gran interés la levadura *Kluyveromyces marxianus*, desde que se consideró como GRAS y QPS en Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente, y fue aceptada por la FDA, se le considera como la más efectiva para la producción de inulinasas con fines alimentarios y biotecnológicos (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010). La inulinasa proveniente de esta levadura es adecuada para su aplicación en la industria, debido a que tiene la mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microorganismo eucarionte y puede crecer sobre los 52°C. Esta característica es muy importante debido a que la inulina es insoluble en agua fría, por lo que para ser procesada y transformada se necesitan temperaturas más elevadas. Además, para producir la inulinasa, este microorganismo no solo utiliza a la inulina, sino también a la sacarosa, fructosa y glucosa (Neagu y Bahrim, 2011). Las enzimas β -galactosidasa y β -glucosidasa, se utilizan para hidrolizar la lactosa en alimentos y la celulosa, respectivamente

(Graciano *et al*, 2008). Todas estas características hacen de esta levadura la mejor opción para muchos procesos biotecnológicos.

Es importante señalar que desde un punto de vista industrial la inulina proveniente de materias primas vegetales es considerada como la mayor fuente de carbono, más que la inulina pura, esto ha sido comprobado en experimentos, como los que se describen a continuación (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010). Jain *et al*, (2012), utilizaron *K. marxianus* MTCC 3995, obtenida de la colección de cultivo de tipo microbiano (MTCC) en Chandigarh, India. Para la producción de la enzima se utilizaron: un medio de cultivo con extracto de dalia como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, otro medio fue con inulina pura, sacarosa, fructosa y glucosa como fuentes de carbono, ambas se incubaron durante 48 horas, a 120 rpm y a 28°C. El filtrado se incubó con inulina disuelta al 1% m/v en buffer de acetato de sodio pH 5, a una temperatura de 50°C durante 30 minutos. Con este último ensayo se estudiaron los efectos de la temperatura y el pH a diferentes valores. Por último, los azúcares reductores liberados de la reacción se midieron con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se leyó su absorbancia a 540 nm. Se determinó de esta manera que hubo mayor actividad de la enzima con extracto de dalia que con inulina pura. A continuación se muestran los gráficos obtenidos para pH y temperaturas óptimos.

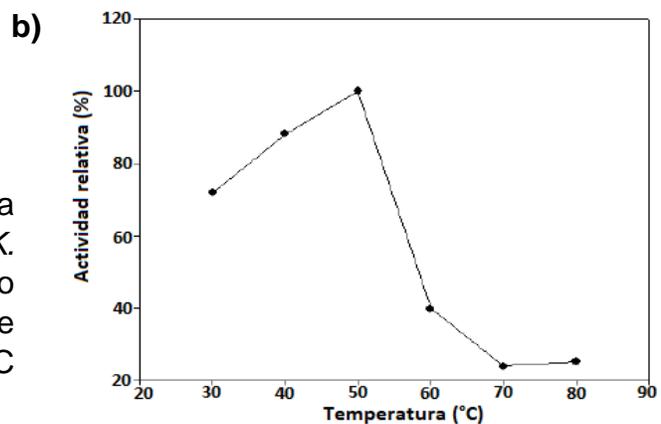
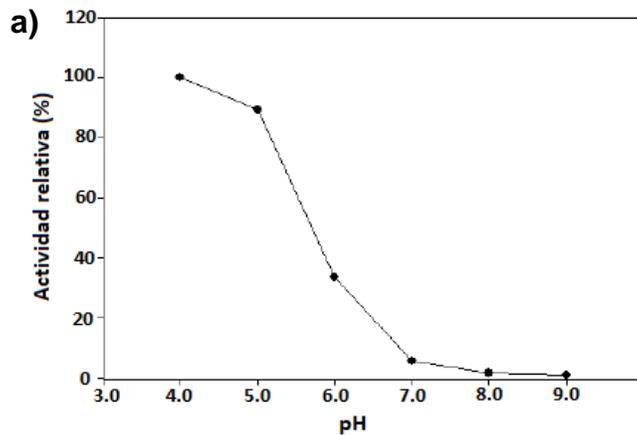


Figura 12. a) Efecto del pH en la actividad de la inulinasa de *K. marxianus* MTCC 3995. b) Efecto de la temperatura en la actividad de la inulinasa de *K. marxianus* MTCC 3995 (Jain *et al*, 2012).

La producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* se realizó en extracto de yacón al 30 % v/v, mostrando un potencial alto de 4.1 U/mL a las 16 horas de incubación, tuvo una capacidad de adaptación en distintos sustratos y un gran crecimiento a diferentes valores de pH, siendo el óptimo de 3.5, y a temperaturas de entre 20 y 40 °C.

Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, (2010), describen la composición de un medio de cultivo adecuado para obtener el mayor rendimiento de inulinasa por *Kluyveromyces* S120. La composición de dicho medio fue de 12.72% de inulina,

10.76% de licor de maceración de maíz como fuente de nitrógeno y 1.61% de sulfato de amonio, se utilizó salvado de trigo como sustrato sólido. Con este medio se alcanzó un rendimiento máximo de 409.9 U/g de sustrato seco inicial.

En otro estudio se obtuvo una alta actividad de la inulinasa, con un valor de 50.2 U/mL utilizando un extracto pulverizado de raíz de espárrago con 4% de inulina, a 30°C.

Se demostró que el tipo de sustrato tiene efecto sobre la naturaleza de la enzima, extra o intracelular. Esto depende principalmente de la clase de microorganismo empleado, siendo que la mayoría de los hongos produce enzima extracelular, es decir que son secretadas al medio de cultivo cuando se crece el microorganismo, mientras que las levaduras producen ambas, ya sea en el medio de cultivo o en la célula (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

En un estudio realizado se optimizaron los parámetros de proceso para la producción de inulinasa. Se demostró que el rendimiento aumentó con el incremento del pH inicial del medio hasta un valor de 6.5 a una temperatura de 30°C. Así mismo se evaluó el efecto de la aireación (150 rpm) y agitación (1 vvm).

La variación de la velocidad de agitación afecta tanto la disponibilidad de oxígeno como la influencia sobre la disponibilidad de los nutrientes en el medio. Se concluye que la aireación y agitación son factores críticos para la levadura *Kluyveromyces marxianus*, debido a que le ayudan en la viabilidad y producción enzimática (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

Los estudios realizados por García-Aguirre *et al*, (2009) confirman que esta levadura tiene un gran potencial para usarse en la hidrólisis de la inulina, y en industrias de alimentos y fermentaciones. En un ensayo realizado a partir del *Agave tequilana* weber var. azul, reveló que un 61% del sustrato fue hidrolizado por la enzima de *K. marxianus*, obteniendo de esta forma fructosa y glucosa como productos principales durante las primeras 48 horas. El producto obtenido de este proceso se analizó con HPLC, el cromatograma confirmó que la solución obtenida contenía un 95% de fructosa, un 5% de glucosa y estaba libre tanto de sacarosa como de compuestos contaminantes como HMF (Figura 13), compuesto que se presenta fácilmente en la hidrólisis ácida. Se confirma de esta forma que la levadura estudiada puede usarse para la producción de jarabes de alta fructosa.

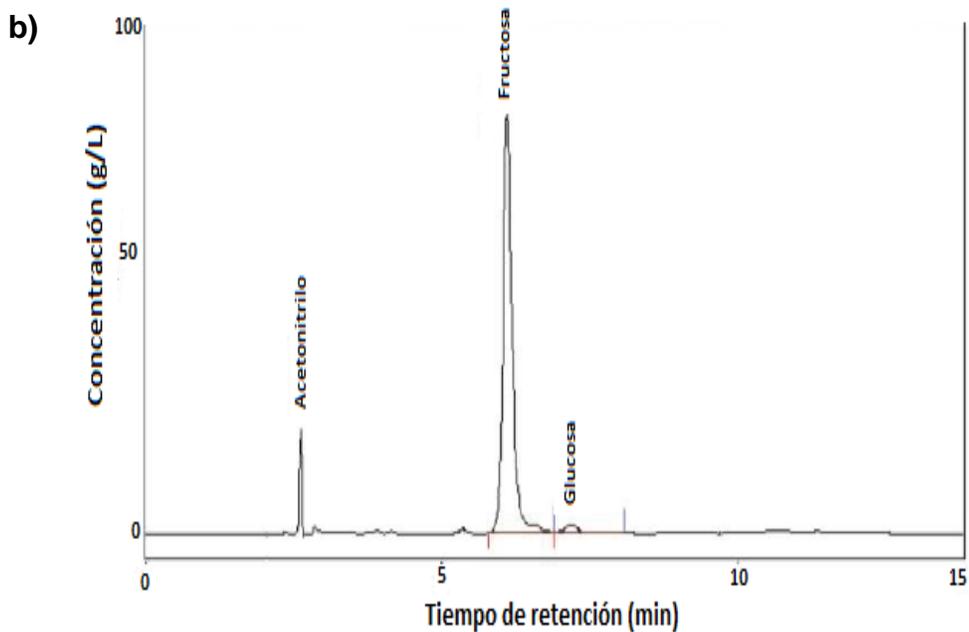
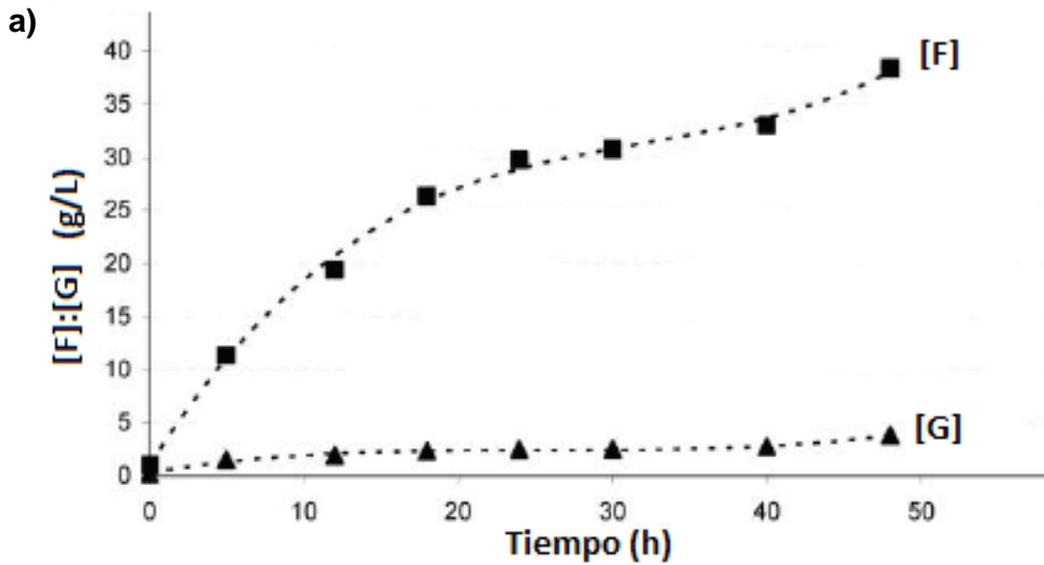


Figura 13. a) Perfil de concentración de fructosa y glucosa en función del tiempo en el proceso de hidrólisis enzimática de fructooligosacáridos del agave. b) Perfil en HPLC del proceso enzimático con la inulinasa de *K. marxianus* en fructooligosacáridos del agave (el acetonitrilo es el disolvente) (García-Aguirre *et al*, 2009).

4.3 PURIFICACIÓN DE LA INULINASA

Para purificar una enzima es necesario conocer su fuente, su complejidad, distribución de cargas y sus propiedades fisicoquímicas. Los métodos se basan en tamaño, polaridad, solubilidad, entre otras características.

La purificación de la inulinasa microbiana se realiza mediante métodos de centrifugación, ultrafiltración, afinidad, precipitación con solventes o sales, cromatografía de intercambio iónico y de permeación en gel. Para la inulinasa intracelular se requiere disrupción celular antes de llevar a cabo los métodos antes mencionados (Castillo-Calderón y Chamy-Maggi, 2010).

Generalmente se utiliza sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ para el método de precipitación por sales, en este procedimiento las proteínas aumentan su solubilidad al incrementar la concentración de sales, pero disminuye cuando se aumenta en exceso y entonces la proteína precipita, esto sucede por la separación de los iones de la sal. Como ejemplo, se purificó la endo-inulinasa de *Bacillus smithii* usando este método junto con cromatografía de intercambio iónico, lo cual asegura un mayor porcentaje de pureza.

La cromatografía de afinidad es una de las técnicas más avanzadas de purificación y es la que comúnmente se utiliza, pues es selectiva, tiene una alta resolución, la recuperación del material de interés es de alto rendimiento y se utiliza un solo paso de purificación. Este método separa las proteínas en función de su especificidad de fijación de ligandos (Singh *et al*, 2016).

Arrizon *et al*, (2011), utilizaron el método de ultrafiltración (100 kDa) para purificar la inulinasa de *K. marxianus*. Esto se realiza mediante membranas porosas que separan o concentran los componentes conforme a su tamaño o peso molecular. Posteriormente el filtrado se aplicó a una columna de intercambio iónico (monoQ Sepharose) equilibrada con buffer Tris-HCl pH 7.8. La muestra se eluyó con ese mismo buffer y NaCl, al final se cuantificó la concentración con UV a 280 nm.

Para purificar una enzima intracelular se debe llevar a cabo una disrupción celular, Tian (2014) describe el método realizado en su experimento con *Bacillus amyloliquefaciens*. Para recuperar la enzima, las células se suspendieron en buffer de fosfatos (pH 6) y se sonicaron a 2 kHz. Posteriormente se realizó una centrifugación a 9800 rpm a una temperatura de 4°C, el extracto se recuperó y se precipitó con polietilenglicol (30% v/v), esto se filtró con buffer de fosfatos de potasio (pH 6) mediante una membrana de 5-6 kDa a 4°C y se liofilizó.

4.4 ESTRUCTURA QUÍMICA Y CRISTALÓGRAFICA DE LA INULINASA

Hay pocos reportes sobre la estructura de las inulinasas, en uno se desarrolló un modelo de la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* por cristalografía de rayos X. La secuencia de los aminoácidos de esta enzima revela que pertenece al grupo de familia de las glicosilhidrolasas 32, dicha familia incluye a la invertasa, la inulinasa, la levanasa y dos tipos de 1-fructosil transferasa (Nagem *et al*, 2004).

La proteína está compuesta por dos dominios: el catalítico, de mayor tamaño, compuesto por 353 aminoácidos y por un plegamiento de 5 hojas β -propela, el segundo dominio está compuesto por 156 aminoácidos y dos hojas β . La estructura

revela dos residuos importantes: Asp41 y Glu241, los cuales se comportan como nucleófilo y como donador de protones, respectivamente (Figura 14). El residuo Asp189, proporciona enlaces de hidrógeno importantes para el reconocimiento del sustrato. La estructura está basada en otra glicosilhidrolasa de una levadura, la secuencia de aminoácidos revela un 36% de identidad y un 52% de similitud entre estas dos enzimas (Nagem *et al*, 2004).

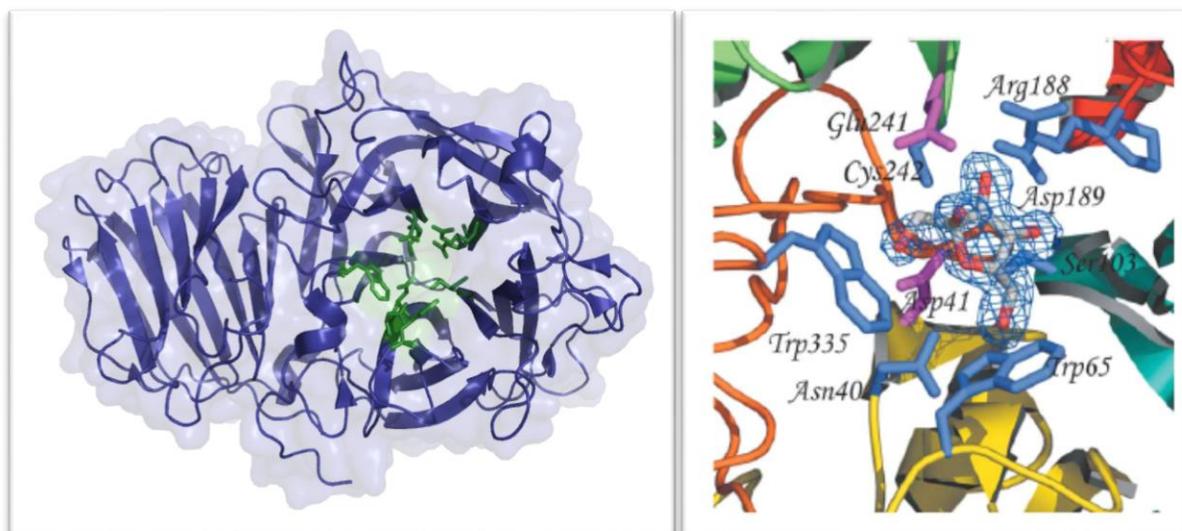


Figura 14. Estructura de la inulinasa de *Aspergillus awamori* y fructosa unida a la enzima, junto con los residuos catalíticos (Nagem *et al*, 2004).

4.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INULINASA

La hidrólisis del enlace glucosídico se produce con la generación de dos posibles estereotipos: la inversión o retención de la configuración anomérica (Tian, 2013). Así mismo, requiere de dos residuos catalíticos: un donador de protón y un nucleófilo (Figura 15) (Nagem *et al*, 2004; Holyavka *et al*, 2016). La distancia entre

los residuos catalíticos para las enzimas de retención e inversión es aproximadamente de 5.5 Å y 10 Å, respectivamente.

Mediante estudios de mutación sitio dirigida de los residuos equivalentes de la enzima de *Bacillus subtilis*, se comprobó que estos dos residuos juegan un papel muy importante en la catálisis. El residuo Asp41 es el nucleófilo, mientras que el Glu241 es el donador de protón (Nagem *et al*, 2004).

En el primer paso, uno de los grupos carboxilo funciona como catalizador ácido y protona al oxígeno del glucósido con la concomitante ruptura del enlace. El otro carboxilo conduce un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del fructosilo y forma un intermediario covalente fructosa-enzima.

En el segundo paso, el carboxilato de la cadena lateral, que actúa como un ácido, desprotona a la molécula de agua, la cual ataca el centro anomérico y desplaza al azúcar (Tian, 2013).

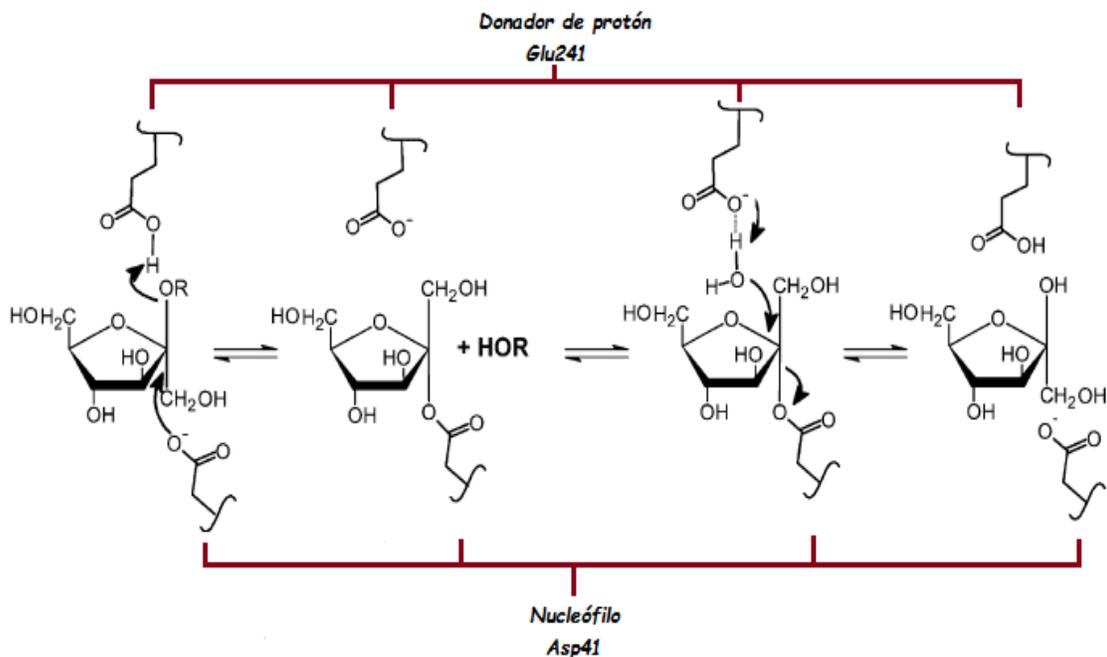


Figura 15. Mecanismo de reacción, interviniendo Asp41 y Glu241, en la hidrólisis de la R= unidades de fructosa de la inulina (Nagem *et al*, 2004).

CAPÍTULO 5. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y FRUCTOSA.

5.1 ¿QUÉ SON LOS FOS?

Los fructooligosacáridos son moléculas que contienen residuos fructosilos unidos con enlaces glicosídicos β -(2-1) o β -(2-6). Pueden ser de varios tipos, como se muestran en la figura 16 (Tian, 2013):

- Inulina: enlaces lineales β -(2-1), la molécula más pequeña de este tipo es la 1-cestosa.
- Neoinulina: su estructura consiste en unidades de fructosa que se unen con los carbonos 1 y 6 mediante ambos tipos de enlace, β -(2-1) y β -(2-6), la neocestosa es la más pequeña en esta categoría.
- Levano: consisten en enlaces lineales β -(2-6), el trisacárido 6-cestosa corresponde a la más pequeña.
- Neolevano: predomina el enlace β -(2-6) entre las moléculas de fructosa que se unen a la glucosa de la molécula sacarosa.
- Mezclas de levano: se componen de ambos enlaces, β -(2-1) y β -(2-6), entre las moléculas de fructosa, la más pequeña es el trisacárido bifurcosa.

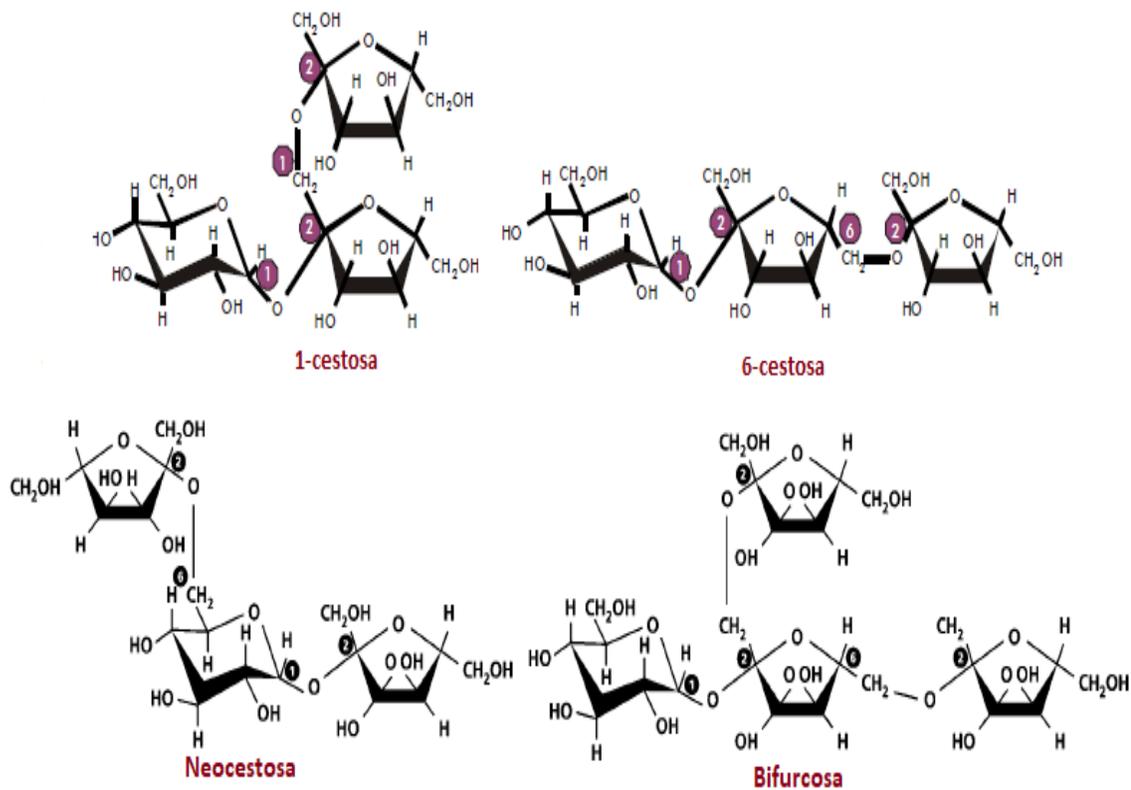


Figura 16. Estructura química de las moléculas de FOS. (Banguela y Hernández, 2006; Ritsema y Smeekens, 2003).

Los efectos en la salud que provocan los carbohidratos no digeribles, tales como fibra dietética, oligosacáridos o el almidón resistente, han sido razones suficientes para continuar estudiándolos. Los oligosacáridos han ido ganando terreno debido a los beneficios al consumirlos. Estos han sido comercializados desde los 80's como agentes de volumen en formulaciones. Recientemente ha crecido el interés por la industria de alimentos para ser utilizados en comida más saludable (Patel y Goyal, 2011).

De acuerdo a la IUPAC, los fructooligosacáridos contienen de 3 a 10 residuos de azúcar, siendo la fructosa la que se encuentra en mayor cantidad. El número de residuos es lo que determina el grado de polimerización del oligosacárido.

Los FOS tienen la capacidad de aumentar la viscosidad del producto y de alterar la temperatura de congelamiento de los alimentos (Tian, 2013). También son de creciente interés como endulzantes, debido a su bajo valor calórico, por no ser cariogénicos y ser estimulantes del crecimiento o actividad de bifidobacterias que mejoran la respuesta inmune intestinal (Tian, 2012). Gracias a que no son de fácil digestión por el sistema digestivo humano, son ideales para ser usados en productos de bajo nivel calórico y en dietas para diabéticos (Tian 2013).

Cuando se tienen entre 2 y 10 moléculas de fructosa en el fructano, se les denomina oligo-sacáridos o fructo-oligo-sacáridos, mientras que un fructano, es un polisacárido con más de 10 moléculas de fructosa en la cadena (Olvera *et al*, 2007).

5.2 PRODUCCIÓN DE FOS

Los fructooligosacáridos de la inulina provenientes de la achicoria son los prebióticos más comúnmente utilizados, pero no necesariamente los más potentes, ya que los FOS tienen distinto comportamiento y eficiencia dependiendo su longitud. Se pueden obtener por hidrólisis de la inulina utilizando endo-inulinasas, las enzimas utilizadas para este fin son generalmente provenientes de hongos como *Aspergillus niger*, y de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, como se ha explicado en el capítulo anterior (González-Herrera *et al*, 2015).

Los FOS comúnmente formados a partir de la transfructosilación de la sacarosa contienen entre 2 y 4 fructosilos unidos por enlaces β -(2-1) y con un residuo terminal α -D-glucosa, entre ellos se encuentran la 1-kestosa, la 1-nistosa y la 1-fructosilnistosa, están constituidos por una molécula de sacarosa y una, dos y tres moléculas de fructosa respectivamente, unidas a la fructosa de la sacarosa en forma lineal (Figura 17). Las principales limitaciones de los actuales prebióticos es su bajo grado de polimerización de los FOS que son producto de este método, así como la producción baja debido a la hidrólisis por las endo-inulinasas. Estas enzimas cortan aleatoriamente los enlaces β -(2-1) de la inulina, dando lugar a mezclas de β -D-fru-(2-1)-[β -D-fru-(2-1)-] $_n$ y α -D-glc-(1-2)-[β -D-fru-(2-1)-] $_n$, lo que significa que no todas las cadenas de FOS tienen en su estructura una glucosa terminal.

La longitud de los fructooligosacáridos producidos de la hidrólisis de la inulina es mayor que aquellos obtenidos de la sacarosa a través de la transfructosilación (Tian, 2013).

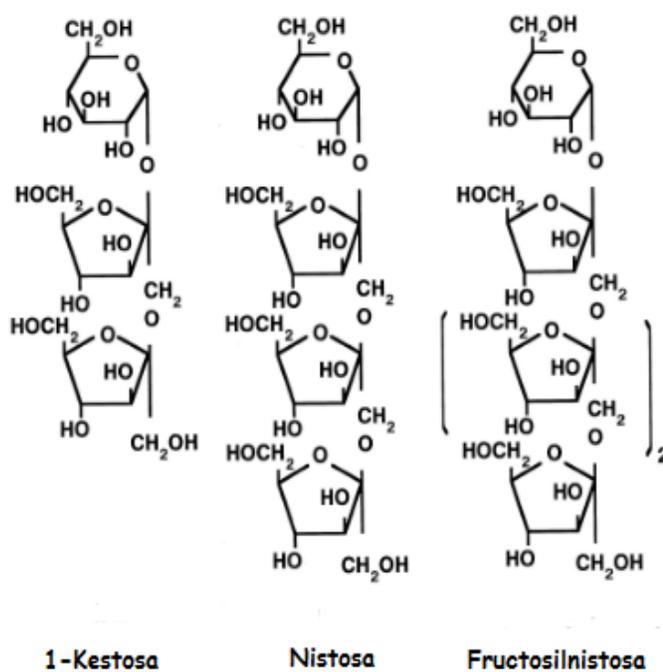


Figura 17. FOS producidos a partir de la transfructosilación de la sacarosa.

En la industria de alimentos se producen los FOS de manera sintética. Esto se realiza a partir de moléculas de sacarosa, a la que se le unen 1,2 o 3 fructosas con enlace glicosídico β -(2-1) con enzimas β -fructosidasas que poseen actividad transferasa, como la del microorganismo *Aspergillus niger* (Kaur y Grupta, 2002). Esta enzima transfiere el residuo fructosil de la sacarosa al aceptor, que pueden ser, por ejemplo: otra sacarosa para la síntesis de cestososa o un fructano para su polimerización.

Los atributos que confieren estas moléculas son dependientes de su estructura química, es decir, del grado de polimerización y el tipo de enlaces que poseen.

Los fructooligosacáridos de bajo GP muestran un sabor dulce, mientras que los de alto GP forman emulsiones con textura tipo grasa y sabor neutro, de dichas características también se ha despertado gran interés en utilizar estos carbohidratos como ingredientes alimenticios bajos en calorías y como nutracéuticos (Urías-Silvas, 2008).

5.3 FRUCTOSA

La fructosa puede también ser producida a partir del almidón por método enzimático, utilizándose α -amilasa, amilogucosidasa y la glucosa isomerasa. De esta manera, el proceso necesita de al menos tres pasos enzimáticos, resultando un rendimiento de 45% de fructosa. Por otro lado, la hidrólisis de inulina mediante el uso de enzimas microbianas y con un paso enzimático el rendimiento es de 95% (Ricca *et al*, 2007; Meenakshi *et al*, 2012).

Alternativamente, la fructosa se obtiene mediante la inversión de la sacarosa, reacción mediada por la invertasa o por la isomerización de la glucosa con la isomerasa (Figura 18). La hidrolisis ácida de la inulina no es un método adecuado para la producción de fructosa, esto porque se generan moléculas anhídras de difructosa y compuestos tóxicos que no pueden actuar como edulcorantes, provocando en el producto un color y sabor indeseables, estas sustancias requieren ser eliminadas al final del proceso.

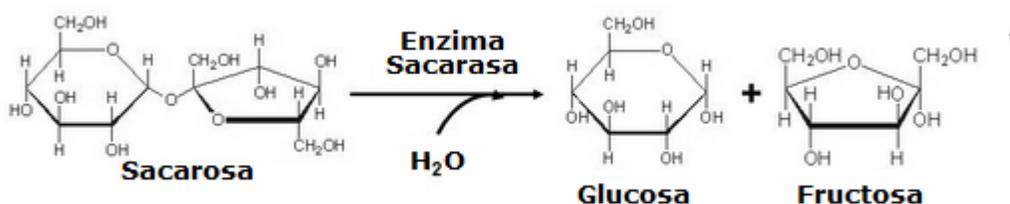


Figura 18. Reacción de la invertasa para producir fructosa.

La fructosa es 40% más dulce que la sacarosa (Olvera *et al*, 2007), y por esta razón ha tenido mucha demanda para los jarabes utilizados principalmente en bebidas carbonatadas. El interés en los jarabes ricos en fructosa se ha destacado para ser utilizados como aditivos alimenticios gracias a los beneficios que aporta a la salud, estos se asocian con la estimulación de la absorción de calcio en mujeres que han pasado por la menopausia, la absorción de hierro en niños, la prevención de cáncer de colon así como la disminución del índice glucémico (Rocha *et al*, 2006). Su solubilidad es alta, es fuente de energía, mejora la estabilidad del producto en cuanto color y sabor, y al tener un menor índice glucémico no estimula la secreción de insulina (Mutanda *et al*, 2014).

Hoy en día, estos jarabes son preferidos en lugar de los de sacarosa. Para su producción se utiliza la hidrólisis de la inulina, para lo cual se han reportado diversas especies como materia prima que son efectivas para la producción de jarabes de alta fructosa, tales como la dalia, la achicoria, la alcachofa de Jerusalén y las plantas de agave (García-Aguirre *et al*, 2009).

Sin embargo, es importante hacer mención que se ha sugerido que el aumento en la obesidad tiene que ver en el uso de los jarabes de fructosa. La fructosa es metabolizada principalmente en el hígado y a mayor velocidad comparada con la glucosa. Esto debido a que no requiere de un paso catalítico por la enzima fosfofructoquinasa (punto donde se controla la velocidad de la utilización de la glucosa). Lo mencionado provoca que las vías en el hígado se llenen de fructosa, lo que causa un incremento de síntesis de ácidos grasos y su esterificación, promoviendo la elevación de triglicéridos en la sangre y secreción de colesterol de baja densidad (Castillo-Urueta *et al*, 2003).

CAPÍTULO 6. EFECTO PREBIÓTICO Y APLICACIONES

6.1 ¿QUÉ ES UN PREBIÓTICO?

Un alimento puede considerarse como funcional si está demostrado que, gracias a los componentes que posee, reduce la probabilidad de padecer enfermedades y afecta de manera benéfica funciones del cuerpo que ayudan al bienestar (Roberfroid, 2002). Este concepto fue primeramente introducido en Japón. En 1991, se clasificó a los oligosacáridos como “alimentos para uso específico en la salud” (FOSHU). Los mercados más grandes de estos alimentos están en Estados Unidos, Europa y Japón. En China, India y Latinoamérica, aunque han ido emergiendo los alimentos funcionales, se ven limitados en el desarrollo de los mismos ya sea por la falta de información nutricional, la falta de ingresos y/o los factores culturales (Patel y Goyal, 2011).

Para que sean llamados “alimentos funcionales” se han considerado las siguientes características (Roberfroid, 2005):

- Que sea un alimento o ingrediente cotidiano.
- Que se encuentre naturalmente en los alimentos.
- Que se hayan demostrado sus efectos benéficos para las funciones del cuerpo.
- Que existan mejoras en el estado de salud, que reduzcan el riesgo a enfermarse y que mejoren la calidad de vida

Los ingredientes que se presentan de forma natural, o son adicionados a los alimentos para humanos y animales se clasifican en tres grupos:

- 1) Probióticos: microorganismos vivos que se administran en cantidades adecuadas y que proveen beneficios al huésped.
- 2) Prebióticos: compuestos como fibra que mejoran la composición de la microbiota intestinal.
- 3) Simbióticos: combinación de probióticos y prebióticos.

Los nuevos productos funcionales se han desarrollado modificando la fórmula del alimento, eliminando o reemplazando ciertos ingredientes, o añadiendo compuestos saludables. Los prebióticos representan una clase muy importante de los alimentos funcionales. El desarrollo de los alimentos que promueven una buena salud y bienestar es un tema de investigación con mucho potencial para la industria (Carvalho de Morais, 2016).

En 2008 la ISAPP, definió un prebiótico como un “ingrediente selectivamente fermentado que resulta en cambios específicos en su composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped”.

Roberfroid *et al* (2010), lo definen como “un ingrediente alimenticio no digerible que beneficia al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de las bacterias del colon y que por tanto mejora la salud”.

Las condiciones para ser considerado un ingrediente como prebiótico son (González-Herrera *et al*, 2015; Urías-Silvas, 2008):

- 1) Ser resistente a la hidrólisis de las enzimas salivales, pancreáticas, a la acidez gástrica y a la absorción del tracto gastrointestinal superior.
- 2) Ser sustrato selectivo (fermentable) para un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*.
- 3) Estimular el crecimiento o la actividad de las bacterias intestinales que se asocian con la salud y el bienestar.

6.2 EFECTOS PREBIÓTICOS

El consumo de los prebióticos ofrece ventajas al huésped debido a su selecto metabolismo en el intestino. Los metabolitos que se producen por la microbiota interactúan con el sistema inmune en la prevención o reducción de la inflamación intestinal (Carvalho de Morais, 2016).

Los componentes alimentarios de los cuales se han reportado tener efectos prebióticos son los oligosacáridos no digeribles como la inulina y los fructooligosacáridos, estos se diferencian por su grado de polimerización, siendo que la inulina contiene de 10 a 60 unidades de monosacáridos y los FOS contienen menos de 10 unidades (Roberfroid *et al*, 2010). Los oligosacáridos se diferencian por su estructura, composición, secuencia y enlaces glucosídicos. Así mismo se clasifican en digeribles y no digeribles, estos últimos son resistentes a las enzimas

digestivas del cuerpo humano debido a la presencia de enlaces β -glucosídicos. (Tian, 2013).

Los fructanos presentan una configuración β del carbono 2 anomérico en los monómeros de fructosa, por lo que son resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas: α -glucosidasa, maltasa, isomaltasa y sacarasa, éstas son específicas para enlaces α -glucosídicos, debido a esto los fructanos se clasifican como oligosacáridos no digeribles.

La hidrólisis de los fructanos desde que son ingeridos hasta llegar al intestino grueso es mínima y llegan al colon sin ser digeridos. Para que sea efectivo el fructano, es crucial la fermentación selectiva por la microbiota colónica. (Urías-Silvas, 2008)]

La acción de estimular el crecimiento de bifidobacterias y lactobacillus e inhibir patógenos como *Clostridium difficile*, se le atribuye precisamente a los prebióticos.

En el intestino humano se llevan a cabo dos tipos de fermentaciones anaeróbicas: la sacarolítica y la proteolítica. La proteolítica, la cual se produce en la región distal del colon libera productos tóxicos, como aminas y amoniaco. Por otra parte, la sacarolítica se produce en la región proximal del colon, en donde los prebióticos (los FOS) son metabolizados en ácidos grasos de cadena corta (Figura 18) (Manning y Gibson, 2004; Tian, 2013).

La degradación de las proteínas en el colon se lleva a cabo por proteasas bacterianas que son activas a pH neutro o alcalino, comienza con la hidrólisis produciendo péptidos y aminoácidos. En el colon proximal el pH es más ácido

debido a la producción de los ácidos de cadena corta a partir de la fermentación de los carbohidratos.

Los principales efectos fisiológicos de los prebióticos son los siguientes (Roberfroid, 2010):

- Mejora y/o estabilización de la composición de la microbiota intestinal.
- Mejora en las funciones del intestino (volumen, regularidad y consistencia de las heces).
- Incremento en la absorción de minerales y mejoría en la salud de los huesos (cantidad de calcio y densidad mineral).
- Regula y modula las funciones del sistema inmune.
- Reduce el riesgo de padecer infecciones intestinales.
- Reduce el riesgo a padecer obesidad y diabetes tipo 2.
- Reduce el riesgo de cáncer de colon.

La microflora benéfica a nuestro organismo produce ácidos grasos de cadena corta fermentando los FOS, como lo son el acetato, el butirato y el propionato, a los cuales se les atribuye la reducción del colesterol, incluso el riesgo de hipertensión, se les identifica también como nutrientes epiteliales del colon, moduladores del pH intracelular y colónico, reguladores de proliferación y diferenciación celular, en el transporte celular epitelial, en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el hígado, en la motilidad intestinal, y en la generación de energía en músculo, riñón, corazón y cerebro. Su acumulación disminuye el pH, lo cual tiene influencia en la composición de la microflora intestinal, incrementa la biodisponibilidad de los

minerales, disminuye la solubilidad de los ácidos biliares y reduce la absorción del amonio y otras aminos (Roberfroid, 2005).

Los FOS afectan de manera benéfica las funciones gastrointestinales modulando la estructura, composición y algunas actividades de la mucosa y microflora a través de sus productos de degradación (Tian, 2013).

El aumento de bifidobacterias ayuda a que el sistema digestivo trabaje mejor aumentando la protección y defensas contra infecciones intestinales, a un mayor aprovechamiento de minerales y nutrientes, y provoca una reducción de triglicéridos y de enfermedades intestinales como estreñimiento, diarreas y el síndrome del colon irritable.

6.3 POTENCIAL PREBIÓTICO

Puede ser evaluado por su fermentación a causa de *Bifidobacterium* y *Lactobacilli*, esto se manifiesta mediante cambios en la flora intestinal, la disminución de las bacterias patógenas, y la actividad metabólica en la producción de metabolitos benéficos a la salud. Los principales indicadores que son más frecuentemente evaluados se asocian con los cambios en la composición de la población de la microbiota y la generación de ácidos grasos de cadena corta (González-Herrera *et al*, 2015).

6.4 MECANISMO PREBIÓTICO DE LOS FOS

La inulina y los fructooligosacáridos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera benéfica al hombre. Esto es porque los carbohidratos con pequeña masa molecular son capaces de pasar fácilmente a través de la pared

celular, en cambio los de cadena larga, que constan de 10 a 65 monómeros, difícilmente lo hacen y estos son solubles en agua. Por lo tanto, el uso de la inulinasa es necesario para la industria de alimentos y bebidas (Meenakshi *et al*, 2012).

Los atributos funcionales de los fructooligosacáridos son dependientes de su estructura química, en particular del tipo de hexosas, del grado de polimerización y del enlace glucosídico (Tian, 2012).

Los beneficios de los FOS incluyen: incremento en la absorción de calcio, magnesio, fósforo y hierro, reducción de grasa y colesterol, prevención de osteoporosis y reducción del riesgo de sufrir obesidad.

Entre los principales productos de la fermentación de los FOS son los ácidos grasos de cadena corta; el acetato, que se metaboliza en músculos, hígado, corazón y riñón, el propionato que inhibe la síntesis del colesterol, y el butirato que regula el crecimiento celular (González-Herrera *et al*, 2015).

Los FOS han satisfecho los tres criterios para considerarse prebióticos. Son capaces de escapar a la digestión en el tracto superior gastrointestinal y llegar al intestino grueso, donde son selectivamente fermentados por la microbiota benéfica del intestino humano, las cuales incluyen a *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* y en menor medida *Eubacteria*, las bacterias producen la inulinasa intracelular necesaria para hidrolizar el enlace β -(2-1). Como resultado de dicha fermentación, el crecimiento de las bacterias ácido lácticas es estimulado, provocando de esta manera un incremento significativo en el número de las bacterias benéficas y reduciendo el

número de aquellas especies dañinas como *Clostridium* (Tian, 2013; Roberfroid, 2005b).

6.5 TRACTO GASTROINTESTINAL

El intestino grueso está compuesto por alrededor de 400 tipos de bacterias, siendo el colon la parte que mayor población tiene, 10^{10} a 10^{12} UFC/g. En general, las bacterias del intestino pueden ser separadas en tres grupos dependiendo de su efecto:

- 1) *Lactobacillus*, constituyen del 0.07 a 1% de la población y *Bifidobacterium* alrededor del 25 al 30%.
- 2) *Clostridium* o posibles patógenos.
- 3) Otras como *Bacteroides*, las cuales pueden tener características positivas o negativas.

Las bacterias del primer grupo se consideran probióticos, por lo que el interés para estimular su crecimiento en el intestino es cada vez mayor. En 1989, McKellar y Modler reportaron que las principales cepas probióticas en niños son *Bifidobacterium bifidum* y *B. infantis*, mientras que en adultos predominan *B. adolescentes* y *B. longum* (Urías-Silvas, 2008), sin embargo, la composición de la flora bacteriana es variable de un individuo a otro, pero sus funciones metabólicas son menos diversas (Guarner, 2002). El ambiente que está presente en el intestino grueso es indispensable para la condición física y un desbalance puede causar enfermedades.

El intestino grueso se conforma por el ciego, colon ascendente, transverso, descendente, sigmoideo y recto. Es la principal área de colonización bacteriana del tracto gastrointestinal, y a través de la microflora el colon realiza sus funciones digestivas, principalmente la hidrólisis de los carbohidratos complejos y proteínas que no se hidrolizaron ni se absorbieron en el intestino delgado.

El tiempo que tardan los residuos digestivos en el intestino grueso determina el metabolismo bacteriano, afectando la digestión de los carbohidratos y proteínas, de esta forma existe una correlación entre el tiempo de tránsito y la masa bacteriana del colon, asociándose tiempos rápidos a alto peso de heces y mayor excreción bacteriana (Urías-Silvas, 2008).

Cuando los residuos digestivos pasan al ciego, inicia la hidrólisis de carbohidratos complejos y proteínas, sirviéndoles como fuente de carbono y nitrógeno a las bacterias.

Las bacterias realizan la fermentación, produciendo ácidos, por esto disminuye el pH a 5.5 o menos en el colon proximal, por los niveles altos de sustratos disponibles el ciego y el colon ascendente son sitios con la más intensa actividad microbiana (Figura 19). La microbiota presente estimula el movimiento peristáltico, facilitando de esta forma el paso de los residuos digestivos a través del intestino.

Se demostró que al incluir inulina en la dieta cambia la composición de especies bacterianas en el intestino grueso, incrementando la población de Bifidobacteria.

Una de las principales actividades de los microorganismos colónicos es la síntesis de varias vitaminas del grupo B y K, que se absorben en el ciego y el colon, y

favorecen la recuperación y absorción de Ca, Fe y Mg (Urías-Silvas, 2008; Guarner, 2002).

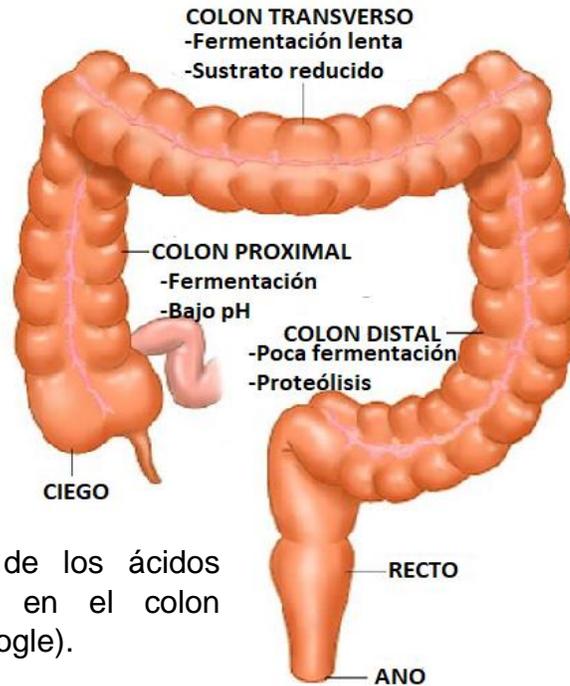


Figura 19. Fermentación de los ácidos grasos de cadena corta en el colon (Modificado de imágenes google).

Se ha mencionado anteriormente que las bacterias fermentan los FOS, realizan esta acción debido a que es el medio por el cual obtienen energía para su crecimiento y mantenimiento de sus funciones. Las bacterias del colon dependen de los carbohidratos que no hayan sido hidrolizados (debido a su composición química, tamaño molecular y solubilidad en el tracto superior, ya sea estómago o intestino delgado), para obtener energía. Estas bacterias poseen enzimas capaces de hidrolizar los enlaces no digeridos por las enzimas intestinales, posteriormente metabolizan los monosacáridos producidos.

La fermentación de los FOS (Figura 20) produce ácidos grasos de cadena corta, lactato y gases como productos del metabolismo anaeróbico de las bacterias. Más

del 95% de los ácidos grasos producidos son absorbidos y metabolizados por el hospedero, lo cual permite obtener energía de los alimentos que no se digieren en el tracto superior. Estos ácidos se generan en el metabolismo del piruvato producido por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica Embden-Meyerhof (García-Peris, 2002).

Existen dos vías para la metabolización del piruvato, en una de ellas se genera propionato a través del succinato. En la otra vía, el piruvato se convierte en acetil CoA que es hidrolizado para formar acetato, o reducido para producir butirato (García-Peris, 2002).

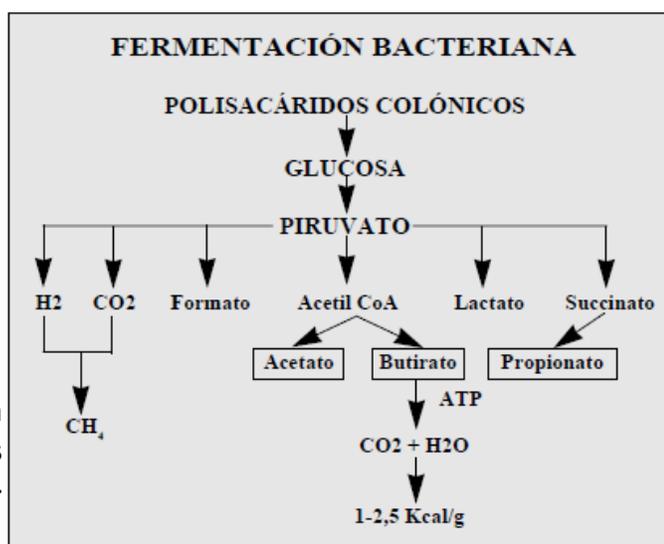


Figura 20. Fermentación bacteriana para producir ácidos grasos de cadena corta (García-Peris, 2002).

Los ácidos grasos de cadena corta, son ácidos monocarboxílicos con una cadena de uno a seis átomos de carbono saturados. Se presentan como ácidos libres, siendo el producto final de la digestión microbiana de los carbohidratos (Ros-Berruezo, 2011).

El principal ácido graso formado es el acetato (60-75%), seguido por el propionato (15-25%) y el butirato (10-15%) (Urías-Silvas, 2008; Ros-Berruezo, 2011). Las dietas que contienen fibra producen mayores concentraciones de ácidos grasos en comparación con aquellas que no la contienen. La solubilidad de los polisacáridos afecta la velocidad de la hidrólisis enzimática provocada por los microorganismos del colon.

La producción de estos ácidos depende del número y tipo de bacterias hidrolíticas y sacarolíticas presentes en la microbiota, así como de la disponibilidad de sustrato y de su composición química.

El acetato atraviesa el hígado para entrar a la circulación periférica y es metabolizado dando lugar a la glutamina y cuerpos cetónicos (acetato y β -hidroxibutirato), estos alcanzan el intestino delgado, siendo los principales sustratos energéticos del enterocito, principalmente la glutamina (García-Peris, 2002). El propionato es extraído por el hígado afectando el metabolismo de lípidos y es utilizado como sustrato para la gluconeogénesis. El butirato es utilizado por el epitelio colónico como energía, juega un papel importante en mantener la salud del colon, también se le atribuye la regulación en la expresión de los genes que codifican para insulina y glucagón, y favorece la diferenciación y crecimiento celular (Macfarlane, 2011).

Estudios *in-vitro*, han demostrado que la fermentación colónica depende de la longitud de la cadena de la inulina.

En pacientes que sufrían de irregularidades intestinales y otras enfermedades se demostró que el uso de inulina y FOS reestableció la estabilidad microbiana (Shoaib *et al*, 2016). Su uso nutricional provee al hospedero de defensas contra bacterias patógenas, además de inhibir enfermedades gastrointestinales.

En resumen, a nivel del colon los ácidos disminuyen el pH, estimulan la reabsorción de agua y sodio, y potencian la absorción de cationes divalentes. A nivel sistémico, regulan el metabolismo lipídico y de la glucosa. En cuanto al lipídico, disminuye la síntesis hepática del colesterol por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A (García-Peris, 2002).

6.6 EXPERIMENTOS REALIZADOS CON FOS

Los efectos reportados del consumo de fructanos son: mayor absorción de minerales, inhibición en el desarrollo de cáncer de colon, disminución de triglicéridos y colesterol en la sangre (Vijn y Smeekens, 1999).

Tabla 7. Experimentos con FOS.

Experimento	Procedimiento	Resultados	Fuente
Ensayos de dietas	Aplicación de oligofruetosa e inulina en dietas controladas y libres.	Variaciones en la composición de microflora. Disminución de bifidobacterias al terminar la administración de los prebióticos.	Roberfroid, 2005.
Ensayos nutricionales	Probar el efecto de los fructanos en la flora fecal.	Incremento de bifidobacterias (ufc/g de heces). La cantidad de estas bacterias disminuye en 1-2 semanas después de	Roberfroid, 2005.

		interrumpir el consumo de los fructanos.	
In vitro	Medios anaerobios con heces de humanos. Fuente de carbono: fructosa, inulina, almidón y oligofructosa.	Incremento de las bifidobacterias después de 12 horas, utilizando inulina y oligofructosa.	Rao, 1999.
In vitro	Fuente de carbono: inulina y FOS en cultivos con cepas de <i>Bifidobacterium</i> y heces fecales.	El butirato fue la sustancia que se produjo en mayor cantidad.	Rossi <i>et al</i> , 2005.
In vivo	Alimentación con inulina por medio de ileostomía.	86% de recuperación en el ileon.	Cummings <i>et al</i> , 2001.
	Ratones alimentados con inulina, oligosacáridos y FOS adicionando <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> .	Las heces fecales revelaron que hubo un incremento del tiempo de sobrevivencia de los probióticos adicionados.	Su <i>et al</i> , 2007.
Leche desnatada	Se le adicionaron <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y 2% de inulina. Voluntarios consumieron 500 mL de leche durante 4 semanas.	Hubo un incremento favorable de bifidobacterias en las heces. Tuvo un buen efecto modulador sobre el ecosistema del intestino.	Casiraghi <i>et al</i> , 2007.

Yogurt	Adicionado con inulina, polidextrosa, <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> , en varias combinaciones.	El consumidor se inclinó hacia aquellos que contenían inulina y polidextrosa, los productos mostraron alta viscosidad y un nivel aceptable de dulzura.	Allgeyer <i>et al</i> , 2010.
Yogurt	Se complementó con concentraciones de 1 y 2% de inulina. Evaluación de propiedades sensoriales y sus características fisicoquímicas y microbiológicas en los días 1,7 y 14 de almacenamiento.	El estudio en el yogurt fortificado con inulina se debe en el efecto que ejerce en sus propiedades de textura y reológicas.	Mazloomi <i>et al</i> , 2011.
Helado	Uno bajo en grasa y otro adicionado con probióticos, se evaluó el efecto que tiene la inulina y la oligofruktosa. Se analizó la supervivencia de <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium animalis</i> durante 30, 60 y 90 días de almacenamiento.	Las características de textura en cuanto a firmeza y grado de fusión fueron más favorables para aquel que contenía inulina. La supervivencia de las bacterias se debió a la oligofruktosa.	Akalin y Erisir, 2008.
Queso crema	Desarrollo con propiedades simbióticas, utilizando inulina al 8% y <i>Lactobacillus paracasei</i>	No hubo cambios significativos en la cuantificación de inulina. El conteo de los probióticos fue similar entre el queso fresco y el almacenado.	Butiri <i>et al</i> , 2007.

	mezclado con <i>Streptococcus thermophilus</i> . Se almacenó durante 21 días.	Se demostró que este producto tiene potencial simbiótico.	
Evaluación de bollos y muffins	Se evaluó el efecto de la inulina y la oligofructosa reemplazando las grasas en la preparación de bollos.	Al mezclar margarina (3.53%), oligofructosa (10%), azúcar (0.55%) e inulina (5.92%), se logró obtener un producto similar al control, además de la intención de reducir grasa y azúcar.	Röble <i>et al</i> , 2011.
	Se usó inulina al 50, 70 y 100% como sustituto de grasa en la preparación de muffins	La evaluación de la textura y las propiedades sensoriales mostraron que mientras el porcentaje de inulina aumenta también lo hace la humedad y la densidad de la miga. Al verse afectadas negativamente las características sensoriales conforme aumentaba el porcentaje de inulina, se concluyó que un 50% es óptimo para obtener un producto similar al control.	Zahn <i>et al</i> , 2010.
Pastas libres de gluten	Adición del 5, 7.5, 10, 12.5, 15 y 20% de inulina.	Las muestras adicionadas con 5 y 7.5% tuvieron buena elongación y viscosidad de corte. Cuando estaban crudas sus características sensoriales eran buenas, pero al someterlas a cocción estas disminuían entre mayor porcentaje de inulina se adicionaba.	Mastromatteo <i>et al</i> , 2012.

De acuerdo a los estudios mencionados y muchos más, queda evidente que los alimentos suplementados con inulina no solamente proveen de potencial prebiótico, sino también de la habilidad para mejorar sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas (González-Herrera *et al*, 2015).

6.7 APLICACIONES DE LOS FRUCTANOS

Los FOS tienen diversas aplicaciones, estas dependen del modo de obtención: Aquellos sintetizados por transfructosilación de la sacarosa se usan como ingredientes prebióticos, mientras que los de cadenas más largas y que fueron producidos por reacción controlada de la hidrólisis enzimática de la inulina, se utilizan como sustitutos de grasa (Mutanda *et al*, 2014).

El consumo excesivo de grasas, principalmente saturadas, de azúcar y sal, y el bajo consumo de fibra dietética han llevado a una incidencia de enfermedades crónicas degenerativas, tales como problemas cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad. Las características nutricionales y principalmente las sensoriales son los estímulos para que los alimentos sean consumidos.

La inulina es utilizada para nuevos productos, es comúnmente adicionada en combinación con otros FOS o probióticos para desarrollar efectos simbióticos. Se utilizan como gelificantes debido a su capacidad de retención de agua; la inulina comercial estabiliza una proporción de agua en formulaciones grasas y genera una textura cremosa, lo que permite disminuir el contenido de grasa en la formulación y, el contenido calórico (Olvera *et al*, 2007).

El mercado de los prebióticos son principalmente los lácteos, alimentos infantiles, pan, cereales y bebidas, a continuación se mencionaran algunos productos y los efectos que han desarrollado en el producto.

Tabla 8. Propiedades funcionales de la inulina y derivados.

Aplicación	Funcionalidad
Productos lácteos	Cuerpo y palatabilidad. Capacidad de formar gel, emulsificantes, sustituto de azúcar y grasa.
Postres congelados	Textura, disminución del punto de congelación, sustituto de azúcar y grasa.
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado, sustituto de grasa.
Productos horneados	Disminución de contenido de agua, sustituto de azúcar.
Aderezos	Cuerpo y palatabilidad.
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasa.
Chocolate	Sustituto de azúcar.

Fuente: Madrigal y Sangronis, 2007.

Debido a las propiedades gelificantes de la inulina, al adicionarla a los alimentos bajos en grasa los mejora, sin tener efectos adversos en sabor y textura. Esto es importante en productos untables como mantequilla, queso crema, quesos procesados, entre otros. La adición de los prebióticos permite el reemplazo de una

cantidad considerable de grasas, además mantiene la emulsión y ofrece una textura untable (Carvalho de Morais, 2016).

El chocolate es un producto al cual se le ha adicionado la inulina reemplazando a la sacarosa. En una evaluación, se utilizó chocolate reemplazando la sacarosa por inulina, povidexrosa y maltodextrina. Se realizaron pruebas fisicoquímicas de Aw y pH, pruebas de dureza y sensoriales. Los chocolates que contenían inulina y povidexrosa tuvieron mayor aceptabilidad entre los degustadores (González-Herrera *et al*, 2015).

Los alimentos que se consumen diariamente es el campo de mayor interés para la adición de estas sustancias y aprovechar las propiedades que confieren al cuerpo humano. Las fórmulas lácteas para bebés son productos que muestran resultados favorables, en un experimento se analizaron las heces fecales y se demostró que en una ingesta durante 14 días hubo una reducción de la bacteria *Clostridium*. A una concentración de 1.25 g por día incrementó el número de bifidobacterias. Se concluyó que en la leche la adición de inulina se enfoca en su potencial prebiótico (Shoaib *et al*, 2016).

En yogurt se ha adicionado inulina con el fin de lograr que los probióticos en el producto sobrevivan un mayor tiempo, además de mejorar sus características reológicas y de textura y llevar a cabo experimentos microbiológicos (Shoaib *et al*, 2016).

También se utiliza en productos lácteos sin grasa, proveyendo casi las mismas características sensoriales. La incorporación de la inulina en estos productos mejora

su firmeza como resultado de un incremento en la actividad microbiológica causada por la acción entre bacterias ácido lácticas y una metabolización parcial de la inulina (Shoaib *et al*, 2016).

Otro producto en el cual se ha probado el efecto de este fructano es el helado, en el cual se evalúan también sus propiedades reológicas. El uso de la inulina mejora las condiciones, incrementando la firmeza y aumentando el tiempo de fusión, así mismo incrementa la supervivencia de probióticos y también sustituye las grasas sin alterar los atributos sensoriales del producto.

La inulina es utilizada como sustituto de grasa en la mayoría de los productos horneados y galletas. En muchos casos se reporta que la dureza incrementa con la cantidad de inulina usada. No hay reportes de estos productos con potencial prebiótico.

En las pastas comerciales, la inulina es frecuentemente utilizada no solo para mejorar la textura, sino para proveer efectos prebióticos.

En Brasil se desarrolló una barra de amaranto adicionada con una mezcla de inulina y oligofructosa. Al evaluarse el valor calórico y la aceptabilidad sensorial por parte de los consumidores, el resultado fue bueno para ser comercializada. Se comparó este producto con las barras tradicionales y el primero presentó menor cantidad de calorías y mayor contenido de fibra (González-Herrera *et al*, 2015).

Estos productos se evalúan en el contenido del fructano, la resistencia en el tracto gastrointestinal y en sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales. Aun cuando existen más evidencias para considerárseles como alimentos con propiedades

funcionales, es necesario complementar esto con ensayos *in vivo* para evaluar sus beneficios al ser consumidos (González-Herrera *et al*, 2015).

En la siguiente tabla se resumen las ventajas que tiene el uso de los fructanos.

Tabla 9. Ventajas de los fructanos.

Característica	Beneficios
Bajo contenido calórico	1.5 kcal/g No se absorbe en el sistema digestivo.
Fibra dietética soluble	Ayuda contra el estreñimiento. Reduce el pH del colon. Ayuda a mantener reducidos el colesterol y los triglicéridos. Mejora la absorción de minerales.
Nutrición	Reemplaza grasas y azúcares. Bajo valor calórico.
Estimula la producción de bifidobacterias.	Ayuda en la síntesis de vitamina B. Ayuda a reducir las bacterias dañinas. Buen alimento para las bifidobacterias. Ayuda a mejorar el sistema inmune.
Para diabéticos	Bajo índice glucémico. No estimula la excreción de insulina.
Tecnológico y funcional	Mejora el sabor. Texturizante. Sustituto de grasa y azúcar.

Fuente: Ibañez-Vázquez *et al*, 2015.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El interés por el cuidado del ambiente y aprovechar los recursos que nos ofrece la naturaleza ha ido creciendo en los últimos años, un ejemplo es el uso que se le ha dado a los desechos generados por la industria del agave.

El agave se compone de sustancias que pueden ser utilizadas como fuente de carbono por microorganismos que producen inulinasas, las cepas productoras más destacadas son las del género *Kluyveromyces*. Estas enzimas son de alto potencial industrial debido a la producción de fructooligosacáridos y de jarabes de alta fructosa como edulcorantes. Sin embargo se continúan estudiando debido a que muestran diferentes aplicaciones dependiendo de sus características químicas, estructurales y del tipo de microorganismo empleado.

A partir de los diversos estudios que se han realizado, se ha confirmado que la inulina es un compuesto con alto potencial para ser utilizado como prebiótico al estimular el crecimiento de bifidobacterias y poseer características como aumentar la absorción de calcio y la resistencia ante infecciones, por mencionar algunos ejemplos. El fin de estudiar la inulina, los FOS, de aprovechar los desechos del Agave y los avances que se han logrado es desarrollar alimentos que promuevan una buena salud y bienestar en el ser humano, además de que de esta manera la industria puede tener mayor crecimiento.

En Latinoamérica, el desarrollo en cuestión a este tema se ha visto limitado ya sea por la información escasa en nutrición o por cuestiones económicas en el ámbito de

la ciencia, sin embargo se continúa trabajando para lograr un avance y mejoría en las situaciones ambientales y de salud.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Sherrer J. S.** (2013). *Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Ambientales. Instituto Politécnico Nacional. 111.
- Akalin A.S.** y Erisir D. (2008). *Effects of inulin and oligofructose on the reological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream*. Journal of Food Science. 73 (4): 184-188.
- Allgeyer L.C.**, Miller M.J. y Lee S-Y. (2010). *Drivers of liking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics*. Journal of Food Science. 75 (4): 212-219.
- Andrade J.L.**, De la Barrera E., Reyes-García C., Ricalde M.F., Vargas-Soto G. y Cervera C. (2007). *El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 81: 37-50.
- Arrizon J.**, Morel S., Gschaedler y Monsan P. (2011). *Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of mezcal*. Bioresource Technology. 102: 3289-3303.
- Ávila-Fernández A.**, Galicia-Lagunas N., Rodríguez-Alegría M.E., Olvera C. y López-Munguía A. (2011). *Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans*. Food Chemistry. 129: 380-386.
- Banguela A.** y Hernández L. (2006). *Fructans: from natural sources to transgenic plants*. Biotecnología aplicada. 23 (3): 202-210.

- Barragán-Huerta B.**, Téllez-Días Y.A. y Laguna-Trinidad A. (2008). *Utilización de residuos agroindustriales*. Revista Sistemas Ambientales. 2 (1): 44-50.
- Butiri F.C.A.**, Cardarelli H.R., Filisetti T.M.C y Saad M.I. (2007). *Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and Lactobacillus paracasei in co-culture with Streptococcus thermophilus*. Food Chemistry. 104 (4): 1605-1610.
- Castillo-Calderón A.** y Chamy-Maggi R. (2010). *Producción de inulinasa por levaduras de Kluyveromyces marxianus*. Scientia Agropecuaria. 1 (3-4): 235-245.
- Castillo-Urueta P.**, García-Gómez R.S. y Durán de Bazúa C. (2003). *El consumo de fructosa: riesgos para la salud y la economía*.
- Castro-Díaz A.S.** y Guerrero-Beltrán J.A. (2013). *El Agave y sus productos*. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 7 (2): 53-61.
- Carvalho de Morais E.** (2016). *Prebiotic addition in dairy products processing and health benefits*. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. Editor Ronald Ross Watson y Víctor R. Preedy. 37-46.
- Casiraghi M.C.**, Canzi E., Zanchi R., Donati E. y Villa L. (2007). *Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem*. Journal of Applied Microbiology. 103 (2): 499-506.
- Chacón-Villalobos A.** (2006). *Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS)*. Agronomía Mesoamericana. 17 (2): 265-286.

- Chairez-Aquino J.**, Enriquez del Valle J. R., Ruíz-Luna J., Campos-Ángeles G. V. y Martínez-García R. (2015). *Uso del bagazo de Agave spp. y hojas de maíz para cultivar el hongo Pleurotus ostreatus*. Revista Mexicana de Agroecosistemas. 2 (1): 23:28.
- Chen H.Q.**, Chen X.M., Chen T.X., Xu X.M. y Jin Z.Y. (2011). *Extraction optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of Aspergillus ficuum JNSP5-06*. Carbohydrate Polymers. 85: 446-451.
- Chi Z.M.**, Zhang T., Cao T.S., Liu X.Y., Cui W. y Zhao C.H. (2011). *Biotechnological potential of inulin for bioprocesses*. Bioresource technology. 102: 4295-4303.
- CONACYT** prensa. (2014).
<http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/biotecnologia/270-bioetanol-tequila>
- Cummings J.H.**, Macfarlane G.T. y Englyst H.N. (2001). *Prebiotic digestion and fermentation*. The American Journal of Clinical Nutrition. 73 (S2): 415S-420S.
- De Moura F.A.**, Macagnan F.T. y Da Silva L.P. (2014). *Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review*. International Journal of Food Science and Technology.
- Flores A.C.**, Morlett J.A. y Rodríguez R. (2016). *Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 56 (11): 1893-1902.
- García-Aguirre M.**, Sáenz-Álvaro V.A., Rodríguez-Soto M.A., Vicente-Magueyál F.J., Botello-Álvarez E., Jiménez-Islas H., Cárdenas-Márquez M.C., Rico-

Martínez R. y Navarrete-Bolaños J.L. (2009). *Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of Agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57 (21): 10205-10210.

García-Herrera E.J., Méndez-Gallegos S. de J y Talavera-Magaña D. (2010). *El género Agave spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica*. Salud pública y nutrición (RESPYN).5:109-129.

García-Mendoza A.J. (2007) *Los agaves de México*. Ciencias. 87: 14-23.

García-Mendoza A.J., Parra-Negrete L.A., Esqueda-Valle M.C., Ramírez-Malagón R., Gómez-Leyva J.F., García-Marín P.C., Jacques-Hernández C. y Rodríguez-Garay B. (2015). *Caracterización y conservación de la diversidad de agaváceas en México*. Resultados en conservación, uso y aprovechamiento sustentable de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. 13-17.

García-Peris P., Bretón-Lesmes I., De la Cuerda-Compes C. y Camblor-Álvarez M. (2002). *Metabolismo colónico de la fibra*. Nutrición Hospitalaria. 2: 11-16.

Gavrilov S. e Ivanova V. (2014). *Biosynthesis of inulinases by Bacillus bacteria*. Journal of Bioscience and Biotechnology. 75-82.

González-García Y., Gonzáles- Reynoso O. y Nungaray-Arellano J. (2005). *Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidratos por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos*. e-Gnosis. 3 (14): 1-18.

- González-Herrera S.M.,** Rodríguez-Herrera R., López M.G., Rutiaga O.M, Aguilar C.N., Contreras-Esquivel J.C. y Ochoa-Martínez L.A. (2015). *Inulin in food products: prebiotic and functional ingredient*. British Food Journal. 117: 371-387.
- Goosen C.,** Van Der Maarel J.E.C. y Dijkhuizen L. (2008). *Exo-inulinase of Aspergillus niger N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity*. Biocatalysis and Biotransformation. 26 (1-2): 49-58.
- Graciano-Fonseca G.,** Heinzle E., Wittman C. y Gombert A.K. (2008). *The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential*. Applied Microbiology and Biotechnology. 79: 339-354.
- Guarner F.** (2002) *El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana*. Nutrición Hospitalaria. 2: 7-10.
- Guillén-Becerril A.** (2015). *Extracción y purificación de enzimas degradadoras de inulina (inulinasas)*. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 77.
- Gutiérrez-Coronado M. L.,** Acedo-Félix E. y Valenzuela-Quintanar A. I. (2007). *Industria del bacanora y su proceso de elaboración*. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 5 (5): 394-404.
- Holyavka M.,** Artyukhov V. y Kovaleva T. (2016). *Structural and functional properties of inulinases: a review*. Biocatalysis and Biotransformation. 34 (1): 1-17.

- Huerta-Alcocer** S.A., Larralde-Corona C.P. y Narváez-Zapata J.A. (2014). *Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas*. Bio Ciencias. 3 (1): 3-15.
- Ibañez-Vázquez** G., Álvarez-Herrera M. y Doria-Mendoza F. J. (2015). *Cadena de suministro: inulina de agave*. Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Jain** S.C, Jain P.C. y Kango N. (2012) *Production of inulinase from Kluyveromyces marxianus using dahlia tuber extract*. Brazilian Journal of Microbiology. 62-69.
- Karimi** R., Azizi M.H., Ghasemlou M. y Vaziri M. (2014) *Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: a review*. Carbohydrate Polymers. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.029>
- Kaur** N. y Grupta A. K. (2002). *Application of inulin and oligofructose in health and nutrition*. Journal of Biosciences. 23: 703-714.
- Legorreta** P.E. y Ogura F.T. (2002). *Proceso, composición y usos de inulina de agave en polvo y solución*. Patente WP 2002066517. A1.
- Li** D., Dai J.Y. y Xiu Z.L. (2010). *A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by Klebsiella pneumoniae*. Bioresource Technology. 101: 8342-8347.
- Liu** X.Y., Chi Z., Liu G.L., Wang F., Madzak C. y Chi Z.M. (2010). *Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered Yarrowia lipolytica displaying inulinase*. Metabolic Engineering. 12: 469-476.

- López M. G.**, Mancilla-Margalli N.A. y Mendoza-Díaz G. (2003). *Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 7835-7840.
- López M. G.** y Mancilla-Margalli N. (2007) *The nature of fructooligosaccharides in Agave plants*. Advances in Fructooligosaccharides Research, 2: 47-67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>
- Macfarlane G.T.** y Macfarlane S. (2011). *Fermentation in the human large intestine. Its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics*. Journal of Clinical Gastroenterology. 45 (3): s120-s127.
- Madrigal L.** y Sangronis E. (2007). *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57 (4): 387-396.
- Mastromatteo M.**, Lannetti M., Civica V., Sepielli G. y Del Nobile M. (2012). *Effect of the inulin addition on the properties of gluten free pasta*. Food and Nutrition Sciences. 3 (1): 22-27.
- Mazloomi S.M.**, Shekarforoush S.S., Ebrahimnejad H. y Sajedianfard J. (2011). *Effect of adding inulin on microbial and physicochemical properties of low fat probiotic yogurt*. Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University. 12 (2): 93-98.
- Meenakshi S.**, Umayaparvathi S., Manivasagan P., Arumugam M., Balasubramanian T. (2012). *Purification and characterization of Inulinase from*

marine bacterium, Bacillus cereus. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 42 (4): 510-515.

Montañez-Soto J., Venegas-González J., Vivar-Vera M. y Ramos-Ramírez E. (2011). *Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza del Agave tequilana Weber azul*. Bioagro. 23 (3): 199-206.

Moreno-Vilet L., Camacho-Ruiz R.M. y Portales-Pérez D.P. (2016). *Prebiotic agave fructans and immune aspects*. Bioactive Foods in Health Promotion: Probiotics, prebiotics and synbiotics. Capítulo 11: 165-179.

Muñoz-Gutiérrez I., Rodríguez-Alegría M.E. y López-Munguía A. (2009). *Kinetic behavior and specificity of β -fructosidades in the hydrolysis of plant and microbial fructans*. Process Biochemistry. 44: 891-898.

Mussatto S.I. y Mancilha I.M. (2007). *Non-digestible oligosaccharides: a review*. Carbohydrate Polymers. 68: 587-597.

Mutanda T., Mokoena M.P., Olaniran A.O., Wilhelmi B.S. y Whiteley C.G. (2014). *Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 41: 893-906.

Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kumlinskaya A.A., Neustroev K.N. y Polikarpov I. (2004). *Crystal structure of exo-inulinase from Aspergillus awamori: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition*. Journal of Molecular Biology. 344: 471-480.

- Nava-Cruz N.Y.**, Medina-Morales M.A., Martínez J.L., Rodríguez R., Aguilar C.N. (2014) *Agave biotechnology: an overview. Critical reviews in biotechnology.* 35 (4): 546-559.
- Naveen K.** y Sumat C. J. (2011). *Production and properties of microbial inulinases: Recent advances.* Food Biotechnology. 25: 165-212.
- Neagu C.** y Bahrim G. (2011). *Inulinases-a versatile tool for Biotechnology.* Innovative Romanian Food Biotechnology. 9: 1-11.
- Olvera-Carranza C.**, Ávila-Fernández A., Bustillo-Armendáriz G.R., López-Munguía A. (2015). *Processing of Fructans and Oligosaccharides from Agave Plants. Processing and Impact on Active Components in Food.* 121-129.
- Olvera C.**, Castillo E. y López-Munguía A. (2007). *Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa.* Biotecnología. 14: 327-346.
- Ortíz-Cruz N.A.** (2016). *Caracterización de la actividad inulinolítica de la cepa 8b de Kluyveromyces marxianus.* Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 65.
- Patel S.** y Goyal A. (2011). *Functional oligosaccharides: production, properties and applications.* World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27: 1119-1128.
- Pérez-Rivas G.** (2016). *Extracción y caracterización de una exo-inulinasa procedente de Bacillus amyloliquefaciens con actividad sobre fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul (agavinas).* Tesis para obtener el título de Químico de Alimentos. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 93.
- Prabhjeet S.** y Kaur-Gill P. (2006). *Production of Inulinases: recent advances.* Food Technology and Biotechnology. 44 (2): 151-162.
- Quintana-Vega M. A.** (2012). *Aprovechamiento integral del bagazo de la piña de Agave tequilana weber: caracterización de fracciones lignocelulósicas*

obtenidas por un proceso organosol. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. 72.

- Rao A.V.** (1999). *Dose-response effects of inulin and oligofructosa on intestinal bifidogenesis effects.* The Journal of Nutrition. 129 (7): 1442S-1445S.
- Ricca E., Calabró V., Curcio S., Iorio G.** (2007). *The state of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis.* Critical Reviews in Biotechnology. 27: 129-145.
- Ritsema T. y Smeekens S. C. M.** (2003). *Engineering fructano metabolism in plants.* Journal of Plant Physiology. 160: 811-820.
- Roberfroid M.B.** (2002). *Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose.* British Journal of Nutrition. 87: S139-S143.
- Roberfroid M.B.** (2005). *Introducing inulin-type fructans.* British Journal of Nutrition. 93 (1): S13-S25.
- Roberfroid M.B.** (2005a). *Inulin-type fructan and the homeostasis of lipids.* Inulin type fructans: functional food ingredients. Editor Roberfroid M.B. CRC Press, Boca Raton. 239-266.
- Roberfroid M.B.** (2005b). *Inulin-type fructans and gastrointestinal functions: Conclusions and perspectives.* Inulin-type fructans: functional food ingredients. Boca Raton, 147-150.
- Roberfroid M., Gibson G. R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M. J., Leotoing L., Wittrant Y., Delzenne N. M., Cani P. D., Neyrinck A. M. y Meheust A.** (2010). *Prebiotic effects: metabolic and health benefits.* British Journal of Nutrition. 104: S1-S63.

- Röble** C., Ktenioudaki A. y Gallagher E. (2011). *Inulin and oligofructose as fat and sugar substitutes in quick breads (scones): a mixture design approach*. European Food Research and Technology. 233 (1): 167-181.
- Rocha** J.R., Catana R., Ferreria B.S., Cabral J. M. y Fernández P. (2006). *Design and characterization of an enzyme system for inulinhydrolisis*. Food Chemistry. 95 (1): 77-82.
- Ros-Berruezo** G., Martínez-Gracia C. y Valencia-Arques J.A. (2011). *Biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena corta: mecanismo de absorción*. 24 (1): 125-134.
- Rossi** M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S. y Matteuzi D. (2005). *Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures*. Applied Environmental Microbiology. 71 (10): 6150-6158.
- Saha** B.C. (2006). *Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with Lactobacillus intermedius NRRL B-3693*. Enzyme and Microbial Technology. 39: 991-995.
- Saval** S. (2012). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro*. BioTecnología. 16(2): 14-46.
- Shoab** M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H. R., Shakeel A., Ansari A. y Niazi S. (2016). *Inulin properties, health benefits and food applications*. Carbohydrate Polymers. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>
- Singh** R.S., Chauhan K. y Kennedy J.F. (2016). *A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications*. International Journal of Biological Macromolecules.
- Sosa-Herrera** M.G. y Delgado-Reyes V.A. (2016). *Propiedades funcionales y aplicaciones tecnológicas de fructanos*. Alimentos funcionales de hoy. 97-116.

- Su, P., Henriksson, A. y Mitchell, H. (2007).** *Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model.* Journal of Applied Microbiology. 103 (6): 2392-2400.
- Tian F. (2013).** *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides and levan through transfructosylation reaction catalyzed by levansucrase from Bacillus amyloliquefaciens and by its combined use with endo-inulinase.* Tesis para obtener el título de Doctor. Quebec, Canadá: Departamento de Ciencia de los Alimentos y Química Agrícola. 203.
- Tian F. y Karboune S. (2012).** *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from Bacillus amyloliquefaciens: specificity, kinetics, and product characterization.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 82: 71-79.
- Tian F., Karboune S. y Hill A. (2014).** *Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system.* Innovative Food Science and Emerging Technologies. 22: 230-238.
- Toriz G., Delgado E. y Zuñiga V. (2007).** *A proposed chemical structure for fructans from blue agave plant (Tequilana Weber var. azul).* E-Gnosis. 5 (1).
- Treichel H., De Oliveira D., Leirin L., Astolfi V., Mazutti M.A., Di Luccio M. y Oliveira J.V. (2012).** *A review on the production and partial characterization of microbial inulinases.* Global Journal of Biochemistry. 3: 7.
- Urías-Silvas J.E. (2008).** *Efecto prebiótico de los fructanos de Agaves y Dasyliirion y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos en ratones.* Tesis para obtener el título de Doctora en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato: Departamento de Biotecnología y Bioquímica. 132.
- Velázquez-Martínez J.R., González-Cervantes R.M., Hernández-Gallegos M.A., Campos-Mendiola R., Jiménez-Aparicio A.R. y Arenas-Ocampo M.L. (2014).**

Prebiotic potential of Agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization. Molecules. 19 (8): 12660-12675.

Vijn I. y **Smeekens S.** (1999). *Fructan: more than a reserve carbohydrate?. Plant Physiology. 120: 351-359.*

Waleckx E., **Gschaedler A.,** **Colonna-Ceccaldi B.** y **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: 40-48.*

Zhang T., **Chi Z.,** **Zhao C.H.,** **Chi Z.M.** y **Gong F.** (2010). *Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by Saccharomyces sp W0. Bioresource Technology. 101: 8166-8170.*

Zahn S., **Pepke F.** y **Rohm H.** (2010). *Effect of inulin as a fat replacer on texture and sensory properties of muffins. International Journal of Food Science and Technology. 45 (12): 2531-2537.*