



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

**TEMA: CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE
EXCLUSIÓN DE FRUCTANOS EXTRAÍDOS DE HOJAS DE
AGAVES COLECTADOS EN MUNICIPIOS DEL NORTE DE
GUANAJUATO**

FORMA DE TITULACIÓN: TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

FÁTIMA ARIZBETH PLASCENCIA DE ANDA

TUTORA EXTERNA: DRA. ROSA MARÍA CAMACHO RUÍZ

TUTORA INTERNA: DRA. HARUMI SHIMADA BELTRÁN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

**TEMA: CARACTERIZACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE
EXCLUSIÓN DE FRUCTANOS EXTRAÍDOS DE HOJAS DE
AGAVES COLECTADOS EN MUNICIPIOS DEL NORTE DE
GUANAJUATO**

FORMA DE TITULACIÓN: TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

FÁTIMA ARIZBETH PLASCENCIA DE ANDA

TUTORA EXTERNA: DRA. ROSA MARÍA CAMACHO RUÍZ

TUTORA INTERNA: DRA. HARUMI SHIMADA BELTRÁN



El presente trabajo se realizó durante mi estancia de proyecto de investigación en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ, A.C.) Unidad Zapopan en el área de Biotecnología Industrial, bajo la dirección y supervisión de la Dra. Rosa María Camacho Ruíz. Y forma parte del proyecto:

“Estudio Técnico y Científico de las características de la región norte del Estado de Guanajuato para determinar la viabilidad, factibilidad y potencialidad del agave mezcalero, la producción de mezcal y otros productos derivados” el responsable técnico: Mtro. Juan Gallardo Valdez.

Dicho trabajo, fue financiado gracias al **Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato**. Convocatoria GTO-2017-01. Clave del proyecto: **285454**.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi casa de estudios, la Escuela Nacional de Estudios Superiores UNAM, León por darme la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente durante estos cuatro años de la licenciatura.

Especialmente agradecerle los apoyos económicos recibidos en el transcurso de mis estudios, por parte de fundación UNAM en conjunto con la Secretaría de Educación Pública: beca MANUTENCIÓN y beca para estancias de investigación en el extranjero, que marcaron el rumbo de mi carrera y vida.

A la coordinadora de la Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas, la Dra. Harumi Shimada por su constante apoyo y motivación, también como a los demás académicos de la carrera. Sin duda me brindaron las herramientas necesarias para continuar exitosamente mi formación profesional.

Al Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Desarrollo del Estado de Jalisco, al departamento de Biotecnología Industrial del mismo, por abrirme sus puertas en sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

A mi directora de tesis, Dra. Rosa Camacho Ruíz, quien, me dio la oportunidad de realizar mi estancia y trabajo de tesis en su laboratorio y que, gracias a sus conocimientos, su experiencia, y sobre todo su paciencia pude finalizar satisfactoriamente.

Al Fondo Mixto y CONACYT – Gobierno del Estado de Guanajuato por el apoyo económico brindado.

DEDICATORIA

Gracias a las personas importantes en mi vida que en esta etapa estuvieron siempre a mi lado, motivándome y dándome fuerza a enfrentar y concluir satisfactoriamente cada reto que se me ponía en frente, que me alentaron con sus palabras a seguir mis sueños y a nunca rendirme.

A ustedes con todo mi cariño les dedico cada página de este trabajo que ya lleva un pedacito de ustedes.

Gracias infinitas por su amor y apoyo constante.

Mi madre Rosalba

Mi hermano Emilio

Mi novio Donaldo

Mi abuela Rosalva

INDICE

TEMA	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO 1	12
1. PROBLEMA	12
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	12
1.3 HIPÓTESIS.....	13
1.4 OBJETIVOS.....	13
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
CAPÍTULO 2	14
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 GUANAJUATO SUS AGAVES Y EL MEZCAL.....	14
2.2 PRODUCTOS DERIVADOS DEL AGAVE.....	15
2.2.1 PULQUES, AGUAMIELES Y MEZCAL. DENOMINACIÓN DE ORIGEN Y NORMATIVIDAD	15
2.3. FRUCTANOS DE AGAVE.....	18
2.4 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	19
2.5 TIPOS DE FRUCTANOS DE AGAVE.....	21
2.5.1 INULINAS	22
2.5.2 GRAMINANOS	22
2.5.3 NEOFRACTANOS (AGAVINAS).....	23
2.6 BIOSÍNTESIS DE FRUCTANOS	23
2.7 PESO MOLECULAR DE POLÍMEROS	25

2.8 EFECTO BIOLÓGICO Y FUNCIONAL DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE.....	27
2.9 PROCESO DE OBTENCIÓN DE FRUCTANOS	28
2.10 SECADO POR ASPERSIÓN	29
2.11 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES.....	31
2.11.1 MÉTODOS FOTO COLORIMÉTRICOS	31
2.11.2 MÉTODOS CUANTITATIVOS.....	32
2.12 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS.....	33
2.12.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y HPLC	33
2.12.2 ESPECTROMETRIA DE MASAS (MALDI -TOF)	34
2.12.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (HPAEC-PAD).....	35
2.12.4 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HP SEC).....	37
2.12.4.1 MECANISMO DE LA SEPARACIÓN	38
2.12.4.2 FASE ESTACIONARIA	40
2.12.4.3 COLUMNA HP SEC	40
2.12.4.4 COLUMNA GUARDA	41
2.12.4.5 FASE MÓVIL	42
2.13 FRUCTANOS DE AGAVE COMO MATERIA PRIMA Y PRODUCTOS.....	43
2.14 NORMATIVIDAD DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE	44
CAPÍTULO 3	47
3.MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 ÁREA DE MUESTREO Y SELECCIÓN DE AGAVES.....	47
3.2.1 EXTRACCIÓN DE JUGOS CONCENTRADOS DE AGAVE CRUDO.....	48
3.3 OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES E INACTIVACIÓN DE ENZIMAS....	50
3.4 CONTENIDO DE AZÚCARES POR MÉTODOS FOTO COLORIMÉTRICOS.....	51
3.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN Y ANÁLISIS DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO MILLER.	51
3.4.2 CURVA DE CALIBRACIÓN Y ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALES	54
3.5 SECADO POR ASPERSIÓN	56
3.6 ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE FRUCTANOS MEDIANTE HP-SEC.....	58
3.6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	58
3.6.2 EQUIPO, COLUMNA Y CONDICIONES.....	59

3.6.3 CURVA DE CALIBRACIÓN Y MÉTODO DE INTEGRACIÓN.....	60
3.7 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC.....	62
3.7.1 COLUMNA Y CONDICIONES.....	63
3.7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	63
CAPÍTULO 4	64
4.RESULTADOS.....	64
4.1 ESPECIES DE AGAVES IDENTIFICADAS.....	64
4.2 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES OBTENIDOS.....	75
4.3 RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DEL SECADO POR ASPERSIÓN.....	79
4.4 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES.....	80
4.4.1 AZÚCARES REDUCTORES POR MÉTODO DNS.....	80
4.4.2 AZÚCARES TOTALES POR ANTRONA.....	83
4.4.3 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES SIMPLES HPLC.....	85
4.5 DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES DE FRUCTANOS DE AGAVE MEDIANTE HP SEC.....	88
CAPÍTULO 5	97
5. DISCUSIÓN	97
CAPÍTULO 6	101
6. CONCLUSIONES	101
CAPÍTULO 7	103
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS CAPÍTULO 2

PÁGINA

Tabla 2. 1. Eluyentes más comunes en cromatografía de exclusión.	42
Tabla 2. 2 Especificaciones fisicoquímicas del fructanos nativos de agave (base seca).	45
Tabla 2. 3 Límites microbiológicos para fructanos y FOS nativos de agave.....	46

TABLAS CAPÍTULO 3

Tabla 3. 1 Soluciones y reactivos método DNS.....	52
Tabla 3. 2 Soluciones de glucosa para curva de calibración DNS.....	52
Tabla 3. 3 Soluciones de sacarosa para curva de calibración antrona.....	55
Tabla 3. 4 Cantidades de polvo utilizado en diluciones para HP SEC.....	58
Tabla 3. 5 Reactivos estándares y su tiempo de retención en HP SEC.	61

TABLAS CAPÍTULO 4

Tabla 4. 1. Memoria fotográfica de especies de agaves identificadas.....	65
Tabla 4. 2 Especies identificadas en los diferentes municipios.....	73
Tabla 4. 3 Pesos de las muestras de base de hojas colectadas en municipios de Guanajuato	74
Tabla 4. 4 Cantidades de jugo líquido de agave extraído concentración de carbohidratos solubles.....	76
Tabla 4. 5 Absorbancias de la curva de calibración para DNS.	81
Tabla 4. 6 Absorbancias de la curva de calibración antrona.	83
Tabla 4. 7 Absorbancias de concentración de glucosa.	85
Tabla 4. 8 Concentración de azúcares obtenidos mediante HPLC.....	87
Tabla 4. 9 Parámetros de la distribución de pesos moleculares de fructanos de agaves del norte del estado de Guanajuato, extraídos de la base de las hojas.	90
Tabla 4. 10 Distribución de pesos moleculares promedio en masa y en número de los fructanos extraídos de la base de hojas de agaves de las distintas especies.	91
Tabla 4. 11 Grado de polimerización promedio en peso y número de los fructanos de agaves extraídos de la base de las hojas de las distintas especies.	92
Tabla 6.1 Clasificación de fructanos <i>Agave salmiana</i> según la Norma Oficial Mexicana	101

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS CAPÍTULO 2	PÁGINA
Figura 2. 1 Especies de agaves utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas y subproductos.	15
Figura 2. 2 Pulque y agua miel.....	16
Figura 2. 3 Tequila y mezcal.	18
Figura 2. 4 Estructuras de los diferentes tipos de fructanos.Ritsema y Smeekens (2003).....	20
Figura 2. 5 Estructuras moleculares propuesta para los fructanos del género Agave (graminanos y agavinas) del Grupo I. Mancilla-Margalli y López (2006).....	21
Figura 2. 6 Esquema de biosíntesis de fructanos de plantas (Vijin and Smeekens, 1999).	25
Figura 2. 7 Sistema de secado por aspersion escala laboratorio. Fuente: BRASSPRAY.....	30
Figura 2. 8 Equipo de MALDI-TOF microfex. Fuente: The Lab World Group.	35
Figura 2. 9 Equipo de cromatografía de intercambio iónico. Fuente: Contaminación atmosférica página web.	37
Figura 2. 10 Mecanismo de separación de la cromatografía de exclusión molecular. Mikhail Tswett, (1906).....	39
Figura 2. 11 Columna Ultrahydrogel para cromatografía de exclusión marca Waters.	41
 FIGURAS CAPÍTULO 3	
Figura 3. 1 Zonas de muestreo de agaves en el estado de Guanajuato.	48
Figura 3. 2 Diagrama de la metodología aplicada.	49
Figura 3. 3 Muestras de agave de San Luis de la Paz con corteza verde y sin corteza.....	49
Figura 3. 4 Procedimiento de extracción de jugos e inactivación de enzimas.	51
Figura 3. 5 Protocolo Miller (2), determinación de azúcares reductores.....	53
Figura 3. 6 Espectrofotómetro Bio-Rad.Fuente: Yaritza López.....	54
Figura 3. 7 Protocolo de reacción foto colorimétrica, determinación de azúcares totales.....	55
Figura 3. 8 Secado por aspersion en equipo ADL311S..	57
Figura 3. 9 Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters e2695, CIATEJ Zapopan. Fuente propia.....	60
Figura 3. 10 Curva de calibración de reactivos estándares.....	61
 FIGURAS CAPÍTULO 4	
Figura 4. 1 Especies de agave identificadas en el muestreo.	64

Figura 4. 2 Contenido de carbohidratos solubles en los extractos de jugo de agave.....	77
Figura 4. 3 Contenido de carbohidratos solubles en los extractos de jugo de agave de las subespecies <i>salmiana</i> y <i>crassispina</i>	78
Figura 4. 4 Sistema del secado por aspersion de jugo de agave y recuperacion de muestra..	79
Figura 4. 5 Porcentajes de eficiencia del secado por aspersion.	80
Figura 4. 6 Muestras de jugo crudo de agave sometidas al protocolo Miller.	81
Figura 4. 7 Curva de calibracion de glucosa para metodo DNS.	81
Figura 4. 8 Concentracion de azuceres reductores por el metodo quimico DNS..	82
Figura 4. 9 Muestras de jugo crudo de agave sometidas a la reaccion de Fehling.	83
Figura 4. 10 Curva de calibracion de sacarosa para metodo antrona..	84
Figura 4. 11 Concentracion de azuceres totales medidos por el metodo colorimetrico antrona	85
Figura 4. 12 Cuantificacion de sacarosa, glucosa y fructosa mediante HPLC.....	86
Figura 4. 13 Cromatogramas de la distribucion de carbohidratos por cromatografia de exclusion de fructanos extraidos de hojas de Agave.....	89
Figura 4. 14 Distribucion grafica de moléculas de acuerdo al grado de polimerizacion en subespecies de Agave Salmiana.....	94
Figura 4. 15 Distribucion grafica del grado de polimerizacion en las especies de agaves.....	95
Figura 4. 16 Histograma de porcentaje de abundancia relativa en funcion del grado de polimerizacion.....	96

SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

mL	Mililitros
µL	Microlitros
mm	Milímetros
g	Gramos
L	Litros
g/L	Gramos/litros
h	Hora
mL/h	Mililitros/hora
min	Minutos
mL/min	Mililitros/minuto
rpm	Revoluciones por minuto
Da	Daltons
%	Porcentaje
V	Volts
MPa	Mega Pascales
pH	Potencial Hidrogeno
°C	Grados Celsius
UFC	Unidades formadoras de colonias
DNS	Ácido dinitrosalicílico
UV	Luz UV
FOS	Fructooligosacáridos
DP	Grado de polimerización
DPn	Grado de polimerización en número
DPw	Grado de polimerización en peso
Mn	Masa molecular en número
Mw	Masa molecular en peso
IP	Índice de polidispersidad
PM	Peso molecular
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio iónico

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HP SEC	Cromatografía de exclusión molecular
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
IR	Índice de refracción
TR	Tiempo de retención
DO	Denominación de origen
V0	Volumen de elución inter partícula
VT	Volumen de permeación total
SD	Sin dilución
JC	Jugo concentrado
JD	Jugo diluido

INTRODUCCIÓN

La salud digestiva es un tema de interés actual. En los últimos años se ha prestado especial atención a los productos funcionales derivados de ingredientes naturales. Como es el caso de los fructanos de agave, polisacáridos de fructosa con enlaces glicosídicos que actúan como fibras solubles. Los fructanos se utilizan actualmente en numerosas formulaciones alimentarias: leche de alpiste fortificada, inulinas como fibras dietéticas y suplementos de grasas para la formulación de helados lácteos, etc. (2).

En México los fructanos de agave se extraen principalmente del corazón o tallo del agave donde se acumulan como reserva energética. Sin embargo, se asegura que la base de las hojas contiene cantidades significantes de estos carbohidratos al estar en contacto cercano al tallo de la planta, donde se lleva a cabo la síntesis de estos. Por ello, se promueve una alternativa de aprovechamiento de las hojas de agave en la producción de fructanos (3), ya que hasta ahora se han aprovechado para la obtención de azúcares reductores y la producción de etanol o de enzimas (4) (100-104).

Debido a la variación estructural, los fructanos de agave son un ingrediente muy atractivo (5), ya que a diferencia de los fructanos de achicoria que son lineales, los fructanos de agave contienen principalmente fructanos ramificados y esto les permite ser metabolizados con mayor rapidez por algunas bacterias probióticas (6). Estudios por Márquez et al. 2016 demuestran que tanto el grado de polimerización (DP por sus siglas en inglés) y el proceso de desmineralización pueden influir en la actividad biológica de éstos (7).

Los fructanos pueden estar formados por enlaces lineales β (2-1) llamados inulinas o fructoligosacáridos (FOS), con una longitud o un grado de polimerización (8) menor a 10 unidades. Otro tipo de fructano que presenta estructura lineal son los levanos, contienen enlaces β (2-6) (9). Los fructanos mixtos, son moléculas ramificadas complejas con enlaces fructosa-fructosa del tipo β (2-1) y β (2-6) con una longitud de cadena o grado de polimerización mayor de 10 unidades. Existen reportes donde se han encontrado fructanos que exceden 200 DP (10). Por otro lado, los fructanos de agave llamados “agavinas”; contienen principalmente fructanos mixtos ramificados, pueden contener unidas en su cadena de fructosa una molécula de glucosa interna o externa característica de los neofructanos y contienen pequeñas cantidades de fructanos lineales (1).

Los fructanos ramificados han sido investigados por sus propiedades como agentes espesantes y efectos positivos en la salud encontrando mejor respuesta como prebióticos y moduladores

de la flora bacteriana benéfica (5). Los fructanos de cadena corta han mostrado efectos en la disminución de ganancia de peso en modelos de obesidad a nivel pre-clínico (7). Es por esto de suma importancia contar con una técnica que nos permita caracterizar adecuadamente los fructanos de agave. Resaltando que para establecer correctamente las propiedades y aplicaciones potenciales de los fructanos; debe de determinarse la distribución de tamaño de los azúcares contenidos en la muestra de fructanos, con parámetros como grado de polimerización promedio en número y en peso (DPn y DPw respectivamente). La relación (DPw / DPn) es una medida de dispersión o distribución de peso (11) teniendo en cuenta obviamente el grado de polimerización promedio (8) de los fructanos.

Se han descrito distintas técnicas para determinar el DP de fructanos. El método más convencional pero no muy exacto es a través de hidrólisis enzimática de los azúcares (5). En esta técnica, se miden polisacáridos de fructosa y glucosa liberada. El contenido de fructanos es una estimación y no es posible tener un perfil de tamaños, ya que no tiene en cuenta la distribución de todas las fracciones (12). Se han utilizado métodos analíticos más modernos, como la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography por sus siglas en inglés) y la cromatografía de exclusión de alta precisión (HP SEC, High Pressure Size Exclusion Chromatography por sus siglas en inglés). El primero depende de interacciones dipolo, es decir por atracción electrostática entre el extremo positivo de una molécula polar y el negativo de otra, dentro de las moléculas de fructanos cargadas en la columna. HPLC cuantifica y separa fructanos a través de una columna o fase estacionaria y una fase móvil que hará pasar las moléculas a través de la columna. Tanto HPAEC-PAD y HPLC se considera que cuentan con una buena resolución de separación y son métodos confiables. Sin embargo, demandan mucho tiempo y no se tienen reactivos estándares disponibles para evaluar DP >12 (13).

Por otro lado la cromatografía de exclusión de alta resolución (HP SEC) es una herramienta bastante poderosa para caracterizar polímeros, ya que nos permite tener una descripción completa de la distribución del tamaño de polímeros (14). Y así mismo, se puede calcular DPn /DPw para hacerla aún más precisa. Esta técnica se enfoca en la separación de moléculas por su tamaño. Se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, pasarán sin retardos a través de la fase estacionaria. Se podrá conocer el tiempo que tarda cada molécula con peso desconocido en recorrer la columna de gel, a partir de

sustancias con pesos moleculares conocidos. Así se analiza el área bajo la curva de cada tiempo de retención que corresponde a distintos grados de polimerización de cada uno.

En este contexto, se utilizó el método de cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (HP SEC) para determinar la distribución de tamaños de los fructanos, en las muestras de la base de hoja del agave. Esta información será de gran interés comercial para el desarrollo de un subproducto del agave mezcalero en los municipios del estado de Guanajuato.

CAPÍTULO 1

1. PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estado de Guanajuato desea obtener la denominación de origen del mezcal, con un proyecto integral donde se tiene como objetivo estudiar la región norte del estado para determinar la viabilidad, factibilidad y potencialidad del agave mezcalero, la producción de mezcal y otros productos derivados; como es el caso de los fructanos de agave. En este último objetivo se requiere conocer la distribución del perfil polimérico de los fructanos contenidos en la base de las hojas de agaves recolectados de la zona norte del estado, debido al efecto benéfico que ejercen sobre la salud humana y que está en función a su diversidad estructural. Esto mediante el uso de técnicas analíticas de cromatografía de exclusión molecular (HP SEC) que permitirán obtener una caracterización adecuada de los fructanos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Determinar verazmente la distribución de tamaños de los azúcares que conforman el agave, especialmente los fructanos nativos es de gran importancia, ya que; en función de su peso molecular, grado de polimerización y tipos de enlaces que los conforman variará el impacto potencial benéfico en la salud humana. Actualmente los fructanos de agave comerciales utilizados como fibras dietéticas están sometidos bajo la regulación de Norma Oficial Mexicana, específicamente NOM-002-SAGARPA-2016: relativa a las características de sanidad, calidad, autenticidad y evaluación de los fructanos de agave y la cual considera un perfil de distribución de pesos moleculares específicos para poder asegurar la calidad del producto y avala la caracterización por cromatografía de exclusión dentro de las técnicas analíticas a utilizar para este fin. De aquí parte la relevancia de estudiar los fructanos de distintas especies del estado de Guanajuato, el determinar el perfil de distribución de pesos moleculares crea un panorama general que nos da pauta a las posibles aplicaciones alimenticias de los fructanos del estado de Guanajuato y abre las puertas a la industria alimentaria como una rama del aprovechamiento integral de los agaves mezcaleros del estado.

1.3 HIPÓTESIS

La cromatografía de exclusión de alta resolución HP SEC mostrará la distribución de carbohidratos de fructanos obtenidos de la base de la hoja de agaves silvestres, incluyendo el grado de polimerización promedio de los mismos (en número y peso), y el peso molecular de los polímeros que los conforman.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar por cromatografía de exclusión la distribución de pesos moleculares de fructanos de agaves silvestres muestreados en municipios del estado de Guanajuato.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer fructanos y carbohidratos solubles de la base de la hoja de agave crudo.
2. Evaluar la distribución de los fructanos por cromatografía de exclusión y cuantificar por HPLC monosacáridos y polisacáridos simples.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GUANAJUATO SUS AGAVES Y EL MEZCAL

El género *Agave* es un habitante típico de climas áridos y semiáridos de América que surgió en el centro de la antigua Mesoamérica lo que corresponde actualmente a los estados del centro y sur de la república mexicana (15, 16) por lo que es un género típicamente endémico de México. Se cuenta en el país con 119 especies de agave convirtiéndolo en el mayor centro de riqueza y diversidad. En México el agave tiene un alto impacto a nivel económico y cultural ya que las diferentes especies de *Agave* han sido utilizadas desde tiempos remotos para la elaboración de distintas bebidas alcohólicas destiladas, como es el tequila y el mezcal. Actualmente la producción de mezcal es la actividad agroindustrial más importante en diversos estados de México (AGARED, 2018). El estado de Guanajuato cuenta con la presencia de especies de *Agave* por ser estado fronterizo de los principales estados productores de bebidas destiladas, Jalisco y San Luis Potosí. Destaca principalmente la siembra de plantas del género *A. tequilana* y *Salmiana* en la región norte del estado (GOB S. G., 2016). En Guanajuato existe una vegetación limitada aunque la flora original está compuesta por zacates, órganos, nopales y magueyes (17), ideales para la producción de bebidas en base a esta planta.

Reportes del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) mencionan que el estado de Guanajuato cuenta con aproximadamente 16 mil 281 hectáreas sembradas de diferentes especies de agave, principalmente *A. tequilana* Weber, y de éstas el 43 por ciento, están dentro de la zona de denominación de origen tequila, aspecto relevante para el mercado de exportación. Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas cuentan con denominación de origen del tequila. Los municipios de Guanajuato con DO son: Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita (18). En Guanajuato no solamente se produce tequila, actualmente en el estado la producción de mezcales ha cobrado participación importante, principalmente en el municipio de San Felipe el cual se integró en el 2001 a la denominación de origen del mezcal, así como el municipio de San Luis de la Paz, ambos productores de mezcal de la región (Guanajuato, 2018). Se estima que para la elaboración del mezcal se utilizan 28 especies de *Agave* a nivel nacional, principalmente *Agave angustifolia* Haw (maguey espadín); *Agave esperrima jacobi*, *Amarilidáceas* (maguey de cerro, bruto o cenizo); *Agave weberi cela* (maguey de mezcal);

Agave Salmiana Otto Ex Salm ssp. crassispina, sin embargo, los municipios del estado de Guanajuato como San Luis de la Paz, es utilizado mayormente el agave del género *Salmiana* (19).



FIGURA 2. 1 ESPECIES DE AGAVES UTILIZADAS PARA LA ELABORACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS Y SUBPRODUCTOS. A) AGAVE TEQUILANA WEBER VAR. AZUL. B) AGAVE SALMIANA. C) AGAVE ANGUSTIFOLIA.

2.2 PRODUCTOS DERIVADOS DEL AGAVE

La producción de bebidas alcohólicas destiladas o no destiladas propiamente de la planta del agave, ha sido sin duda una de las principales aplicaciones desde tiempos ancestrales. Pero a lo largo del tiempo se ha diversificado el aprovechamiento de ésta, en distintas aplicaciones de la industria alimentaria utilizando los fructanos de agave, jarabes, mieles y bebidas destiladas como el mezcal sin olvidar las no destiladas, el pulque y aguamieles. También el aprovechamiento de los subproductos de la industria en biocombustibles y que hoy en día está bajo investigación con un futuro prometedor (20).

2.2.1 PULQUES, AGUAMIELES Y MEZCAL. DENOMINACIÓN DE ORIGEN Y NORMATIVIDAD

Los productos derivados del agave en México son bastantes amplios, en cuestión de bebidas fermentadas se encuentra el pulque (**Figura 2.2 A**), aunque internacionalmente no es tan reconocida, en México es bastante popular (21). Es una bebida de origen prehispánico y producido de manera artesanal, a base de la fermentación del mucilago o jarabe de agave con microorganismos autóctonos de la planta. Para la producción del pulque, la fermentación de

aguamiel (**Figura 2.2 B**) se inicia en el maguey, continuando su proceso natural en los tinacales (tinajas de fermentación) (22). Gracias a los altos contenidos de azúcares y presencia de distintos tipos de microorganismos, la savia del agave se vuelve propicia para el crecimiento de bacterias del ácido láctico, productoras de dextranos, bacterias productoras de ácido acético, etc.

Según el SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2013) los estados de México que cultivan agave pulquero son: Coahuila, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Las plantas que se usan pertenecen a las especies *Agave Salmiana* y *Agave atrovirens*, *Agave mapisaga*, *Agave mapisaga* var. *lisa*, *Agave angustifolia*, entre otras (22).

La miel que se obtiene de las piñas de agave no solo se utiliza para la elaboración de bebidas fermentadas; sino que la miel restante resultado de la hidrólisis de los fructanos del maguey se aprovecha para producir jarabe endulzante, el cual está comercializado y popularizado por su índice glucémico bajo respecto a otros jarabes naturales (23). Estos productos son obtenidos principalmente de *Agave tequilana* Weber var. *Azul*.



Alistan Feria del Pulque Tepetlaoxtoc (2014) | Almomento.Mx [Imagen en línea] <http://almomento.mx/alistan-feria-del-pulque-tepetlaoxtoc-2014/>



Recetas prehispánicas: atole de aguamiel - Más de México (2016) | [Imagen en línea] <https://masdemx.com/2016/08/recetas-prehispanicas-atole-de-aguamiel/>

FIGURA 2. 2 PULQUE Y AGUA MIEL. A) PULQUE, BEBIDA FERMENTADA ELABORADA CON AGUA MIEL. B) AGUA MIEL ACUMULADA EN EL TALLO DEL AGAVE.

El mezcal es otra de las bebidas alcohólicas tradicionales de México y reconocida en el mundo, producto de la fermentación de los azúcares del jugo extraído de la piña cocinada de diferentes agaves como el *Agave salmiana* y *Agave angustifolia*, *Agave esperima*, *Agave weberi* y *Agave potatorum* (24) y otras especies de agave, siempre y cuando no sean ya utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo estado. De acuerdo a lo establecido en la NOM-070-SCFI-1994: “se considerará mezcal a aquella bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de agave; cabe destacar que

para ser utilizada la planta con estos fines, debe de alcanzar una madurez de 7 a 12 años” (25). El proceso de elaboración debe estar verificado bajo la norma NOM-251-SSA1-2009 titulada “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y se resume en lo siguiente: recolección de la materia prima (piña o tallo jimado, sin hojas), el cocimiento de la piña; como función de hidrolizar los fructanos en azúcares simples y ponerlos disponibles al consumo de microorganismos, molienda de la piña cocida para obtener los jugos, doble fermentación, destilación y rectificación”. Una característica de esta bebida es que su sabor y olor los adquiere durante la cocción de la piña, la fermentación de azúcares y el destilado. Esto es dependiente de la naturaleza del agave (25).

El mezcal como el tequila (**Figura 2.3 A y B**) son productos que cuentan con la determinación de denominación de origen mexicano. Una denominación de origen (DO) “es el nombre o indicación de un lugar geográfico, que puede ser un país o región determinada, que designa un producto que por ser originario de dicha región y por las costumbres de producción o transformación de sus habitantes, tiene unas características y/o reputación que lo hacen diferente” (Secretaría de Economía, 2015). El mezcal fue nombrado con denominación de origen desde 1994, y fue aprobada (registrada en Ginebra Suiza el 09 de marzo de 1995, ante la Organización Mundial de la Propiedad Industrial), significa la protección de cierto territorio para la producción de dicha bebida a nivel nacional e internacional (Guanajuato G. d., 2015). Los estados de la República Mexicana que actualmente cuentan con DO del mezcal son: Oaxaca, Guerrero, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán y Guanajuato.

Existe un organismo regulador para garantizar y salvaguardar esta denominación, el CONSEJO MEXICANO REGULADOR DE LA CALIDAD DEL MEZCAL A.C. (COMERCAM), con el propósito de ser el Organismo Certificador del Mezcal, con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Mezcal Especificaciones.

Por lo tanto, es de suma importancia para los nuevos productores de mezcal contar con la certificación oficial de sus productos auténticos 100% de agave y, avalados por la COMERCAM, debido a la ventaja en el comercio mexicano y extranjero (Guanajuato G. d., 2015).



Blog Oficial Experiencias Xcaret Xoximilco, Differences Between Tequila and Mezcal (2016) [Imagen en línea] <http://blog.xoximilco.com/en/tequila-vs-mezcal/>

FIGURA 2. 3 TEQUILA Y MEZCAL. A) TEQUILA Y B) MEZCAL DONDE SE APRECIAN SUS DIFERENCIAS FÍSICAS.

2.3. FRUCTANOS DE AGAVE

Los fructooligosacaridos (FOS) y los fructanos son carbohidratos solubles que se encuentran distribuidos principalmente durante la transición de la planta joven a adulta, y su principal función es actuar como reserva energética en algunas plantas mono y dicotiledóneas; por ejemplo en ajo, cebolla, achicoria (*Cichorium intybus*), en especies *Dasyliirion* y por supuesto en plantas de Agave (1). El término de fructanos se emplea para los oligosacáridos y polisacáridos que contienen enlaces glicosídicos con fructosas en su estructura (13).

Los principales productos de la fotosíntesis son los fructanos, que se sintetizan y almacenan en los tallos, cuya función principal es el almacenamiento como reserva energética, pero también tienen un rol relevante actuando como osmoprotectores durante temporadas de sequía (26, 27). Los carbohidratos de reserva acumulados preferencialmente de *Agave tequilana* durante el período de crecimiento de dos a siete años antes de la floración son fructanos en el tallo (28). Sin embargo, para otras especies se ha demostrado que la síntesis, la acumulación y el transporte de FOS pueden tener lugar en tejidos vasculares y células de floema de hojas maduras (29). Así como la ramificación de moléculas lineales (FOS) se va acentuando durante la transición a plantas adultas (1).

Los fructanos de Agave más estudiados han sido en especies de *A.tequilana* por su alto contenido en el tallo y ser la materia prima principal para la elaboración de tequila (NOM-002-

SAGARPA-2015). Además, por la capacidad prebiótica de sus fructanos y su efecto sistémico en la salud. Son estructuralmente diversos ya que las fructosas pueden unirse tanto a la glucosa, como a la fructosa, a esta última mediante enlaces β (2-1) y β (2-6) produciendo moléculas ramificadas (30). En la industria alimentaria la fuente de fructanos más utilizada hasta el momento es la inulina o FOS lineales provenientes de la achicoria. Sin embargo, existe un amplio potencial para los fructanos de agave ramificados los cuales son una mezcla de isómeros de fructosa, incluyendo inulinas y agavinas, con potencial para impartir propiedades funcionales biológicas y tecnológicas de gran interés a la industria de alimentos (Agaves, 2017).

En los últimos años ha surgido un interés creciente en la extracción, caracterización y usos de los fructanos como un ingrediente potencial en la industria alimenticia y nutracéutica (Agaves, 2017). Por ello se requiere contar con estrategias de investigación y transferencia tecnológica, que permitan los centros de investigación satisfacer la demanda de conocimiento y tecnificación a las industrias procesadoras mexicanas para cumplir correctamente a la normatividad y entrar a un mercado competitivo nacional e internacional.

2.4 ESTRUCTURA QUÍMICA

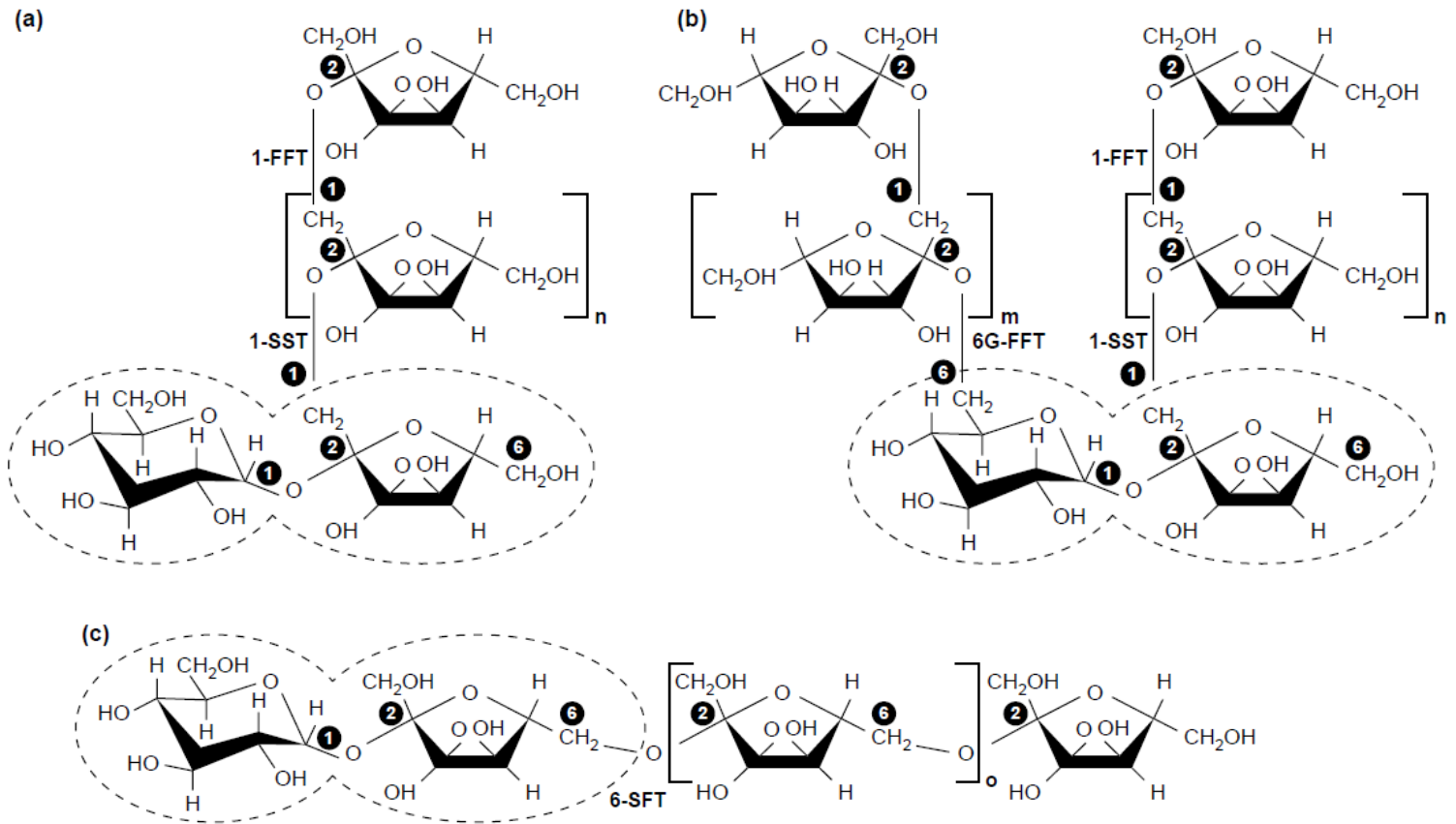
Como ya se mencionó anteriormente; los fructanos del agave contienen una mezcla de unidades de fructosa unidos mediante enlaces O-glucosídicos, en el rango de grados de polimerización (8) entre 3 hasta 50 unidades de fructosa (26), ocasionalmente excediéndose hasta 200 DP (31).

Los fructanos de agave se clasifican de acuerdo como las unidades de β -fructofuranosilo están enlazados: Inulinas con enlaces tipo β (2-1) (**Figura 2.4 A**). Levanos que muestran enlaces β (2-6) (**Figura 2.4 C**). Agavinas/graminanos (glucosa interna/terminal) con ambos tipos de enlaces β (2-1) y β (2-6). Estos fructanos son altamente ramificados, ya que aproximadamente se presenta una ramificación cada cuatro residuos de fructosa de la cadena principal (1). Las agavinas como los graminanos tienen en su estructura una mezcla compleja de fructanos con diferentes DP (30). Mientras que las neoserias tienen dos enlaces lineales β (2-1) o β (2-6) en las cadenas fructosilo, una unido al residuo de fructosilo de sacarosa y el otro unido al residuo de glucosilo generando neoserias de levanina e inulina (**Figura 2.4 B**) (1, 32).

Reportes por Mellado-Mojica y López (2012) demuestran que la diversidad estructural de los fructanos almacenados en *Agave tequilana* Weber var. *Azul* es cambiante a lo largo de su ciclo biológico en campo donde se observan cambios en los tipos de enlaces glicosídicos de acuerdo

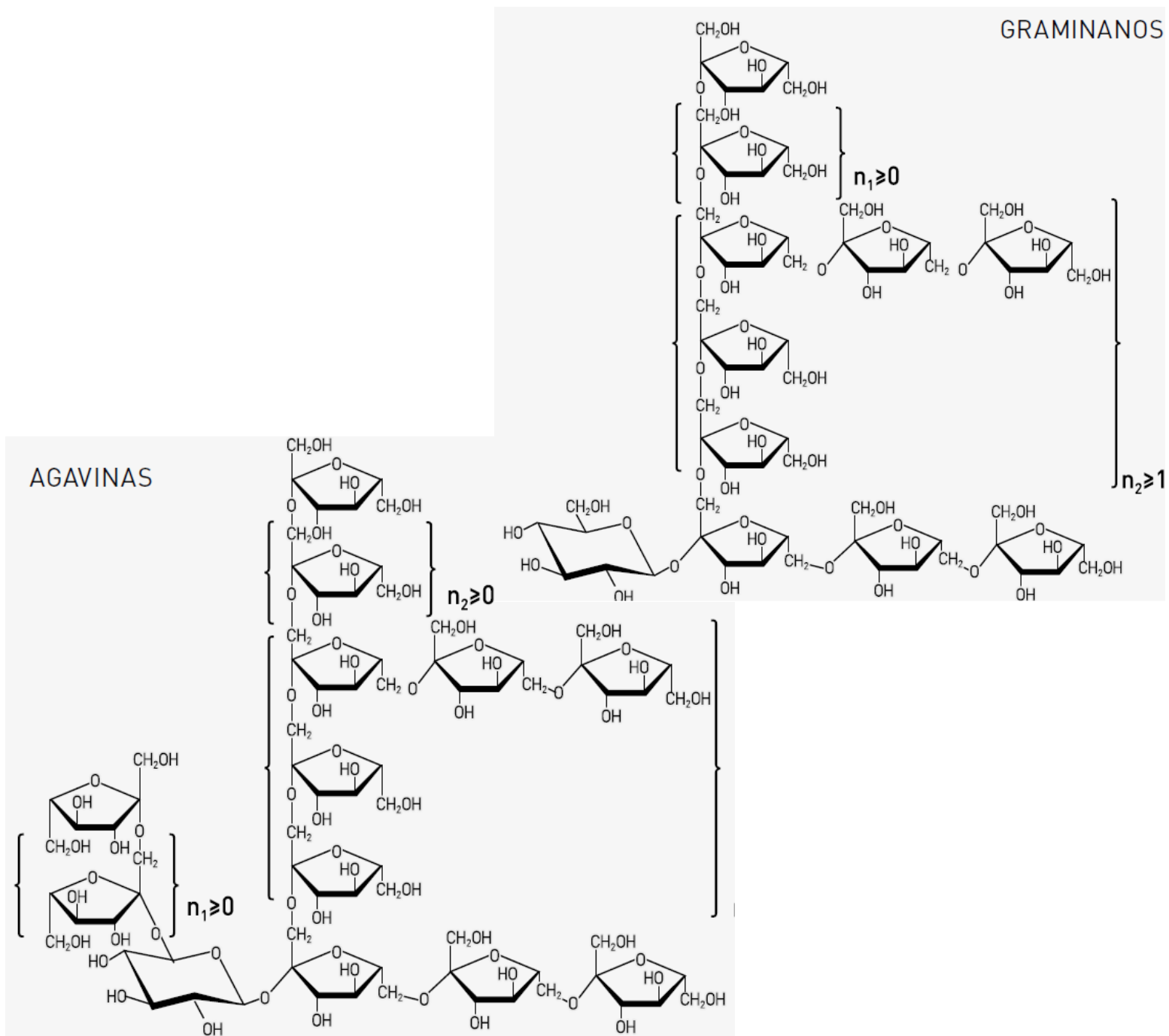
a la edad de la planta y aumento en el DP conforme la planta va envejeciendo. Sugiriendo una fuerte relación del ciclo biológico de la planta y el tipo de fructano encontrado.

Los fructanos vegetales tienen gran diversidad estructural en comparación de los producidos por bacterias (31). Esto debido a los diferentes factores fisiológicos de la planta o podría ser la consecuencia de los diferentes orígenes evolutivos de la biosíntesis de fructanos en diferentes familias (26).



Tomado de: Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 223-230.

FIGURA 2. 4 ESTRUCTURAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE FRUCTANOS. LAS ENZIMAS DE UNIONES ESTÁN INDICADAS RITSEMA Y SMEEKENS (2003). A) INULINA TIENE UNA CADENA DE FRUCTOSILO CON ENLACES B (1-2) LINEALES. B) NEOSERIES TIPO INULINA TIENE DOS CADENAS DE FRUCTOSILO CON ENLACES LINEALES B (1-2), UNA LIGADA AL RESIDUO FRUCTOSILO DE LA SACAROSA Y LA OTRA UNIDA AL RESIDUO GLUCOSILO. C) LEVANO TIENE UNA CADENA DE FRUCTOSILO CON ENLACE LINEAL B (2-6) UNIDA AL RESIDUO DE FRUCTOSILO DEL INICIADOR DE SACAROSA.



Tomado de: Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839.

FIGURA 2. 5 ESTRUCTURAS MOLECULARES PROPUESTA PARA LOS FRUCTANOS DEL GÉNERO AGAVE (GRAMINANOS Y AGAVINAS)(1)

2.5 TIPOS DE FRUCTANOS DE AGAVE

2.5.1 INULINAS

Los fructanos tipo inulina están disponibles en altas cantidades en las raíces de la planta achicoria (13-20%) (33). Se encuentran en cantidades significativas en la cabeza de las plantas de *Agave tequilana* y en menor abundancia en punta y base de las hojas (15).

Químicamente, los fructanos de tipo inulina son un material poli disperso de carbohidrato lineal que consiste principalmente, si no exclusivamente, en enlaces de fructosil-fructosa β (2-1) (34). Con una molécula terminal α -D-glucosa que puede estar presente pero no es necesario (9). La longitud de cadena de la inulina varía en función de la estación y del tipo de planta, por ejemplo en achicoria la inulina tiene un DP 2 a 60 unidades con un DP promedio de 12 (9), en comparación con la inulina de agave con DP 25 a 34 (35).

Se sabe que la inulina cuando es ingerida pasa intacta a través del sistema digestivo, hasta que llega al intestino grueso, donde es fermentada por bifidobacterias y lactobacilos para obtener diversos productos metabólicos, y su eliminación del organismo es parcial, actuando como fibra (36, 37). Este fenómeno es probablemente explicado debido a la configuración del C2 anomérico en sus monómeros de fructosa. Así mismo es probable que los fructanos de tipo inulina sean resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas (α -glucosidasa, maltasa-isomaltasa, sacarasa), que son específicas para enlaces α -glicosídicos, convirtiéndose en prebióticos (7).

Diversos estudios *in vitro* y con modelos animales han demostrado los efectos benéficos en la salud de los fructanos provenientes de agave. Al actuar como fibras, inducen efectos variables sobre la composición corporal, el colesterol en la sangre y las concentraciones de glucosa en sangre (35). Así como disminución de metabolitos tóxicos y promueven la actividad enzimática. También Márquez et. al (2016) y Holscher et. al (2015) demostraron un aumento significativo en el contenido de bacterias prebióticas en el sistema digestivo de ratones (2, 38).

2.5.2 GRAMINANOS

Los fructanos tipo graminano, son moléculas mixtas que tienen enlaces tanto β (2-1) como β (2-6) con moléculas externas de glucosa (1, 5), muestran una longitud de cadena mucho mayor con algunas ramificaciones (30). La estructura de graminanos se encuentra en fructanos pertenecientes a plantas como el trigo y en familias que forman parte del orden *Asparagales*, lo que incluye a la familia *Agavaceae* y *Dasyllirion*, ya que ambos contienen enlaces β -

fructofuranosilo, además de los restos ramificados de fructofuranosilo (1). El componente básico para que los fructanos se ramifiquen es bifurcosa, una molécula ramificada con un DP 4; por lo tanto, a partir de esta estructura, las enzimas fructofuranosil transferasas (FT) cataliza la fructosiltransferencia durante la formación del polímero (39).

2.5.3 NEOFRACTANOS (AGAVINAS)

Las plantas del genero *Agave* no solo contienen fructanos tipo inulinas y graminanos, en el 2003 sé elucidó por el grupo de López, Mercedes et. al (2003) un tipo de fructano ramificado parecido a los graminanos a los cuales clasificó como “agavinas”. Este tipo de fructano exhibe una de las mayores complejidades estructurales pues están constituidos de enlaces β (2-1) y β (2-6), con unidades internas de glucosa (fructanos tipo neoserie), se caracterizan por una α -D-glucopiranososa (1, 32, 40).

Graminanos y agavinas están presentes en plantas de todas las edades, sin embargo las proporciones fluctúan de acuerdo con la edad de la misma (30). Mancilla et. al (2006) observaron diferencias reales en la composición de los enlaces glicosídicos que presentan los fructanos de *Agave tequilana Weber var. azul* conforme a la edad de la planta, incrementando su grado de polimerización (rango de DP 6 a DP 23), la proporción de agavinas es mayor respecto a los fructanos tipo graminanos; así como el número y frecuencia de ramificaciones.

2.6 BIOSÍNTESIS DE FRUCTANOS

La biosíntesis de fructanos en plantas comienza con sacarosa (Sac), a la cual se agregan los residuos de fructosa (41), mediante las enzimas fructosiltransferasas. Existen dos principales enzimas encargadas de sintetizar fructanos: sacarosa-fructosiltransferasa (1-SST) y fructan-1-fructosiltransferasa (1-FFT) (26). La enzima (1-SST) inicia *de novo* la síntesis de fructano catalizando la transferencia de un residuo de fructosilo de una molécula de Sac a otra, dando como resultado la formación del trisacárido 1-kestosa (**Figura 2.6**) (5). A partir de 1-kestosa muchas plantas la convierten en moléculas más complejas de fructanos, haciendo uso de la misma enzima.

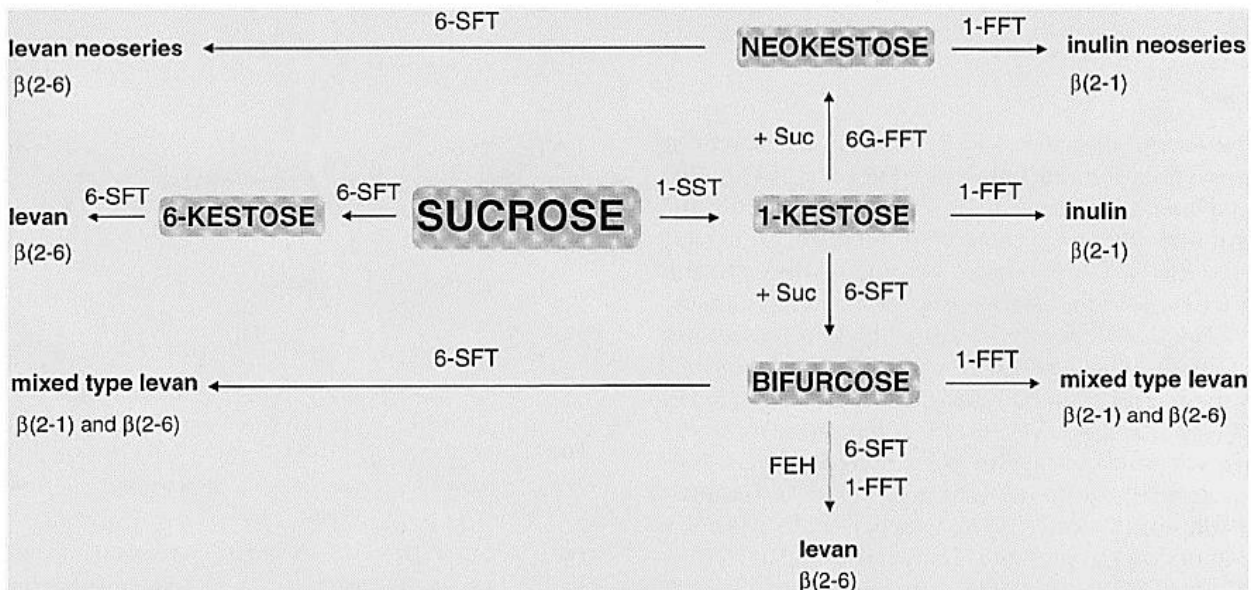
La segunda enzima, 1-FFT transfiere residuos de fructosilo de una molécula de fructano con un DP de ≤ 3 a otra molécula de fructano. Las acciones de 1-SST y 1-FFT dan como resultado la formación de una mezcla de moléculas de fructano con diferentes longitudes de cadena (31).

Estudios de expresión genética de 1-FFT de plantas de achicoria de *Jerusalem*, reflejaron la longitud de distribución de inulinas *in vivo*, e indican que la actividad enzimática de 1-FFT

determina la longitud de inulina sintetizada (42). También observaron en estudios de transformación de plantas de tabaco con cDNA de la enzima 1-FFT de achicoria, que producía moléculas con un DP mayor de hasta 20 unidades, acentuando la importancia de la actividad de 1-FFT en función con la longitud de la molécula (43). Sin embargo ambas enzimas son necesarias para la síntesis de fructanos tipo inulinas (26), y su acción conjunta da como resultado una mezcla de fructanos con diferentes longitudes de cadenas (31).

Se requieren de otras enzimas adicionales para la síntesis de fructanos más complejos. La síntesis de neo-series inulina requiere fructan: fructan-6G-fructosyltransferasa (6G-FFT). Ensayos con enzimas purificadas y clones heterólogos expresados mostraron que esta enzima produce el trisacárido neokestosa mediante una molécula de 1-kestosa como donador de fructosa y transfiere la fructosa al residuo de glucosa de sacarosa a través de un enlace $\beta(2-6)$ (44). 6G-FFT no solo sintetiza neo-kestosa, también es capaz de producir una gama completa de inulina y neo series (**Figura 2.6**) (26).

Actualmente no se conocen con certeza los mecanismos de biosíntesis de los fructanos tipo graminanos, pero se sabe que tales fructanos complejos podrían ser producido por la acción combinada de 1-SST, 1-FFT, sacarosa: fructan 6-fructosiltransferasa (6-SFT) y 6G-FFT(45). Una posible vía de producción de fructanos ramificados es a partir de Sac y 1-kestosa, 6-SFT produce bifurcosis, que también pueden alargarse mediante 1-FFT o 6-SFT, dando como resultado levanos ramificados de tipo mixto (31). Tampoco se tiene elucidado de qué forma son inducidas la acción de fructosiltransferasas: sin embargo, estudios de clonación del promotor 6-FFT en centeno indican que los responsables de activar el promotor es por inducción de luz y sacarosa (46), también se sugiere un rol importante de proteínas quinasas y fosfatasas en la inducción de estas enzimas (47).



Tomado de: Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant physiology*, 120(2), 351-360.

FIGURA 2. 6 ESQUEMA DE BIOSÍNTESIS DE FRUCTANOS DE PLANTAS (VIJIN AND SMEEKENS, 1999). A PARTIR DE SAC, 1-SST PRODUCE 1-KESTOSA, PUEDE USAR 1-FFT RESULTANDO EN FORMACIÓN DE INULINA. DE SAC Y 1-KESTOSA, 6G-FFT PRODUCE NEOKESTOSA, QUE PUEDE ALARGARSE MEDIANTE 1-FFT O 6-SFT, LO QUE DA COMO RESULTADO NEOSERIES DE INULINA. A PARTIR DE SAC Y 1-KESTOSA, 6-SFT PRODUCE BIFURCOSA, QUE PUEDEN ALARGARSE MEDIANTE 1-FFT O 6-SFT, DANDO COMO RESULTADO LEVANOS RAMIFICADOS DE TIPO MIXTO. CUANDO SOLO ESTÁ DISPONIBLE SAC COMO SUSTRATO, 6-SFT PRODUCE 6-KESTOSA, QUE TAMBIÉN PUEDE ALARGARSE MEDIANTE 6-SFT PARA PRODUCIR LEVANOS.

2.7 PESO MOLECULAR DE POLÍMEROS

Los polímeros están formados por las reacciones en cadena de pequeñas moléculas llamadas monómeros. Las sustancias macromoleculares resultantes son clasificadas por la distribución según su masa molar (14), la cual es una de las principales características responsable de las propiedades físicas de éstos (48). Por ende, los fructanos son considerados polímeros o polisacáridos, debido a que están compuestos por unidades repetitivas de fructosa, cuya longitud de cadena está determinada por el número de unidades que se repiten en la cadena, a esto se le conoce como grado de polimerización (DP por sus siglas en inglés). Con respecto al tamaño de cadena, a los fructanos con un DP menor a 10 unidades se les conoce como fructo oligosacáridos (FOS) mientras el término fructano en general, se utiliza respecto a los conformados con un DP mayor a 10. Por lo tanto, los fructanos con un DP mayor tienden a tener un peso molecular más alto y viceversa.

La caracterización de un polímero requiere conocer la distribución de pesos moleculares en la muestra y una de las técnicas analíticas utilizadas para conocer esta distribución es por cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (HP SEC).

El peso molecular promedio en número **Mn** ecuación [1] describe el peso total de todas las moléculas poliméricas que están presentes en la muestra, dividido por el número total de las mismas. El peso molecular promedio en peso **Mw** ecuación [2] se obtiene a partir del peso de cada fracción **Mi**. La importancia de este parámetro radica en que permite obtener la distribución de pesos moleculares, tomando en cuenta que los polímeros a diferencia de los compuestos de bajo peso molecular no tienen un peso molecular único. Es importante no sólo tomar en cuenta el valor del peso molecular, sino la distribución de los mismos. Por lo tanto, los fructanos al estar constituidos por polímeros homogéneos, pero a la vez con distinta longitud de cadena y diferente peso molecular, se consideran materiales polidispersos. Es por eso necesario medir la amplitud de la distribución de pesos moleculares, mediante el cálculo del índice de polidispersidad **IP** ecuación [3] (48). Valores cercanos a 1 muestran mayor homogeneidad y por lo tanto mejores propiedades que los lejanos a 1 (Herrera Soberanís, 2016). El grado de polimerización promedio en número **DPn** ecuación [4] y grado de polimerización promedio en peso **DPw** ecuación [5] está en función de **Mn** y **Mw** respectivamente, donde la reacción de polimerización de las moléculas de fructosa se toma en cuenta para medir estos parámetros. Una molécula de agua es liberada por cada molécula de fructosa que es añadida a la cadena, en consecuencia, se resta el peso molecular del agua dividido entre el peso molecular de dos monómeros de fructosa (Herrera Soberanís, 2016).

$$[1] \quad \mathbf{Mn} = \frac{\sum \mathbf{Xi} * \mathbf{Mi}}{\sum \mathbf{Xi}} \quad (\text{Mier y col., 2012})$$

También puede ser descrita como $\mathbf{Mn} = \sum \mathbf{Xi} * \mathbf{Mi}$

Donde **Xi** es la fracción en número de moléculas de tamaño **Mi**. El subíndice *i* agrupa a las moléculas con peso molecular **Mi**.

$$[2] \quad \mathbf{Mw} = \sum \mathbf{Wi} * \mathbf{Mi} \quad \text{donde } \mathbf{Wi} = \mathbf{Ni} \times \mathbf{Mi}, \text{ siendo } \mathbf{Wi} \text{ el peso de las moléculas que tienen el peso molecular } \mathbf{Mi}.$$

$$[3] \quad IP = \frac{Mw}{Mn}$$

$$[4] \quad DPn = \frac{Mn-18}{162.1}, \quad [5] \quad DPw = \frac{Mw-18}{162.1}$$

(Herrera Soberanís, 2016)

2.8 EFECTO BIOLÓGICO Y FUNCIONAL DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

Los efectos benéficos de la inulina y fructanos de agave en la salud humana han sido investigados durante los últimos años, debido al gran potencial que tienen como alimentos funcionales (26). Los fructanos tipo inulina han demostrado su comportamiento como fibra dietética al ser insolubles en el tracto digestivo debido a su configuración química, pero si fermentables por microorganismos benéficos en el colon (49), convirtiéndolos en prebióticos ya que permiten cambios específicos, tanto en la composición y / o actividad en la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios sobre el bienestar del huésped (9). Diversas investigaciones *in vitro* y en modelos animales han demostrado que los fructanos de agave son capaces de aumentar significativamente la cantidad de bacterias benéficas, por ejemplo *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* que reducen la presencia de patógenos en el intestino (2, 5, 50) ya que los microorganismos prebióticos producen metabolitos extracelulares inducidos por los fructanos de agave, mostrando un efecto antibiótico contra *Clostridium ssp.*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (50).

Se tiene evidencia que existe influencia respecto al grado de polimerización y peso molecular de los fructanos sobre la actividad bacteriana. Fructanos de bajo y mediano peso molecular extraídos de *Agave Salmiana* y *Agave tequilana* revelaron un mayor crecimiento de bacterias prebióticas en comparación con los fructanos de alto peso molecular (51), así como la proliferación de ciertas cepas al ser utilizados fructanos de bajo peso molecular como fuente de carbono (6).

Los fructanos de *Agave tequilana* y *Agave Salmiana* no solamente tienen influencia sobre la microbiota benéfica del aparato digestivo, sino que revelaron disminución de ganancia de peso corporal al ser administrados fructanos con bajo DP como parte dietética en ratones (2) y mejora en el metabolismo lipídico y la respuesta glucémica al ser suministrados fructanos con DP > 10 en los mismos modelos animales, así como otros efectos fisiometabólicos positivos (52). Los

resultados de estas investigaciones mostraron que los fructanos de *Agave tequilana* no tienen efectos mutagénicos o tóxicos atribuidos y son seguros de ingerir, incluso a altas dosis (7).

También están involucrados en la activación y la diferenciación selectiva de las células del sistema inmune a través de interacciones con los prebióticos (8). Moreno-Vilet et.al (2013) demostraron que hubo mayor expresión de activación en células inmunitarias de activación temprana CD69, actividad proliferativa y producción de óxido nítrico cuando se administraron fructanos de *Agave Salmiana* junto con ciertos prebióticos.

Los fructanos de agave de distintas especies, tienen entonces amplias posibilidades de incorporación a una amplia gama de productos alimenticios y pueden ejercer un impacto beneficioso en la salud intestinal, prevenir enfermedades gastrointestinales como el cáncer de colon y ser auxiliares para tratamientos de pacientes obesos.

2.9 PROCESO DE OBTENCIÓN DE FRUCTANOS

El jugo de la piña de la planta de agave es el que mayor cantidad de fructanos contiene, *Agave Salmiana*: 69%, *Agave tequilana*: 73% (base seca) (32) y es extraído por presión o molienda y lixiviación. Generalmente antes del proceso de extracción del jugo, las piñas previamente jimadas son desfibradas utilizando cuchillas o machetes, seguido de una desfibradora desintegradora de discos tipo astillera para lograr mayor recuperación de jugo (17), sin embargo en algunos estudios someten primero las piñas a la molienda y el jugo es filtrado para separar los sólidos y fibras (53).

Los sistemas de presión o molienda que se pueden utilizar para el agave crudo son los mismos que para agave cocido: molinos de rodillos y prensas de tornillo, las cuales presentan limitaciones en el caso de procesar agave crudo, debido a la dureza de las fibras que contiene. Para el procesamiento de agave crudo se utiliza preferencialmente prensas de tornillo o en este caso en particular, prensas hidráulicas que muestran mejores rendimientos en comparación con la molienda debido a que el material es obligado a fluir siendo comprimido conforme avanza (17).

La extracción de fructanos de agave mediante lixiviación se realiza mediante el uso de un solvente (agua) a temperaturas entre 75 y 85°C, y es una práctica común hoy en día en el medio industrial (17). Se utiliza desde tiempos remotos con un equipo llamado “difusor” siguiendo el principio del lecho móvil. Tales equipos operan en etapas múltiples y permiten obtener la mayor

recuperación de fructanos de la materia prima, sin embargo, el jugo rico en fructanos que se obtiene, debe de ser procesado por etapas de purificación (54).

En ocasiones el tejido vegetal donde se desea obtener los fructanos es desecado y triturado para formar una harina, y esta posteriormente es utilizada como fuente directa de extracción de fructanos en una relación adecuada de sólido: agua, en agitación y temperaturas de 20-95°C (15).

2.10 SECADO POR ASPERSIÓN

Con la finalidad de tener un mejor manejo de las muestras y evitar la contaminación con microorganismos del jugo de agave es conveniente eliminar el exceso de agua y micro encapsular los fructanos a través de secado por aspersion. Es uno de los métodos más comunes utilizados para la micro encapsulación en la industria alimentaria, mejorando sus características organolépticas del producto (55).

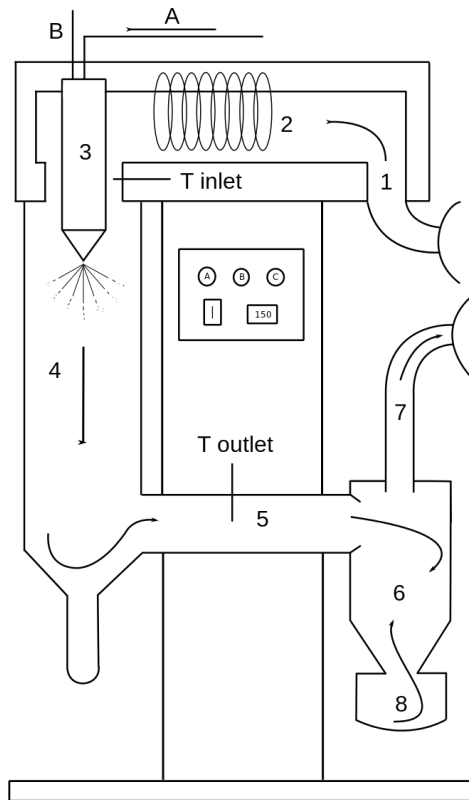
El método en general consiste en convertir un producto que se encuentra en estado líquido inicial a uno pulverizado. Se obtiene un sólido seco utilizando aire con altas temperaturas.

La solución es bombeada a una presión determinada hasta la turbina de pulverización donde es atomizada en gotas sumamente finas de varios micrones, gracias a que pasan a través de un atomizador rotatorio y un distribuidor de aire. Primeramente el aire se mueve por un ventilador succionado a través de un filtro, llevándolo a un sistema de calentamiento logrando alcanzar temperaturas de entrada de 100 y 200°C (56). Después el aire caliente entra a la cámara de pulverización y hace contacto con la solución. Formando partículas esféricas de diferentes tamaños dependiendo de las características físicas de las moléculas a secar. La muestra pulverizada es recogida del contenedor en la base del ciclón (**Figura 2.7**).

El proceso está bajo la influencia de variables, como la temperatura; velocidad del atomizador, flujo de aire, flujo de alimentación, naturaleza de los alimentos y su geometría, los sólidos totales y la concentración en una solución juega un papel importante en los cambios de las propiedades de la solución a micro encapsular (57).

Se ha reportado la optimización de la micro encapsulación de fructanos de *Agave tequilana weber var. azul* utilizando secado por aspersion. El máximo rendimiento, la mejor solubilidad mejorando la higroscopicidad, actividad de agua y azúcares reductores. Se encontró que la temperatura de salida óptima es entre 70 y 80°C, con una velocidad de atomización de 20,000 y 30,000 rpm, flujo de aire de 0.2 a 0.23 m^3/s (58). Por lo tanto se sabe que los FOS tipo inulina

soporta altas temperaturas durante la micro encapsulación, sin embargo no soportan un tratamiento térmico en sí, ya que se romperían las cadenas largas (57).



Production drawing PDF | [Imagen en línea]
<https://mbtskoudsalg.com/images/dryer-drawing-sketch-4.png>

FIGURA 2. 7 SISTEMA DE SECADO POR ASPERSIÓN ESCALA LABORATORIO. A=SOLUCIÓN A SECAR PASA A TRAVÉS, B=GAS ATOMIZADOR ES ATOMIZADO, 1=GAS DE SECADO, 2=CALENTAMIENTO DEL GAS DE SECADO, 3=ATOMIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN, 4=CÁMARA DE SECADO, 5=ESPACIO ENTRE CÁMARA Y CICLÓN, 6=CICLÓN, 7=GAS DE SECADO SALE, 8=COLECTOR DE PRODUCTO.

2.11 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

Determinar el contenido de azúcares en el tallo y hojas de los extractos de jugo de agave, es una tarea primordial para evaluar la calidad del agave cuando es requerido para la elaboración de bebidas alcohólicas, ya que la cantidad y tipo de azúcares que contienen son esenciales para una buena fermentación, las levaduras y microorganismos utilizan los carbohidratos para la obtención de etanol y los compuestos sensoriales de tequilas y mezcales (18). Sin embargo, también nos da indicios de la composición de los fructanos de agave, ya que al cuantificar los mono y disacáridos liberados (F, S, G) por hidrólisis enzimática o química podemos tener una estimación de la distribución de los fructanos (11).

2.11.1 MÉTODOS FOTO COLORIMÉTRICOS

La fructosa y glucosa presente en los agaves son azúcares que en la industria de alimentos es de suma importancia cuantificar, debido a que la cantidad de alcohol obtenido depende de la fermentación de estos azúcares principalmente. Además, los azúcares pueden interactuar con distintos compuestos de los reactivos químicos, dando como resultado una coloración de distinta intensidad y que son medibles con métodos espectrofotométricos, proporcional a la concentración de azúcar presente.

2.11.1.1 MÉTODO MILLER (DNS)

Los azúcares reductores son monosacáridos que poseen el grupo carbonilo intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores (donando electrones) con otras moléculas que actuarán como oxidantes (aceptando electrones). Lo que permite cuantificar la concentración de azúcares en dilución midiendo la cantidad de agente oxidante que es reducido. Dentro de este grupo se encuentra principalmente la glucosa la cual se utiliza como estándar de calibración para medir los agentes reducidos. También son azúcares reductores la maltosa, lactosa y celebiosa.

Según el método de Miller (59) los azúcares reductores son capaces de reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en presencia de calor. Cuando los azúcares reductores entran en contacto con el DNS, este se reduce a 3-amino-5-nitrosalicílico y se produce un cambio de color que va de amarillo hasta café (60). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

2.11.1.2 MÉTODO REACTIVO ANTRONA

El reactivo antrona en combinación con ácido sulfúrico nos permite cuantificar el contenido de carbohidratos presentes en una muestra, por ejemplo; azúcares: hexosas, fructosa, aldopentosas; ya sea en forma libre o en polisacáridos (como fructanos). El método es utilizado ampliamente en la industria azucarera y alimenticia en general (18).

El ácido sulfúrico en contacto con el reactivo de antrona hace que los carbohidratos sean hidrolizados a monosacáridos los cuales sufren deshidratación convirtiéndose en furfurales o hidroximetil furfural (61). Estos compuestos pueden condensarse en aminas aromáticas, fenoles, antrona, etc. y producir coloración, en el caso del jugo de agave la coloración que se experimenta al entrar en contacto el reactivo con la muestra es de color azul y la intensidad en la condensación va en función según la cantidad de azúcares presentes. La cuantificación de los azúcares totales liberados se mide a través de espectrofotómetro que determina la intensidad de la luz que pasa a través de la sustancia, a una absorbancia con longitud de onda de 620 nm.

2.11.2 MÉTODOS CUANTITATIVOS

La cuantificación enzimática o química de los azúcares liberados tiene el inconveniente de mostrar una gran desviación estándar debido a las grandes correcciones que deben realizarse (11), además de no dar una distribución adecuada de los fructanos. Con el fin de obtener un perfil certero de azúcares se utiliza HPLC.

2.11.2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Una metodología sencilla y que muestra mayor fidelidad en cuestión de cuantificar carbohidratos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (**Figura 3.9**), es ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de productos químicos en mezclas complejas (61) en la mayoría de industrias alimenticias, farmacéuticas y en plantas (62).

La técnica se basa en un mecanismo de separación tipo cromatográfico en columna, separando los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. El compuesto se hace pasar por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido o fase móvil (en este caso se utiliza una mezcla de acetonitrilo y agua) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las

interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna (63).

Diversos estudios se han enfocado en cuantificar e identificar los carbohidratos estructurales y no estructurales en diversas especies de agaves ya que son la materia prima para la fermentación de las bebidas, entre ellos se analizaron los carbohidratos en *Agave Salmiana*, donde se ha identificado fructosa, glucosa, sacarosa, xilosa y maltosa en el jugo de agave crudo tanto en piña como en hojas (64). En el caso de *Agave cocui* los resultados sugieren como azúcares presentes en la piña cruda: fructosa y glucosa; en las hojas: arabinosa y manosa; en la piña cocida: xilosa, arabinosa y manosa (60).

2.12 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS

Existen diversas metodologías para evaluar parámetros de calidad y componentes de los fructanos de agave comerciales, así como técnicas analíticas con mayor complejidad para analizar a fondo su composición y estructura (17). Conocer el grado de polimerización de los fructanos y su estructura química es de suma importancia para la industria ya que son requerimientos de norma de ley demostrar su pureza y origen para poder ser comercializados. Los métodos analíticos comúnmente utilizados para la determinación del grado de polimerización de fructanos de agave son los siguientes:

2.12.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y HPLC

La cuantificación de fructanos por el método enzimático, consiste primeramente en purificar el fructano y se hidroliza con una emulsión de inulinasas que romperán los enlaces simples, la fructosa se cuantifica mediante técnicas convencionales. Esta técnica subestima la cuantificación de fructanos ramificados y complejos ya que a las inulinasas no les es posible hidrolizar completamente este tipo de fructano y no muestra un perfil de distribución completo, sino la concentración de fructano (62). Por otro lado, existe una técnica que combina filtración y técnicas cromatográficas para determinar la distribución de perfil de estas moléculas. En general consiste en conocer la concentración inicial de sólidos solubles con un refractómetro y por HPLC la concentración de sacarosa-glucosa-fructosa de la muestra de jugo de agave purificado y clarificado (21). Posteriormente la muestra se filtra con una membrana para separar los fructanos en función de su longitud o DP, finalmente se hidrolizan totalmente por intercambio

iónico y nuevamente se determina la concentración de azúcares simples y por diferencia se estiman los fructanos (11, 64).

2.12.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI -TOF)

La técnica de ionización suave basada en espectrometría de masas MALDI TOF (por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization y detector de iones Time-Of-Flight) **(Figura 2.8)** se ha utilizado como una herramienta eficaz para la determinación de secuencias de oligosacáridos tanto en plantas de ajos, achicoria y agave resultando en una buena alternativa para la caracterización estructural de los carbohidratos ya que ofrece resultados precisos con versatilidad analítica, poco tiempo de análisis, muy alta sensibilidad y acceso directo al peso molecular (32, 65, 66).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar la masa molecular de iones libres, lo que requiere trabajar en condiciones de alto vacío (67). En MALDI TOF la muestra interactúa en la placa de metal que la contiene, con el exceso de una sustancia matriz que cuenta en su estructura anillos aromáticos, de tal forma que se evapora produciéndose una co-cristalización de muestra y matriz, así las moléculas de la muestra quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Esta etapa del procedimiento resulta esencial para conseguir una posterior desorción/ionización eficiente (67, 68). Posteriormente, la placa es introducida en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de radiación láser de longitud de onda del UV, con lo que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz obtienen energía por excitación de los electrones y el analito es protonado con iones H^+ , las moléculas cargadas son analizadas al impactar en el detector TOF que mide el tiempo de vuelo de los iones desde que son acelerados, por la fuente, hasta que impactan en él (68, 69).

Esta técnica analítica ha sido utilizada con éxito para determinar el tamaño molecular de los fructanos de agave, permitiendo la caracterización de la masa molar dando el máximo DP, y registro de una señal para cada cadena presente en la muestra (2, 32). Sin embargo, muestra desventajas si se desea obtener un cromatograma donde se incluya toda la dispersión de tamaños de una sola muestra, ya que, se favorece la visualización de altos o bajos pesos moleculares, más no de ambos (70, 71). Además de la adquisición de un aparato tan sofisticado y de alto precio.



The Lab World Group | Quality, Reliable Tools For An Affordable Price. [Imagen en línea] <https://www.thelabworldgroup.com/bruker-microflex-maldi-tof-mass-spec>

FIGURA 2. 8 EQUIPO DE MALDI-TOF BRUCKER MICROFLEX.

2.12.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (HPAEC-PAD)

La Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Rendimiento con Detector de Pulsos Amperométricos (también conocida como HPAEC-PAD por sus siglas en inglés), la técnica permite la separación de iones y moléculas polares basado en las propiedades de carga de las moléculas. La cromatografía de intercambio aniónico retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente (72). Actualmente es de las más utilizadas para la separación de fructanos en distintos vegetales con diferente DP y para determinar la longitud de cadena de los mismos (13, 73). Ha resultado ser el método analítico oficial para la determinación y cuantificación de oligo fructanos en diversos alimentos, al ser sumamente confiable y exacto (74).

La muestra a analizar debe de ser diluida de tal forma que las concentraciones de componentes de FOS caigan dentro del rango de la curva de calibración, seguido de centrifugación y filtrado (75). Posteriormente se inyectan las muestras en el equipo, el cual es programado con un gradiente de elución determinado. Una solución acuosa conocida como fase móvil lleva la muestra hacia a la columna de cromatografía que contiene un analito en fase estacionaria, este es típicamente una resina o matriz de gel que consiste en agarosa o celulosa cargada (aniones o cationes) en el caso de la resina de intercambio catiónico (76). Las moléculas de interés son conservadas en la fase estacionaria y detectadas por conductividad o por absorción de luz UV (77). Las señales detectadas de cada molécula analizada, así como de los estándares de la curva de calibración son traducidos en picos con amplitudes distintas que son sujetos a comparación (75).

Se ha demostrado la efectividad de este equipo en la separación con picos individuales de fructanos tipo inulina y la separación de fructo oligosacáridos. Sin embargo, muestra debilidades en la caracterización de fructanos con un $DP > 10$, si no se tienen las condiciones correctas programadas en el equipo. Si comparamos los tiempos de elución de los perfiles de inulina se puede obtener una aproximación del DP y polidispersidad (78). Otra inconveniencia que nos enfrentamos en esta técnica es que podemos encontrar en los resultados desviaciones estándar elevadas, cuando la muestra tiene alto contenido de azúcares, maltodextrinas y/o almidón (79).



Romero Pareja Pablo M. Universidad de Cádiz, RESEARCH GATE (2015). [Imagen en línea] https://www.researchgate.net/profile/Pablo_Romero_Pareja/publication/311774190/figure/fig10/AS:441659524685834@1482311244559/Figura-310-Modulos-de-cromatografia-ionica-empleada-en-la-Universidad-de-Cadiz.png

FIGURA 2. 9 EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

2.12.4 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HP SEC)

La cromatografía de exclusión de pesos moleculares es una de las técnicas analíticas más recientes empleadas para la caracterización de polímeros, ya que permite obtener una distribución completa de pesos moleculares de la muestra (17), mediante la construcción de curvas de distribución de pesos moleculares de moléculas estándares conocidas (3). HP SEC está basado en la exclusión de tamaños dependiendo del volumen hidrodinámico de las moléculas. El sistema de detección de señales utiliza un detector de índice de refracción universal y más común (80).

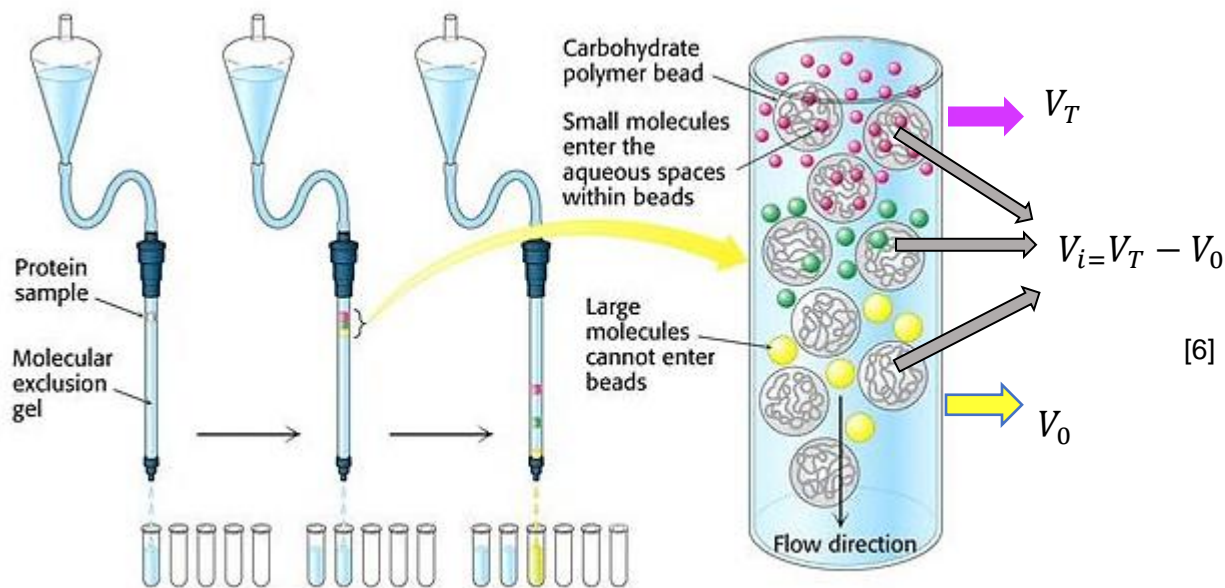
El método también es conocido como filtración en gel o de tamiz molecular porque contiene una columna porosa de gel; cuyas partículas son de un material esponjoso hidratado, con un tamaño de poro determinado (81) y es comúnmente empleada para la separación de ácidos nucleicos, proteínas y polímeros sintéticos (48), donde se han identificado pesos moleculares grandes con DP >12 (82). SEC es una técnica poderosa para obtener el perfil completo de los polímeros de

interés y generalmente tiene una alta precisión para polímeros ramificados regulares pero disminuye en la caracterización de fructanos ramificados aleatoriamente (83).

Actualmente ha cobrado relevancia como método de implementación para determinar la distribución de tamaños en fructanos de agave comerciales (82), debido a que permite conocer los parámetros requeridos en la Norma Oficial Mexicana relativa a los productos derivados de los fructanos de agave; como es el grado de polimerización promedio en número y peso (Diario Oficial de la Federación, 2016).

2.12.4.1 MECANISMO DE LA SEPARACIÓN

El fundamento de separación de SEC se basa en el principio de exclusión molecular, dependiendo del radio molecular hidrodinámico de la molécula. (84). Cuando una mezcla de moléculas de distinto tamaño pasa a través de la columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas de gel; pasarán sin retención a través de la fase estacionaria en un volumen de elución inter-partícula V_0 y por lo tanto, su descenso será más rápido (14) En cambio aquellas moléculas de tamaño intermedio serán capaces de penetrar en las partículas de la columna tan rápido como su tamaño les permite. Por otro lado, las moléculas más pequeñas, junto con las del solvente pasan por todos los poros sin sufrir separación y eluyen en el volumen de permeación total V_T (**Figura 2.10**), que representa el volumen vacío y total de la columna (85). Y el volumen disponible en los poros V_i [6] puede ser determinado $V_T - V_0$, es decir el volumen total de la columna restado al volumen vacío(82). Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular (86).



LIDIA CON LA QUÍMICA BLOG, Enrique Castaños (2015) [Imagen en línea]
<https://lidiakonlaQuímica.files.wordpress.com/2015/08/cromatografoa-exclusion-tamac3b1o.png>

FIGURA 2. 10 MECANISMO DE SEPARACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR. MÉTODOS CORMATOGRÁFICOS EMPLEADO POR PRIMERA VEZ, MIKHAIL TSWETT, 1906

Es posible conocer el volumen de elución de cada compuesto V_e [7] está dado por la suma del volumen vacío y el coeficiente de partición K_{av} [8] de cada estándar utilizado en la construcción de la curva de calibración. Donde K_{av} es el coeficiente de distribución del soluto en el relleno de gel. Tiene una relación lineal con el logaritmo de peso molecular de los estándares, en un rango de 180 a 5000 Da.

$$[7] \quad V_e = V_0 + K_{av}V_i$$

$$[8] \quad K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0} \quad (\text{Herrera Soberanís, 2016})$$

Antes de someter las muestras a análisis mediante SEC se deben tener en cuenta algunos requisitos previos importantes para un buen resultado: disolución completa, sin adsorción en

fase estacionaria, sin degradación y una concentración de inyección adecuada (83). La solubilidad del polímero en solución es un pre requisito para su buena separación y caracterización en SEC, ya que de esto dependerá la migración del soluto dentro de la fase móvil. Especialmente para las moléculas ramificadas, como almidón y poliolefinas (83).

2.12.4.2 FASE ESTACIONARIA

La cromatografía para llevarse a cabo se realiza en dos fases: estacionaria y móvil. La fase estacionaria es aquel sólido que se encuentra fijo dentro de una columna de acero inoxidable; compuesto de un gel semirrígido, en el caso de HP SEC y consiste en largos polímeros hidroxilados reticulados entrecruzados que forman una red tridimensional porosa permanente y estable, lo cual determina el recorrido que deberán hacer las moléculas que serán arrastradas por la fase móvil dentro de la columna (87). Cabe destacar que no existe interacción química del analito con la fase estacionaria ni con la móvil (88).

2.12.4.3 COLUMNA HP SEC

La columna es el corazón de los procesos SEC porque determina la separación del polímero en sus fracciones específicas de peso molecular (89). Las columnas para SEC habitualmente son mucho más grandes que las utilizadas para otros tipos de cromatografía y funcionan con velocidades de flujo relativamente bajas. Las dimensiones estándar de las columnas para SEC son 7,8 x 300 mm, trabajan con hasta un flujo de 1 ml/min; trabajan a velocidades lineales 2-3 veces superiores que la cromatografía convencional y utilizan detector de índice de refracción (IR) (Technologies, Agilent).

Es posible utilizar distintos tipos de columnas para realizar una cromatografía de exclusión, dependiendo de las biomoléculas a analizar y su fin. Las más utilizadas para la caracterización de oligosacáridos son las columnas Waters Ultrahydrogel DP de gel compatible con agua para el análisis y separaciones preparativas de polímeros solubles en agua (Technologies, Agilent) (Waters, 2015).

Entre los compuestos que son caracterizados con este tipo de columna están oligómeros y sustancias biológicas tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. A continuación, se enlistan las características que proporciona esta columna: alta resolución, baja adsorción, una amplia gama de separaciones de peso molecular, estabilidad en un rango de pH de 2 a 12 y un rango de temperatura de 10 °C a 80 °C (Waters, 2015) (90). El almacenamiento

en corto y largo plazo de la columna no requiere buffers, el solvente utilizado debe ser reemplazado por agua destilada y almacenar a temperatura ambiente (Waters, 2015).



FIGURA 2. 11 COLUMNA ULTRAHYDROGEL DE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MARCA WATERS. FUENTE PROPIA, CIATEJ ZAPOPAN.

2.12.4.4 COLUMNA GUARDA

Las columnas propias de SEC requieren de una columna guarda acompañando a la columna de gel durante el análisis, ya que eliminarán y / o filtrarán muchas impurezas encontradas en muestras solubles tales como sacáridos, péptidos e hidrolizados que podrían adsorberse irreversiblemente en la columna de Ultrahydrogel. También se utilizan de protección para eliminar partículas y componentes de muestra retenidos y que a última instancia afectaran la vida de la columna (91). Sin embargo, las columnas de protección tienen una capacidad finita de filtración de impurezas (Waters, 2015).

2.12.4.5 FASE MÓVIL

Se le llama fase móvil en cromatografía a aquella que se mueve en una dirección definida. Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, dependiendo del tipo de cromatografía empleada. La característica principal del eluyente empleado como fase móvil es que debe arrastrar los diferentes componentes, sin interactuar con la muestra ni con la fase estacionaria (88). Por tanto, la muestra debe ser soluble en la fase móvil para evitar interferencias en los resultados (88). En HP SEC con columnas Ultrahydrogel la fase móvil es un disolvente líquido y son física y químicamente estables en mezclas ordinarias de solventes orgánicos solubles en agua. Las soluciones acuosas de metanol, etanol, acetonitrilo, ácido fórmico y dimetilsulfóxido también proporcionan separaciones confiables (Waters, 2015).

A pesar de que en HP SEC la resolución no depende exclusivamente de la naturaleza de la fase móvil, las diferentes fases móviles y sus características pueden afectar el orden de elución debido a los cambios del tamaño de la molécula en disolución (radio hidrodinámico) (92). Con el fin de tener una buena separación y resolución del polímero a analizar es necesario que la fase móvil cumpla con ciertos requisitos: debe ser un buen solvente para el polímero, no presentar soluciones de polímeros demasiado viscosas y evitar fenómenos de retención en la superficie de relleno de la columna (13). También se puede optimizar la separación aumentando o reduciendo la fuerza iónica de la fase móvil; por ejemplo, ajustando el pH o con un cambio de temperatura (Technologies, Agilent).

Los eluyentes mas comunes empleados en la cromatografia de exclusión se enlistan en la **Tabla 2.1**.

TABLA 2. 1. ELUYENTES MÁS COMUNES EN CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN (1).

ELUYENTE	USO
1,2,4, triclorobenceno	Poliófelinas
Tolueno	Cauchos y elastómeros
Cloroformo	Siliconas, resinas epoxi
Agua	Polímeros biológicos, gelatina, poliacrilatos polidextranos, poliglicoles, poliacrilamida, pulpa de papel, polisacáridos.

Además de la influencia que ejerce el eluyente en la separación de las moléculas, existen otros factores más importantes que pueden ejercer mayor fuerza en la correcta separación de las

mismas, por ejemplo: longitud de la columna; de acuerdo a mayor longitud aumentara el éxito de la separación (13), flujo; la velocidad de flujo determina el tiempo de separación y puede afectar significativamente la resolución y la eficiencia. La resolución suele ser más alta a velocidades de flujo más lentas (90), entre otros aspectos a consideración.

2.13 FRUCTANOS DE AGAVE COMO MATERIA PRIMA Y PRODUCTOS

Recientemente ha aumentado la demanda de fructanos de agave; por ejemplo, las inulinas en las industrias alimenticias principalmente. Les han dado utilidades como sustitutos de endulzantes artificiales, espesantes, texturizantes, como fibra para consumo humano y animal, etc. El campo de aplicación de los fructanos de agave es bastante amplio no sólo para mejorar la funcionalidad del alimento, sino como para impartir características que mejoren la salud de los consumidores (17). Surge el interés de la aplicación de inulinas provenientes de diferentes especies de agave debido a sus propiedades prebióticas, es decir compuestos que el organismo no puede digerir, pero que tienen un efecto positivo en la composición de la microbiota en el tracto gastrointestinal brindando beneficios en la salud del huésped (93). Estos carbohidratos que ya han sido estudiados ampliamente tanto en modelos animales como humanos demostraron cumplir los requisitos de prebióticos y actualmente en México ya existen en el mercado diversas marcas comerciales de productos de fructanos nativos de *Agave tequilana weber var. azul* que son los únicos fructanos comercializados hasta el momento. Los principales productos son mieles y jarabes (94); estevia con fructanos de agave, panes enriquecidos con fructanos de *Agave angustifolia* (95); una gran variedad de presentaciones de fructanos de agave en polvo para uso como fibra dietética de la marca Olifrufructin y una línea de batidos en polvo de sabores, adicionados con fructanos (17). Estudios han comprobado la eficacia de inulinas hidrolizadas como sustitutos de grasas para la elaboración de productos lácteos, especialmente de helados (96).

También se han evaluado fructanos con distinto DP en formulaciones de productos alimenticios como agentes protectores de compuestos termolábiles; por ejemplo, el grupo de Rodríguez Furlan et. al (2014) evaluaron fructanos nativos de agave con alto e intermedio DP como agentes lipo protectores de la proteína de plasma de bovino para evitar la desnaturalización de la proteína durante su proceso de secado y almacenamiento (97). Entre varios ejemplos actuales, el campo de aplicación de los fructanos de agaves es bastante amplio y prometedor para las industrias alimenticias. Diversos estudios e investigaciones en México y en el mundo

están en marcha para la elaboración de nuevos productos derivados de estos prometedores carbohidratos (98).

2.14 NORMATIVIDAD DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

Al ser el agave una planta de reconocimiento mundial debido a sus diversas utilidades para la producción de azúcares y fibras; como es el caso de los fructanos nativos de la planta, considerados exclusivamente de agave dependiendo de su perfil o grado de polimerización, los productores, distribuidores y comercializadores del producto han incrementado. Por ello, es conveniente definir sus características fisicoquímicas y contrastarlas con las de otros productos que no provienen del agave y por ende que no cuentan con las mismas características (Diario Oficial de la Federación, 2016). Los fructanos de agave se identifican por sus características fisicoquímicas particulares las cuales están sujetas a métodos de prueba, con el objetivo de medirlas y evaluarlas a través de una Norma Oficial Mexicana; lo anterior hace posible cerciorar la naturaleza del producto con los estándares adecuados de calidad, sanidad, inocuidad, trazabilidad, etiquetado, etc., para asegurar no cause un riesgo a la salud de los consumidores. Con base al proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, los fructanos de agave y FOS de agave deben cumplir las especificaciones reportadas en las **Tabla 2.2** y **2.3**.

TABLA 2. 2 ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DE FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE (BASE SECA).

PARÁMETRO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	EXPRESADO EN UNIDADES
Humedad	--	5	%
Ph	5	7	unidades de pH
Cenizas	--	1	%
Sacarosa/ difructosa	0.3	5	%
Glucosa	1,5	6	%
Fructosa	3	9	%
Fructanos nativos de agave	85	--	%
Manitol	--	0.15	%
Otros Azúcares propios del Agave	--	0.1	%
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%
Enlaces glucósidos tipo β-2,1 como β-2,6 (unidades de fructosa terminal)	20	40	%
Enlaces glucósidos tipo β-2,1 como β-2,6 (unidades de fructosa ramificada)	10	20	%
PARA FOS DE AGAVE			
DPw 3 a 10	50	--	%
Humedad	--	5	%
pH	5	7	unidades de pH
Cenizas	--	1	%
Sacarosa/difructosa	0.3	5	%

Glucosa	1,5	6	%
Fructosa	3	9	%
Fructanos nativos de agave	70	--	%
Manitol	--	0.15	%
Otros azúcares propios del agave	--	0.1	%
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%

(Diario Oficial de la Federación, 2016)

TABLA 2. 3 LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PARA FRUCTANOS Y FOS NATIVOS DE AGAVE.

PARÁMETRO	LÍMITES PERMISIBLES	REFERENCIA
Mohos y Levadura	Máximo 100 UFC/g	NOM-111-SSA1-1994
Recuento total de microorganismos mesofílicos aerobios	2,500 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
Coliformes fecales	10 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
<i>E.Coli</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014
<i>Salmonella Ssp</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014
<i>Staphylococcus</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014

(Diario Oficial de la Federación, 2016)

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE MUESTREO Y SELECCIÓN DE AGAVES

Los municipios del estado de Guanajuato que no sólo desean obtener la denominación de origen del mezcal sino también explorar el potencial de sus agaves para la producción de productos derivados del agave son los siguientes: Atarjea, San Diego de la Unión, Comonfort, San Luis de la Paz, Doctor Mora, Victoria, Santa Catarina, Dolores Hidalgo, Tierra Blanca, Ocampo, Comonfort, San Miguel de Allende, Xichú, San Felipe (**Figura 3.1**).

La selección de las plantas de agave fue de manera aleatoria; de plantas silvestres en cada municipio, con excepción de San Luis de la Paz donde las muestras pertenecían a plantaciones de agaves comerciales. En el municipio de Doctor Mora y Victoria, las plantas se seleccionaron en una zona que se encontraba entre ambos municipios, representado como DM-V.

Se tuvo como referencia morfológica que fueran plantas no mayores a seis años. Sin embargo, no se puede aseverar con exactitud la edad y especie de la planta. La muestra se recolectó cortando partes de la base de la hoja de la planta de maguey. Posteriormente se almacenaron en crudo a 4°C hasta su procesamiento.

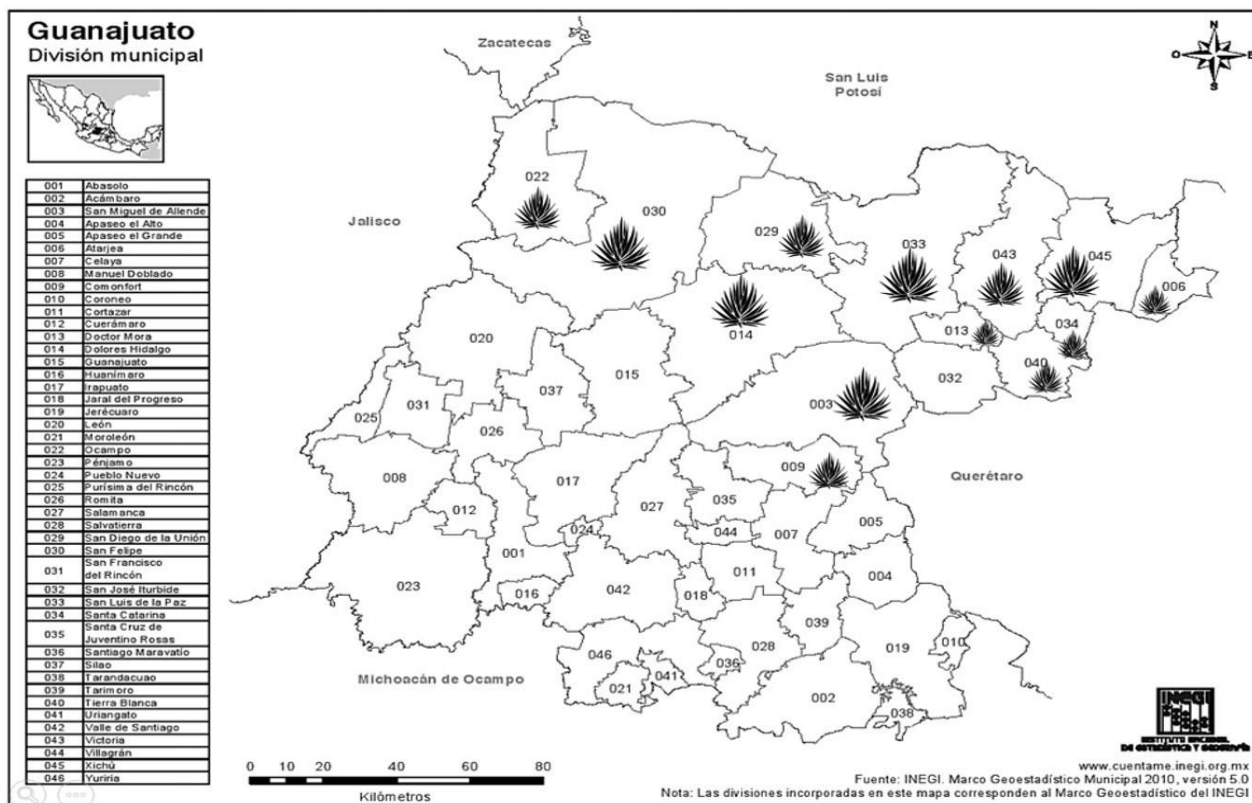


FIGURA 3. 1 ZONAS DE MUESTREO DE AGAVES EN EL ESTADO DE GUANAJUATO. NÚMEROS IDENTIFICADORES: 022 OCAMPO, 029 SAN DIEGO DE LA UNION, 033 SAN LUIS DE LA PAZ, 043 VICTORIA, 013 DOCTOR MORA, 006 ATARJEA, 034 SANTA CATARINA, 040 TIERRA BLANCA, 014 DOLORES HIDALGO, 009 COMONFORT, 030 SAN FELIPE, 045 XICHU. 003 SAN MIGUEL DE ALLENDE.

3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.2.1 EXTRACCIÓN DE JUGOS CONCENTRADOS DE AGAVE CRUDO

La piña, hojas y tallos del agave; pueden ser procesados tanto cocido como crudo, ya sea para la extracción de azúcares para la fermentación, hidrólisis de fructanos u otro proceso para realizar productos derivados. En este trabajo se utilizaron las muestras en crudo para evitar hidrolizar o separar los fructanos con las altas temperaturas de cocción. La **Figura 3.2** muestra un diagrama de la metodología empleada en el proyecto:



FIGURA 3. 2 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA APLICADA.

Todas las muestras de diferentes tamaños fueron pesadas antes y después de remover la corteza de la hoja con un cuchillo (**Figura 3.3**). Posteriormente se procedió a picar en cuadros y rectángulos regulares y pequeños cada muestra por separado y limpiando los instrumentos en cada una.



FIGURA 3. 3 MUESTRAS DE AGAVE DEL MUNICIPIO SAN LUIS DE LA PAZ CON CORTEZA VERDE Y SIN CORTEZA. BASE DE LA HOJA DE AGAVE CRUDO. FUENTE PROPIA.

3.3 OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES E INACTIVACIÓN DE ENZIMAS

Debido a que el agave presenta una estructura sumamente fibrosa y dura, el método más viable para la extracción de fructanos en muestras crudas, es usando maquinarias de presión. Por lo tanto, las muestras previamente picadas fueron sometidas a presión en una prensa hidráulica marca Carver, con una capacidad de presión de 20 toneladas (**Figura 3.4 A**). Recuperando el jugo concentrado en tubos de centrifuga de 50 mL y en recipientes de 500 mL, se utilizaron entre 20 y 30 mL de agua destilada para enjuagar lo sobrante dentro de la prensa. Los jugos mostraron variaciones colorimétricas entre muestras, que iban de marrones claros a oscuros y tonalidades blanquecinas o transparentes. El bagazo fue desechado.

Una vez recuperado el líquido del agave, se midieron los grados Brix o la cantidad de sólidos solubles en agua, haciendo uso de un refractómetro de bolsillo marca ATAGO.

Los extractos se sometieron a congelación de -80°C si no eran utilizados en las próximas 24 horas y descongelados a baño María.

Para obtener un líquido sin presencia de sólidos, los jugos obtenidos se centrifugaron a condiciones de 4,000 rpm, 10 minutos a 4°C . Se recolectó el sobrenadante y se repitió centrifugación en caso de observar partículas sólidas en el líquido. Se volvieron a medir los carbohidratos solubles después del centrifugado.

Una vez centrifugado el líquido se sometió a calentamiento con agitación en una plancha IKA a 800 rpm a una temperatura de 70°C , durante una hora (**Figura 3.4**). Con el objetivo de inactivar enzimas que pudieran hidrolizar los fructanos o alterar sus propiedades.

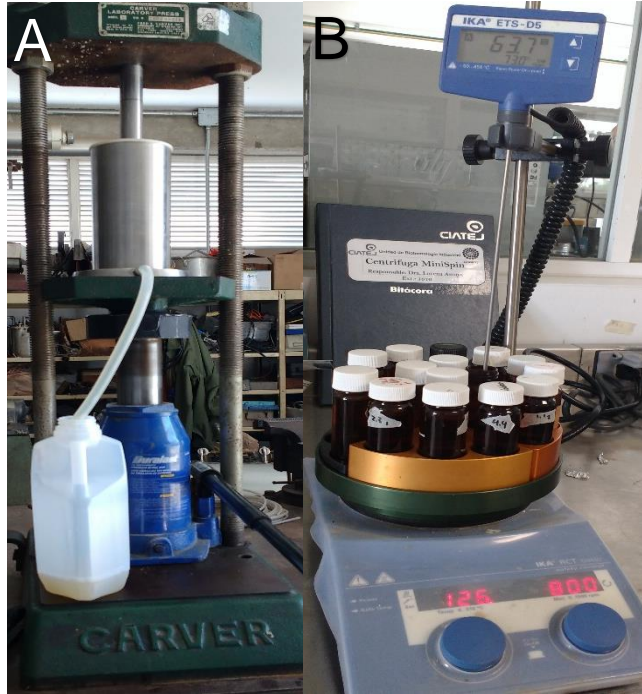


FIGURA 3. 4 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE JUGOS E INACTIVACIÓN DE ENZIMAS. A) PRENSA DE AGAVE. B) PLANCHA IKA CON MUESTRAS EN PROCESAMIENTO. FUENTE PROPIA CIATEJ ZAPOPAN.

Posteriormente se repitió la centrifugación de los extractos previamente calentados, se recolectó el sobrenadante y se almacenaron a -80°C hasta volverlos a utilizar.

3.4 CONTENIDO DE AZÚCARES POR MÉTODOS FOTOCOLORIMÉTRICOS

3.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN Y ANÁLISIS DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO MILLER.

Se elaboró una curva patrón para poder calcular la concentración de los azúcares reductores de nuestras muestras. Se utilizó glucosa como estándar. Primeramente, se preparó el ácido 3,5-dinitrosalicílico los reactivos se enlistan en la **Tabla 3.1**.

TABLA 3. 1 SOLUCIONES Y REACTIVOS MÉTODO DNS

REACTIVO	CANTIDAD
NaOH	10 g/L
Tartrato de Na y K	200 g/L
Metabisulfito de Na	0.5 g/L
Fenol	2 g/L
Acido 3,5-dinitrosalisilico	10 g/L

1. Disolver 10 g/L de NaOH en 600 ml de agua.
2. Agregar el metabisulfito de sodio.
3. Agregar en agitación y lentamente el ácido 3,5-dinitrosalisilico.
4. Aforar la solución a un litro.

La curva de calibración se realizó con un stock de glucosa en una concentración de 2 g/L. La glucosa fue secada previamente en el horno a 35° C. Se pesó exactamente 0.2 g de glucosa y se diluyó en 100 mL de agua destilada en un matraz aforado. De la solución stock se hicieron diluciones con concentraciones de 0.2-2 g/L, las cantidades se reportan en la **Tabla 3.2**.

TABLA 3. 2 SOLUCIONES DE GLUCOSA PARA CURVA DE CALIBRACIÓN DNS

mL DE GLUCOSA	mL DE AGUA	[GLUCOSA g/L]
0	1	0
0.2	0.8	0.4
0.4	0.6	0.8
0.6	0.4	1.2
0.8	0.2	1.6
1	0	2

Una vez hechas las diluciones se siguió el protocolo Miller (59), en la **Figura 3.5** se muestra el protocolo empleado.

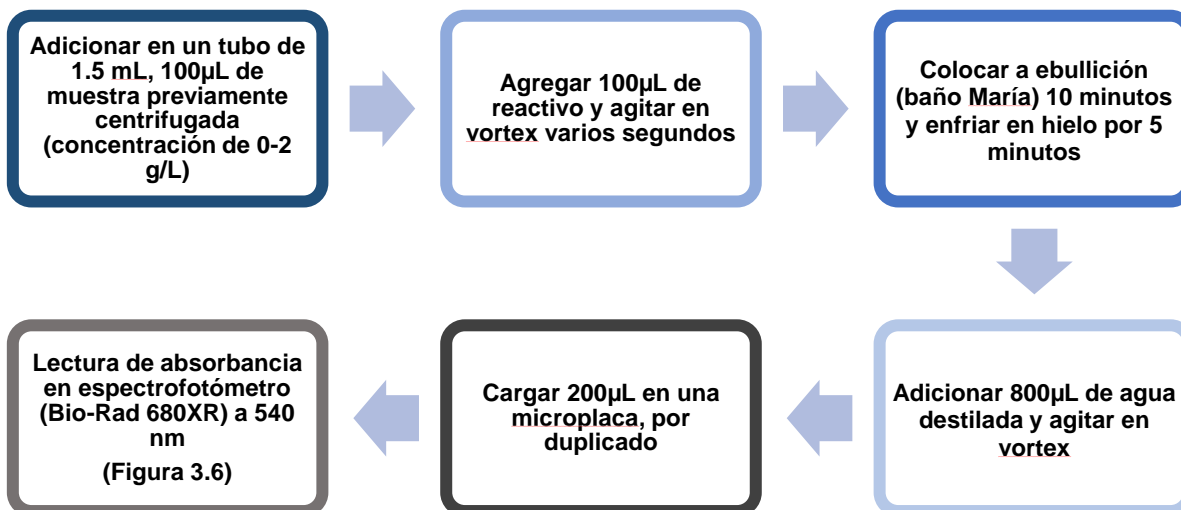


FIGURA 3. 5 PROTOCOLO MILLER (2), DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

Se promediaron las absorbancias del duplicado para cada concentración y se realizó una gráfica con regresión lineal. La cual se utilizó para estimar el contenido de azúcares reductores del jugo crudo de agave.

La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determinó haciendo una interpolación con la curva patrón del azúcar utilizado, gráficamente la absorbancia en función de la concentración.

Una vez construida la curva patrón, las muestras de jugo de agave previamente diluidas (1:10, 1:100 y 1:100) fueron sometidas al reactivo ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) siguiendo el protocolo **(Figura 3.5)**. Se tomaron lecturas de la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro marca Bio-Rad 680 XR **(Figura 3.6)**.



FIGURA 3. 6 ESPECTROFOTÓMETRO BIO-RAD LECTURA DE MICROPLACA CON MUESTRA Y REACCIÓN DNS. FUENTE: YARITZA LÓPEZ, CIATEJ ZAPOPAN.

Ahora bien, para calcular la concentración de azúcares en las muestras se utilizó la ecuación obtenida en la regresión lineal y la absorbancia dada.

3.4.2 CURVA DE CALIBRACIÓN Y ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALES

Con el mismo objetivo de cuantificar correctamente la concentración de azúcares reductores, se construyó una curva de calibración para el análisis de contenido de azúcares totales en jugo crudo de agave. En este caso se utilizó sacarosa como muestra. Se preparó el reactivo con 200 mg de antrona en 100 ml de H₂SO₄.

La curva de calibración se realizó con un stock de sacarosa en una concentración de 0.2 g/L. La sacarosa se secó previamente en el horno a 35° C. Se pesó aproximadamente 0.02 g de sacarosa y se diluyó en 100 mL de agua destilada en un matraz aforado. De la solución stock se hicieron diluciones con concentraciones de 0.04-0.2 g/L, las cantidades se reportan en la **Tabla 3.3**.

TABLA 3. 3 SOLUCIONES DE SACAROSA PARA CURVA DE CALIBRACIÓN ANTRONA.

mL STOCK SACAROSA	mL DE AGUA	[SACAROSA g/L]
0	1	0
0.2	0.8	0.04
0.4	0.6	0.08
0.6	0.4	0.12
0.8	0.2	0.16
1	0	0.2

Una vez hechas las diluciones se siguió el protocolo, la **Figura 3.7** muestra un diagrama del proceso:

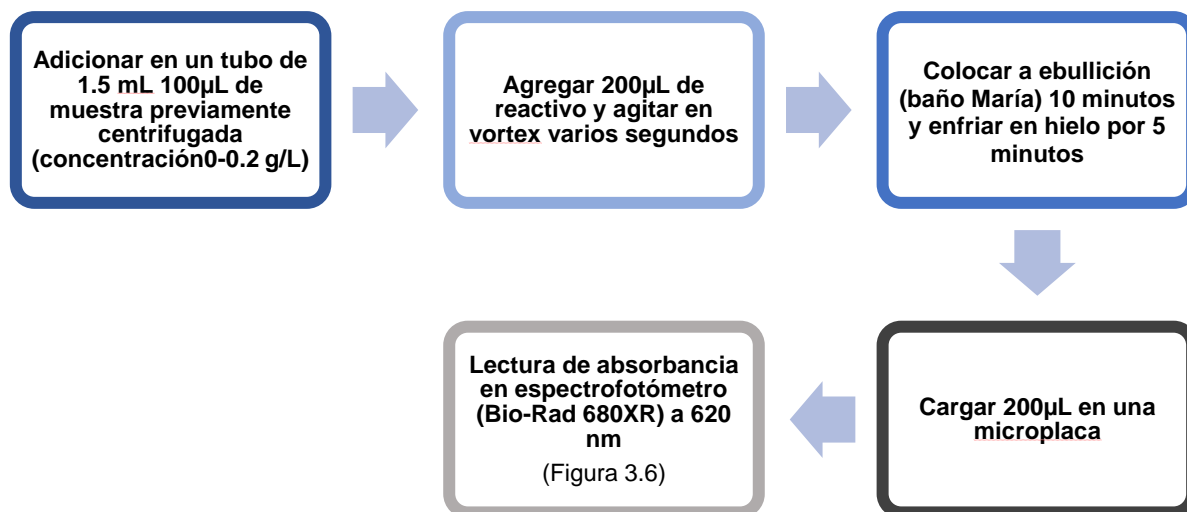


FIGURA 3. 7 PROTOCOLO DE REACCIÓN FOTO COLORIMÉTRICA, DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES.

Se promediaron las absorbancias del duplicado para cada concentración y se realizó una gráfica con regresión lineal. La cual se utilizó para estimar el contenido de azúcares totales del jugo crudo de agave.

La concentración de los azúcares totales liberados en la muestra se determinó haciendo una interpolación con la curva patrón del azúcar utilizado, gráficamente la absorbancia en función de la concentración.

Una vez construida la curva patrón, las muestras de jugo de agave previamente diluidas (1:10 y 1:100) fueron sometidas al reactivo antrona siguiendo el protocolo (**Figura 3.7**). Se tomaron lecturas de la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro marca Bio-Rad 680 XR (**Figura 3.6**).

Ahora bien, para calcular la concentración de azúcares en las muestras se utilizó la ecuación obtenida en la regresión. Se multiplicó la ecuación por la absorbancia obtenida en cada lectura y después por el factor de dilución de cada una.

3.5 SECADO POR ASPERSIÓN

Posterior a la inactivación enzimática, todas las muestras fueron pasadas a través de un filtro de poros angostos de 80 micras y después a través de una tela delgada sintética donde se quedaron la mayor parte de los residuos no visibles. Antes de colocar los extractos de jugo de agave, se estabilizó el secador con las condiciones óptimas según el grupo de trabajo en CIATEJ: presión de 0.2 MPa, velocidad de bombeo en 2, aire de 6 unidades, temperatura de entrada de 150° C y de salida 60° C, con agua destilada estéril como muestra, alrededor de 10 minutos.

El jugo se hizo pasar por un secador por aspersion marca Yamato modelo ADL311S (**Figura 3.8 A**) que cuenta con las siguientes características: secado con temperaturas de 40 a 220° C, con una dimensión de poro de 10 a 40 micras, evaporación 1300 mL/h, flujo de la muestra líquida máxima 28 mL/h inyector de rocío para líquido y aire; con dimensiones 580 mm por 420 mm de radio y 1075 mm de alto. Necesita vidriería GF300, con una fuente de poder 220V. Para su funcionamiento requiere adicionalmente aire comprimido.

Las primeras tres muestras correspondientes a los estados de Ocampo y Dolores Hidalgo se pasaron en jugo concentrado sin dilución alguna, pero debido al tamaño de partículas que el aspersor puede secar y procesar, hubo un taponamiento constante; por lo que las muestras restantes se diluyeron con agua destilada al 50%. El tiempo de secado varió mucho entre muestras, por el diferente volumen de cada una.

Un polvo fino blanquecino fue pasado a través del sistema de ciclones y recolectado en el fondo de un recipiente, donde se tomó la muestra (**Figura 3.8 B**). Dentro del segundo ciclón de cristal quedaba material adherido a las paredes, por lo que la recuperación no fue del 100%. Posteriormente el polvo recuperado con espátula fue guardado en tubos de centrífuga de 50 mL y almacenado en una cámara de desecación con 50 % de humedad para después ser analizado.

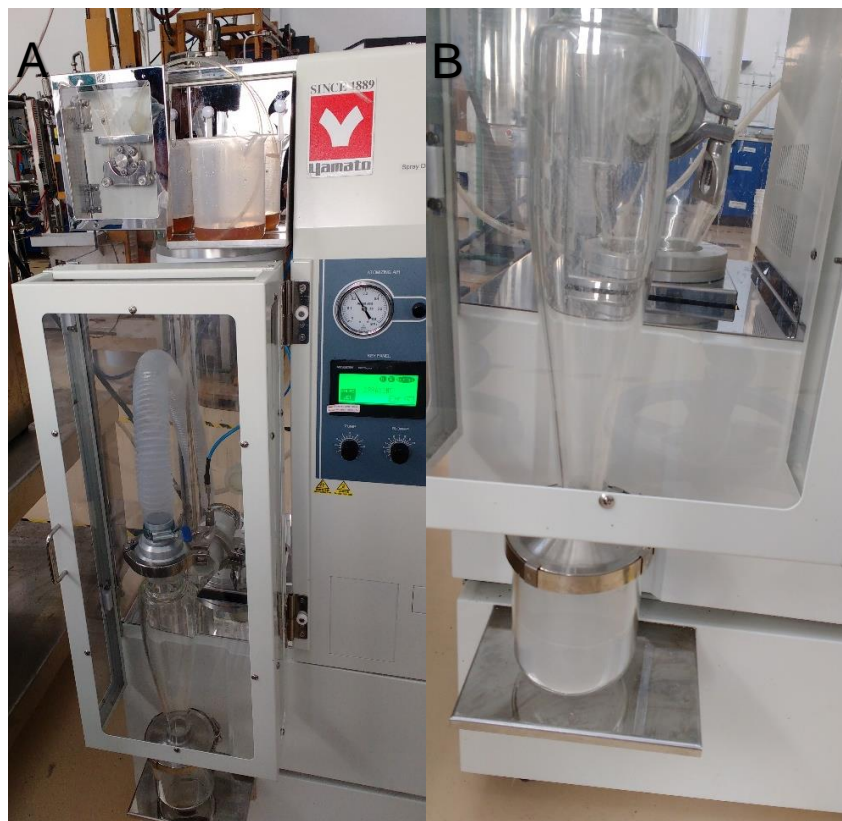


FIGURA 3. 8 SECADO POR ASPERSIÓN EN EQUIPO ADL311S. A) SISTEMA SECADO POR SPRAY CON MUESTRA. B) SISTEMA DE CICLONES Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAL SECADO. FUENTE PROPIA, CIATEJ ZAPOPAN.

3.6 ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE FRUCTANOS MEDIANTE HP-SEC

3.6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras pulverizadas se solubilizaron en agua por duplicados en matraces aforados de 5 y 10 mL, a una concentración aproximada de 25 g/L de azúcares/fructano. Se pesaron aproximadamente 0.125 g de jugo pulverizado de agave dentro del matraz aforado de 5 mL y 0.25 g en el duplicado de 10 mL (**Tabla 3.4**). Se aforó cada uno con agua destilada hasta 5 o 10 mL, según correspondió y se mezcló vigorosamente hasta diluir el polvo. La solución se tomó con una jeringa y se filtró en una membrana de polietersulfona (PES) de 0.45 µm, filtro de jeringa con diámetro de 15 mm (Agilent, CA, USA). Y la solución filtrada se colocó en viales de 1.5 ml.

Las muestras con número identificador 3.1, 3.2 ,4.4 y 6.2.2 no resultaron con buena cantidad de polvo seco, por lo que no se realizó duplicado. Y algunas otras no se pudieron secar correctamente por lo que se procesó el jugo de agave líquido concentrado y en dilución con agua destilada en proporción 1:2.

TABLA 3. 4 TABLA 3.4. CANTIDADES DE POLVO UTILIZADO EN DILUCIONES PARA HP SEC. SD: SIN DILUCIÓN, JC: JUGO CONCENTRADO, JD: JUGO DILUIDO.

MUESTRA	POLVO PARA MATRAZ DE 5 mL (g)	POLVO PARA MATRAZ DE 10 mL (g)
1.1	0.1222	0.2605
1.2	0.1254	0.2121
2.1	0.1226	SD
2.2	0.1297	0.2648
2.3	0.1294	0.279
3.1	0.1367	SD
3.2	0.082	SD
4.1	0.1307	0.2556
4.2	0.1309	0.2663
4.3	0.1293	0.2516
4.4	0.1215	SD
5.1	0.1286	0.2598
6.1.1	0.1292	0.2629
6.1.2	0.1336	0.2635
6.2.1	0.1359	0.2534

6.2.2	0.1271	0.2607
7.1	0.1457	0.2503
7.2	0.1314	0.2435
8.1	JC	JD
8.2	0.1351	0.2587
8.3	0.1253	0.2682
9	JC	JD
9.2	JC	JD
9.3	JC	JD
10.1	JC	JD
10.2	0.1329	0.2511
10.3	0.079	SD
11.1	0.127	0.2507
11.2	0.1265	0.2639
11.3	0.1346	0.2428
12.1	0.1297	0.256
12.2	JC	JD
12.3	0.1269	0.2633
13	0.1299	0.2651
14	0.1265	0.257

3.6.2 EQUIPO, COLUMNA Y CONDICIONES

Para detectar y cuantificar polisacáridos de fructosa se utilizó el sistema HP SEC. Haciendo uso de un cromatógrafo líquido de alta resolución marca Waters modelo e2695 (**Figura 3.9**) y el detector de índice de refracción. Como fase estacionaria se usó una columna Ultrahydrogel DP (7,8 mm d.i. x 300 mm, Waters, Milford, MA, EE. UU.) Con un límite de exclusión de tamaño de 5000 Da.

El volumen de la muestra inyectada fue de 50 µL (con el inyector completamente lleno). La fase móvil se preparó con agua tri destilada y filtrada en una membrana de polietersulfona (PES) de 0.45 µm y se ajustó el pH 4.5-5. Se limpió el equipo antes de instalar la columna con acida de sodio y se purgo en seco y en líquido. Posteriormente se dejó equilibrando la columna por aproximadamente 3 horas. Las condiciones que se utilizaron son las siguientes:

- Bomba A, 100% agua tridestilada pH= 4.5.
 - Fase móvil a un flujo: 0.36 mL/min
 - Temperatura de la columna a 61.7° C.
 - Temperatura del detector IR: 50° C
 - Tiempo de corrida: 32 min
 - Inyección: 20 µL
- } Estos parámetros se verificaron y programaron en el apartado del software, al iniciar un nuevo proyecto en “la lista de muestras”



FIGURA 3. 9 CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN WATERS E2695, CIATEJ ZAPOPAN. FUENTE PROPIA

3.6.3 CURVA DE CALIBRACIÓN Y MÉTODO DE INTEGRACIÓN

Gracias al trabajo previo del grupo de Moreno Vilet (12) en CIATEJ Zapopan, se determinaron los siguientes reactivos como estándares con diferentes pesos moleculares y distintos DP. Bajo las condiciones optimizadas del equipo reportadas por Moreno-Vilet et. al (2017) se registró el tiempo de retención en la columna SEC de cada uno (**Tabla 3.5**) (12). Estos datos sirvieron para la construcción de una curva de calibración (**Figura 3.10**) la cual fue utilizada para integrar el área bajo la curva descrita en el cromatograma por las muestras de agave de los estados de Guanajuato que fueron procesadas.

Para la construcción de la curva; primeramente, se calcularon el (K_{av}) de cada uno de los estándares con la ecuación [1] el cual está relacionado linealmente con el logaritmo del peso molecular (Herrera Soberanis, 2016).

$$[1] \quad K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

Donde V_e es el volumen de elución para cada soluto, V_0 y V_t son el vacío y el volumen total de la columna, respectivamente.

La curva se obtuvo gráficamente el coeficiente de partición (K_{av}) contra el logaritmo del peso molecular y se evaluó su linealidad con el coeficiente de correlación, el cual debe ser mayor a 0.99 (Herrera Soberanis, 2016). Este parámetro es generalmente utilizado en lugar del tiempo de retención en las curvas de calibración porque no depende de la columna utilizada.

TABLA 3. 5. REACTIVOS ESTÁNDARES Y SU TIEMPO DE RETENCIÓN EN HP SEC.

ESTÁNDAR	TR
Dextran 12000 Da	16.783
Dextran 5000 Da	18.207
DP7	22.562
DP6	23.053
DP5	23.644
Nystosa	24.280
1-Kestosa	25.25
Sacraosa	26.856
Fructosa	28.637

Herrera Soberanis 2016

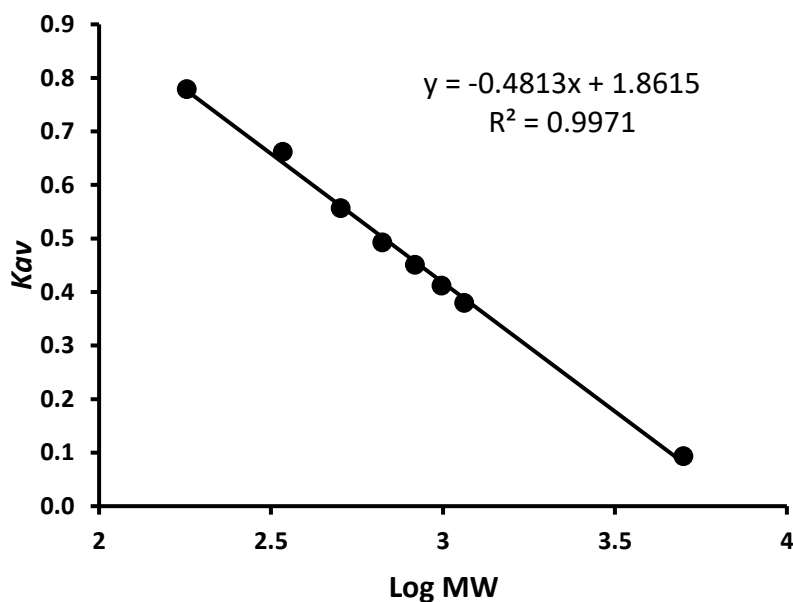


FIGURA 3. 10 CURVA DE CALIBRACIÓN DE REACTIVOS ESTÁNDARES.

Gracias a los parámetros calculados de esta curva de calibración fue posible estimar los pesos moleculares promedio desconocidos de las muestras de agave del estado de Guanajuato. En base al método implementado por Herrera Soberanis en el 2016 del grupo Moreno Vilet, CIATEJ Zapopan.

En primer lugar, se realizó una tabla de integración, donde se calculó el tiempo de retención (TR) para cada grado de polimerización teórico de los fructanos. (A partir de los parámetros de la ecuación de Kav y la curva de calibración). Para cada cromatograma obtenido de HP SEC, se calculó el área bajo la curva integrando automáticamente en el equipo para el tiempo correspondiente a cada DP. Se obtuvo el área bajo la curva en cada pico específico a un tiempo de retención y se calculó el porcentaje de área relativo para cada grado de polimerización, el cual está directamente relacionado con la cantidad de moléculas en los fructanos. En base a las cifras obtenidas del área de cada TR, se calcularon los parámetros de peso molecular promedio en número Mn [2], peso molecular promedio en peso Mw [3], índice de polidispersidad (IP) [4], así como el grado de polimerización promedio en número (DPn) y grado de polimerización promedio en peso (DPw) [5] para cada muestra por duplicado. Todos los datos obtenidos se vaciaron en una tabla de Excel.

Finalmente se elaboró un histograma de distribución de tamaños para cada grado de polimerización.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC

Se cuantificó el contenido de glucosa (G), fructosa (F) y sacarosa (S) de las muestras previamente utilizadas y filtradas en HP SEC. Con una concentración de 25-30 g/L. Se empleó un equipo HPLC marca Waters modelo e2695 (**Figura 3.9**), usando una columna BioRad Aminex 42-C, y agua filtrada en membranas (PES) de 0.45 μm como fase móvil. La concentración de azúcar se obtuvo usando la ecuación relacionada con la curva de calibración de estos azúcares con el área bajo la curva utilizando el detector de índice de refracción.

3.7.1 COLUMNA Y CONDICIONES

Se utilizó una columna con medidas 300 x 7.8 mm la cual está optimizada para el análisis de mono y disacáridos (BioRad). El volumen de la muestra inyectada fue de 50 µL (con el inyector completamente lleno). La fase móvil se preparó con agua tri destilada y filtrada en una membrana PES de 0.45 µm.

Se limpió el equipo antes de instalar la columna con acida de sodio y se purgo en seco y en líquido. Posteriormente se dejó equilibrando la columna por aproximadamente 1 hora.

Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes: Bomba A: 100%, fase móvil agua tri destilada. Con un flujo de presión máxima de la columna a 1,500 psi. Temperatura de columna 65°C y del detector IR 50°C. Fase móvil a un flujo de presión 0.33 mL/min y flujo de inyección: 0.33 mL/min <= 3.030 mL/min. Tiempo de inyección de la muestra durante 18 min.

3.7.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

Se construyó una curva de calibración de reactivos sacarosa (S), glucosa (G) y fructosa (F) a concentraciones de 0 a 10 g/L, en el software Empower versión 3 del cromatógrafo Waters. Y se procesaron las muestras bajo la ecuación de regresión lineal con una confianza de 0.999.

CAPÍTULO 4

4.RESULTADOS

4.1 ESPECIES DE AGAVES IDENTIFICADAS

Las muestras fueron colectadas en nueve municipios del norte de Guanajuato, San Diego de la Unión, Doctor Mora, Victoria, Dolores Hidalgo, Tierra Blanca y Ocampo. Se cortaron las hojas y se tomó una parte de la base para caracterizar a los fructanos. Se encontraron agaves de distintas especies, algunas pudieron ser identificadas. En su mayoría se encontraron *Agave salmiana ssp. crassispina* (conocido como “verde”) y *Agave salmiana ssp. salmiana* (“cenizo”) (**Figura 4.1**). Hubo mayor diversidad de agaves en el municipio de Dolores Hidalgo con incidencia de agaves verdes, cenizos, *Agave angustifolia* y *Agave americana*. San Miguel de Allende y San Felipe fueron más abundantes en la presencia de agaves verdes. Por otro lado, Santa Catarina, San Luis de la Paz y Ocampo sobresalieron en la existencia de agaves cenizos. Se registró recolección de *Agave mapisaga* únicamente en el municipio de Ocampo. Muchos agaves no fueron identificados por presentar morfológica distinta a las morfologías conocidas, y se colectaron muestras para un estudio posterior. Así mismo se generó una memoria fotográfica de todas las muestras colectadas además se registró la geolocalización de estas (**Tabla 4.1**), los datos de todos los registros se muestran en la **Tabla 4.2**.

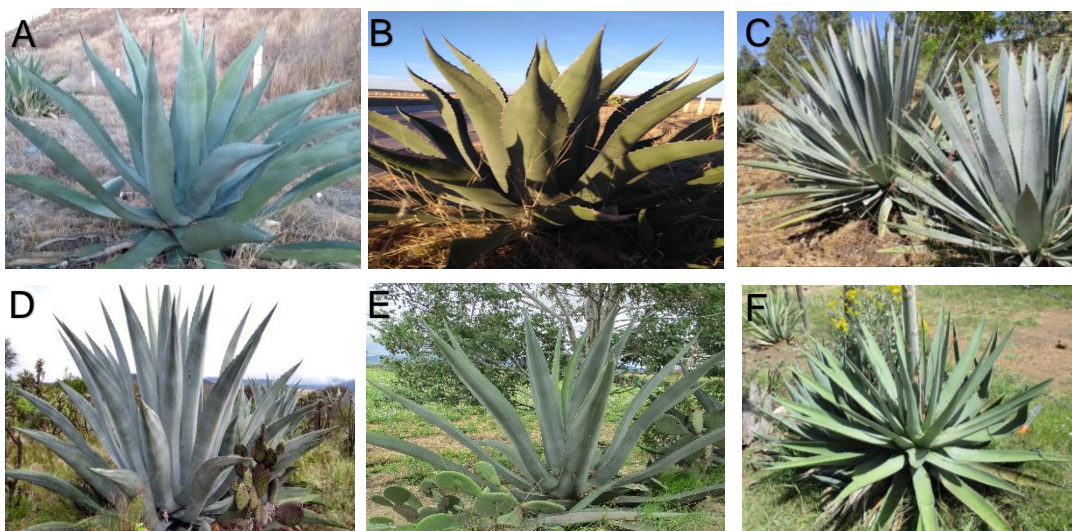



















FIGURA 4. 1 ESPECIES DE AGAVE IDENTIFICADAS EN EL MUESTREO. A) *AGAVE SALMIANA SSP. SALMIANA* (CENIZO) (4) B) *AGAVE SALMIANA SSP. CRASSISPINA* (VERDE) C) *AGAVE ANGUSTIFOLIA* (COMONFORT) D) *AGAVE AMERICANA* (DOCTOR MORA-VICTORIA). E) *AGAVE MAPISAGA*. F) *AGAVE SUBGÉNERO LITTAEA* (SAN DIEGO DE LA UNIÓN).






TABLA 4. 1. MEMORIA FOTOGRÁFICA DE ESPECIES DE AGAVES IDENTIFICADAS. LOS NÚMEROS DE MUESTRA SON IDENTIFICADORES DE CADA MUNICIPIO EN ORDEN DE MUESTREO. FOTOGRAFÍAS TOMADAS POR ROSA MARÍA CAMACHO RUÍZ Y ANTONIA GUTIÉRREZ MORA.






MUNICIPIO	MUESTRA	ESPECIE	FOTOGRAFÍAS
O	1.1	<i>Agave mapisaga</i>	
	1.2	<i>ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	1.3	No <i>identificado</i>	
	1.4	<i>ssp. salmiana</i> (cenizo)	






	1.5	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
DH	2.1	Agave no identificado, posiblemente <i>agave americana</i> .	
	2.2	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	2.3	<i>Agave angustifolia</i>	
	2.4	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

SDU	3.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	3.2	NI, subgénero <i>littea</i>	
	3.3	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
DM-V	4.1	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

	4.2	<i>Agave americana</i>	
	4.3	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
	4.4	NI, parecido a <i>marmorata</i>	
TB	5.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	5.2	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
SLP	6.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	6.2	<i>Agave angustifolia</i>	
	6.3	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

A	7.1	NI	
	7.2	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
	7.3	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
SC	8.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	8.2	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

	8.3	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
C	9	<i>Agave angustifolia</i>	
	9.2	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
SMA	10.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
	10.2	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

	10.3	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
X	11.1	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
	11.2	NI	
	11.3	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
SF	12.1	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	





	12.2	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
	12.3	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	
V	13	<i>Ssp. salmiana</i> (cenizo)	
DM	14	<i>Ssp. crassispina</i> (verde)	

TABLA 4. 2 ESPECIES IDENTIFICADAS EN LOS DIFERENTES MUNICIPIOS.

ESPECIE	MUNICIPIO	MUESTRA
<i>Agave mapisaga</i>	Ocampo	1.1
<i>Agave salmiana ssp. salmiana</i> (cenizo)	Ocampo	1.2, 1.4
	Dolores Hidalgo	2.2
	San Diego de la Unión	3.1
	Tierra Blanca	5.1
	San Luis de la Paz	6.1.1, 6.1.2
	Santa Catarina	8.1. 8.3
	San Luis de la Paz	6.4
	Atarjea	7.3
	Comonfort	9.2
	San Miguel	10.1
	Xichú	11.3
	San Felipe	12.1
	Victoria	13
<i>Agave salmiana ssp. crassispina</i> (verde)	Ocampo	1.5
	Dolores Hidalgo	2.4
	San Diego de la Unión	3.3
	Doctor Mora-Victoria	4.1, 4.3
	Santa Catarina	8.2
	Atarjea	7.2
	San Luis de la Paz	6.3, 6.5
	Tierra Blanca	5.2
	Comonfort	9.3
	San Miguel de Allende	10.2, 10.3
	Xichú	11.1
	San Felipe	12.2, 12.3
	Doctor Mora	14
<i>Agave angustifolia</i>	Dolores Hidalgo	2.3
	San Luis de la Paz	6.2.1, 6.2.2
	Comonfort	9
<i>Agave americana</i>	Dolores Hidalgo	2.1
	Doctor Mora-Victoria	4.2
<i>Agave marmorata</i>	Doctor Mora-Victoria	4.4
<i>Agave subgénero littaea</i>	San Diego de la Unión	3.2
No identificado	Ocampo	1.3
	Atarjea	7.1
	Xichú	11.2

Las muestras fueron pesadas antes de la extracción de los fructanos (**Tabla 4.3**), con la finalidad de estimar el porcentaje de carbohidratos solubles en agua que era posible extraer de la base de las hojas. El tejido recolectado fue de distintos tamaños y pesos, así como el contenido de jugo y agua.

TABLA 4. 3 PESOS DE LAS MUESTRAS DE BASE DE HOJAS COLECTADAS EN MUNICIPIOS DE GUANAJUATO. NI: NO IDENTIFICADO, SC: SIN CORTEZA.

MUNICIPIO	MUESTRA	ESPECIE	PESO CON CORTEZA (g)	PESO SIN CORTEZA (g)
O	1.1	<i>Agave mapisaga</i>	288.5	SC
	1.2	<i>Salmiana</i>	232.4	SC
	1.3	NI	729.8	629
	1.4	<i>Salmiana</i>	740.3	662
	1.5	<i>Crassispina</i>	485	397
DH	2.1	<i>Agave americana</i>	169.1	SC
	2.2	<i>Salmiana</i>	247.9	SC
	2.3	<i>Agave angustifolia</i>	123.8	SC
	2.4	<i>Crassispina</i>	498	390
SDU	3.1	<i>Salmiana</i>	190.3	186.7
	3.2	<i>Agave</i> subgénero <i>littaea</i>	143.7	109.1
	3.3	<i>Crassispina</i>	626.3	533.8
DM-V	4.1	<i>Crassispina</i>	1009.8	836.8
	4.2	<i>Agave americana</i>	1017.4	914.3
	4.3	<i>Crassispina</i>	387.8	SC
	4.4	<i>Agave marmorata</i>	196.8	173.1
TB	5.1	<i>Salmiana</i>	543.3	491.4
	5.2	<i>Crassispina</i>	311	241.2
SLP	6.1.1	<i>Salmiana</i>	3876.5	3716
	6.1.2	<i>Salmiana</i>	446	SC
	6.2.1	<i>Agave angustifolia</i>	818.9	SC
	6.2.2	<i>Agave angustifolia</i>	835	SC
	6.3	<i>Crassispina</i>	653	648
	6.4	<i>Salmiana</i>	473.8	381.5
	6.5	<i>Crassispina</i>	757	645
A	7.1	NI	2194.3	2076.8
	7.2	<i>Crassispina</i>	1053.4	928
	7.3	<i>Salmiana</i>	1000	866.3
SC	8.1	<i>Salmiana</i>	461.4	391.6
	8.2	<i>Crassispina</i>	610	561.3
	8.3	<i>Salmiana</i>	412.1	356
C	9	<i>Agave angustifolia</i>	34	29.9
	9.2	<i>Salmiana</i>	1147.9	1060.5
	9.3	<i>Crassispina</i>	1265	1121.5
SMA	10.1	<i>Salmiana</i>	324	260.8

	10.2	<i>Crassispina</i>	218.4	181
	10.3	<i>Crassispina</i>	293	224
X	11.1	<i>Crassispina</i>	275.4	197.2
	11.2	NI	197	165.2
	11.3	<i>Salmiana</i>	333	284.3
SF	12.1	<i>Salmiana</i>	1275.2	1094
	12.2	<i>Crassispina</i>	235.2	113.3
	12.3	<i>Crassispina</i>	518	416.3
V	13	<i>Salmiana</i>	516.5	414.6
DM	14	<i>Crassispina</i>	1065.5	772.5

O: Ocampo, DH: Dolores Hidalgo, SDU: San Diego de la Unión, DM-V: Doctor Mora-Victoria, TB: Tierra Blanca, SLP: San Luis de la Paz, A: Atarjea, SC: Santa Catarina, C: Comonfort, SMA: San Miguel de Allende, X: Xichú, SF: San Felipe, V: Victoria, DM: Doctor Mora.

4.2 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES OBTENIDOS

Los carbohidratos solubles fueron extraídos de la base de las hojas cerca de la zona del tallo y fueron cuantificados mediante un refractómetro en ° Brix. Se obtuvieron extractos con contenido de carbohidratos entre 2 y 12 °Brix para *Agave salmiana* ambas subespecies. Los máximos valores obtenidos fueron 27.8 y 12.4 °Brix correspondiente a *Agave angustifolia* recolectados de un predio de producción de mezcal en el municipio de San Luis de la Paz y Dolores Hidalgo respectivamente (**Tabla 4.4**). Y un mínimo de promedio 2 °Brix, correspondientes *ssp. salmiana*, *Agave marmorata* y *Agave subgénero littaea*. Entre el 0.33% y el 5.55 % del peso húmedo total de la muestra representa carbohidratos solubles (**Figura 4.2**). El contenido de azúcares está relacionado con la especie de agave, en el caso de *Agave angustifolia*, colectado en Dolores Hidalgo, San Luis de la Paz y Comonfort se obtuvo un extracto con el mayor contenido de azúcares solubles. Los resultados revelan el porcentaje mínimo y máximo (0.3-2.5%) de carbohidratos obtenidos en la subespecie de *Agave salmiana* (cenizo) del municipio San Luis de la Paz, así como un promedio de 0.77% (**Figura 4.3 A**). Por otro lado, *Agave salmiana* subespecie *Crassispina* (verde) mostró en promedio mayor porcentaje de azúcares solubles (0.91%), con un mínimo de 0.33% y máximo de 3.5% (**Figura 4.3 B**). El agave proveniente del municipio San Luis de la Paz, resultó tener un mayor contenido de azúcares y carbohidratos solubles en sus jugos tanto en *Agave angustifolia* y *Agave salmiana* ambas subespecies.

TABLA 4. 4 CANTIDADES DE JUGO LÍQUIDO DE AGAVE EXTRAÍDO CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES.

MUNICIPIO	MUESTRA	ESPECIE	CANTIDAD DE JUGO EXTRAÍDO (mL)	° BRIX
O	1.1	<i>Agave mapisaga</i>	120	2.75
	1.2	<i>Salmiana</i>	90	1.95
	1.3	NI	75	4.3
	1.4	<i>Salmiana</i>	84	3.8
	1.5	<i>Crassispina</i>	63	3.6
DH	2.1	<i>Agave americana</i>	60	2.8
	2.2	<i>Salmiana</i>	73	2.7
	2.3	<i>Agave angustifolia</i>	56	12.4
	2.4	<i>Crassispina</i>	41.5	4.4
SDU	3.1	<i>Salmiana</i>	63	2.3
	3.2	<i>Agave subgénero littaea</i>	37	2.1
	3.3	<i>Crassispina</i>	65	5.0
DM-V	4.1	<i>Crassispina</i>	205	2.8
	4.2	<i>Agave americana</i>	298	5.9
	4.3	<i>Crassispina</i>	95	8.7
	4.4	<i>Agave marmorata</i>	43	2
TB	5.1	<i>Salmiana</i>	125	2.5
	5.2	<i>Crassispina</i>	17	5.0
SLP	6.1.1	<i>Salmiana</i>	1,150	8.1
	6.1.2	<i>Salmiana</i>	95	9
	6.2.1	<i>Agave angustifolia</i>	30	15.1
	6.2.2	<i>Agave angustifolia</i>	143	27.8
	6.3	<i>Crassispina</i>	190	12.1
	6.4	<i>Salmiana</i>	30	4.1
	6.5	<i>Crassispina</i>	43	5.1
A	7.1	NI	900	3.4
	7.2	<i>Crassispina</i>	175	2.4
	7.3	<i>Salmiana</i>	50	5.6
SC	8.1	<i>Salmiana</i>	65	2.3
	8.2	<i>Crassispina</i>	145	2.3
	8.3	<i>Salmiana</i>	39	10.9
C	9	<i>Agave angustifolia</i>	30	4.4
	9.2	<i>Salmiana</i>	61	8.2
	9.3	<i>Crassispina</i>	125	5.9
SMA	10.1	<i>Salmiana</i>	18	4.7
	10.2	<i>Crassispina</i>	44	5.3
	10.3	<i>Crassispina</i>	44	3.7
X	11.1	<i>Crassispina</i>	33	4.2

	11.2	NI	39	14.4
	11.3	<i>Salmiana</i>	46	3.4
SF	12.1	<i>Salmiana</i>	85	5.2
	12.2	<i>Crassispina</i>	14	4.8
	12.3	<i>Crassispina</i>	63	3.8
V	13	<i>Salmiana</i>	43	4.0
DM	14	<i>Crassispina</i>	129	8.3

O: Ocampo, DH: Dolores Hidalgo, SDU: San Diego de la Unión, DM-V: Doctor Mora-Victoria, TB: Tierra Blanca, SLP: San Luis de la Paz, A: Atarjea, SC: Santa Catarina, C: Comonfort, SMA: San Miguel de Allende, X: Xichú, SF: San Felipe, V: Victoria, DM: Doctor Mora, NI: no identificado.

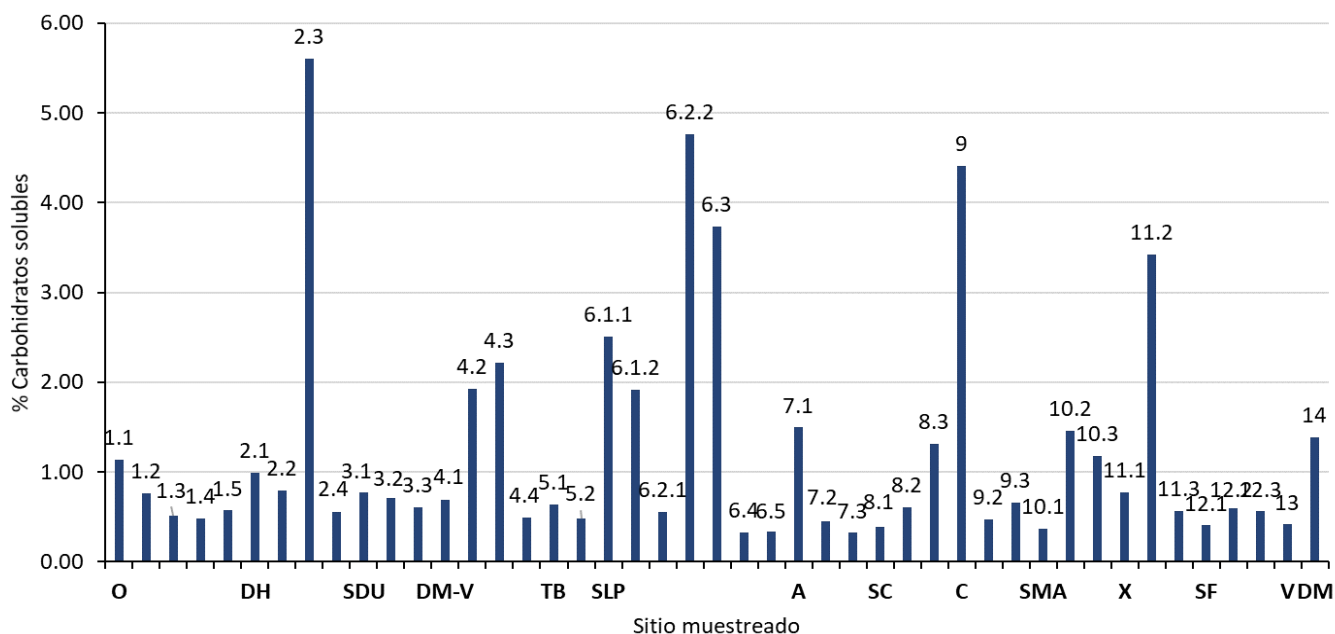


FIGURA 4. 2 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN LOS EXTRACTOS DE JUGO DE AGAVE. NÚMERO IDENTIFICADOR DE ESPECIES DE AGAVE: 1.1 *AGAVE MAPISAGA*. 1.2, 1.4, 2.2, 3.1, 5.1, 6.1.1, 6.1.2, 6.4, 8.1, 8.3, 7.3, 9.2, 10.1, 11.3, 12.1, 13 *AGAVE SALMIANA* SSP. *SALMIANA* (CENIZO). 1.5, 2.4, 3.3, 4.1, 4.3, 5.2, 6.3, 6.5, 7.2, 9.3, 10.2, 10.3, 11.1, 12.2, 12.3, 14 *AGAVE SALMIANA* SSP. *CRASSISPINA* (VERDE). 2.3, 6.2.1, 6.2.2 Y 9 *AGAVE ANGUSTIFOLIA*. 2.1, 4.2 *AGAVE AMERICANA*. 4.4 *AGAVE MARMORATA*. 3.2 *AGAVE* SUBG. *LITTAEA*. 7.1 NO IDENTIFICADO. O:OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

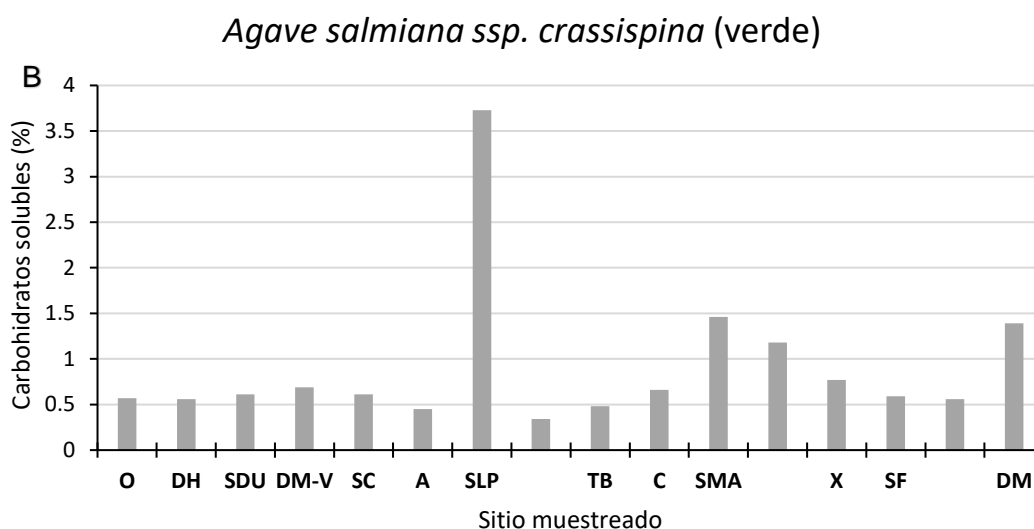
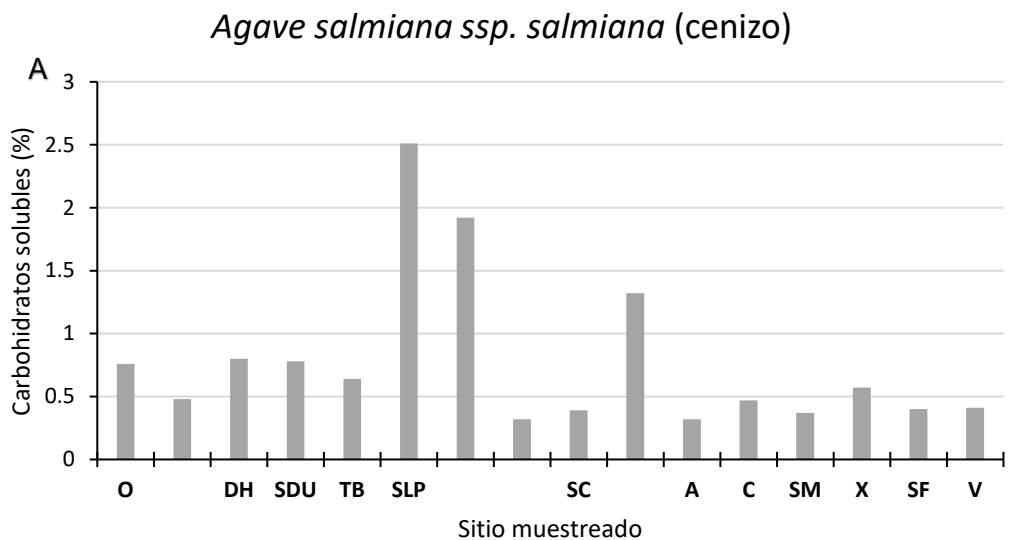


FIGURA 4. 3 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN LOS EXTRACTOS DE JUGO DE AGAVE DE LAS SUBESPECIES *SALMIANA* Y *CRASSISPINA*. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

4.3 RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DEL SECADO POR ASPERSIÓN

Los carbohidratos solubles fueron secados mediante secado por aspersión, se obtuvo un polvo blanquecino fino con alto carácter higroscópico (**Figura 4.4**). Se obtuvieron diferentes porcentajes de eficiencia de secado (**Figura 4.5**), lo que se traduce en distintas cantidades de muestra en polvo recuperado. Estas diferencias se deben al porcentaje de carbohidratos solubles presentes en las muestras. Se obtuvieron eficiencias relativamente altas con un promedio de 50% y alcanzando eficiencias de hasta 80%, en el caso de *Agave salmiana ssp. crassispina* (verde) correspondiente al municipio de San Luis de la Paz. También se recuperaron distintas cantidades de polvo seco correspondiente a las muestras líquidas procesadas. La cantidad máxima que se recolectó fue 27.8 y 15 g para *angustifolia* del municipio San Luis de la Paz, lo que corresponde a aquellas muestras con mayor registro de carbohidratos solubles o °Brix. No obstante, algunas de las muestras no fue posible secarlas por completo, esto debido a la alta cantidad de fructosa o, por el contrario, baja concentración de sólidos solubles. También por factores técnicos durante el secado, por ejemplo, el humedecimiento del recipiente circulador de muestra que la dirige hacia el recipiente colector final. En estos casos, se obtuvo mínima cantidad de polvo 0.15 g, por lo que en los análisis posteriores no tuvieron replicas y se muestra con la abreviación SD (sin dilución).

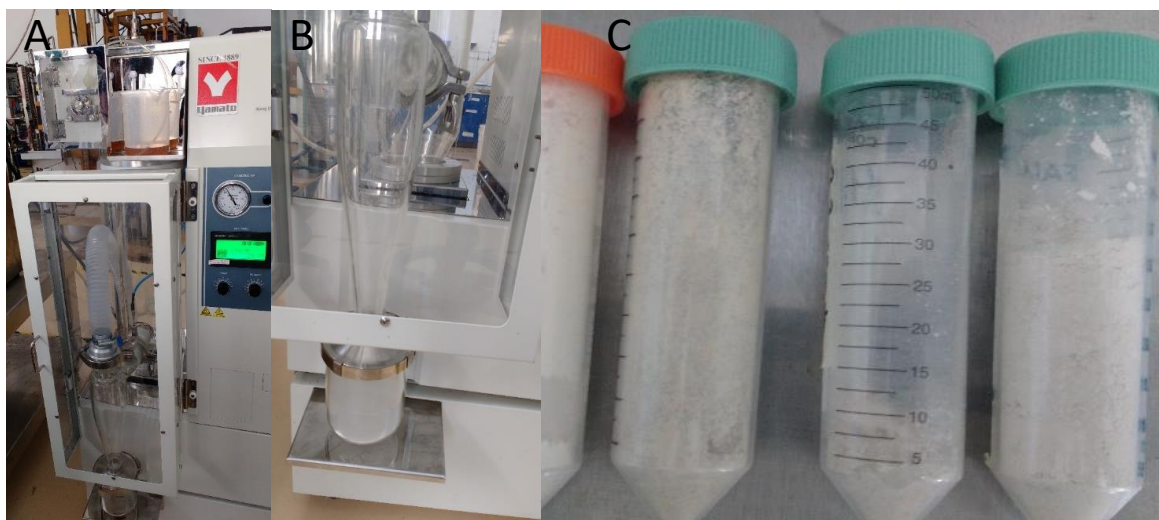


FIGURA 4. 4 SISTEMA DEL SECADO POR ASPERSIÓN DE JUGO DE AGAVE Y RECUPERACIÓN DE MUESTRA. A) EQUIPO DE SECADO POR ASPERSIÓN EN USO. B) SISTEMA DE CICLONES Y RECUPERACIÓN DE MATERIAL SECO. C) POLVO BLANQUECINO FINO RECUPERADO DE LAS MUESTRAS DE JUGO DE AGAVE.

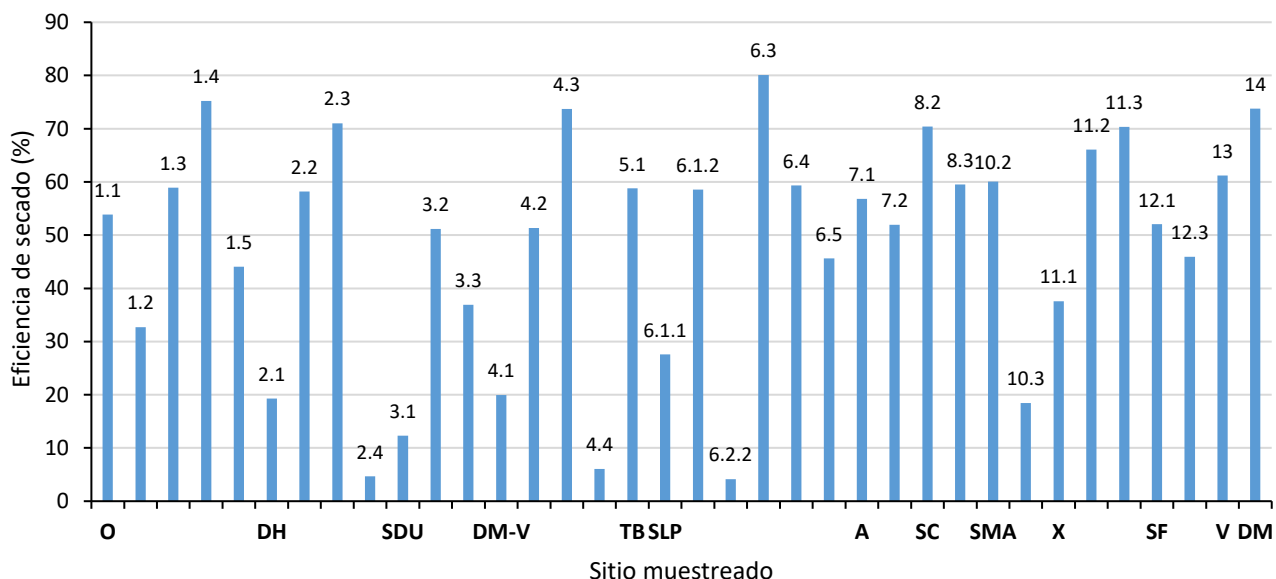


FIGURA 4. 5 PORCENTAJES DE EFICIENCIA DEL SECADO POR ASPERSIÓN. NÚMERO IDENTIFICADOR DE ESPECIES DE AGAVE: 1.1 AGAVE MAPISAGA. 1.2, 1.4, 2.2, 3.1, 5.1, 6.1.1, 6.1.2, 6.4, 8.1, 8.3, 7.3, 9.2, 10.1, 11.3, 12.1, 13 AGAVE SALMIANA SSP. SALMIANA (CENIZO). 1.5, 2.4, 3.3, 4.1, 4.3, 5.2, 6.3, 6.5, 7.2, 9.3, 10.2, 10.3, 11.1, 12.2, 12.3, 14 AGAVE SALMIANA SSP. CRASSISPINA (VERDE). 2.3, 6.2.1, 6.2.2 Y 9 AGAVE ANGUSTIFOLIA. 2.1, 4.2 AGAVE AMERICANA. 4.4 AGAVE MARMORATA. 3.2 AGAVE SUBG. LITAEAE. 7.1 NO IDENTIFICADO. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES

4.4.1 AZÚCARES REDUCTORES POR MÉTODO DNS

El cambio de coloración en la muestra de anaranjado claro a oscuro da las absorbancias proporcionales a la concentración de azúcares (**Figura 4.6**). Se realizó una curva con concentraciones de glucosa conocidas. Se obtuvieron las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm en duplicado. Para la menor concentración de glucosa (0.4 g/L) se obtuvo una absorbancia promedio de 0.3185 y para la concentración de glucosa de 2 g/L se obtuvo una absorbancia promedio de 1.1595 (**Tabla 4.5**). Lo que indica que las muestras a analizar no deben pasar las absorbancias obtenidas de la curva de calibración para cada concentración de azúcar.

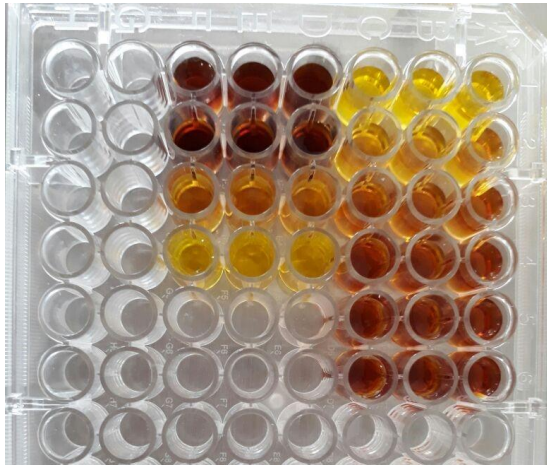


FIGURA 4. 6 MUESTRAS DE JUGO CRUDO DE AGAVE SOMETIDAS AL PROTOCOLO MILLER.

TABLA 4. 5 ABSORBANCIAS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DNS.

[GLUCOSA g/L)	ABSORBANCIA PROMEDIO
0	0.0875
0.4	0.3185
0.8	0.606
1.2	0.789
1.6	0.98
2	1.1595

Con los valores obtenidos se construyó una curva de calibración que correlaciona la concentración de glucosa con la absorbancia. Se obtuvo la ecuación de la pendiente de la recta con una correlación cercana a 0.99 (**Figura 4.7**) con esta ecuación fue posible cuantificar los azúcares reductores contenidos en las muestras.

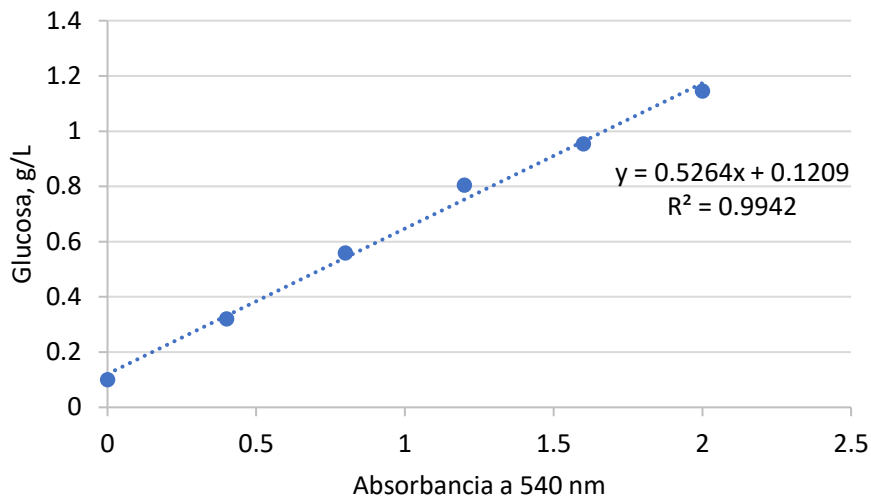


FIGURA 4. 7 CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA PARA MÉTODO DNS.
MIDE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA A 540 NM CORRESPONDIENTES A CADA CONCENTRACIÓN UTILIZADA.

Se obtuvieron concentraciones de azúcares reductores (ejemplo; glucosa, fructosa) bastante fluctuantes entre municipios y especies de agaves, con cantidades que van desde 1 a 17 g/L de azúcares (**Figura 4.8**). La muestra de *Agave salmiana* (cenizo) correspondiente al municipio de

Tierra Blanca mostró la menor cantidad de azúcares a 1 g/L, seguido de la muestra con identificador 1.2 del municipio de Ocampo perteneciente a la misma especie que la anterior. Así como otras muestras de *ssp. crassispina* y *ssp. salmiana* del municipio Dolores Hidalgo tuvieron en promedio una concentración de 4 g/L. Por otro lado, se puede observar también concentraciones altas de azúcares reductores que van de 13 a 16 g/L en las mismas especies de agave, *ssp. salmiana* y *ssp. crassispina* con la diferencia del municipio al que corresponden, en este caso Comonfort y San Miguel de Allende. No existe relación conforme a la cantidad de azúcares y especie de planta muestreada, ni diferencias notables entre muestras del mismo municipio, sin embargo, se observa mayor tendencia de acumulación de azúcar en especies de *Agave salmiana*.

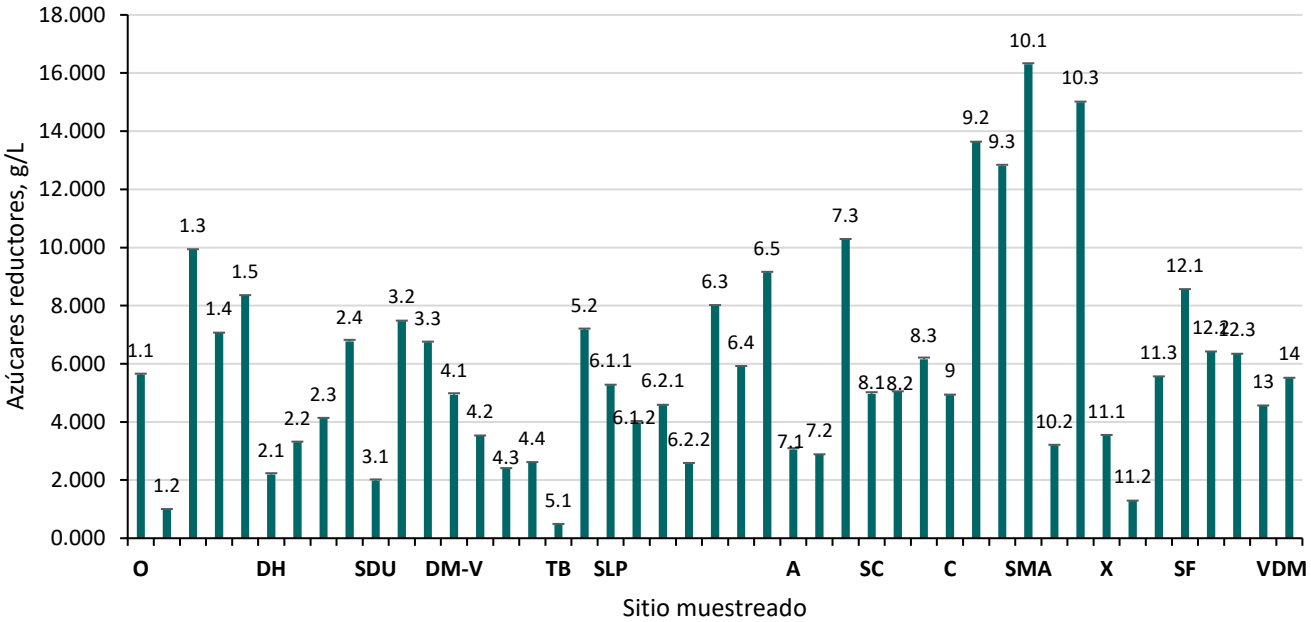


FIGURA 4. 8 CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO QUÍMICO DNS. NÚMERO IDENTIFICADOR DE ESPECIES DE AGAVE: 1.1 *AGAVE MAPISAGA*. 1.2, 1.4, 2.2, 3.1, 5.1, 6.1.1, 6.1.2, 6.4, 8.1, 8.3, 7.3, 9.2, 10.1, 11.3, 12.1, 13 *AGAVE SALMIANA SSP. SALMIANA* (CENIZO). 1.5, 2.4, 3.3, 4.1, 4.3, 5.2, 6.3, 6.5, 7.2, 9.3, 10.2, 10.3, 11.1, 12.2, 12.3, 14 *AGAVE SALMIANA SSP. CRASSISPINA* (VERDE). 2.3, 6.2.1, 6.2.2 Y 9 *AGAVE ANGUSTIFOLIA*. 2.1, 4.2 *AGAVE AMERICANA*. 4.4 *AGAVE MARMORATA*. 3.2 *AGAVE SUBG. LITTAEA*. 7.1 NO IDENTIFICADO. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEJA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

4.4.2 AZÚCARES TOTALES POR ANTRONA

El cambio de coloración en la muestra de azul claro a oscuro nos dará las absorbancias proporcionales a la concentración de azúcares (**Figura 4.9**). Se obtuvieron absorbancias registrando las lecturas a una longitud de onda de 620 nm en duplicado. La menor concentración de sacarosa (0.04) resultó con una absorbancia de 0.515 y la mayor concentración mostró una absorbancia de 2.251 correspondiente a 0.2 g/L (**Tabla 4.6**). Lo que indica que las muestras a analizar no deben pasar las absorbancias obtenidas de la curva de calibración para cada concentración de azúcares.



FIGURA 4. 9 MUESTRAS DE JUGO CRUDO DE AGAVE SOMETIDAS A LA REACCIÓN DE FEHLING.

TABLA 4. 6 ABSORBANCIAS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ANTRONA.

[SACAROSA g/L)	ABSORBANCIA PROMEDIO
0	0.229
0.04	0.5155
0.08	0.666
0.12	0.905
0.16	1.105
0.2	1.2445

De la misma manera con los valores obtenidos se construyó una curva de calibración con la ecuación de la pendiente de la recta y una correlación cercana a 0.99 lo que confirma la concentración más veraz de las muestras (**Figura 4.10**).

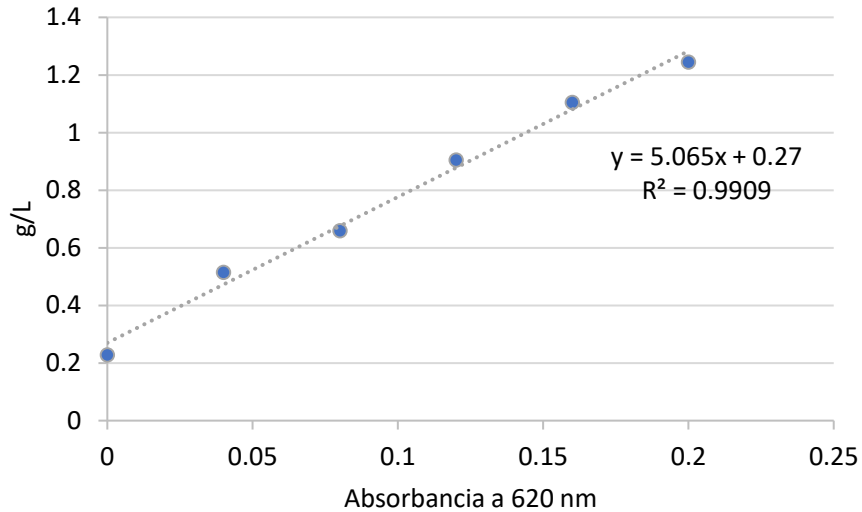


FIGURA 4. 10 CURVA DE CALIBRACIÓN DE SACAROSA PARA MÉTODO ANTRONA. MIDE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA A 620 NM CORRESPONDIENTES A CADA CONCENTRACIÓN UTILIZADA.

La concentración de azúcares totales, entre ellos moléculas de fructanos, tuvieron diferencias notables entre municipios y especies de agaves, las concentraciones obtenidas fueron de 30 a 1,100 g/L y en promedio 286 g/L (**Figura 4.11**). Muestras de *Agave angustifolia* y *Agave ssp. crassispina* de San Luis de la Paz y Doctor Mora respectivamente obtuvieron la mayor concentración de azúcares totales. Por otro lado, los agaves *ssp. salmiana* y de las otras especies identificadas entre ellas *Agave americana* y *Agave marmorata* resultaron con concentraciones notablemente bajas.

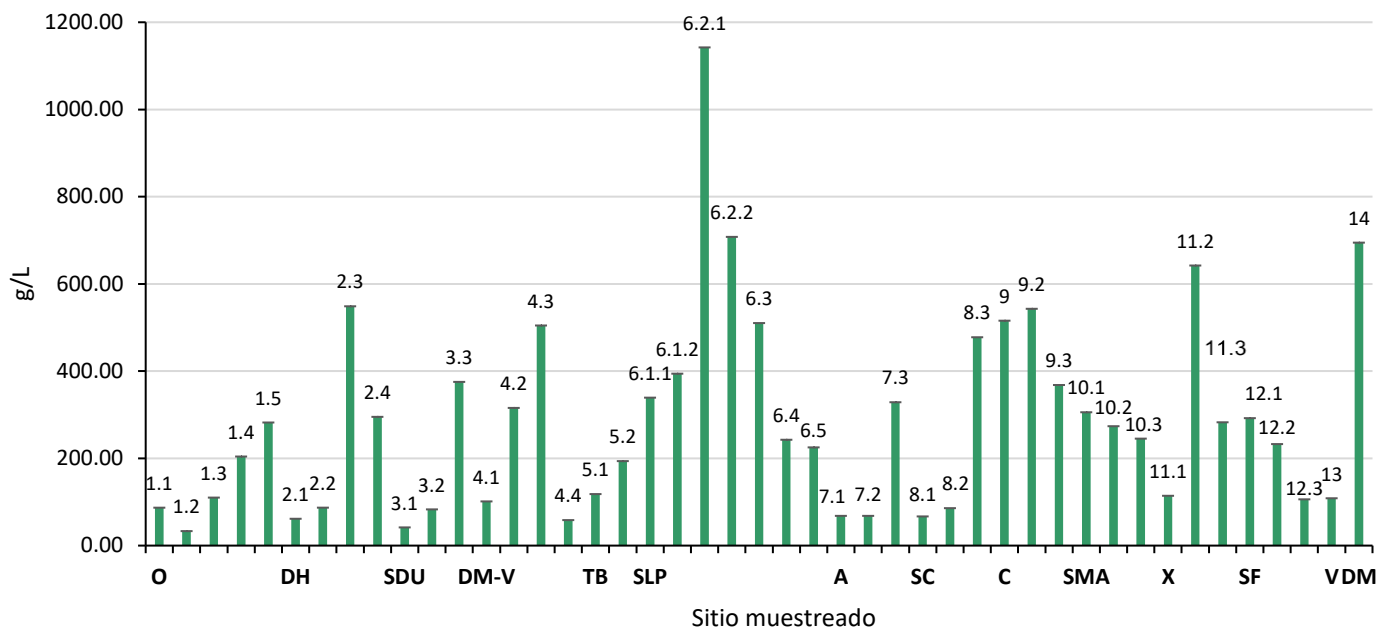


FIGURA 4. 11 CONCENTRACIÓN EN G/L DE AZÚCARES TOTALES MEDIDOS POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO ANTRONA. NÚMERO IDENTIFICADOR DE ESPECIES DE AGAVE: 1.1 AGAVE MAPISAGA. 1.2, 1.4, 2.2, 3.1, 5.1, 6.1.1, 6.1.2, 6.4, 8.1, 8.3, 7.3, 9.2, 10.1, 11.3, 12.1, 13 AGAVE SALMIANA SSP. SALMIANA (CENIZO). 1.5, 2.4, 3.3, 4.1, 4.3, 5.2, 6.3, 6.5, 7.2, 9.3, 10.2, 10.3, 11.1, 12.2, 12.3, 14 AGAVE SALMIANA SSP. CRASSISPINA (VERDE). 2.3, 6.2.1, 6.2.2 Y 9 AGAVE ANGUSTIFOLIA. 2.1, 4.2 AGAVE AMERICANA. 4.4 AGAVE MARMORATA. 3.2 AGAVE SUBG. LITTEA. 7.1 NO IDENTIFICADO. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

4.4.3 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES SIMPLES HPLC

Los azúcares simples mono y disacáridos: fructosa, sacarosa y glucosa fueron cuantificados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se obtuvieron los siguientes tiempos de retención para cada estándar y las ecuaciones de la curva de calibración se muestran en la **Tabla 4.7.**

TABLA 4. 7 ABSORBANCIAS DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA.

ESTÁNDAR	Tr (min)	ECUACION DE LA CURVA
Sacarosa	7.804	$y = 1.12x + 0.06$
Glucosa	9.167	$y = 1.23x + 0.06$
Fructosa	11.370	$y = 1.25x + 0.06$

Se obtuvieron cromatogramas con picos separados para cada estándar y buena resolución (**Figura 4.12**), con excepción de algunas muestras que no pudieron ser detectados por el equipo debido a factores como la contaminación de la muestra o por el tiempo de procesamiento de ésta. Los cromatogramas se pueden observar con la línea base fuera de los límites y picos pertenecientes a moléculas distintas. Los resultados se calcularon y reportaron en porcentaje base húmeda, es decir, gramos de azúcar entre gramos de muestra (**Tabla 4.8**). Los azúcares que se encontraron en el jugo de la base de las hojas de agave son sacarosa en menor cantidad, seguido de glucosa y significativamente un aumento en cantidad de fructosa. El análisis de los datos indica que los porcentajes de azúcares obtenidos mediante HPLC corresponden a las proporciones de azúcares presentes de manera convencional en el jugo de agave. En general, el porcentaje de sacarosa fue 0.29-4.74%, glucosa de 0.12-34% y fructosa desde 1.89% hasta 42%. *Agave ssp. salmiana* y *ssp. crassispina* resultaron con la mayor cantidad de azúcares presente (**Tabla 4.8**); contradiciendo los resultados de carbohidratos mediante técnicas químicas, los cuales indicaron mayor cantidad de carbohidratos en *Agave angustifolia*. Algunas muestras no pudieron ser detectadas por el equipo lo que se indica en la **Tabla 4.8** como ND, probablemente a causa de contaminación de la muestra o hasta desgaste en el relleno de la columna utilizada, entre otros factores.

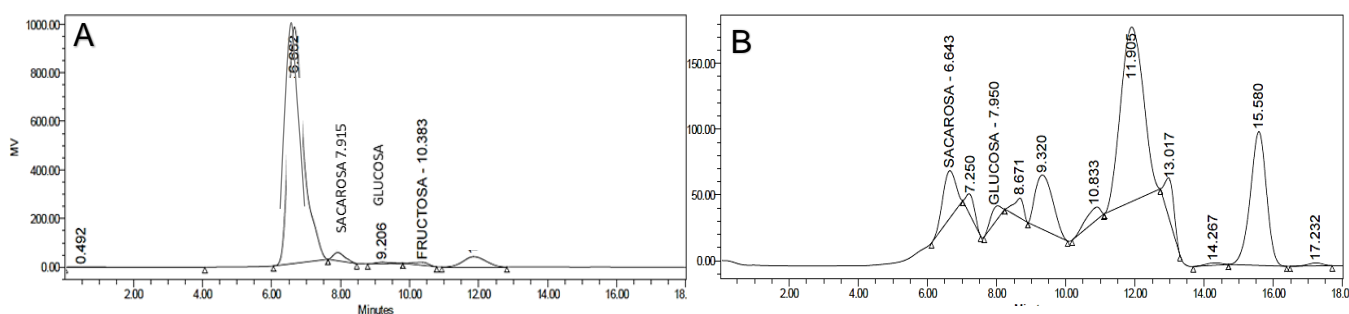


FIGURA 4. 12 CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA MEDIANTE HPLC. A) MUESTRA CORRESPONDIENTE AL MUNICIPIO DE DOLORES HIDALGO, *AGAVE ANGUSTIFOLIA*. SE OBSERVA BUENA RESOLUCIÓN Y SEPARACIÓN DE AZÚCARES A CUANTIFICAR. B) MUESTRA DE OCAMPO, *AGAVE SALMIANA SSP. CRASSISPINA*, MALA RESOLUCIÓN DEL CROMATOGRAMA, DETECCIÓN DE DIFERENTES MOLÉCULAS EN LA CUANTIFICACIÓN.

TABLA 4. 8 CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES OBTENIDOS MEDIANTE HPLC. REPORTADOS EN PORCENTAJE EN BASE HÚMEDA. ND: NO DETECTADO EN EL EQUIPO, SD: SIN DILUCIÓN.

MUNICIPIO	ESPECIE	SACAROSA (% base húmeda)	GLUCOSA (% base húmeda)	FRUCTOSA (% base húmeda)
O	<i>Agave mapisaga</i>	1.4 ± 0.2	9.7 ± 3.7	14 ± 3.2
	<i>Salmiana</i>	ND	ND	ND
	NI	1.6 ± 0.1	34.3 ± 0.1	30 ± 0.3
	<i>Salmiana</i>	3.7 ± 0.1	21.9 ± 0.2	17.3 ± 0.3
	<i>Crassispina</i>	2.1 ± 0.1	20.2 ± 1.3	29.2 ± 1.3
DH	<i>Agave americana</i>	2.7 SD	26 SD	29.4 SD
	<i>Salmiana</i>	4 ± 0.2	14.5 ± 6.7	21.2 ± 1.6
	<i>Agave angustifolia</i>	2 ± 1	1.52 ± 1.3	5 ± 1.2
	<i>Crassispina</i>	1.2 ± 0.2	17 ± 3.7	25 ± 0.1
SDU	<i>Salmiana</i>	1.8 SD	ND	22 SD
	<i>Agave subg littaea</i>	ND	27 SD	28.7 SD
	<i>Crassispina</i>	1.5 ± 0.1	17.5 ± 1.1	19.5 ± 0.1
DM-V	<i>Crassispina</i>	2.5 ± 0.4	21 ± 2	28.6 ± 0.4
	<i>Agave americana</i>	1.6 ± 0.1	4 ± 0.1	10.2 ± 0.1
	<i>Crassispina</i>	1.1 ± 0.1	3 ± 0.3	4.1 ± 0.4
	<i>Agave marmorata</i>	0.3 SD	17.4 SD	35.9 SD
TB	<i>Salmiana</i>	4.7 ± 0.6	3.6 ± 0.8	21.5 ± 2.2
	<i>Crassispina</i>	0.5 ± 0.1	18.2 ± 2.8	18.6 ± 5.3
SLP	<i>Salmiana</i>	2 ± 0.1	7 ± 1	11 ± 1.2
	<i>Salmiana</i>	1 ± 0.6	1 ± 0.8	5 ± 0.4
	<i>Agave angustifolia</i>	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	2 ± 0.6
	<i>Agave angustifolia</i>	1 ± 0.2	0.1	2 ± 0.1
	<i>Crassispina</i>	1 ± 0.1	5 ± 0.4	10 ± 0.3
	<i>Salmiana</i>	0.5 ± 0.1	13 ± 5	15 ± 0.2
	<i>Crassispina</i>	2 ± 0.1	16 ± 0.1	42 ± 0.5
A	NI	1 ± 0.05	7 ± 1	43 ± 11
	<i>Crassispina</i>	1 ± 0.1	8 ± 2	16 ± 0.1
	<i>Salmiana</i>	2 ± 0.1	27 ± 5	23 ± 1
SC	<i>Salmiana</i>	4 ± 1	48 ± 16	149 ± 51
	<i>Crassispina</i>	3 ± 0.4	12 ± 3	30 ± 4
	<i>Salmiana</i>	1 ± 0.02	3 ± 0.3	8 ± 0.2
C	<i>Agave angustifolia</i>	2 ± 0.4	9 ± 2	17 ± 6
	<i>Salmiana</i>	3 ± 0.4	12 ± 3	13 ± 1
	<i>Crassispina</i>	4 ± 0.6	14 ± 2	17 ± 3

SMA	<i>Salmiana</i>	3 ± 0.4	26 ± 5	25 ± 5
	<i>Crassispina</i>	0.5 ± 0.02	14 ± 2	9 ± 0.02
	<i>Crassispina</i>	2 SD	20 SD	34 SD
X	<i>Crassispina</i>	1 ± 0.3	23 ± 3	16 ± 0.4
	NI	0.5 ± 0.05	0.1 ± 0.01	2 ± 0.6
	<i>Salmiana</i>	0.6 ± 0.1	10 ± 3	17 ± 0.1
SF	<i>Salmiana</i>	6 ± 0.4	17 ± 1	21 ± 1
	<i>Crassispina</i>	1 ± 0.05	16 ± 8	14 ± 3
	<i>Crassispina</i>	1 ± 0.04	8 ± 2	2 ± 0.7
V	<i>Salmiana</i>	11 ± 0.7	1 ± 0.01	16 ± 0.3
DM	<i>Crassispina</i>	0.4 SD	1 ± 1	5 ± 0.3

O: Ocampo, DH: Dolores Hidalgo, SDU: San Diego de la Unión, DM-V: Doctor Mora-Victoria, TB: Tierra Blanca, SLP: San Luis de la Paz, A: Atarjea, SC: Santa Catarina, C: Comonfort, SMA: San Miguel de Allende, X: Xichú, SF: San Felipe, V: Victoria, DM: Doctor Mora.

4.5 DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES DE FRUCTANOS DE AGAVE MEDIANTE HP SEC

Se obtuvieron los cromatogramas de los análisis de la distribución de polisacáridos mediante HP SEC de las muestras de carbohidratos solubles extraídos de hojas de las especies de agaves. Se mostraron diferentes distribuciones de los polisacáridos en cada muestra independientemente de la especie. Esto se ve reflejado en los niveles de altura y anchura de los picos (**Figura 4.13**). Los cuales corresponden a un tiempo de retención específico según cada grado de polimerización (8) de los estándares utilizados. Según el concepto de la cromatografía de exclusión, las moléculas de mayor tamaño, o sea, fructanos con DP >10 son las primeras en eluir en un tiempo menor a través de la columna. Lo que se refleja como una acumulación de segmentos divididos en mayor proporción en un tiempo de elución 15 a 20 minutos (**Figura 4.13 A y B**). A diferencia de los fructanos con menor longitud de cadena, los cuales eluyen a tiempos tardíos de 20 a 25 minutos al ser retenidos en los poros de la fase estacionaria (**Figura 4.13 C**). La mayoría de los carbohidratos extraídos corresponden a

fructanos de agave, sin embargo, la presencia de mono y disacáridos es significativa. Representados por los picos finales en los tiempos de retención de 27 a 30 minutos.

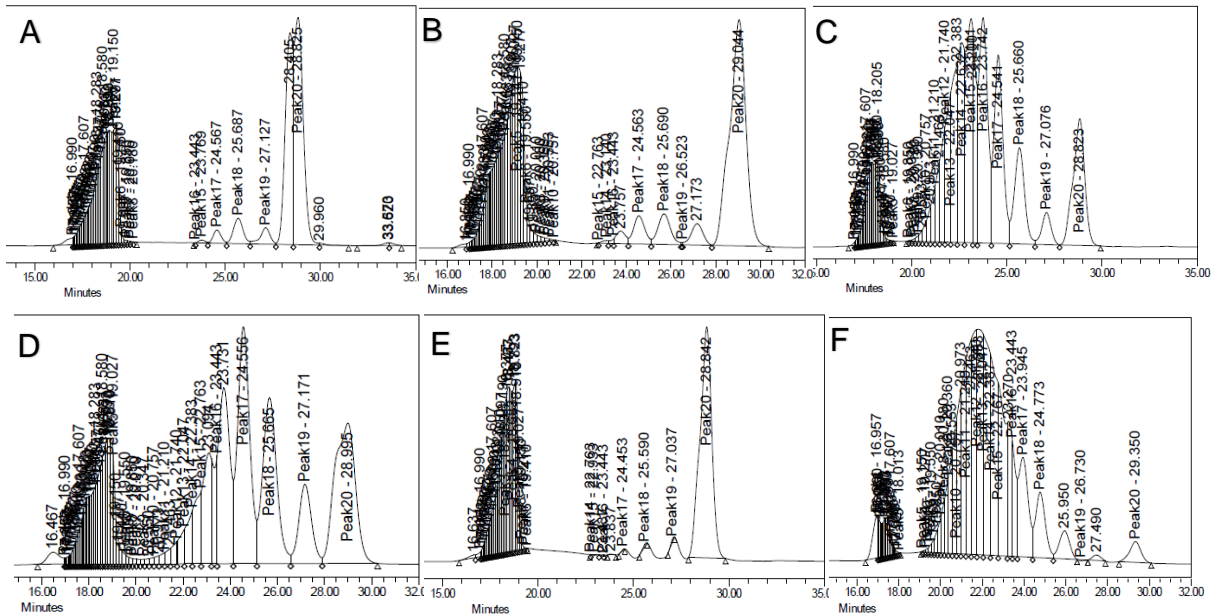


FIGURA 4. 13 CROMATOGRAMAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN DE FRUCTANOS EXTRAÍDOS DE HOJAS DE AGAVE A) *AGAVE SALMIANA* CENIZO DEL MUNICIPIO DE OCAMPO, B) *AGAVE SALMIANA* VERDE DEL MUNICIPIO ATARJEA, C) *AGAVE AMERICANA* MUESTRA RECOLECTADA ENTRE LOS MUNICIPIOS DE DOCTOR MORA Y VICTORIA. D) *AGAVE ANGUSTIFOLIA* DEL MUNICIPIO COMONFORT, E) *AGAVE* PERTENECIENTE AL GÉNERO *LITTAEA*, RECOLECTADO SAN DIEGO DE LA UNIÓN F) *AGAVE* NO IDENTIFICADO, RECOLECTADO EN XICHÚ.

Los resultados de distribución de los pesos moleculares de los fructanos extraídos de las hojas de los agaves se muestran en la **Tabla 4.9**. Se obtuvieron valores fluctuantes de peso molecular promedio en número (99) y en peso (Mw) para las diferentes especies de agave (**Tabla 4.14**). *Agave salmiana ssp. salmiana* mostró valores de Mn de 1192 a 4933 g/mol y un promedio de 2970 g/mol, *ssp. crassispina* resultó con un rango de Mn 1156 a 4568 g/mol, en promedio 3059 g/mol. En general agave *ssp. salmiana* (cenizo) muestra menor peso molecular que *ssp. crassispina* (verde), el mismo patrón se observó en *Agave angustifolia* en contraste con los fructanos de *Agave americana*. Y con un mayor peso molecular los fructanos de *Agave mapisaga*, *Agave marmorata*, *Agave subgénero littaea* y en los agaves no identificados.

TABLA 4. 9 PARÁMETROS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES DE FRUCTANOS DE AGAVES DEL NORTE DEL ESTADO DE GUANAJUATO, EXTRAÍDOS DE LA BASE DE LAS HOJAS. NI: NO IDENTIFICADO, SD: SIN DILUCIÓN.

MUNICIPIO	ESPECIE	Mn g/mol	Mw g/mol	DPn	DPw	P	DP>10 (%)	DP<10 (%)
O	<i>A.mapisaga</i>	2214 ± 10	4577 ± 33	14 ± 1	28 ± 1	2 ± 0.1	32 ± 1	68 ± 1
	<i>Salmiana</i>	4398± 262	5023±174	27 ± 2	31 ± 1	1.1 ± 0.1	88 ± 2	11 ± 1
	NI	5487±17	6547±11	34 ± 1	40 ± 1	1.2 ± 0.1	81 ± 1	19 ± 1
	<i>Salmiana</i>	4842± 53	6281±6	30 ± 1	39 ± 1	1.3 ± 0.1	72 ± 1	28 ± 1
	<i>Crassispina</i>	4568± 45	6432±28	28 ± 1	40 ± 1	1.4 ± 0.1	64±1	36 ± 1
DH	<i>A.americana</i>	2348 SD	4879 SD	14 SD	30 SD	2 SD	35 SD	65 SD
	<i>Salmiana</i>	2078± 23	4703±9	13 ± 1	29 ± 1	2.3 ± 0.1	29 ± 1	73 ± 2
	<i>A.angustifolia</i>	1505±2	2574±0.04	9 ± 1	16 ± 0	1.7 ± 0.1	24 ± 1	77 ± 1
	<i>Crassispina</i>	3933± 52	6074±58	24 ± 1	37 ± 1	1.5 ± 0.1	55 ± 1	45 ± 1
SDU	<i>Salmiana</i>	4096 SD	4765 SD	25 SD	29 SD	1.2 SD	88 SD	12 SD
	<i>A. littaea</i>	5213 SD	5355 SD	32 SD	33 SD	1 SD	99 SD	1 SD
	<i>Crassispina</i>	2627 ± 238	5533 ± 282	16 ± 1	34 ± 2	2.1 ± 0.1	32 ± 3	68 ± 3
DM-V	<i>Crassispina</i>	3060 ± 25	5209 ± 12	19 ± 2	32 ± 1	1.7 ± 0.1	48 ± 6	54 ± 2
	<i>A.americana</i>	1608 ± 4	3111 ± 13	10 ± 1	19 ± 1	1.9 ± 0.1	19 ± 1	81 ± 1
	<i>Crassispina</i>	1156 ± 22	2113 ± 25	7 ± 1	13 ± 1	1.8 ± 0.1	8 ± 1	92 ± 1
	<i>A.marmorata</i>	2843 SD	4925 SD	17 SD	30 SD	1.7 SD	44 SD	56 SD
TB	<i>Salmiana</i>	1293 ± 16	3436 ± 18	8 ± 1	21 ± 1	2.7 ± 0.1	10 ± 1	90 ± 1
	<i>Crassispina</i>	3551 ± 50	5492 ± 236	22 ± 1	34 ± 1	1.5 ± 0.1	58 ± 3	42 ± 3
SLP	<i>Salmiana</i>	1192 ± 8	2181 ± 27	7 ± 1	13 ± 1	1.8 ± 0.1	9 ± 1	91 ± 1
	<i>Salmiana</i>	2018 ± 36	2647 ± 74	12 ± 1	14 ± 1	1.3 ± 0.1	55 ± 1	49 ± 7
	<i>A.angustifolia</i>	3974 ± 221	4595 ± 83	24 ± 1	28 ± 1	1.2 ± 0.1	91 ± 5	9 ± 5
	<i>A.angustifolia</i>	3955 SD	4567 SD	24 SD	28 SD	1.1 SD	92 SD	8 SD
	<i>Crassispina</i>	1458 ± 37	3278 ± 240	9 ± 1	20 ± 1	2.2 ± 0.2	17 ± 1	83 ± 1
	<i>Salmiana</i>	3152 ± 261	5848 ± 123	19 ± 1	36 ± 1	1.9 ± 0.1	45 ± 2	55 ± 2
	<i>Crassispina</i>	2142 ± 51	4064 ± 132	13 ± 1	25 ± 1	1.9 ± 0.1	43 ± 1	58 ± 1
A	NI	3782 ± 43	4663 ± 55	23 ± 1	29 ± 1	1.2 ± 0	79 ± 1	21 ± 1
	<i>Crassispina</i>	4065 ± 16	4802 ± 14	25 ± 1	30 ± 1	1.2 ± 0	84 ± 1	16 ± 1
	<i>Salmiana</i>	3286 ± 262	5552 ± 229	20 ± 2	34 ± 1	1.7 ± 0.2	45 ± 7	55 ± 7
SC	<i>Salmiana</i>	3043 ± 166	4363 ± 273	19 ± 1	27 ± 2	1.4 ± 0.1	62 ± 1	38 ± 1
	<i>Crassispina</i>	4348 ± 22	5007 ± 5	27 ± 1	31 ± 1	1.2 ± 0.1	86 ± 5	17 ± 1
	<i>Salmiana</i>	1646 ± 37	2616 ± 142	10 ± 1	16 ± 1	1.6 ± 0.1	24 ± 1	76 ± 1
C	<i>A.angustifolia</i>	1872 ± 36	3880 ± 171	11 ± 1	24 ± 1	2 ± 0.1	26 ± 1	74 ± 1
	<i>Salmiana</i>	1902 ± 9	4448 ± 81	12 ± 1	27 ± 1	2.3 ± 0.1	20 ± 1	80 ± 1
	<i>Crassispina</i>	3002 ± 534	5363 ± 664	18 ± 3	33 ± 4	1.8 ± 0.1	43 ± 5	58 ± 4

SMA	<i>Salmiana</i>	4933 ± 284	5868 ± 286	30 ± 2	36 ± 2	1.2 ± 0	82 ± 1	18 ± 1
	<i>Crassispina</i>	2862 ± 1	5742 ± 51	18 ± 1	35 ± 1	2 ± 0.1	36 ± 1	65 ± 1
	<i>Crassispina</i>	4504 SD	6499 SD	28 SD	40 SD	1.4 SD	64 SD	38 SD
X	<i>Crassispina</i>	4226 ± 12	6122 ± 42	26 ± 1	38 ± 1	1.4 ± 0.1	62 ± 1	39 ± 1
	NI	1863 ± 46	2571 ± 101	11 ± 1	16 ± 1	1.4 ± 0.1	50 ± 1	50 ± 1
	<i>Salmiana</i>	3623 ± 114	6208 ± 174	22 ± 1	38 ± 1	1.7 ± 0.1	50 ± 2	50 ± 1
SF	<i>Salmiana</i>	2036 ± 134	4895 ± 218	12 ± 1	30 ± 1	2.4 ± 0.1	21 ± 2	79 ± 2
	<i>Crassispina</i>	3175 ± 50	5515 ± 255	19 ± 1	34 ± 2	1.7 ± 0.1	45 ± 2	55 ± 2
	<i>Crassispina</i>	3633 ± 162	6017 ± 138	22 ± 1	37 ± 1	1.7 ± 0.1	50 ± 2	50 ± 2
V	<i>Salmiana</i>	3981 ± 216	6100 ± 189	24 ± 1	38 ± 1	1.5 ± 0.1	57 ± 3	44 ± 2
DM	<i>Crassispina</i>	1211 ± 43	1975 ± 187	7 ± 1	12 ± 1	1.6 ± 0.1	8 ± 1	92 ± 1

Mn (masa molar promedio en número), Mw (masa molar promedio en peso), DPn (grado de polimerización promedio en número), DPw (grado de polimerización promedio en peso), P (polidispersidad), DP>10 (fructanos de cadena larga, %), DP<10 (fructanos de cadena corta o FOS, %). O: Ocampo, DH: Dolores Hidalgo, SDU: San Diego de la Unión, DM-V: Doctor Mora-Victoria, TB: Tierra Blanca, SLP: San Luis de la Paz, A: Atarjea, SC: Santa Catarina, C: Comonfort, SMA: San Miguel de Allende, X: Xichú, SF: San Felipe, V: Victoria, DM: Doctor Mora.

TABLA 4. 10 DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES PROMEDIO EN MASA Y EN NÚMERO DE LOS FRUCTANOS EXTRAÍDOS DE LA BASE DE HOJAS DE AGAVES DE LAS DISTINTAS ESPECIES.

ESPECIE	RANGO (<i>Mn</i>) g/mol	PROMEDIO (<i>Mn</i>) g/mol	RANGO (<i>Mw</i>) g/mol	PROMEDIO (<i>Mw</i>) g/mol
<i>ssp. salmiana</i> (cenizo)	1192 - 4933	2970	2181 - 6281	4683
<i>ssp. crassispina</i> (verde)	1156 - 4568	3059	1975 - 6499	5195
<i>A. angustifolia</i>	1505 - 3974	2827	2574 - 4595	3904
<i>A. americana</i>	1608, 2348	1978	3111, 4879	3995
<i>A. mapisaga</i>	2214	2214	4577	4577
<i>A. marmorata</i>	2843	2843	4925	4925
<i>A. subgénero</i> <i>littea</i>	5213	5213	5355	5355
NI	1863 - 5487	3711	2571 - 6547	4594

Mn (masa molar promedio en número), Mw (masa molar promedio en peso).

El peso molecular promedio en número (99) está asociado a las concentraciones molares mientras que el peso molecular promedio en peso (M_w) a la concentración de la masa. Por lo tanto, M_n y M_w tienden a ser idénticos cuando el material es monodisperso (Polidispersidad= 1.0) es decir, que no muestra variación en sus pesos moleculares. Fenómeno que no se observó en la mayoría de las muestras. Mostrando generalmente valores arriba de 1.0 indicando una distribución amplia o dispersa de los pesos moleculares de los polímeros. Se obtuvieron valores de polidispersidad de 1.03 a 2.66.

El grado de polimerización promedio (8) es otra forma práctica de resumir el tamaño de la cadena de los polímeros. Sin embargo, el DP no toma en cuenta la distribución de las diferentes fracciones, por lo tanto, es recomendable incluir ambos parámetros de peso molecular en número y peso. El análisis de distribución de tamaños de los fructanos revela que el grado de polimerización promedio en número (DP_n) en *Agave salmiana* (ambas) es de 7 a 30, en promedio 19. El grado de polimerización promedio en peso (DP_w) de 12 a 40, con un promedio de 30. (**Tabla 4.11**). Las demás especies de agaves mostraron de 16 a 40 DP_w , desde *Agave angustifolia* y muestras no identificadas.

TABLA 4. 11 GRADO DE POLIMERIZACIÓN PROMEDIO EN PESO Y NÚMERO DE LOS FRUCTANOS DE AGAVES EXTRAÍDOS DE LA BASE DE LAS HOJAS DE LAS DISTINTAS ESPECIES.

ESPECIE	RANGO (DP_n)	PROMEDIO (DP_n)	RANGO (DP_w)	PROMEDIO (DP_w)
<i>ssp. salmiana</i> (cenizo)	13 - 30	18	13 - 39	29
<i>ssp. crassispina</i> (verde)	7 - 28	19	12 - 40	31
<i>A. angustifolia</i>	9 - 24	17	16 - 28	24
<i>A. americana</i>	10,14	12	19, 30	25
<i>A. mapisaga</i>	14	14	28	28
<i>A. marmorata</i>	17	17	30	30
<i>A. subgénero</i> <i>littaea</i>	32	32	33	33
NI	11 - 34	23	16 - 40	28

DP_n (grado de polimerización promedio en número), DP_w (grado de polimerización promedio en peso).

Por otro lado, el contenido de fructanos de cadena larga ($DP > 10$) o corta ($DP < 10$) fue distinto entre municipios y especie de agave. Los resultados indican que los fructanos de *Agave salmiana ssp. salmiana* (cenizo) son en su mayoría de cadena corta; destacando por arriba del 60% en los municipios de Dolores Hidalgo, Tierra Blanca, San Luis de la Paz, Santa Catarina y San Felipe (**Figura 4.14 A**). Sin embargo, fructanos de cadena larga también tuvieron incidencia, notablemente en las muestras recolectadas en el municipio de Ocampo, San Diego de la Unión y San Miguel de Allende. Por otro lado, *Agave salmiana ssp. crassispina* (verde) mostró mayor porcentaje de fructanos con $DP > 10$, sobresaliendo en gran medida aquellas que fueron recolectadas en Ocampo, Santa Catarina, Atarjea, San Miguel de Allende y Xichú (**Figura 4.14 C**).

En general, el contenido de menor grado de polimerización de fructanos fue mayor en *Agave salmiana ssp. salmiana* (57%) que en *Agave salmiana ssp. crassispina* (47%) (**Figura 4.14 B y D**).

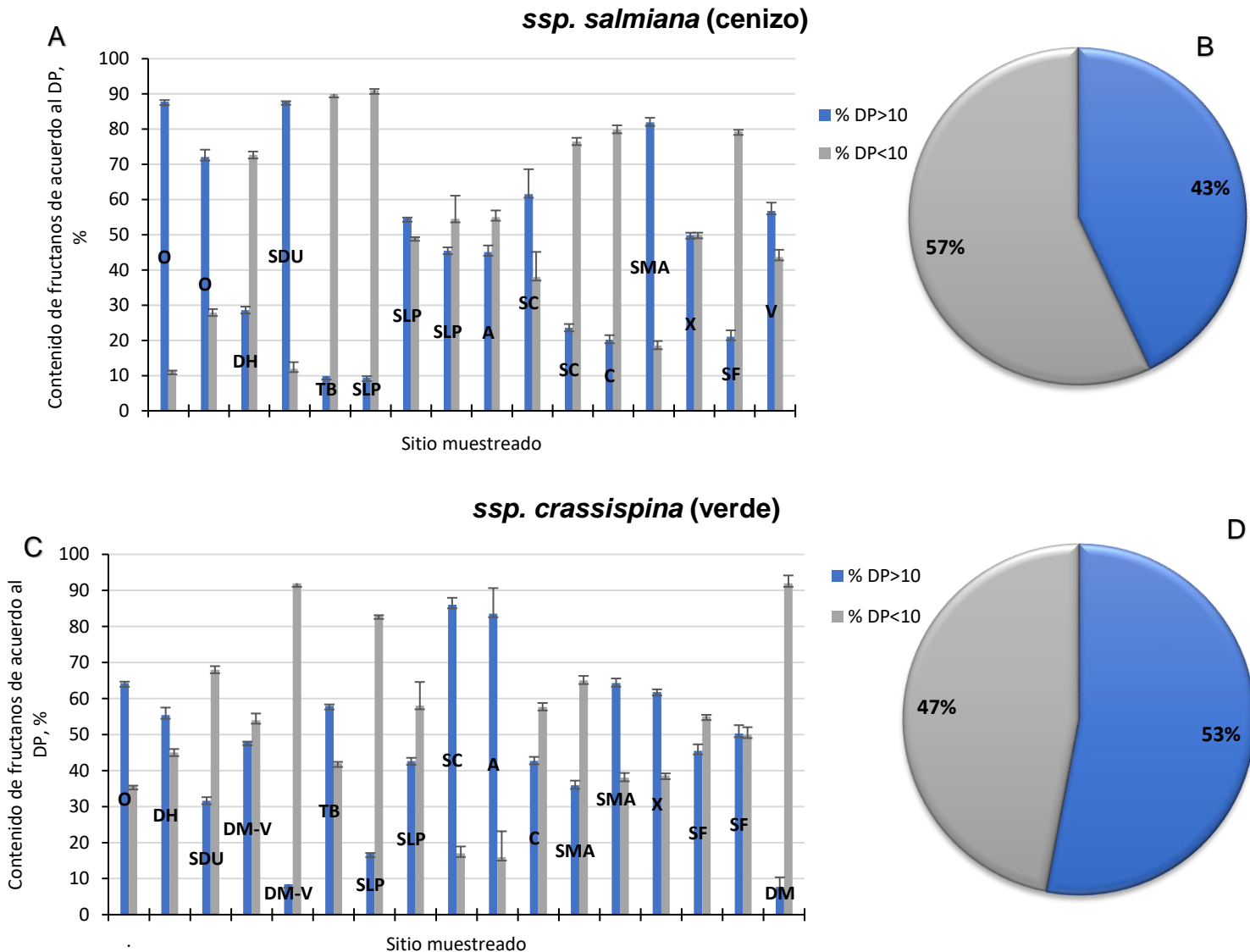


FIGURA 4. 14 DISTRIBUCIÓN GRÁFICA DE MOLÉCULAS DE ACUERDO CON EL GRADO DE POLIMERIZACIÓN EN SUBESPECIES DE *AGAVE SALMIANA*. A), C) PORCENTAJE DE DP POR MUESTRA Y MUNICIPIO MUESTREADO, EN *AGAVE SALMIANA* *ssp. SALMIANA* Y *AGAVE SALMIANA* *ssp. CRASSISPINA*, RESPECTIVAMENTE. B), D) PROPORCIÓN GENERAL DE DP DE FRUCTANOS DE AGAVE DE MENOR Y MAYOR GRADO DE DP EN *AGAVE SALMIANA* *ssp. SALMIANA* Y *AGAVE SALMIANA* *ssp. CRASSISPINA*, RESPECTIVAMENTE. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA, TB: TIERRA BLANCA, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, SC: SANTA CATARINA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, SF: SAN FELIPE, V: VICTORIA, DM: DOCTOR MORA.

Con respecto a las especies de *Agave americana*, *Agave marmorata*, *Agave mapisaga* y una muestra de *Agave angustifolia*, se encontraron mayormente fructanos de cadena corta en un porcentaje de 55-80% (**Figura 4.15**), con excepción de un *Agave angustifolia* del municipio de San Luis de la Paz, junto con el agave *subgénero littaea* y dos muestras no identificadas de Atarjea y Ocampo que resultaron en porcentajes altos de fructanos de cadena larga.

A pesar de que se encuentran diferencias visibles en los porcentajes de DP en las especies muestreadas, se puede encontrar un patrón de similitud en DP, en función al agrupamiento de municipios muestreados. Los municipios de Ocampo, San Diego de la Unión, Atarjea y Santa Catarina se agrupan en mayor porcentaje de fructanos de cadena larga, en el otro grupo se encuentran Dolores Hidalgo, Doctor Mora-Victoria, San Luis de la Paz y Comonfort con fructanos en su mayoría con un DP<10 (**Tabla 4.9**).

Las diferencias encontradas podrían deberse a la madurez de los agaves muestreados. Está claro que el agave joven tiene una distribución de peso molecular con tamaños de cadena más bajos, donde los FOS representan el 33-50% de los fructanos y los agaves maduros solo tienen 10-20% de FOS (40).

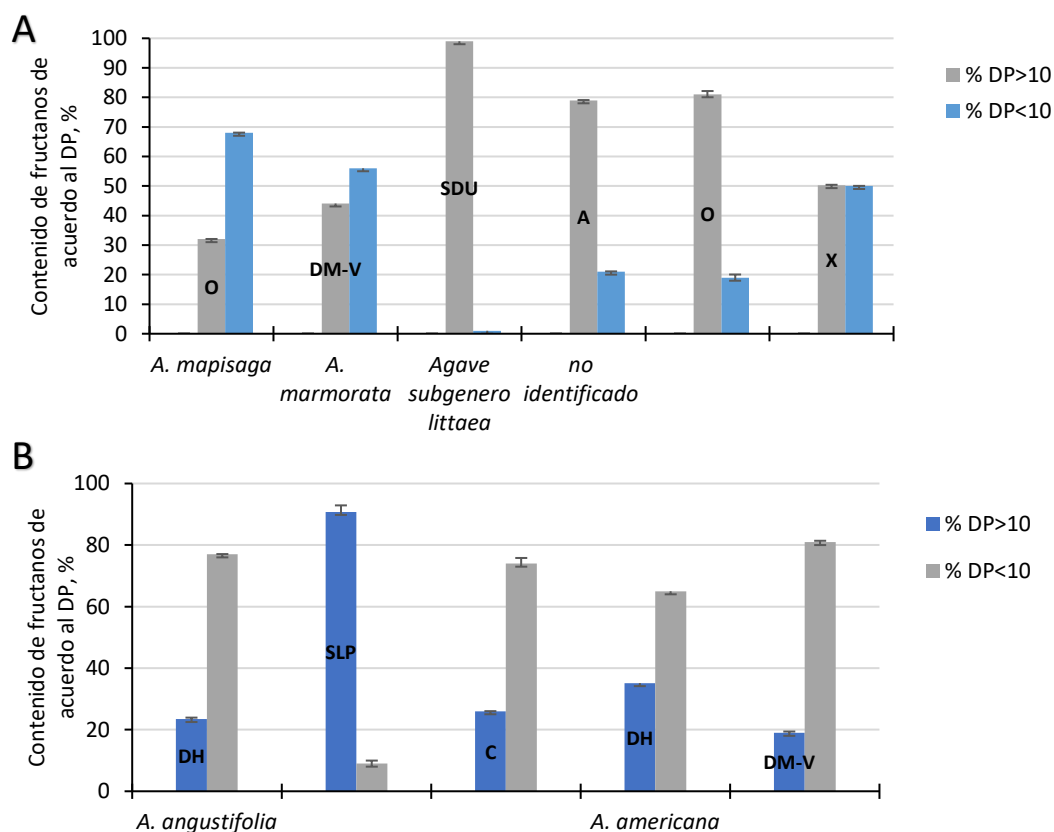


FIGURA 4. 15 DISTRIBUCIÓN GRÁFICA DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN EN LAS ESPECIES DE AGAVES. O: OCAMPO, DH: DOLORES HIDALGO, SDU: SAN DIEGO DE LA UNIÓN, SLP: SAN LUIS DE LA PAZ, A: ATARJEA, C: COMONFORT, SMA: SAN MIGUEL DE ALLENDE, X: XICHÚ, DM-V: DOCTOR MORA-VICTORIA.

La **Figura 4.16** muestra los histogramas generados a partir del análisis de cada muestra, donde se puede observar la distribución de tamaños de los fructanos y los porcentajes de abundancia relativa en función del DP. Las muestras de fructanos muestran grados diferentes DP no homogéneos, lo que corresponde a los %DP, en contraste con fructanos de agaves comerciales, los cuales forman una distribución tipo campana gaussiana.

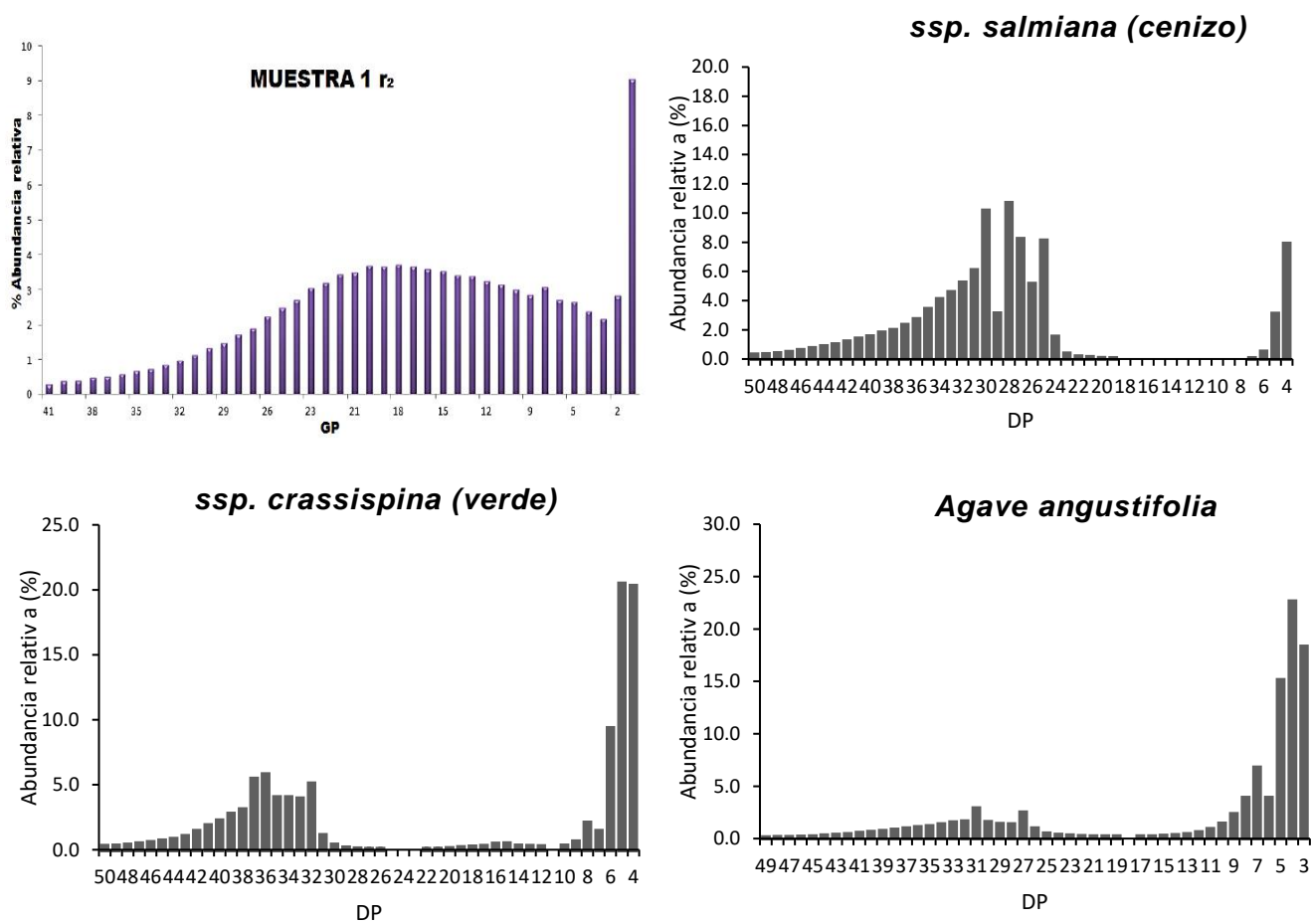


FIGURA 4. 16 HISTOGRAMA DE PORCENTAJE DE ABUNDANCIA RELATIVA EN FUNCIÓN DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN. MUESTRA 1: FRUCTANOS DE *AGAVE TEQUILANA WEBER* COMERCIALES. DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DIFERENCIAL; FRACCIONES MOLARES NORMALIZADAS A ÁREA = 100%.

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

Actualmente el estado de Guanajuato cuenta ya con la denominación de origen (DO) del mezcal en los municipios de San Luis de la Paz y San Felipe (100). Sin embargo, se busca sumar a 11 municipios más: Atarjea, San Diego de la Unión, Comonfort, Doctor Mora, Santa Catarina, Dolores Hidalgo, Tierra Blanca, Xichú, Ocampo y Victoria (<http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/economia/17904-denominacion-origen-mezcal-guanajuato>). Se espera también el aprovechamiento de los agaves de esta zona para la explotación de otros recursos derivados; como jarabes, mieles y fructanos. Debido a que se ha observado un gran potencial en cuanto a la diversidad de agaves silvestres y de plantaciones al colindar con San Luis Potosí, uno de los principales productores de mezcal en el país. En los municipios del norte del estado de Guanajuato destaca la presencia de agaves silvestres y de plantaciones, principalmente *Agave salmiana ssp. salmiana*, *Agave salmiana ssp. crassispina*, siendo la especie de hoja ancha más distribuida en México y uno de los dos agaves más utilizados para la producción de aguamiel y pulque, así como para fibras (101). También se observó incidencia de *Agave angustifolia* tanto en plantaciones como de manera silvestre, esta especie de agave es comúnmente utilizada para la elaboración del mezcal en el estado (102), sus hojas a diferencia de las de *ssp. salmiana* son delgadas. No existen actualmente estudios específicos de la distribución del agave en Guanajuato, no obstante, se puede mencionar presencia de otras especies, en Ocampo *Agave mapisaga*, en Doctor Mora y Dolores Hidalgo se encontraron plantas de *Agave marmorata* y *Agave americana*.

En la elaboración del mezcal se emplea solamente el tallo o piña de la planta, resultando las hojas un residuo de la industria. Diversos estudios se han enfocado en el procesamiento para la obtención de fibras y a recuperar los azúcares de este desecho, (103) para diversas aplicaciones. Entre ellas, la producción de bio combustible (4), sustrato para procesos de fermentación alternativos (104) y enzimas hidrolíticas (105). Sin embargo, los azúcares poliméricos (fructanos) sintetizados tanto en el tallo como en las hojas tienen efectos funcionales a la salud digestiva en humanos (106) y pueden ser utilizado como prebióticos. La extracción y caracterización de fructanos de las hojas del agave ha cobrado importancia sobre todo en *Agave tequilana* (107) y *Agave salmiana* (64). Como se mencionó anteriormente, municipios del estado de Guanajuato desean incluirse en la DO del mezcal

por lo que se espera un aumento del residuo de la planta e interés por explotar los agaves de la región para una posible producción de fructanos. Por lo que se están estudiando opciones para un aprovechamiento integral del cultivo. Se encontraron diferencias notables en los carbohidratos solubles de hojas en los agaves, con rangos de 0.32% *ssp. salmiana* a 5.6% *Agave angustifolia* (San Luis de la Paz y Dolores Hidalgo respectivamente), las diferencias muestran relación con el sitio de muestreo. Se ha determinado el contenido de fructanos en hojas de *Agave durangensis*, mostrando 8.9% de carbohidratos solubles (105), siendo significativamente mayor a nuestros resultados 5.6% en *Agave angustifolia*. Estudios anteriores han demostrado la influencia que ejercen las condiciones climáticas, los nutrientes del suelo, el cambio en las estaciones, las lluvias y variedad de la planta, en la composición y acumulación de carbohidratos en la misma (40, 108, 109). A pesar de que se recolectaron especies de *Agave salmiana* en su mayoría, las condiciones climáticas de cada sitio muestreado son distintas, por lo que el contenido de carbohidratos tiende a ser fluctuante, además de la influencia de las edades de la planta en el desarrollo y acumulación de azúcares. En Ocampo, el clima es predominantemente semi seco y semi árido, con una temperatura media de 17°C y la más alta de 40°C. San Felipe presenta contrastes montañosos y planicies, colinda al oeste con Ocampo y cuenta con un clima semiseco, pero en comparación con Ocampo las temperaturas máximas no superan los 25°C. Así como San Luis de la Paz, el cual tiene un clima similar a Ocampo semi seco, con temperaturas anuales de 16°C y una máxima de 20°C. Por otro lado, Atarjea se localiza en la Sierra Gorda de Guanajuato y presenta microclimas, de tropical-cálido húmedo y templado semi cálido (GOB). Esto por nombrar algunos ejemplos.

Investigaciones recientes argumentan que el contenido de fructanos y azúcares en los tejidos del agave, disminuye según la distancia al tallo. Es decir, la mayor concentración de azúcares se encuentran en el tallo (16 a 28%) o en la base cercana al mismo (1) y menor en las hojas (3.3 a 16.1%) (110). Se ha evaluado en otros estudios el contenido de fructanos en la base de las hojas en diversas especies de agave; *ssp. salmiana* 86.4 g/L, *ssp. crassispina* 53.9 g/L y *Americana* 39.8 g/L (111). Asimismo, se ha analizado ampliamente el contenido de azúcares en el jugo extraído de la base de las hojas, especialmente en plantas de *Agave tequilana*. Hojas secas y trituradas de esta especie identifican a la fructosa en grandes cantidades, seguido por glucosa como azúcar monomérico principal, y en menores cantidades galactosa, manosa y arabinosa (104). Por otro lado, en especies como *Agave salmiana*, se identificaron los carbohidratos no estructurales presentes en el jugo crudo extraído del tallo de la planta mediante HPLC y observaron valores altos en contenido de fructosa, glucosa, xilosa, maltosa y sacarosa en orden decreciente (112). A pesar de que

estos análisis se realizaron en jugos obtenidos de tallos, la información es comparable respecto al contenido de azúcares simples en el jugo derivado de la base de las hojas de los agaves muestreados en el presente trabajo. La cromatografía líquida de alta resolución muestra una cantidad mayor respecto a fructosa y significativamente menor en glucosa y sacarosa, en la mayoría de los agaves. En general el jugo crudo obtenido de las hojas del agave; se espera tenga menor contenido de azúcares, en comparación al tejido de piña u hojas cocidas. Ya que los agaves contienen carbohidratos complejos que se degradan por la acidez del jugo y principalmente a la hidrólisis ácida que experimentan los polisacáridos durante la cocción, la cual libera otros azúcares simples (113, 114).

Diversos estudios han evaluado las concentraciones de azúcares reductores en jugos crudos de *Agave ssp. crassispina* el cual cuenta con 22.8 g/L, *Agave americana* con una concentración de 19.7 g/L, las concentraciones más altas se encontraron en *Agave ssp. salmiana* 26.1 g/L (111). Dichas investigaciones son consistentes con los resultados del presente trabajo, donde *Agave ssp. crassispina* y *ssp. salmiana* revelan tener las concentraciones más altas de azúcares reductores, en comparación con los agaves de las otras especies. Sin embargo, muestras de *Agave angustifolia* del municipio San Luis de la Paz, mostraron la mayor cantidad de carbohidratos totales presentes en su jugo 1.142 kg/L, esto era de esperarse en consecuencia que la recolección de estos agaves fueron de plantaciones comerciales empleadas en la elaboración del mezcal en el municipio.

Las hojas, producto de los residuos de la industria tequilera, han sido sometidas a procesos de secado convencionales con el fin de obtener un producto en polvo para su venta como fructanos (116), así como para el aprovechamiento de sus carbohidratos en otras aplicaciones biotecnológicas (4). Uno de los métodos efectivos de pulverización de líquidos es mediante secado por aspersión. En este proyecto se obtuvieron porcentajes relativamente altos de eficiencia de secado en los fructanos extraídos de hojas de *Agave salmiana* con un promedio del 50%, obteniendo incluso el 80% en algunas muestras. Y desde 30 a 50% en las otras especies. No obstante, otras muestras no fue posible secarlas. Debido a que probablemente la eficiencia de secado de los fructanos de agave podría estar relacionada con el contenido de fructosa y los sólidos solubles totales en la muestra. Los estudios sobre el secado de fructanos de *Agave salmiana* han demostrado que la eliminación de mono y disacáridos por nanofiltración mejora la pureza y el proceso de secado por pulverización (99). Incluso se podría mejorar el rendimiento haciendo cambios en las condiciones operacionales del equipo; en temperatura de salida (198°C), velocidad de atomización (30,000rpm) y flujo de aire (720 m³h⁻¹) (58).

Se sabe que las propiedades de los fructanos dependen de su grado de polimerización, hay reportes donde se informa que los fructooligosacáridos tipo inulina (DP <10) y los fructanos levemente polimerizados ejercen efectos más pronunciados para la composición microbiana del colon (117, 118). Los fructanos de agave con DP comparable resultaron ser efectivos como prebióticos, estuvieron más disponibles a la fermentación bacteriana por la solubilidad de su estructura (6). Por otro lado, se ha informado que fructanos de agave de cadena larga disminuyen los triglicéridos en modelos animales (2), siendo una posible alternativa de tratamiento para pacientes obesos. Los fructanos de cadena larga también han resultado exitosos sustitutos de grasas en panadería (119). Los fructanos extraídos de las hojas de *Agave salmiana* muestran diversidad del DP promedio oscilando de 7 a 30 y DPn promedio de 19, *Agave angustifolia* de 9-24, DPn promedio 17, *Agave americana* con dos muestras de 10 y 14 DP. *Agave marmorata* de 17, *Agave subgénero littaea* 32 y agaves no identificados de 11-34, DPn promedio 23. Esta diversidad podría atribuirse a la composición del suelo y al clima de los lugares de muestreo, además de la edad de los agaves, aunque se estimó fueran agaves de seis años, no se sabe con certeza la edad de los agaves silvestres. Se ha informado anteriormente que los agaves jóvenes tienen fructanos de menor grado de polimerización, mientras que los agaves maduros tienden a acumular fructanos de mayor grado de polimerización; además de la ramificación de los fructanos de agave aumenta con la edad (30, 40).

Un estudio realizado con agave *ssp. crassispina* del estado de Guanajuato, afirma que sus fructanos están compuestos por bajo, intermedio y alto DP (51). Nuestros resultados revelan que en *ssp. crassispina* 53% son fructanos de cadena intermedia, en un rango de 7-28 y un promedio de grado de polimerización de 19. El mismo estudio menciona que a diferencia de *ssp. crassispina*, *ssp. salmiana* del estado de Guanajuato sus fructanos son nativos de agave (51), es decir de 8 a 12 DP, lo que confirma nuestros datos: la proporción de DP <10 es ligeramente mayor (57%) que los DP>10 (43%). Incluyendo *Agave angustifolia*, *Agave americana*, *Agave sub. littaea* y varios agaves no identificados.

Se hizo una comparación entre fructanos extraídos de hojas de *Agave salmiana* y fructanos comerciales. Los fructanos comerciales mostraron una mayor proporción de alto peso molecular; por otro lado, hojas de *Agave salmiana* mostraron una proporción casi igual de fructanos de bajo y alto peso molecular, incluso algunas muestras tenían más del 90% de bajo peso molecular. Existen reportes donde se observó que *Agave tequilana* sintetiza fructanos de bajo peso molecular en las hojas, luego estos se transportan al tallo y se transforman en fructanos de alto peso molecular (107).

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

Se demostró la viabilidad técnica para obtener fructanos de agaves silvestres del estado de Guanajuato, principalmente de hojas de *Agave salmiana*. Los carbohidratos solubles en agua se recuperaron de la base de las hojas cerca del tallo, los fructanos representan el 1.23% del peso de las hojas en base húmeda. Los fructanos extraídos fueron susceptibles de ser secados, alcanzando eficiencias de secado del 50% o incluso mayores. Adicionalmente se determinó la distribución del peso molecular de los fructanos extraídos de las hojas. Se encontró una gran diversidad en la distribución del peso molecular, pero en general, las hojas de *Agave salmiana* ambas subespecies contienen una baja proporción de fructanos de alto peso molecular, en comparación con los fructanos comerciales de agave. Los resultados del análisis de pesos moleculares de *Agave salmiana*, confirman una Mn promedio de 3014.5 g/mol y una P promedio de 1.7. Los fructanos de *Agave ssp. salmiana* muestran mayor proporción de fructanos de bajo peso molecular con un porcentaje de 57%, en contraste con los fructanos de *Agave ssp. crassispina* los cuales evidencian una proporción de 53% correspondiente a fructanos de cadena larga. No obstante, el DPn promedio de ambas subespecies es igual a 19, siendo mayor que la de los fructanos comerciales (DPn=16). Los resultados revelan a esta especie de agave como una fuente potencial de extracción tanto de fructanos de cadena larga y corta.

La Norma Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, establece tres tipos de carbohidratos provenientes del agave en base a la proporción de fructanos según su longitud de cadena; los fructanos nativos de agave, los cuales pueden tener cualquier porcentaje de fructanos largos y cortos, siempre y cuando la suma de ambos sea por lo menos de 85%. Los FOS, que presentan por lo menos un 50% de fructanos con un DP menor a 10. Por último, los fructanos de alto peso molecular que deben tener mayoritariamente 75% de cadena larga, es decir de DP mayores a 10. Aproximadamente 43% y 58% de los fructanos de *Agave salmiana ssp. salmiana* y *ssp. crassispina* respectivamente, corresponden a la clasificación según la Norma Oficial a fructanos nativos de agave, 30% y 37% fue posible clasificarlos como FOS, finalmente el 11% y 18% corresponden a fructanos de alto peso molecular (**Tabla 6.1**).

TABLA 6. 1 CLASIFICACIÓN DE FRUCTANOS AGAVE SALMIANA SEGÚN LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-002-SAGARPA-2016. FAPM: FRUCTANOS DE ALTO PESO MOLECULAR, FN: FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE, FOS: FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.

<i>ssp. salmiana</i>						<i>ssp. crassispina</i>					
Mn g/mol	DPn	P	DP> 10 (%)	DP< 10 (%)	Clasificación	Mn g/mol	DPn	P	DP> 10 (%)	DP< 10 (%)	Clasificación
4398	27	1.14	88	11	FAPM	4568	28	1.41	64	36	FN
4842	30	1.30	72	28	FN	3933	24	1.54	55	45	FN
2078	13	2.26	29	73	FOS	2627	16	2.11	32	68	FOS
4096	25	1.16	88	12	FAPM	3060	19	1.71	48	54	FN
1293	8	2.66	10	90	FOS	1156	7	1.83	8	92	FOS
1192	7	1.83	9	91	FOS	3551	22	1.55	58	42	FN
2018	12	1.31	55	49	FN	4064	9	2.25	17	83	FOS
3152	19	1.86	45	55	FN	2142	13	1.90	43	58	FN
3286	20	1.70	45	55	FN	4065	25	1.18	84	16	FAPM
3043	19	1.43	62	38	FN	4348	27	1.15	86	17	FAPM
1646	10	1.59	24	76	FOS	3002	18	1.79	43	58	FN
1902	12	2.34	20	80	FOS	2862	18	2.01	36	65	FOS
4933	30	1.19	82	18	FAPM	4504	28	1.44	64	38	FN
3623	22	1.71	50	50	FN	4226	26	1.45	62	39	FB
2036	12	2.41	21	79	FOS	3175	19	1.74	45	55	FN
3981	24	1.53	57	44	FN	3633	22	1.66	50	50	FN
						1211	7	1.63	8	92	FOS

Los fructanos extraídos de las hojas de *Agave salmiana* tienen el potencial para ser explotadas como ingrediente en formulaciones alimentarias o como suplementos alimentarios. Sin embargo, se requiere explorar la viabilidad comercial y evaluar una posible producción de fructanos a mayor escala mediante una prueba piloto donde se analizará el rendimiento de producción, tiempo, recursos y se evaluará estrategias para la obtención de los carbohidratos, con la finalidad de obtener una proyección del desarrollo de una industria, donde sea viable el aprovechamiento de las hojas de los agaves mezcaleros del estado de Guanajuato para la producción y comercialización de fructanos de agave.

CAPÍTULO 7

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mancilla-Margalli NA & López MG (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(20):7832-7839.
2. Márquez-Aguirre AL, et al. (2013) Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice. *Food & function* 4(8):1237-1244.
3. Praznik W & Huber A (2005) De facto molecular weight distributions of glucans by size-exclusion chromatography combined with mass/molar-detection of fluorescence labeled terminal hemiacetals. *Journal of Chromatography B* 824(1):295-307.
4. Avila-Gaxiola J, et al. (2018) Treatments to improve obtention of reducing sugars from agave leaves powder. *Industrial Crops and Products* 112:577-583.
5. Franco-Robles E & López MG (2015) Implication of fructans in health: immunomodulatory and antioxidant mechanisms. *The Scientific World Journal* 2015.
6. Mueller M, et al. (2016) Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *Journal of functional Foods* 24:264-275.
7. Márquez-Aguirre A, et al. (2016) Fructans from Agave tequilana with a Lower Degree of Polymerization Prevent Weight Gain, Hyperglycemia and Liver Steatosis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(4):416-421.
8. Moreno-Vilet L, et al. (2014) In vitro assessment of agave fructans (Agave Salmiana) as prebiotics and immune system activators. *International journal of biological macromolecules* 63:181-187.
9. Roberfroid MB (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition* 137(11):2493S-2502S.
10. Vijn I & Smeekens S (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant physiology* 120(2):351-360.
11. Alvarado C, Camacho R, Cejas R, & Rodríguez J (2014) Profiling of commercial agave fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography. *Revista mexicana de ingeniería química* 13(2).
12. Moreno-Vilet L, Bostyn S, Flores-Montaña J-L, & Camacho-Ruiz R-M (2017) Size-exclusion chromatography (HP SEC) technique optimization by simplex method to estimate molecular weight distribution of agave fructans. *Food Chemistry*.
13. Benkeblia N (2013) Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* 1313(Supplement C):54-61.
14. Berek D (2010) Size exclusion chromatography – A blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers. *Journal of Separation Science* 33(3):315-335.
15. Montañez-Soto J, Venegas-González J, Vivar-Vera M, & Ramos-Ramírez E (2011) Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro* 23(3):199-206.
16. Gentry HS (2004) *Agaves of Continental North America* (University of Arizona Press).
17. Agaves RTMAISyBdl (2017) *Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México* (Guadalajara, Jalisco México).
18. Bautista-Justo M, García-Oropeza L, Salcedo-Hernández R, & Parra-Negrete L (2001) Azúcares en agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta universitaria* 11(1):33-38.
19. Castán MdRH (2014) *Manual del MEZCAL Guía Normativa para la elaboración, distribución y venta de bebida alcohólicas a base de Agave espadín* (Azul y Verde Biología Integral).

20. Robles NS, *et al.* (2012) Propuesta de una cosechadora-desmenuzadora de Agave tequilana Weber para la producción de bioetanol y revisión de los procedimientos existentes. *Acta Universitaria* 22(2):9-18.
21. Godoy A, Herrera T, & Ulloa M (2003) *Más allá del pulque y el tepache: las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México* (Unam).
22. Castro-Díaz A & Guerrero-Beltrán J (2013) El agave y sus productos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7(2):53-61.
23. Mellado-Mojica E & López-Pérez MG (2013) Análisis comparativo entre jarabe de agave azul (Agave tequilana Weber var. azul) y otros jarabes naturales. *Agrociencia* 47:233-244.
24. Verdugo Valdez A, *et al.* (2011) Yeast communities associated with artisanal mezcals fermentations from Agave Salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek* 100(4):497-506.
25. Garcia-Herrera E, Méndez-Gallegos S, & Talavera-Magana D (2010) El género Agave ssp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Special Ed* 5:109-129.
26. Ritsema T & Smeekens S (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):223-230.
27. Velázquez-Martínez JR, *et al.* (2014) Prebiotic potential of Agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules* 19(8):12660-12675.
28. Mellado-Mojica E & López MG (2012) Fructan metabolism in A. tequilana Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(47):11704-11713.
29. Wang N & Nobel PS (1998) Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species Agave deserti. *Plant physiology* 116(2):709-714.
30. Mellado-Mojica E & López MG (2012) Fructan Metabolism in A. tequilana Weber Blue Variety along Its Developmental Cycle in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(47):11704-11713.
31. Vijn I & Smeekens S (1999) Fructan: More than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology* 120(2):351-359.
32. Lopez MG, Mancilla-Margalli NA, & Mendoza-Diaz G (2003) Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27):7835-7840.
33. Quemener B, Thibault J-F, & Coussement P (1994) Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *LWT-Food Science and Technology* 27(2):125-132.
34. Waterhouse AL & Chatterton NJ (1993) Glossary of fructan terms. *Science and technology of fructans*:1-7.
35. Holscher HD, *et al.* (2015) Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *The Journal of Nutrition* 145(9):2025-2032.
36. Martínez del Campo G (1999) Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de Agave pulquero (Agave atrovirens). (B. Sc. Thesis. National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico).
37. Allsopp P, *et al.* (2013) An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22:38-44.
38. Holscher HD, *et al.* (2015) Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial—3. *The Journal of nutrition* 145(9):2025-2032.
39. Livingston DP & Henson CA (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116(1):403-408.
40. Arrizon J, Morel S, Gschaedler A, & Monsan P (2010) Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chemistry* 122(1):123-130.
41. Kelly G (2008) Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Alternative Medicine Review* 13(4).
42. Hellwege EM, Raap M, Gritscher D, Willmitzer L, & Heyer AG (1998) Differences in chain length distribution of inulin from Cynara scolymus and Helianthus tuberosus are reflected in

- a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS letters* 427(1):25-28.
43. Hellwege EM, Gritscher D, Willmitzer L, & Heyer AG (1997) Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *The Plant Journal* 12(5):1057-1065.
 44. Shiomi N (1989) Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* 134(2):151-155.
 45. Van den Ende W & Van Laere A (2002) Induction of 1-FEH in mature chicory roots appears to be related to low temperatures rather than to leaf damage. *The Scientific World Journal* 2:1750-1761.
 46. Nagaraj VJ, Riedl R, Boller T, Wiemken A, & Meyer AD (2001) Light and sugar regulation of the barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology* 158(12):1601-1607.
 47. Noël G, Tognetti JA, & Pontis HG (2001) Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* 213(4):640-646.
 48. Berek D (2010) Size exclusion chromatography—a blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers. *Journal of separation science* 33(3):315-335.
 49. Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* 125(6):1401-1412.
 50. Arrizon J, Hernández-Moedano A, Oner ET, & González-Avila M (2014) IN VITRO PREBIOTIC ACTIVITY OF FRUCTANS WITH DIFFERENT FRUCTOSYL LINKAGE FOR SYMBIOTICS ELABORATION. *International Journal of Probiotics & Prebiotics* 9(3):69-76.
 51. Gamboa RG, *et al.* (2018) In vitro evaluation of prebiotic activity, pathogen inhibition and enzymatic metabolism of intestinal bacteria in the presence of fructans extracted from agave: A comparison based on polymerization degree. *LWT* 92:380-387.
 52. Andrade AC, *et al.* (2017) Physiometabolic effects of Agave Salmiana fructans evaluated in Wistar rats. *International journal of biological macromolecules*.
 53. Michel-Cuello C, Gallegos Fonseca G, Maldonado Cervantes E, & Aguilar Rivera N (2015) EFFECT OF TEMPERATURE AND PH ENVIRONMENT ON THE HYDROLYSIS OF MAGUEY FRUCTANS TO OBTAIN FRUCTOSE SYRUP. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14(3).
 54. Gutiérrez-García MdJ, Laura DS-RA, Botello-Álvarez JEJ-I, Hugo N, & Bolaños JL (MEJORA DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE FRUCTANOS DE AGAVE EN POLVO.
 55. BAYRAM ÖA, BAYRAM M, & TEKİN AR (2008) WHEY POWDER AS A CARRIER IN SPRAY DRYING OF SUMAC CONCENTRATE. *Journal of Food Process Engineering* 31(1):105-119.
 56. López Hernández OD (2010) Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* 44:381-389.
 57. Gonzalez-Palomares S, Estarrón-Espinosa M, Gómez-Leyva JF, & Andrade-González I (2009) Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant foods for human nutrition* 64(1):62-67.
 58. Chávez-Rodríguez A, *et al.* (2016) Quality attributes and particles deposition of spray dried fructans of blue agave juice. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15(2).
 59. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31(3):426-428.
 60. Ávila Núñez R, Rivas Pérez B, Hernández Motzezak R, & Chirinos M (2012) Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias* 12(2).
 61. Kissinger P & Heineman WR (1996) *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded* (CRC press).
 62. Lee H & Coates G (2000) Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus juices by HPLC and a literature compilation.
 63. Cela R, CASAIS MDC, & LORENZO RA (2002) *Técnicas de separación en química analítica* (Síntesis).

64. Michel-Cuello C, Juárez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, & Pinos-Rodríguez JM (2008) Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal Agave (Agave Salmiana Otto ex Salm-Dick). *Journal of agricultural and food chemistry* 56(14):5753-5757.
65. Losso JN & Nakai S (1997) Molecular size of garlic fructooligosaccharides and fructopolysaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(11):4342-4346.
66. Wang J, Sporns P, & Low NH (1999) Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry* 47(4):1549-1557.
67. March GA, Eiros JM, & España V (2012) Impacto de la metodología MALDI-TOF en la identificación clínica de agentes infecciosos. *Electron J Biomed (revista electrónica)* 1:60-65.
68. Caprioli RM, Farmer TB, & Gile J (1997) Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* 69(23):4751-4760.
69. Beavis RC, Chait BT, & Fales H (1989) Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 3(12):432-435.
70. Evans M, Gallagher JA, Ratcliffe I, & Williams PA (2016) Determination of the degree of polymerisation of fructans from ryegrass and chicory using MALDI-TOF Mass Spectrometry and Gel Permeation Chromatography coupled to multiangle laser light scattering. *Food Hydrocolloids* 53:155-162.
71. Reed JD, Krueger CG, & Vestling MM (2005) MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry* 66(18):2248-2263.
72. Small H (2013) *Ion chromatography* (Springer Science & Business Media).
73. Fujishima M, *et al.* (2005) Purification and characterization of a fructosyltransferase from onion bulbs and its key role in the synthesis of fructo-oligosaccharides in vivo. *New phytologist* 165(2):513-524.
74. Coussement PA (1999) Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *The Journal of nutrition* 129(7):1412S-1417S.
75. Hogarth A, Hunter DE, Jacobs WA, Garleb KA, & Wolf BW (2000) Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(11):5326-5330.
76. Weiss J (2016) *Handbook of Ion Chromatography, 3 Volume Set* (John Wiley & Sons).
77. Christian GD (1981) *Química analítica* (Limusa).
78. Ortiz-Basurto RI, *et al.* (2008) Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (Agave mapisaga) throughout the harvest period. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(10):3682-3687.
79. Madrigal L & Sangronis E (2007) La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 57(4):387-396.
80. Crispín-Isidro G, Lobato-Calleros C, Espinosa-Andrews H, Alvarez-Ramirez J, & Vernon-Carter E (2015) Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT-Food Science and Technology* 62(1):438-444.
81. Quattrocchi OA, de Andrizzi SIA, & Laba RF (1992) *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica* (Artes Gráficas Farro).
82. Moreno-Vilet L, Bostyn S, Flores-Montano J-L, & Camacho-Ruiz R-M (2017) Size-exclusion chromatography (HP SEC) technique optimization by simplex method to estimate molecular weight distribution of agave fructans. *Food chemistry* 237:833-840.
83. Gaborieau M & Castignolles P (2011) Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and bioanalytical chemistry* 399(4):1413-1423.
84. Eksteen R & Pardue KJ (2003) Modified silica-based packing materials for size exclusion chromatography. *Handbook Of Size Exclusion Chromatography And Related Techniques: Revised And Expanded* 91:44.
85. Neue UD (1999) Waters columns for size exclusion chromatography. *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, (Elsevier), pp 325-348.

86. Harris DC (2007) Análisis químico cuantitativo (Séptima edición). (WH Freeman and Company, Nueva York, EE.UU.).
87. López Sánchez M (2005) Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas.
88. Gutiérrez Bouzán MC, Burdó Expósito A, & Cegarra Sánchez J (2009) La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial* (135):33-40.
89. Neue UD (1999) 11 - Waters Columns for Size Exclusion Chromatography. *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, ed Wu C-s (Academic Press, San Diego), pp 325-348.
90. Wu C-s (1999) *Column handbook for size exclusion chromatography* (Academic Press).
91. Bouchard J, Chornet E, & Overend RP (1988) High-performance liquid chromatographic monitoring of carbohydrate fractions in partially hydrolyzed corn starch. *Journal of agricultural and food chemistry* 36(6):1188-1192.
92. Faraldos M & Goberna C (2011) *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
93. Roberfroid M (2007) Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition* 137(3):830S-837S.
94. Garcia-Aguirre M, *et al.* (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.
95. Arriaga F & Celeste I (Obtención de un producto de panificación enriquecido con fructanos de agave angustifolia haw y su evaluación en ratones en crecimiento.
96. Cherbut C (2002) Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition* 87(S2):S159-S162.
97. Furlán LTR, Padilla AP, & Campderrós ME (2014) Development of reduced fat minced meats using inulin and bovine plasma proteins as fat replacers. *Meat Science* 96(2):762-768.
98. Narváez-Zapata J & Sánchez-Teyer L (2010) Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3(3):185-191.
99. Reynoso-Ponce H, Grajales-Lagunes A, Castillo-Andrade A, González-García R, & Ruiz-Cabrera MA (2017) Integration of nanofiltration and spray drying processes for enhancing the purity of powdered fructans from Agave Salmiana juice. *Powder Technology* 322:96-105.
100. LEDESMA HORTA JC & VILLARREAL QUINTANILLA JÁDA (2014) Distribución del Agave Mezcalero (Agave ssp.) y Áreas con Aptitud Potencial para su Desarrollo en San Felipe, Guanajuato.
101. Negrete LAP, del Villar Quiñones P, & Rodríguez AP (2010) Extracción de fibras de agave para elaborar papel y artesanías. *Acta universitaria* 20(4):77-83.
102. Vera Guzmán AM, Santiago García PA, & López MG (2009) Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum. *Revista fitotecnia mexicana* 32:273-279.
103. Iñiguez-Covarrubias G, Díaz-Teres R, Sanjuan-Dueñas R, Anzaldo-Hernández J, & Rowell RM (2001) Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves. *Bioresource Technology* 77(2):101-108.
104. Close D, Rodriguez M, Hu R, & Yang X (2017) Disposition and bioavailability of inulin and free sugar in untreated and dilute acid pretreated Agave tequilana leaves. *Biomass and Bioenergy* 106:176-181.
105. Contreras-Hernández MG, *et al.* (2018) Effect of ultrasound pre-treatment on the physicochemical composition of Agave durangensis leaves and potential enzyme production. *Bioresource Technology* 249:439-446.
106. López MG & Urías-Silvas JE (2007) Agave fructans as prebiotics. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research* 37:1-14.
107. Praznik W, Löppert R, Cruz Rubio JM, Zangger K, & Huber A (2013) Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of Agave tequilana Weber, var. azul. *Carbohydrate Research* 381:64-73.

108. Cuzzuol GRF, Carvalho MAM, Zaidan LBP, & Furlani PR (2005) Nutrient solutions for plant growth and fructan production in *Vernonia herbacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(9):911-917.
109. Wilson RG, Smith JA, & Yonts CD (2004) Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting, and harvest date. *Crop Science* 44(3):748-752.
110. Iñiguez-Covarrubias G, Diaz-Teres R, Sanjuan-Deñias R, Anzaldo-Hernández J, & Rowell RM (2001) Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves. *Bioresource Technology* 77(2):101-108.
111. González-Llanes MD, *et al.* (2018) Fermentable sugars production by enzymatic processing of agave leaf juice. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 96(3):639-650.
112. Michel-Cuello C, Juárez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, & Pinos-Rodríguez JM (2008) Quantitative Characterization of Nonstructural Carbohydrates of Mezcal Agave (*Agave Salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(14):5753-5757.
113. Morales OM (1997) Caracterización general del proceso de producción de la Tequilera Corralejo, SA de CV, ubicada en el municipio de Pénjamo, Gto.
114. Bautista-Justo M, García-Oropeza L, Corona JB, & Parra-Negrete L (2001) El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria* 11(2):26-34.
115. í vila Núñez R, Pérez BR, Motzezak RH, & Chirinos M (2012) Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias* 12(2).
116. Fabela-Morón MF, García-Luna IN, Alamilla-Beltrán L, & Arenas-Ocampo M (CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE AGAVE EN POLVO OBTENIDO MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN.
117. Van De Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, & Verstraete W (2007) Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology* 102(2):452-460.
118. Biedrzycka E & Bielecka M (2004) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology* 15(3):170-175.
119. Santiago-García PA, Mellado-Mojica E, León-Martínez FM, & López MG (2017) Evaluation of Agave angustifolia fructans as fat replacer in the cookies manufacture. *LWT* 77:100-109.

AGARED, O. (2018). *La red temática mexicana aprovechamiento integral sustentable y biotecnología de los agaves*. Obtenido de <http://www.agared.org/modulos-que-integran-la-red>

Agaves, R. T. (2017). *Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México*. Guadalajara, Jalisco México.

Castán, M. d. (2014). *Manual del MEZCAL Guía Normativa para la elaboracion, distribución y venta de bebidad alcoholicas a base de Agave espadín*. Azul y Verde Biología Integral.

Diario Oficial de la Federación. (12 de diciembre de 2016). *NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave*. Obtenido de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5463926&fecha=02/12/2016

GOB, I. (s.f.). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Obtenido de Estado de Guanajuato: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM11guanajuato/index.html>

GOB, S. G. (2016). *SAGARPA GUANAJUATO GOB*. Obtenido de <https://www.gob.mx/sagarpa/guanajuato>

Guanajuato, G. d. (2015). *Denominación de Origen Mezcal*. Obtenido de <https://www.guanajuato.gob.mx/denominacion-mezcal-guanajuato.php>

Guanajuato, S. d. (2018). *SECTUR*. Obtenido de <https://sectur.guanajuato.gob.mx/>

Harris, D. C. (2007). Análisis químico cuantitativo (Séptima edición). Nueva York, EE.UU.: WH Freeman and Company.

Herrera Soberanís, D. E. (2016). DESARROLLO DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA PARA DETERMINAR DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE FRUCTANOS DE AGAVE POR. Acapulco, Guerrero: TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO.

Secretaría de Economía, G. d. (14 de septiembre de 2015). *Denominaciones de Origen #OrgulloDeMéxico*. Obtenido de <https://www.gob.mx/se/articulos/denominaciones-de-origen-orgullodemexico>

Waters. (Marzo de 2015). *Care and Use Manual Ultrahydrogel Columns* . Obtenido de <https://www.manualshelf.com/manual/waters/ultrahydrogel-columns/manual-english.html>