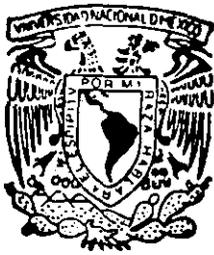


26
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DETERMINACION, CUANTIFICACION E
HIDROLISIS DE INULINA EN EL AGUAMIEL DE
AGAVE PULQUERO, *Agave atrovirens*.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIA GABRIELA MARTINEZ DEL CAMPO PADILLA



MEXICO, D. F.



1999

EXAMENADO Y APROBADO
27/1600

27 16 00

1

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Eduardo Bárzana García _____
VOCAL: Prof. Agustín López-Munguía Canales _____
SECRETARIO: Prof. Alma Cruz Guerrero _____
PRIMER SUPLENTE: Prof. Hugo Carreño Ortiz _____
SEGUNDO SUPLENTE: Prof. Amelia Farres González Saravia _____

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

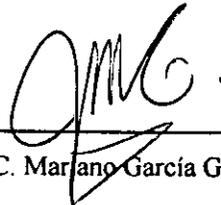
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología
Enzimática. Planta Piloto 2

ASESOR:



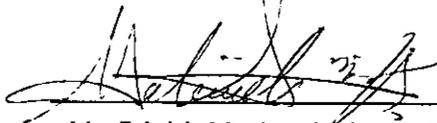
M. en C. Alma E. Cruz Guerrero

SUPERVISOR TÉCNICO:



M. en C. Mariano García Garibay

SUSTENTANTE:



Ma. Gabriela Martínez del Campo Padilla.

Agradecimiento especial a:
la M. en C. Lorena Gómez Ruíz
*Por los valiosos conocimientos y asesoría
aportados para la realización de esta tesis.*

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta donde estoy y por estar conmigo durante toda mi vida.

A la Sra. Gloria Padilla, mi madre, por haberme permitido venir a este mundo y por todo el amor, apoyo, comprensión y aliento que de ella he recibido. Madre, esta tesis es uno de los triunfos de tu vida, es una de las recompensas por todas las batallas que has librado en mi nombre.

Gracias A. S. H.[†] por todo el apoyo y los consejos que me diste. Gracias por haber desempeñado el papel de padre y amigo. Que este agradecimiento te encuentre en donde quiera que estés.

A Cristóbal por estar conmigo durante toda la carrera y por todo el apoyo y amor que me has brindado. Gracias por haber sido una de los soportes durante las etapas más débiles de mi vida.

Gracias a mi familia por estar siempre conmigo. Que esta tesis sea un logro para todos nosotros.

Gracias a todos los amigos que han estado conmigo a lo largo de los años: Cristóbal Rivero, Nicolás Hernández, Patricia Guerrero, Edith Osnaya, Virginia Mendoza, Gloria Sánchez, Gabriela Becerril, Claudia Robles, Jesús Ogaz, Manuel Villa, Rosalba Gómez, Bernardo Arrieta, Alfredo Lugo, Eiko Ma. Tlalic Pérez, Felipe Ríos, Luis Cadena, Ismael Reyes, Graciela Díaz y Alejandro Mora.

A "Tato"[†], por haber estado conmigo en las noches de desvelo y cansancio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química, por haberme acogido en su comunidad para alcanzar una de las metas más importantes de mi vida. Gracias a todos los profesores por los conocimientos que me transmitieron.

A la M. en C. Alma E. Cruz Guerrero por su ayuda, amistad y paciencia. Gracias Alma por haber estado siempre dispuesta a ayudar. Ojalá que la amistad no termine.

Al M. en C. Mariano García Garibay y a la M. en C. Lorena Gómez Ruíz por su amistad y asesoría. Gracias por haberme brindado la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo.

Gracias también a todos los integrantes de la Planta Piloto 2, Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, por su amistad y por el apoyo para la realización de esta tesis. En especial a: Judith Jiménez, Julieta Domínguez, Patricia Rivera, Octavio Dublán, Baciliza Quintero, Cristina Cruz y José M. Barreiro.

INDICE.

	Página
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	10
3. GENERALIDADES	11
3.1. El maguey de pulque	11
3.1.1. Descripción	11
3.1.2. Distribución geográfica	12
3.1.3. Cultivo	12
3.1.4. Obtención del aguamiel	13
3.1.5. Descripción del aguamiel	15
3.2. Edulcorantes	17
3.2.1. Descripción general	17
3.2.2. Glucosa	17
3.2.3. Fructosa	18
3.2.3.1. Descripción	18
3.2.3.2. Propiedades y usos	19
3.2.4. Sacarosa	20
3.3. Inulina	20
3.4. Producción de jarabes de fructosa	22
3.4.1. Producción de jarabes de fructosa a partir de almidón de maíz	22
3.4.1.1. Producción de jarabes de glucosa	23
3.4.1.2. Producción de jarabes de fructosa	24
3.4.2. Producción de jarabes de fructosa a partir de inulina de alcachofa de Jerusalem	28
3.4.2.1. Extracción de los polifruktanos	28
3.4.2.2. Hidrólisis del licor	29
3.4.2.3. Remoción de impurezas	30
3.4.2.4. Concentración del jarabe	31
3.5. Enzimas	32
3.5.1. Inulinasa	32
3.5.1.1. Características de la inulinasa	33
3.5.2. Invertasa	35

	Página
4. METODOLOGÍA	36
4.1. Materia prima	36
4.1.1. Recolección y preparación del aguamiel	36
4.2. Caracterización del aguamiel	37
4.2.1. Cuantificación de azúcares	38
4.2.1.1. Cuantificación de azúcares totales. Método de fenol-sulfúrico	39
4.2.1.2. Cuantificación de azúcares reductores directos. Método de Somogyi-Nelson	40
4.2.1.3. Cuantificación de fructosa total. Método de cisteína-carbazol	41
4.2.1.4. Cuantificación de glucosa libre Método enzimático colorimétrico GOD-POD.	42
4.2.1.5. Determinación de azúcares no libres	44
4.2.1.6. Hidrólisis con invertasa	44
4.2.1.7. Cuantificación de inulina Hidrólisis con inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	46
4.2.2. Cromatografía en capa fina	49
4.3. Obtención de polisacáridos de <i>Agave tequilana</i>	51
4.3.1. Obtención de los polisacáridos	51
4.3.1.1. Obtención del jugo crudo de agave	52
4.3.1.2. Clarificación del jugo crudo de agave	52
4.3.1.3. Precipitación de los polisacáridos	54
4.3.2. Caracterización de los precipitados	54
4.3.3. Hidrólisis con invertasa	55
4.3.4. Cuantificación de inulina Hidrólisis con inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	58
4.4. Tratamiento estadístico	59

	Página
5. RESULTADOS Y DISCUSION	60
5.1. Caracterización del aguamiel	60
5.1.1. Cuantificación de azúcares iniciales	60
5.1.2. Hidrólisis con invertasa	61
5.1.3. Cuantificación de inulina	63
5.1.4. Composición de los aguamieles hidrolizados	65
5.1.5. Cromatografía de los aguamieles	67
5.2. Polisacáridos de <i>Agave tequilana</i>	71
5.2.1. Cuantificación de azúcares iniciales	72
5.2.2. Hidrólisis con invertasa	74
5.2.3. Cuantificación de inulina	76
5.2.4. Composición de los precipitados hidrolizados	78
5.2.5. Cromatografía de los precipitados	80
5.4. Discusión final	83
6. CONCLUSIONES.	85
7. RECOMENDACIONES	86
8. BIBLIOGRAFÍA	87

1. INTRODUCCION.

El agave pulquero (*Agave atrovirens*) es una planta perteneciente a la familia de las Amarilidaceas las cuales son abundantes en nuestro país; de dicho agave se extrae el aguamiel para la producción de pulque.

Se han hecho estudios poco precisos que reportan la presencia de inulina (polimero de fructosa con una unidad terminal de glucosa, que contiene más del 90% de fructosa) en los agaves (en particular el *Agave tequilana*) como el polisacárido de reserva más abundante, la cual es una fuente potencial para la obtención de jarabes de alta fructosa, sin embargo, no hay reportes acerca de la presencia de inulina en el aguamiel del agave pulquero (*Agave atrovirens*).

Los procesos actuales de obtención de fructosa a partir de almidón de maíz son muy costosos porque involucran el uso de enzimas de alto valor agregado para la hidrólisis del almidón en glucosa y la isomerización de ésta a fructosa, con un rendimiento del 50% de conversión. Se han reportado pasos adicionales para aumentar esta concentración, como por ejemplo el uso de cromatografía de intercambio iónico que produce cerca del 90% de fructosa, pero eleva demasiado los costos de producción. Una alternativa son los jarabes de fructosa a partir de agave, sin embargo la tecnología para su producción aún no se ha desarrollado al máximo.

El objetivo de este trabajo fue determinar si en el aguamiel, que es el jugo proveniente de las pencas del agave pulquero, se encuentra la inulina en alta proporción, y evaluar su potencial como fuente de ésta para la obtención de fructosa. La cuantificación de inulina se realizó por métodos enzimáticos (por hidrólisis enzimática, que es más específica que la hidrólisis ácida, con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*) y químicos.

El aguamiel es una materia prima de bajo costo, y dada la amplia distribución del agave pulquero en nuestro país, si se llega a determinar que tiene inulina en alta proporción, se convierte en una fuente potencial de fructosa para la elaboración de jarabes con alto contenido de ésta a un menor costo que los elaborados a partir de almidón de maíz.

2. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la presencia de inulina en el aguamiel de agave pulquero (*Agave atrovirens*) y cuantificarla para establecer si es el polisacárido más abundante.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar cualitativamente la presencia de inulina en el aguamiel de agave pulquero (*Agave atrovirens*) por cromatografía en capa fina.

- Determinar cuantitativamente la inulina presente por hidrólisis enzimática (con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278) y por métodos químicos.

- Determinar la relación final de glucosa-fructosa en el aguamiel hidrolizado y revisar el perfil de azúcares mediante cromatografía en capa fina.

- Determinar la presencia de inulina en los tejidos del corazón de *Agave tequilana* como polisacárido de reserva.

- Comparar los resultados obtenidos de aguamiel de *Agave atrovirens* y corazón de *Agave tequilana*.

3. GENERALIDADES.

3.1. EL MAGUEY DE PULQUE

3.1.1. DESCRIPCION.

Entre las variedades de agaves productores de aguamiel se destaca el maguey manso, cuyo nombre científico es *Agave atrovirens Karw* y tiene la siguiente clasificación botánica: reino vegetal, subreino fanerógamas, tipo angiospermas, clase monocotiledóneas, familia amarilidáceas, género agave, especie atrovirens (Barquet-Fuentes, 1976; Loyola, 1956). Este es el típico maguey de pulque, las otras variedades que también producen aguamiel para pulque son: *Agave salmiana Otto ex Salm*, *Agave mapisaga*, *Agave ferox*, *Agave salmiana*, *Agave hookeri*, *Agave americana L.* (Scott, 1982).

La raíz del agave es fibrosa, gruesa y con numerosas raicecillas; mide aproximadamente 40 cm de diámetro y 50 cm de alto. El tallo es muy corto y grueso; de las mismas proporciones que la raíz. Las hojas o pencas, cuyo número varía de 30 a 50, son de color verde oscuro, son muy gruesas y anchas cerca de la base, se distribuyen en torno del tallo formando una roseta; su longitud varía de 1 a 2.5 m y su anchura es de unos 30 cm, están cubiertas por una película transparente y apergaminada que evita que el agua se evapore de la planta, sus bordes están provistos de gruesas espinas triangulares y rematan en una espina morado oscuro de 10 a 20 cm de largo (Rodríguez-Beauregard, 1950; Loyola, 1956).

El maguey florece sólo una vez y muere poco después. La edad en la que se inicia la floración depende de factores tales como la especie o variedad, las características del terreno, el clima y los cuidados agrícolas que se le hayan proporcionado. En los magueyes cultivados la floración se presenta entre los 8 y los 12 años, pero en los silvestres es más tardía. Al llegar la floración, la planta emite en su parte central (*meyolote*) un tallo o pedúnculo floral llamado *quiote*, que se desarrolla en poco tiempo (de 5 a 6 semanas) y cuya altura llega a ser superior a 5 metros; este tallo remata en un enorme racimo compuesto en forma de corimbo cuyas ramificaciones tienen numerosos grupos de flores erguidas, de color verde amarillento (Rodríguez-Beauregard, 1950; Loyola, 1956).

3.1.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

El maguey manso (*Agave atrovirens*) crece en regiones poco lluviosas, con temperaturas templadas a frías, suelos resecos y duros, de composición arcillosa o arcillo-arenosa (tepetate). Los terrenos de cultivo son frecuentemente inclinados y se hallan en los flancos de los cerros y lomas lo que dificulta su riego (Loyola, 1956).

La zona mas amplia en la que se cultiva se sitúa, en términos generales, desde el extremo meridional del Distrito Federal y los puntos que quedan a la misma altura en los estados de México y Puebla (el Eje Volcánico), por el Sur, hasta las llanuras de San Luis Potosí y Saltillo, en la Mesa del Norte; y desde Tehuacán, Perote y Tezuitlán por el Oriente; hasta Zitácuaro y Morelia por el Occidente. Naturalmente el cultivo de este agave es menos frecuente a medida que se avanza hacia los extremos de esta zona y su densidad es variable aún dentro de la misma altiplanicie central del país (Barquet-Fuentes, 1976; Loyola, 1956; Rodríguez-Beauregard, 1950; Soto-Portilla, 1960).

En la actualidad el cultivo de este agave ha decrecido en la zona por la poca importancia comercial que tiene el pulque, por la proliferación de otros cultivos más redituables y la intensa expansión de las ciudades.

3.1.3. CULTIVO

La propagación del maguey se puede hacer mediante semillas, bulbillos o por hijuelos o *mecuates*, que nacen en la base de la planta. Las semillas no son útiles porque se obtienen plantas de apariencia defectuosa y de muy lento desarrollo, que tardan hasta 25 años en llegar a la madurez, además los botánicos afirman que la mayor parte de las semillas son estériles (Loyola, 1956; Rodríguez-Beauregard, 1950).

La propagación se hace mediante los hijuelos, que permanecen junto a la planta madre durante 2 a 4 años o hasta que alcanzan aproximadamente 1 m de altura; en este momento el agricultor los arranca, limpia, desbarba y poda, quitándoles un buen número de hojas de la base, y los deja en el campo a la intemperie durante algunas semanas para que cicatricen las lesiones y para que no se pudran las raíces.

En este punto se procede a su plantación, se dejan crecer y madurar antes de realizar las operaciones para la obtención del aguamiel. Por lo general el maguey alcanza las condiciones apropiadas para la obtención del aguamiel en un período que va de 8 a 12 años, y en ocasiones hasta 20, dependiendo de las condiciones de cultivo, el clima, el suelo y la variedad del maguey (Loyola, 1956).

3.1.4. OBTENCION DEL AGUAMIEL.

Para la obtención del aguamiel es necesario someter al maguey a una serie de operaciones antes de que inicie la floración. La primera de estas operaciones es la *capazón* o *castración*, que tiene por objeto evitar que el maguey florezca y consuma los jugos que almacena en sus hojas durante esta fase de desarrollo.

Aproximadamente a los 10 años, la configuración del maguey indica que la floración está próxima: el *cogollo* (hojas de la parte central de la planta) se adelgaza, a la vez que sus hojas exteriores pierden las espinas de sus bordes en su parte inferior y forman una línea continua llamada "hilo"; las pencas exteriores se ven más cercanas al meyolote y sus extremos se doblan ligeramente hacia el centro de la planta; al mismo tiempo las púas terminales se hacen más agudas y toman una coloración más oscura, especialmente la punta del cogollo. Si el maguey se castra cuando presenta estas características se dice que se castró "al hilo"; cuando la castración se anticipa, se dice que se castró "gordo".

La castración se lleva a cabo de la manera siguiente: primero se fija una vía de acceso al centro de la planta, que es el lado por el que se entrecruzan menos las pencas, se rebanan las orillas de las pencas exteriores para poder inclinarlas hacia los lados, a continuación se deshoja el cogollo con las manos jalando las pencas exteriores para llegar al cono de las hojas interiores. Luego se cortan algunas de las pencas que rodean al meyolote para facilitar la extracción completa del tallo floral (Loyola, 1956; Rodríguez-Beauregard, 1950).

Concluida la *capazón* el maguey se deja *orear* o *añejar* con el propósito de que el tallo de la planta o *mezontete* y las hojas alcancen su máximo desarrollo, también para que el aguamiel alcance el máximo contenido de azúcares. La duración del periodo de añejamiento varía de seis meses a un año, dependiendo de las características del maguey, el suelo, el clima y de si se castró a tiempo o prematuramente.

Cuando el maguey llega al estado de añejamiento conveniente, que los agricultores reconocen por la aparición de ciertas manchas en las hojas de la planta, se procede a la *picazón*, operación que tiene por objeto abrir en el tallo del maguey o mezontete la cavidad en la que se habrá de acumular el aguamiel, y producir en la planta la lesión necesaria para que el aguamiel fluya. Para esto, primero se cortan algunas pencas del cogollo o cercanas a él, luego se separa la costra o cicatriz que dejó la *capazón*, y finalmente se pica con una barreta la parte descubierta del tallo para preparar la apertura de la *taza* o *cajete*. Utilizando un raspador (instrumento metálico en forma de cuchara con los bordes afilados), se da forma a esta cavidad, raspando la masa de tejidos blandos removida por la *capazón*, se deja la raspadura en el interior y se cubre la entrada con pedazos de penca, para evitar la entrada de agua de lluvia y de insectos. Terminada la *picazón* se deja *podrir* el maguey por un período de 4 a 10 días, dependiendo de la estación y los cambios de temperatura.

Después de este período se procede a la *raspa*, operación que inicia la producción del aguamiel. Se limpia la boca del cajete, se extrae la raspadura que quedó dentro de él al efectuarse la *picazón*, se raspan capas mas o menos finas y uniformes en las paredes de la cavidad para abrir las bocas de los vasos por donde el aguamiel fluye. Después de uno o dos días de hecho lo anterior, el maguey empieza a soltar el aguamiel (Loyola, 1956, Soto-Portilla, 1960). En la figura 3.1.4.1. se muestra un diagrama de la extracción del aguamiel.

La producción de aguamiel es reducida durante los primeros días, pero va en aumento hasta alcanzar el máximo aproximadamente dos o tres semanas después de haberse iniciado la *raspa*, y se mantiene constante durante un mes mas o menos, para declinar después en forma paulatina. El período que permanece en producción es de 3 a 6 meses (García-Garibay y López-Munguía, 1993; Rodríguez-Beauregard, 1950).

La recolección del aguamiel se realiza diariamente por la mañana y por la tarde. Algunas veces se recoge también al mediodía, durante el verano, para evitar que las lluvias echen a perder el aguamiel. Cada vez que se recoge el aguamiel se efectúa la *raspa* para mantener abiertos los vasos de salida del líquido.

La cantidad de aguamiel que produce un maguey depende del tamaño del mismo, lo cual es consecuencia de la calidad del suelo, de los cuidados que se le dieron y de la especie o variedad; de la forma en que el *tlachiquero* (persona que efectúa la *raspa* y extrae el aguamiel) efectúa la *raspa*, ya que si se hacen cortes mas gruesos de lo conveniente, la planta se resiente disminuyendo la cantidad de aguamiel que produce; y de los factores climáticos, los cambios de temperatura, las

heladas, el granizo, etc., afectan a la planta de tal modo que disminuye su producción de un día para otro. En el verano, la planta desprende una mayor cantidad de aguamiel, ya que la temperatura templada y la humedad propias de la estación ejercen una acción benéfica. La cantidad de aguamiel que produce un maguey en un día es de 1 a 2 litros en promedio.

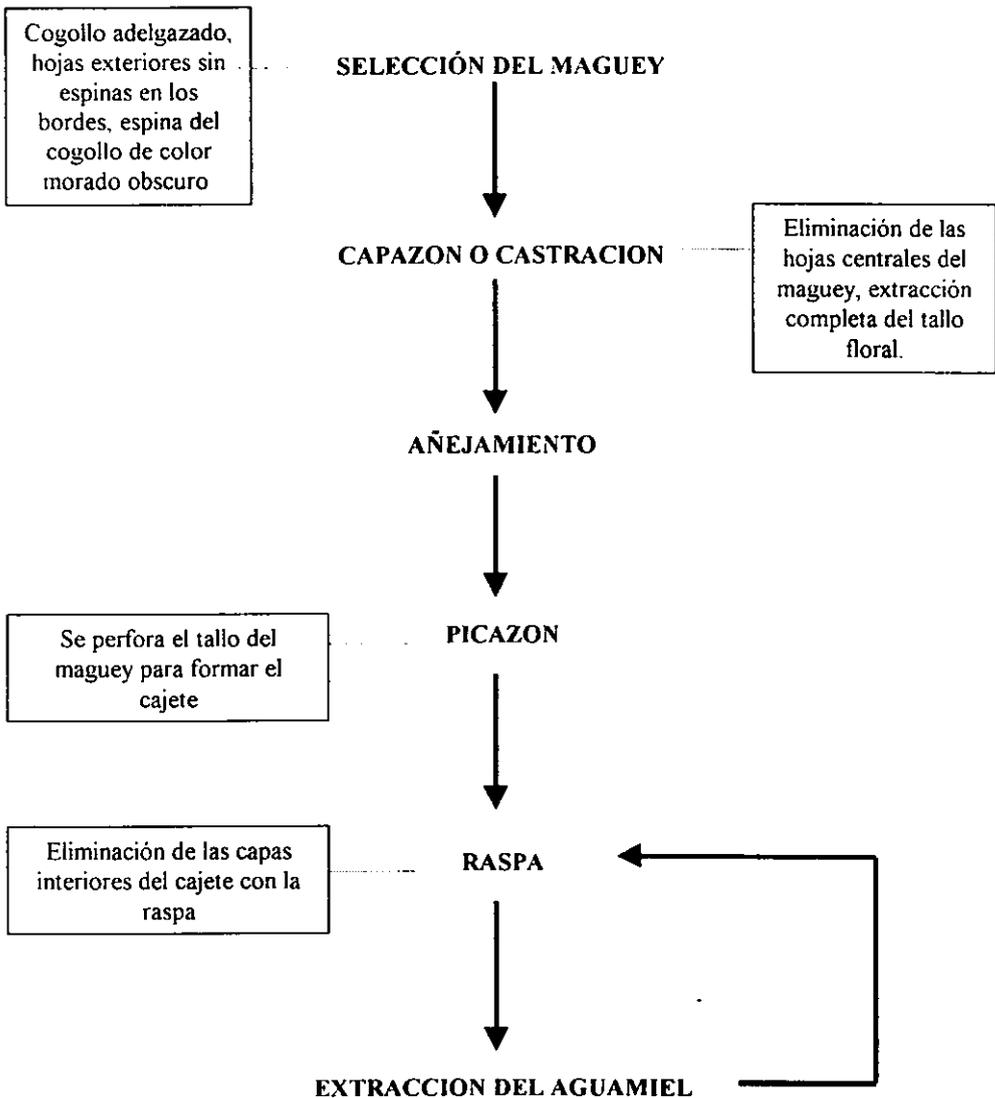
El procedimiento para efectuar la recolección del aguamiel es rudimentario y con pocos cuidados higiénicos. Como pipeta de succión se usa el *acocote*, que es una especie de calabaza alargada, perforada en sus dos extremos, a la que se adapta frecuentemente una boquilla en forma de cuerno en la perforación mas estrecha. Este extremo se introduce en el aguamiel acumulado en el cajete y por la otra el tlachiquero succiona con la boca para hacer vacío, provocando así la ascensión del líquido. Para evitar que el aguamiel se derrame al levantar el acocote, el tlachiquero tapa con un dedo el orificio inferior y así lo lleva al recipiente donde transporta el aguamiel. En tales operaciones es fácil advertir las diversas formas en que el tlachiquero establece contacto directo con el aguamiel y que pueden provocar la contaminación. En ciertos lugares se empleaban bombas de 2 kg de peso que tienen capacidad para 8 litros de aguamiel y que son más higiénicas, y que por desgracia en la actualidad ya no se utilizan (Loyola, 1956; Rodríguez-Beauregard, 1950).

3.1.5. DESCRIPCIÓN DEL AGUAMIEL.

El aguamiel que proviene de magueyes mansos, es un líquido azucarado, incoloro, transparente, con cierto olor herbáceo y sabor dulce agradable. Los aguamieles producidos por agaves de especies más corrientes y las que se cosechan en terrenos húmedos de clima templado, son opalinos y blanquecinos, mucilaginosos y en ellos el sabor dulce es menor.

Los componentes más comunes del aguamiel son: agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas, proteínas, minerales y vitaminas (Loyola, 1956; Cravioto y col., 1951), aunque también se han detectado otros azúcares tales como xilosa, galactosa y arabinosa, en una proporción mucho menor que la glucosa y la fructosa (Aguilar, 1956). La proporción en la que aparecen estos componentes varía de acuerdo con la clase, condiciones de cultivo y otras características del maguey. En lo que se refiere a sacarosa, el aguamiel más rico es el que proviene de magueyes finos, cultivados en terrenos secos, de clima frío, castrados al hilo y explotados después de seis meses de efectuada la castración (Loyola, 1956).

FIGURA 3.1.4.1. DIAGRAMA DE OBTENCION DEL AGUAMIEL.



3.2. EDULCORANTES.

3.2.1. DESCRIPCION GENERAL.

Los azúcares representan la forma más común y conocida de los edulcorantes ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son también las unidades de que están constituidos carbohidratos más complejos (polisacáridos) como almidón, celulosa, pectina, glucógeno, inulina, etc. Todos los carbohidratos deben ser desdoblados hasta azúcares simples (monosacáridos) para poder ser asimilados, siendo la glucosa y la fructosa los más comunes (López-Munguía, 1993).

La característica de mayor importancia industrial de un edulcorante es su poder de endulzamiento, esto se muestra en la tabla 3.2.1.1.

TABLA 3.2.1.1. PODER EDULCORANTE DE ALGUNOS AZUCARES.

Azúcar	Poder Edulcorante **	Jarabes	Poder Edulcorante **
Fructosa	1.5	Fructosados 55 % *	1.0
Glucosa	0.8	Fructosados 90 % *	1.5
Lactosa	0.4	Maltosados con: *	
Maltosa	0.4	45 - 60 %	0.4
		70 - 85 %	0.6

Fuente: López-Munguía, 1993.

* Los porcentajes indican el contenido de fructosa o maltosa en el jarabe

** Respecto a la sacarosa a la que se le asigna un valor de 1.0 (López-Munguía, 1993)

3.2.2. GLUCOSA

La glucosa o dextrosa es la principal forma a la que otros azúcares son transformados en el cuerpo. Está presente en muchas frutas y es la unidad base del almidón, glucógeno y celulosa. Se obtiene a partir de la hidrólisis ácida o enzimática del almidón de maíz y como parte del azúcar invertido.

En estado sólido es poco higroscópica y cristaliza a altas concentraciones. Los jarabes de glucosa son higroscópicos y la tendencia a absorber agua se incrementa con el aumento en la concentración de fructosa.

3.2.3. FRUCTOSA.

3.2.3.1. DESCRIPCION.

La fructosa es una cetohehexosa. Es uno de los azúcares naturales más comunes. Es llamado también "azúcar de frutas" o "levulosa". La fructosa libre se encuentra en casi todas las frutas y bayas, azúcar, miel y en la mayoría de los vegetales. (López-Munguía, 1993; Salminen y Hallikainen, 1990).

Es uno de los azúcares naturales más dulces que se conocen. Es casi 1.5 veces más dulce que la sacarosa en la misma base de peso (López-Munguía, 1993; Vandamme y Derycke, 1983; Salminen y Hallikainen, 1990).

Se conocen cinco formas isoméricas, intercambiables por mutarotación. La distribución porcentual a 20 °C de estos isómeros es como sigue:

TABLA 3.2.3.1.1. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LOS ISOMEROS DE FRUCTOSA EN SOLUCION A 20 °C.

α - fructo furanosa	0%
β - fructo furanosa	28 - 31.6 %
α - fructo piranosa	4 %
β - fructo piranosa	68.4 - 76 %
cadena abierta	0 %

La forma fructo-furanosa es la más dulce de todas, la dulzura se incrementa con la disminución de la temperatura, mientras que un incremento en la temperatura disminuye el porcentaje de este isómero, disminuyendo la dulzura; por ello la fructosa es de especial interés para los refrescos fríos (Vandamme y Derycke, 1983).

La fructosa se obtiene a partir de la sacarosa como parte del azúcar invertido, de la glucosa por una isomerización catalizada por álcali y actualmente por isomerización enzimática (Tombs, 1991; Gerhartz, 1990; Vandamme y Derycke, 1983). Puede ser obtenida también a partir de inulina, un polímero de fructosa que es el carbohidrato de reserva de algunas plantas (Tombs, 1991; Vandamme y Derycke, 1983; Tsang y GrootWassink, 1988)

3.2.3.2. PROPIEDADES Y USOS

A diferencia de la sacarosa y la glucosa, la fructosa es absorbida más lentamente y no estimula la secreción de insulina *per se*. No incrementa los triglicéridos en plasma en individuos normales. De ahí que la fructosa haya sido recomendada como endulzante para los diabéticos y actualmente está incluida en las recomendaciones dietéticas para éstos en muchos países.

Resultados de ensayos clínicos dentales con fructosa, han indicado que la fructosa es menos cariogénica que la sacarosa (Salminen y Hallikainen, 1990; Doty y Vanniken, 1975).

La viscosidad de las soluciones de fructosa es menor que la de las soluciones de sacarosa. Es altamente soluble en agua aún a bajas temperaturas y no cristaliza aún a altas concentraciones (Doty y Vanniken, 1975). Es más dulce en soluciones frías, también tiende a resaltar el sabor de frutas y bayas, lo que la hace adecuada como endulzante para frutas frescas, té helado y limonadas.

Como un azúcar tipo cetosa, la fructosa sufre reacción de Maillard con los grupos amino a temperaturas menores que la sacarosa, de ahí que las reacciones de oscurecimiento en productos horneados o cocidos puedan obtenerse a menor temperatura.

Puede ser aplicada en cereales pre-endulzados, frutas enlatadas, refrescos, pasteles, bisquets y helados; es ideal también para jugos en polvo y productos congelados (Salminen y Hallikainen, 1990).

La fructosa es comercializada en forma de cristales y como jarabes de glucosa y fructosa, que contienen del 42 al 90 % de fructosa, (HFCS, High Fructose Corn Syrupes), su uso principal es en productos con un contenido muy alto de agua, como bebidas y jugos (Salminen y Hallikainen, 1990). En la actualidad los HFCS han desplazado a la sacarosa de una buena parte de su mercado internacional, pero aún su proceso sigue siendo muy costoso. Se han buscado varias alternativas para disminuir el costo, desde la inmovilización de enzimas, optimización del proceso tradicional,

hasta encontrar fuentes mas baratas de donde se pueda extraer la fructosa directamente (López-Munguía, 1993).

3.2.4. SACAROSA

La sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa y es el principal azúcar de importancia comercial (López-Munguía, 1993). Es el disacárido más ampliamente distribuido en la naturaleza. Es extraída de la remolacha y de la caña de azúcar.

En la actualidad su uso ha disminuido, ya sea porque su precio se ha elevado, porque han salido al mercado edulcorantes con mayor poder endulzante o porque la tendencia actual es hacia el consumo de edulcorantes no calóricos. Aún así la sacarosa tiene gran importancia comercial en la industria confitera y de mermeladas ya que proporciona viscosidad (cuando se usa en altas concentraciones) y actúa como agente bacteriostático (Tombs, 1991). También se utiliza como materia prima para la elaboración de azúcar invertido, el cual es comercializado a un costo ligeramente mayor que la sacarosa y presenta mayores ventajas tecnológicas que ésta.

En la actualidad la producción de sacarosa a partir de caña de azúcar se ha visto afectada ya que el proceso de obtención se hace cada vez menos redituable y el precio de la sacarosa es cada vez menos competitivo contra los jarabes de fructosa o el azúcar invertido. Sin embargo, en algunos sectores la sacarosa sigue siendo una materia prima indispensable, tal es el caso de la confitería, las jaleas y mermeladas, la industria farmacéutica y el comercio a granel. El precio del azúcar refinada se ha incrementado en mayor proporción que el del azúcar sin refinar.

3.3. INULINA.

La inulina es un polifructano de origen vegetal que se encuentra en los tubérculos y raíces de las plantas de las familias *Compositae*, *Gramineae* (Vandamme y Derycke, 1983), y *Amarilidaceae* (Badui-Dergal, 1981; García-Garibay y López-Munguía, 1993; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953), familia a la que pertenece el agave.

Algunas fuentes comunes de inulina son: cebolla (2 - 6%), ajo (9 - 16 %), puerro (3 - 10 %), plátano (0.3 - 0.7 %), espárrago (10 - 15 %), alcachofa de Jerusalem (15 - 20 %), y achicoria (13 -

20 %), siendo la fuente más promisoría la alcahofa de Jerusalem o la achicoria (Quemener y col., 1994).

La inulina y sus análogos están formados por cadenas lineales de fructosa con enlaces β -2,1, con una unidad terminal de glucosa unida a la fructosa por un enlace β -2,4. La longitud total de la inulina varía en función de la planta y de la estación. Teóricamente la inulina contiene como mínimo 30 unidades de fructosa, esto corresponde a un peso molecular de al menos 5400 Da. En una misma planta, los polímeros de fructosa varían en longitud, por lo que el peso molecular de la inulina varía entre 3500 y 5500 Da (Vandamme y Derycke, 1983).

La inulina puede ser precipitada en soluciones etanol-agua. Es hidrolizable en medio ácido a alta temperatura (70 - 80 °C) (Vandamme y Derycke, 1983; Murgia-Rosete, 1960).

La inulina es insoluble en agua fría, muestra su más alta solubilidad a 60 °C, arriba de esta temperatura la cadena sufre modificaciones, e incluso hidrólisis inespecífica. A 60 °C se obtiene la mayor relación entre solubilidad considerable y poca hidrólisis. Con el tiempo (3 - 5 días) la inulina en solución precipita (Phelps, 1965). La solubilidad de la inulina varía también con la longitud de la cadena, entre más corta sea la cadena la solubilidad es mayor (Fleming y GrootWassink, 1979).

Cuando se ingiere, la inulina viaja a través del sistema digestivo prácticamente sin ser alterada, hasta que alcanza el intestino grueso (colon), donde es fermentada por la microflora para producir varios productos metabólicos (ver tabla 3.3.1.).

TABLA 3.3.1. TRANSFORMACION DE LA INULINA EN EL SISTEMA DIGESTIVO.

Cavidad oral	No hay hidrólisis. Utilización insignificante por las bacterias.
Estómago	Hidrólisis ácida insignificante. No hay absorción
Intestino delgado	No hay hidrólisis enzimática ni absorción.
Intestino grueso	Fermentación \longrightarrow Productos metabólicos
Excremento	Eliminación parcial (fibra)

Debido a que la inulina no es metabolizada por el organismo, entra dentro de la definición de fibra dietética, que es "... la suma de polisacáridos vegetales y lignina que no son hidrolizados por las secreciones del sistema digestivo humano"... Contribuye también al crecimiento de bifidobacterias en el colon y disminuye la población de bacterias putrefactivas y patógenas.

Actuando como fibra dietética, la inulina contribuye a:

- la reducción de la concentración de metabolitos tóxicos,
- la reducción en la constipación por acelerar el tránsito del bolo fecal en el intestino,
- la reducción de la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo cual contribuye a la disminución de la concentración de colesterol en sangre y disminuye la presión arterial en la gente hipertensa,
- la optimización en la absorción de minerales tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , PO_4^{3-} .

Además de sus diversas aplicaciones medicinales / nutricionales, la inulina es un ingrediente alimenticio altamente funcional ya que posee excelentes cualidades de gelificación y capacidad de retención de agua, mejora la textura y la viscosidad, entre otras; lo cual la hace un ingrediente único para reemplazar la grasa, dar cuerpo y reducir las calorías en los alimentos (Spiegel y col, 1994; Tokunaga y col., 1986).

Además de lo anterior, la inulina se ha propuesto para la producción de jarabes de alto contenido de fructosa. Se han realizado varios ensayos de la hidrólisis de la inulina extraída de la alcachofa de Jerusalem, tanto por vía ácida como por vía enzimática, con gran éxito (Bajpai y Margaritis, 1985 y 1986; Byun y Nahm, 1978; Kim y Byun, 1982; Kim y Rhee, 1989; Manzoni y Cavazzonni, 1992; Thonart y col., 1988; Vandamme y Derycke, 1983; Worman y Day, 1984).

3.4. PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA.

3.4.1. PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA A PARTIR DE ALMIDON DE MAIZ

La producción tradicional de los jarabes de glucosa y fructosa se realiza a partir de almidón, el que proviene principalmente del maíz. El almidón es obtenido mediante la molienda húmeda del grano de maíz, obteniéndose un almidón con el 99 % de pureza (Gerhartz, 1990; López-Munguía, 1993).

A nivel internacional, la hidrólisis enzimática del almidón para la producción de jarabes de glucosa y fructosa, ha sustituido casi totalmente a la hidrólisis ácida, ya que hay mayor control de la reacción, mayor especificidad en el tipo de productos obtenidos, eliminación de productos de oxidación (p. ej. el hidroximetil furfural (HMF), que genera color), menores requerimientos

energéticos y ausencia de sabores indeseables. Sin embargo, en México y América Latina aún se emplea la hidrólisis ácida (López-Munguía, 1993; Fleming y Groot Wassink, 1979).

Para la caracterización de los productos de hidrólisis del almidón de maíz, se emplea el parámetro equivalente dextrosa (ED) que es igual a las unidades masa de glucosa pura requeridas para reducir la misma cantidad de reactivo de Fehling que 100 unidades masa del hidrolizado seco. La hidrólisis total de 100 partes de almidón resulta en 111 partes en peso de glucosa por la incorporación de agua en la hidrólisis (López-Munguía, 1993).

La producción de jarabes de fructosa se divide en dos pasos principales: la producción de jarabes de glucosa y su posterior isomerización a fructosa.

3.4.1.1. PRODUCCION DE JARABES DE GLUCOSA.

El primer paso en la producción de jarabes de glucosa a partir de almidón de maíz, es lo que se conoce como **licuefacción**. Una solución de almidón (de 40 a 45 % en peso), es calentada en un cocedor, junto con la enzima α -amilasa y sales de calcio (Ca^{2+}) a un pH neutro. La pasta de almidón se mantiene por 3 a 7 minutos a 105 - 110 °C, para posteriormente permanecer por 1 a 3 horas a 90 - 95 °C (López-Munguía, 1993; Tucker y Woods, 1991).

El hidrolizado así obtenido contiene como principales productos, α -dextrinas, maltosa, maltotriosa y maltopentosa, y un ED de 12 a 15 (López-Munguía, 1993).

La α -amilasa (E.C. 3.2.1.1., α -1,4-glucán glucanohidrolasa), hidroliza los enlaces interiores α -1,4 en la amilosa y amilopectina, no actúa sobre los enlaces α -1,6, de ahí que su acción en almidón produzca una mezcla de oligosacáridos más cortos. Las α -amilasas de uso industrial son aisladas de fuentes bacterianas (*Bacillus spp.*) y son bastante termoestables (la enzima de *Bacillus licheniformis* puede ser usada a temperaturas superiores a 110 °C) (Tucker y Woods, 1991).

La segunda etapa en el proceso se conoce como **sacarificación**. El hidrolizado de almidón con α -amilasa se ajusta a un pH de 4.5, después de desactivar la primera enzima, se disminuye la temperatura a 60 °C y se adiciona la enzima amiloglucosidasa. La reacción dura de 48 a 72 horas, después de las cuales se desactiva la enzima (20 min a 80 °C) para evitar la conversión a isomaltosa. De esta forma es posible alcanzar un ED de 96 a 98, lo que implica entre 92 a 98 % de glucosa.

La enzima amiloglucosidasa o glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3., α -1,4-glucan glucanohidrolasa) es de acción exo, rompe rápidamente el almidón para liberar glucosa; es también débilmente hidrolítica hacia los enlaces α -1,6. Pueden obtenerse actividades más altas hacia estos enlaces por la adición de más enzima, sin embargo, esto puede resultar en una reacción lateral indeseable llamada "reversión", producida principalmente por dos causas: 1) la contaminación de las preparaciones de esta enzima con enzimas transglucosidasas, que producen panosa e isomaltosa, y 2) a altas concentraciones de producto, la reacción inversa se favorece, resultando en la producción de maltosa, isomaltosa y en menor grado oligosacáridos (López-Munguía, 1993; Tucker y Woods, 1991).

El grado de hidrólisis del almidón de maíz está limitado por la presencia de enlaces α -1,6. Por ello es necesario el uso de enzimas desramificantes (MacAllister, 1980). La isoamilasa (E.C. 3.2.1.68, glicogen 6-glucanohidrolasa) y la pululanasa (E.C. 3.2.1.41, pululan 6-glucanohidrolasa) son las llamadas enzimas desramificantes, ya que actúan específicamente sobre los enlaces α -1,6 en los polisacáridos, facilitando así la acción de las enzimas amilolíticas sobre el almidón, logrando un mayor porcentaje de hidrólisis (Tucker y Woods, 1991).

El jarabe obtenido del proceso de sacarificación contiene además de glucosa, cerca del 5 - 6 % de otros carbohidratos, pequeñas cantidades de nitrógeno, materia grasa, fibra e iones inorgánicos.

El material grasoso, fibra y el nitrógeno soluble son removidos por filtración, usualmente en un filtro de tambor rotatorio al vacío con una capa de tierra de diatomeas. El licor se concentra al vacío hasta 60 % de materia seca, se pasa a través de columnas de carbón granular que absorbe prácticamente todas las impurezas, excepto los iones. La solución se pasa sucesivamente a través de columnas de resinas intercambiadoras de iones para remover el material iónico (MacAllister, 1980). El efluente obtenido es una solución de al menos 95 % de glucosa. Esta solución puede ser cristalizada para producir glucosa pura o bien enviada para su isomerización a fructosa (Gerhartz, 1990).

3.4.1.2. PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA.

Una vez purificado el efluente de la sacarificación se le adicionan pequeñas proporciones de sales de magnesio y bisulfito, el pH se ajusta a 7.5 y la temperatura se fija en 60 °C. Las sales de bisulfito adicionadas, al igual que el magnesio, tienen un efecto activador sobre la enzima, los iones bisulfito actúan como amortiguador regulando el cambio en el pH. Los iones calcio actúan como inhibidores desplazando al magnesio en la molécula de la enzima, por ello es necesaria la

purificación previa del jarabe glucosado (MacAllister, 1980; Gerhartz, 1990). Esta solución se alimenta al reactor de isomerización donde se encuentra la enzima glucosa isomerasa inmovilizada

La enzima que se utiliza a nivel industrial en el proceso de isomerización es en realidad una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5, D-xilosa ceto isomerasa) que proviene normalmente de: *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces rubiginosus* o *Actinoplanes missouriensis* (Fleming y GrootWassink, 1979)

El tiempo de residencia en el reactor es de 20 a 30 min, dependiendo de la cantidad de glucosa isomerasa presente en el reactor y de su actividad (MacAllister, 1980). En estas condiciones la conversión a fructosa es de 50 % pero para evitar un tiempo de reacción excesivo, que resulta en la formación de subproductos, la conversión es normalmente limitada a un 42 - 45 %.

Las ventajas de usar enzimas inmovilizadas son: la obtención de más producto por unidad de enzima, menos contaminación de la mezcla de reacción con las impurezas asociadas con la enzima, menor tiempo de residencia en el reactor y menor formación de subproductos. Después que el licor sale del reactor de isomerización es sometido a un proceso de refinación para eliminar el material que no sea azúcar (Tucker y Woods, 1991; Gerhartz, 1990; López-Mungia, 1993; MacAllister, 1980).

Al efluente se le disminuye el pH inmediatamente a 4.0, se le hace pasar por camas de carbón granular, donde las trazas de color y sabor son eliminadas por adsorción. Después se pasa sucesivamente por columnas intercambiadoras de iones que remueven el material inorgánico y los materiales residuales de color. El licor resultante es substancialmente incoloro, inodoro y sin otro sabor más que un intenso sabor dulce (MacAllister, 1980; Gerhartz, 1990).

Las condiciones de pH y temperatura en el manejo subsecuente deben ser controladas para evitar el deterioro del color y sabor. Los jarabes de glucosa y fructosa son más estables a pH de 4.0. Un pH demasiado bajo puede causar la formación de productos de condensación y un pH demasiado alto lleva a la formación de psicosa, materiales ácidos y de color.

El licor refinado de alto contenido de fructosa es concentrado aproximadamente a 71 % de materia seca y este constituye el principal producto comercial.

El licor isomerizado puede ser tratado de varias maneras para obtener un producto con mayor contenido de fructosa. Se puede concentrar el licor a baja presión a un nivel relativamente alto de

materia seca, después cristalizar la glucosa del concentrado y removerla. El producto obtenido es un jarabe con cerca del 70 % de fructosa (base seca). La glucosa cristalina puede ser disuelta y recirculada al reactor de isomerización (MacAllister, 1980).

También se puede realizar el enriquecimiento de fructosa de los jarabes mediante cromatografía de elución en columnas de resinas fuertemente ácidas intercambiadoras de iones, que separan a la glucosa de la fructosa, obteniéndose jarabes de hasta 55 % de fructosa en base seca (MacAllister, 1980; Gerhartz, 1990). El proceso total se muestra en la tabla 3.4.1.2.1.

**TABLA 3.4.1.2.1. PROCESO DE TRANSFORMACION DEL ALMIDON DE MAIZ
A JARABES DE GLUCOSA Y FRUCTOSA**

OPERACION	CONDICIONES	REACTIVOS	PRODUCTOS
Separación de almidón		Dióxido de azufre Granos de maiz	Aceite, germen, cascarilla, gluten y ALMIDON
Licuefacción 1) primaria 2) secundaria	pH 6.7 Soln. almidón 40% 1) 10 min/ 100 °C 2) 1-3 h / 90 - 95 °C	α -amilasa + Ca^{2+} +/- Isoamilasa	α -Dextrinas Maltosa Maltotriosa Maltopentosa
Sacarificación	pH 4.5 60°C / 48 - 72 h	Glucamilasa +/- Isoamilasa o Pululanasa	94 % Glucosa 6 % Otros azúcares
Purificación	pH 4.0	Centrifugación Carbón activado Resinas intercambiadoras De iones	Jarabes de alto contenido de glucosa
Isomerización	pH 6.0 a 7.5 + Mg^{2+} / $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 30 min / 150 °F	Glucosa - isomerasa	42 % Fructosa 52 % Glucosa 6 % Otros azúcares
Purificación	pH 4.0	Carbón activado Resinas intercambiadoras de iones	Jarabes de alto contenido de fructosa
Optimización		Cromatografía de elución	55 - 95 % fructosa
		Cristalización de glucosa	72 - 90 % fructosa

+ / - : Significa que su adición es optativa, pero se sugiere su uso para lograr un porcentaje mayor de hidrólisis.

3.4.2. PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA A PARTIR DE INULINA DE ALCAHOFA DE JERUSALEM.

Se han propuesto esquemas industriales para producir jarabes con ultra alto contenido de fructosa a partir de inulina extraída de la alcahofa de Jerusalem y raíces de achicoria, que proveen una fuente barata de inulina y fructosa (Vandamme y Derycke, 1983).

Cuatro pasos principales se siguen en la producción de jarabes de fructosa a partir de los tubérculos de la alcachofa:

- extracción de los fructanos
- hidrólisis del licor vía ácida o enzimática
- remoción de impurezas
- condensación del jarabe

3.4.2.1. EXTRACCION DE LOS POLIFRUCTANOS.

Los polifruktanos son extraídos de los tubérculos por extrusión de éstos para obtener el jugo. El primer paso es lavar y rebanar los tubérculos o cortarlos en pequeños trozos, para disminuir el tamaño de partícula y aumentar la eficiencia de extracción (Bajpai y Margaritis, 1985 y 1986; Byun y Nahm, 1978; Manzoni y Cavazzonni, 1992; Workman y Day, 1984; Fleming y GrootWassink, 1979; Kim y Rhee, 1989; Murguía-Rosete, 1960).

La extracción puede realizarse de diferentes maneras:

Por expresión de los tubérculos con una prensa mecánica, (Bajpai y Margaritis, 1986; Murguía-Rosete, 1960); mezclar los tubérculos con agua caliente (hirviendo o a 60 - 70 °C) y prensar (ya sea en una prensa mecánica o a través de manta de cielo) (Byun y Nahm, 1978; Kim y Rhee, 1989); o bien macerarlos con agua caliente en un mezclador Waring antes de prensar (Bajpai y Margaritis, 1985; Workman y Day, 1984; Fleming y GrootWassink, 1979).

Se recomienda que el agua con que se maceran los tubérculos contenga un 0.1 % de dióxido de azufre, que evita que la enzima polifenol oxidasa induzca la formación de productos coloridos (Fleming y GrootWassink, 1979).

El jugo extraído se clarifica añadiendo lechada de cal o carbonato de calcio para precipitar el material coloidal, el exceso de calcio es eliminado con ácido oxálico, ajustando de paso el pH a

7.0. Aquí se corre el riesgo de precipitar fructosa libre en forma de sal de calcio (Fleming y GrootWassink, 1979; Murguia-Rosete, 1960).

Las proteínas se eliminan por el calentamiento del jugo a 90 °C o bien por la esterilización del mismo a 115 - 121 °C / 15 - 20 min en autoclave. El precipitado formado se elimina por filtración con algodón o bien por centrifugación a 6000 o 10000 rpm / 10 min (Workman y Day, 1984; Kim y Rhee, 1989; Manzoni y Cavazzoni, 1992; Bajpai y Margaritis, 1985).

En caso de que el jugo presente color, éste se elimina tratando el jugo con carbón activado y posterior filtración. La capacidad de adsorción del carbón activado es óptima si se utiliza carbón finamente molido y condiciones ligeramente ácidas (Fleming y GrootWassink, 1979; Murguia-Rosete, 1960).

3.4.2.2. HIDROLISIS DEL LICOR.

3.4.2.2.1. HIDROLISIS ACIDA.

Se ha realizado con ácido clorhídrico, sulfúrico, oxálico, cítrico y fosfórico. El pH para la hidrólisis que ha dado buenos resultados es de 3.0 a 4.5, pero se requieren de presiones de 25 psi y temperaturas de 70 a 85 °C por un periodo mínimo de 8 horas, para obtener del 70 al 85 % de fructosa. El uso de estas condiciones de hidrólisis, si bien permite obtener jarabes de buena calidad, impide que se obtenga una hidrólisis completa de los enlaces glucosa-fructosa. Después de un periodo de 8 h de hidrólisis, de un total de 85 % de azúcares reductores producidos, el 58 % son monosacáridos y el 25 % restante permanecen como disacáridos (Fleming y GrootWassink, 1979).

Un paso alternativo es el tratamiento del licor hidrolizado y neutralizado con invertasa, para lograr la hidrólisis completa de los grupos terminales glucosa-fructosa (Vandamme y Derycke, 1983).

La hidrólisis se puede realizar también mediante la alimentación del licor concentrado a columnas de resinas intercambiadoras de cationes, donde el pH es disminuido hasta 2.0, en esta columna la solución se mantiene por un determinado tiempo. Posteriormente el efluente se alimenta a una columna con resinas intercambiadoras de aniones, donde el pH se eleva hasta 7.0 (Vandamme y Derycke, 1983). El uso de este tipo de resinas requiere de una gran inversión inicial y para el mantenimiento de éstas (Fleming y GrootWassink, 1979).

En estas condiciones ácidas la fructosa sufre degradación y se producen compuestos coloridos y odoríferos indeseables, como el hidroximetil furfural (HMF), que son difíciles de eliminar por completo y demeritan la calidad de los jarabes obtenidos.

3.4.2.2.2. HIDROLISIS ENZIMÁTICA.

Se efectúa por medio de la acción de la enzima inulinasa sobre los polifruktanos. La inulinasa proveniente de la levadura *Kluyveromyces marxianus* es una alternativa viable para la hidrólisis enzimática de la inulina, ya que además de la actividad de inulinasa, posee actividad de invertasa, lo que permite que después de 6 h de hidrólisis se produzca cerca de 82 % de azúcares reductores de los cuales 79 % son monosacáridos y sólo el 3 % permanecen como disacáridos (Tombs, 1991; Fleming y GrootWassink, 1979).

La velocidad de hidrólisis de los fructanos por la enzima inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* varía dependiendo del peso molecular de éstos; entre más grandes sean los fructanos, la velocidad de hidrólisis será menor, conforme va disminuyendo la longitud de la cadena la velocidad se va incrementando (Fleming y GrootWassink, 1979; Kim y Byun, 1982).

La hidrólisis enzimática con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* se realiza a 50 °C, pH 5.0 y 8 horas de reacción; el periodo de reacción depende de la concentración del jarabe inicial, del tamaño de la cadena de los polifruktanos presentes y de la actividad de la enzima. Se puede emplear la enzima en solución o bien emplearla en forma inmovilizada, lo que disminuye el tiempo de proceso y los costos de producción (Fleming y GrootWassink, 1979).

Las ventajas de emplear la hidrólisis enzimática son que no se producen cambios en el color y los cambios en el sabor y olor de los jarabes obtenidos son mínimos, la hidrólisis se realiza en tiempos menores, la calidad de los jarabes obtenidos es mayor y no es necesario el uso de equipo resistente a la corrosión. Además si se emplea la enzima inmovilizada, el proceso se vuelve continuo, lo que implica una reducción en los costos de producción y un volumen mayor de producto.

3.4.2.3. REMOCION DE IMPUREZAS

Durante el proceso de purificación, las impurezas como materia suspendida, sales solubles, cenizas, compuestos nitrogenados y ácidos deben ser removidos; para esto se usan resinas catiónicas fuertes en la forma de H^+ que remueven los constituyentes metálicos de las sales, componentes protéicos, incluyendo aminoácidos y algunos productos coloridos no removidos por filtración con carbón activado. Las resinas aniónicas fuertes en la forma de OH^- se usan para

remover compuestos que imparten olor y sabor y para mejorar la estabilidad del color (Fleming y GrootWassink, 1982)

Si el jarabe proviene de hidrólisis ácida, el pH se eleva a 9.5 con una resina aniónica fuerte, se reacidifica a pH 3.0 con una resina catiónica fuerte y después se trata con una resina aniónica débil para obtener un pH de 4 - 4.5 para su almacenamiento, ya que a este pH la fructosa es estable por varios meses (Fleming y GrootWassink, 1979).

Otra alternativa es separar la fructosa presente en forma de fructosado de calcio mediante la adición de lechada de cal y posterior filtración. El precipitado se suspende en agua y se inyecta CO₂ para provocar la precipitación del calcio como carbonato de calcio, que se elimina por filtración, dejando a la fructosa pura en solución. La solución es tratada con carbón activado para eliminar color (Vandamme y Derycke, 1983).

Si proviene de hidrólisis enzimática a pH 5.0, el pH del jarabe se ajusta a 3.0 con una resina catiónica fuerte, después a pH 9.0 con una resina aniónica fuerte; se reacidifica a pH 3.0 con una resina catiónica fuerte y después se lleva a pH 4.5 con una resina aniónica débil (Fleming y GrootWassink, 1979).

3.4.2.4. CONCENTRACION DEL JARABE.

La concentración puede realizarse por ósmosis inversa, evaporación en condiciones de vacío o bien una combinación de ambas. La temperatura no debe de exceder los 60 - 70 °C y se debe tener cuidado de mantener el pH en 4.0 - 4.5, para evitar la degradación de la fructosa y prevenir la caramelización. Puede lograrse una concentración de hasta el 80 % de sólidos totales dentro de los límites de solubilidad (Fleming y GrootWassink, 1979).

3.5. ENZIMAS

3.5.1. INULINASA

La mayoría de las inulinasas son de hecho β -fructofuranosidasas que liberan moléculas de fructosa de la terminación no reductora de la molécula de inulina por la ruptura de los enlaces β -2,1; estas enzimas son designadas como 2,1- β -D-fructan fructano hidrolasas (E.C. 3.2.1.7). Se encuentran en plantas y microorganismos, incluyendo hongos, levaduras y bacterias. Se han aislado inulinasas de alcachofa de Jerusalem, achicoria y raíces de diente de león. Las inulinasas de plantas no presentan actividad de invertasa; contrariamente muchas inulinasas microbianas sí poseen dicha actividad. (Avigad y Bauer, 1966; Onodera y Shiomi, 1988; Rutherford y Deacon, 1972; Vandamme y Derycke, 1983).

Se han hecho estudios para inmovilizar la inulinasa para hacer posible su uso repetido y conducir un proceso continuo para la reacción. Las principales ventajas son: menores inversiones en las plantas y la disminución en los costos de operación (Bajpai y Margaritis, 1986).

Se ha inmovilizado la inulinasa libre de *Kluyveromyces marxianus* en camas de aminoetil-celulosa (Kim y Byun, 1982), encontrando que este proceso disminuye la estabilidad de la inulinasa, ya que después de 4 horas de proceso la enzima ha perdido el 25 % de su actividad. Kim y Rhee (1989) inmovilizaron inulinasa de *Aspergillus ficuum* por enlaces entrecruzados con glutaraldehído en quitina y observaron que la estabilidad de la enzima es mejor. Workman y Day (1984) fijaron las células de *Kluyveromyces fragilis* con un tratamiento con glutaraldehído, encontrando que no se afecta la estabilidad de la enzima, sin embargo, no se logra el 100% de hidrólisis debido posiblemente a la inhibición por producto. Bajpai y Margaritis en 1985 probaron inmovilizar las células de *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa en matrices de gelatina y en alginato de calcio en 1986, sin que esto diera los resultados esperados. Aún se continúan haciendo estudios para encontrar las condiciones óptimas de inmovilización de la inulinasa.

Se ha encontrado que la inulinasa inmovilizada tiene mayor estabilidad a alta temperatura (más de 60 °C) y al pH (en un rango de 3.0 a 6.0). Se cree que el complejo inulinasa-inulina estabiliza la estructura terciaria de la proteína no permitiendo que ésta se desnaturalice tan rápido como la enzima sola (Kim y Byun, 1982; Kim y Rhee, 1989).

3.5.1.1. CARACTERISTICAS DE LA INULINASA.

3.5.1.1.1. **SUBSTRATO:** La mayoría de las inulinasas liberan unidades terminales de fructosa de la molécula de inulina. Las fructan hidrolasas se clasifican, dependiendo de la especificidad sobre un sustrato, como sigue:

(A) β -fructofuranosidasas inespecíficas capaces de hidrolizar la sacarosa así como enlaces β -2,1 (del tipo de la inulina) y β -2,6 (del tipo de los levanos). En la mayoría de estos casos la degradación es por la liberación progresiva de una molécula de fructosa de la terminación de la cadena. A esta clasificación pertenece la enzima fructan-hidrolasa de *Kluyveromyces marxianus*. Esta hidrolasa ataca ambos enlaces, el β -2,1 y el β -2,6 de los oligosacáridos inulina y levano e hidroliza la sacarosa a una velocidad 25 veces mayor que la inulina.

(B) Enzimas que hidrolizan específicamente el enlace β -2,1 de la inulina, usualmente por la liberación gradual de monómeros de fructosa de las terminaciones de la cadena. Se observa una disminución en la velocidad de hidrólisis con la disminución de la longitud de la cadena o la presencia de una glucosa en vez de una fructosa en la terminación reductora. En esta clasificación se encuentra la enzima llamada inulin-1-fructano hidrolasa, aislada de los tubérculos de alcachofa de Jerusalén. Esta enzima sólo hidroliza los enlaces β -2,1 de las cadenas lineales en oligosacáridos y polifruktanos. La sacarosa, rafinosa y melezitosa son hidrolizadas insignificadamente (Avigad y Bauer, 1966).

(C) Levanasas (E.C. 3.2.1.65., 2,6- β -D-fructan fructanohidrolasa), que hidrolizan específicamente el enlace β -2,6 del levano de forma aleatoria para producir oligofruktanos de cadena corta, pero en algunos casos se liberan difruktanos de las terminaciones de la cadena .

(D) Enzimas que hidrolizan la inulina por acción endo liberando oligosacáridos y polifruktanos de menor tamaño. Dentro de esta clasificación encontramos las inulinasas aisladas de hongos como *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum* y en general *Penicillium sp.* (Onodera y Shiomi, 1988).

3.5.1.1.2. **TEMPERATURA:** la temperatura de 50 °C se observa como óptima para la inulina de *Kluyveromyces marxianus*, sin embargo la enzima es estable en un rango de temperaturas de 45 – 50 °C (Vandamme y Derycke, 1983; Cruz-Guerrero y col., 1995). Una temperatura de 60 °C puede ser favorable en la industria para combatir la contaminación microbiana de los reactores e incrementar la solubilidad de la inulina, sin embargo, a esta temperatura la inulina reduce su

actividad en un 40 % (Vandamme y Derycke, 1983). A temperaturas más altas pueden ocurrir reacciones secundarias (formación de color) y decrecer la estabilidad de la enzima.

3.5.1.1.3. **pH:** el pH óptimo de actividad de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* está alrededor de 4.5 - 5.0. Este valor bajo es ventajoso para la preparación industrial de jarabes porque reduce la formación de color y la susceptibilidad a la contaminación microbiana. Esta inulinasa aparentemente es estable en un amplio rango de pH de 4.0 a 6.0 (Vandamme y Derycke, 1983; Cruz-Guerrero y col., 1995).

3.5.1.1.4. **AFINIDAD:** Debido a que la inulina no tiene peso molecular fijo y es poco soluble en agua, no se han podido determinar valores exactos de la constante de Michaelis-Menten (Km). Además, dado que la inulina es gradualmente hidrolizada por remoción del grupo terminal fructosa, un residuo de inulina cada vez más pequeño se presenta como sustrato para la enzima, lo que provoca cambios en la velocidad de hidrólisis (Vandamme y Derycke, 1983). Se han reportado valores de la Km de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* sobre inulina que van desde 3.04 mM (Cruz-Guerrero y col., 1995), hasta 7.4 - 8.0 mM (Vandamme y Derycke, 1983).

Esta inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* también hidroliza a la sacarosa, reportándose valores de Km que van desde 6.7 mM (Vandamme y Derycke, 1983) hasta 40.18 mM (Cruz-Guerrero y col., 1995).

La inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* también hidroliza a la rafinosa (O- α -D-galactopiranosil-(1-6)-O- α -D-glucopiranosil-(1-2)- β -D-fructofuranósido) en fructosa y melibiosa (6-O- α -D-galactopiranosil-D-glucopiranosido). Sin embargo, no hidroliza a la melezitosa (3-O- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranosido), ya que aunque tiene la misma configuración terminal que la inulina, la molécula central de fructosa está protegida contra la hidrólisis por una segunda molécula de glucosa fijada en la posición C-3. Ciertas inulinasas, por ejemplo la inulinasa de *Penicillium spp* y de *Kluyveromyces marxianus*, hidrolizan el levano bacteriano. Esto indica que estas liberan unidades de fructosa unidas por enlaces β -2-6 en la cadena del levano así como las unidades de fructosa unidas por enlaces β -2-1 en los puntos de ramificación (Vandamme y Derycke, 1983).

3.5.1.1.5. **INHIBIDORES:** la inulinasa es inhibida por la presencia de iones Cu^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} . (Vandamme y Derycke, 1983). También se ha encontrado que la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* es inhibida por la urea, cloruro de mercurio, fenilhidrazina y *p*-cloromercuribenzoato en concentraciones promedio de 10^{-4} M (Negoro, 1978).

Workman y Day (1984), observaron que hay una disminución en la velocidad de hidrólisis de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* sobre los fructanos cuando la reacción estaba llegando a su fin, sugiriendo que se estaba produciendo un inhibidor durante la reacción. Encontraron que la fructosa inhibe la inulinasa cuando se emplea inulina de tubérculos de dalia, aunque la fructosa no se considera inhibidor de las invertasas de levaduras. También observaron que la fructosa no inhibe la inulinasa soluble de *Kluyveromyces marxianus* arriba de una concentración de 100 mM cuando se utiliza como substrato sacarosa. Se piensa que la forma furanosa de la fructosa es la que inhibe a la enzima, mientras que la forma piranosa no la inhibe.

3.5.2. INVERTASA.

La invertasa también se clasifica como una β -fructofuranosidasa (E.C. 3.2.1.26, β -D-fructofuranosido fructohidrolasa), se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y está presente en plantas, animales y microorganismos. Hidroliza cualquier compuesto con un residuo β -D-fructofuranosil sin substituir, tales como sacarosa y rafinosa (Goldstein y Lampen, 1975).

El pH óptimo de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* está en el rango de 4.5 a 5.5. Es estable a temperaturas de aproximadamente 50 - 56 °C. Es inhibida irreversiblemente por iodo (inhibición al 50%), aminas como la anilina, y reversiblemente por iones de metales pesados (Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+}) (Goldstein y Lampen, 1975; Hestrin y col., 1955).

La capacidad de la invertasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para hidrolizar la inulina y los levanos probablemente varía dependiendo del grado de polimerización de éstos; mientras los miembros de cadena corta de las series homólogas de estos polímeros son rápidamente hidrolizados por la invertasa, la acción en los polímeros nativos es extremadamente lenta o insignificante (Hestrin y col., 1955).

4. METODOLOGIA.

4.1. MATERIA PRIMA.

4.1.1. RECOLECCION Y PREPARACION DEL AGUAMIEL.

El aguamiel se recolectó de la manera tradicional. El tlachiquero (persona que recolecta el aguamiel) destapó la cavidad donde se depositó el aguamiel y procedió a su extracción con el "acocote", que es una especie de calabaza alargada, perforada en sus dos extremos. La extremidad mas angosta se introdujo en el aguamiel acumulado en el cajete (cavidad donde se acumula el aguamiel que fluye de la planta) y por la otra el tlachiquero succionó con la boca para hacer vacío, provocando así la ascensión del líquido. Para evitar que el aguamiel se derramara al levantar el acocote, el tlachiquero tapó con un dedo el orificio inferior y así lo llevó a botellas de vidrio, que se transportaron en hielo al laboratorio.

Antes de analizarlo se le realizó una filtración gruesa, a través de algodón, para eliminar materia extraña (basura e insectos). Después se pasteurizó a 85 °C / 15 min en autoclave: se dejó calentar el autoclave hasta que los vapores de agua se condensaron en la tapa (en este punto el autoclave alcanzó una temperatura de 85 °C), se introdujo el aguamiel en botellas de vidrio cerradas, se tapó el autoclave, sin cerrar las llaves, se pasteurizó 15 min a 85 °C. Al concluir el tiempo de pasteurización se sacaron las botellas con el aguamiel y se enfriaron en baño de hielo.

La pasteurización se realizó con el propósito de reducir la carga microbiana y la actividad enzimática propias del aguamiel para evitar interferencias al momento de realizar las hidrólisis con invertasa e inulinasa.

El aguamiel se mantuvo en congelación mientras no se utilizó, para evitar la fermentación causada por las bacterias presentes de manera natural en el aguamiel y la contaminación microbiana.

Se trabajó con muestras de aguamiel provenientes de San Pedro Atocpan, Milpa Alta, México D.F. Los magueyes tenían aproximadamente tres meses de haber iniciado su raspa. En la tabla 4.1.1.1. se muestran las características generales de los aguamieles que se emplearon en el estudio.

TABLA 4.1.1.1. INFORMACION GENERAL DE LOS AGUAMIELES.

MUESTRA	MESES DE INICIADO EL RASPADO	FECHA DE RECOLECCION	CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS	HORA DE RECOLECCION
A1	3	25-03-1996	Todos los aguamieles tenían un color blanquecino. sabor dulce. ligeramente herbáceo y presentaban poco mucilago.	mañana
A2	2	25-03-1996		mañana
A3	3	25-03-1996		mañana
A4	3	02-04-1996		tarde
A5	3	15-07-1996		tarde
A6	3	15-07-1996		tarde
A7	1.5	15-07-1996		tarde

Observamos en la tabla 4.1.1.1. que todos los aguamieles tienen casi el mismo tiempo de haber iniciado su raspa, 3 meses. Según lo reportado por García-Garibay y López-Munguía (1993) y Loyola (1956), en esta etapa el aguamiel debe haber alcanzado su concentración máxima de azúcares.

4.2. CARACTERIZACION DEL AGUAMIEL.

Se procedió entonces a la caracterización del aguamiel como se observa en la figura 4.2.1. Se hicieron las siguientes determinaciones:

- azúcares totales (método de fenol-sulfúrico)
- azúcares reductores directos (método de Somogyi-Nelson)
- fructosa total (método de cisteína-carbazol)
- glucosa libre (método enzimático de GOD-POD)
- azúcares no libres

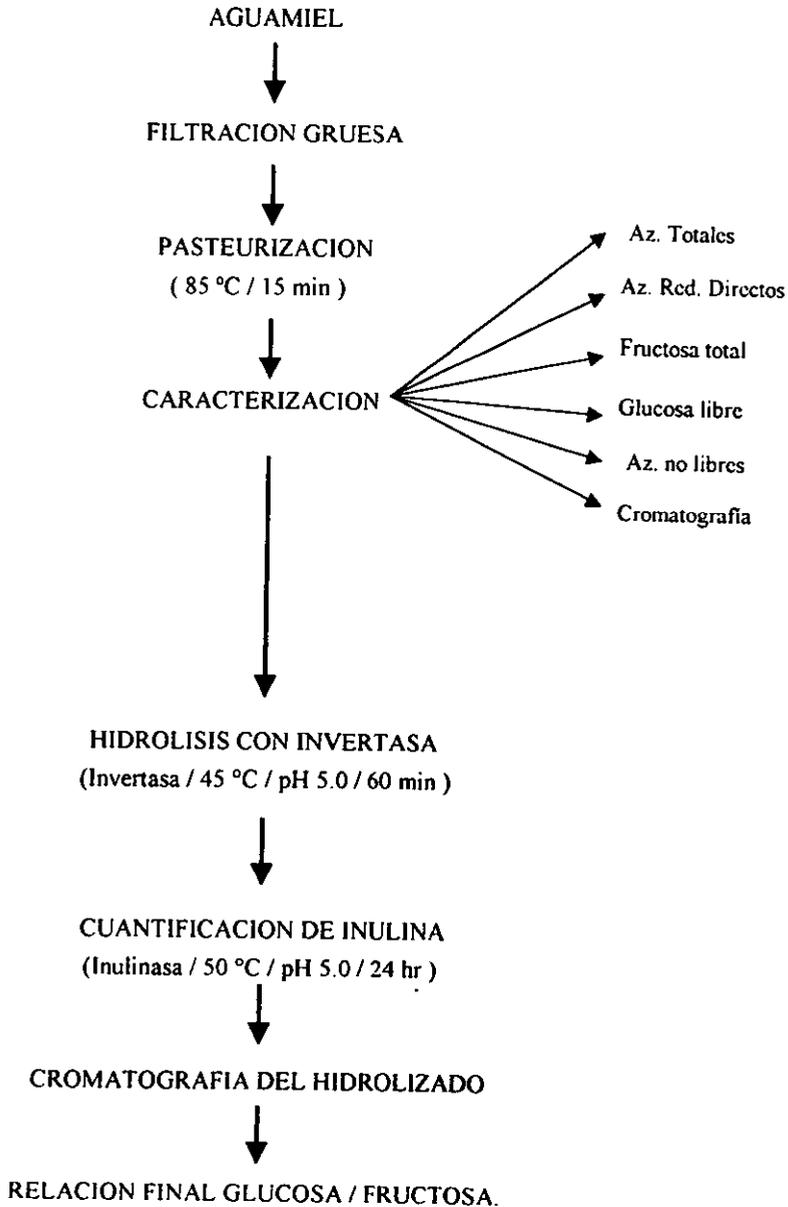
hidrólisis con invertasa

inulina (hidrólisis con inulinasa)

y cromatografía en capa fina de los aguamieles sin hidrolizar e hidrolizados.

A continuación se explica con detalle cada determinación.

FIGURA 4.2.1. DIAGRAMA DE PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LOS AGUAMIELES.



4.2.1. CUANTIFICACION DE AZUCARES.

4.2.1.1. CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES

METODO DE FENOL - SULFURICO. (Dubois y col., 1956)

4.2.1.1.1. REACTIVOS

- Acido sulfúrico concentrado (98.2 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México)
 - Solución de fenol (J.T. Baker, Xalostoc México) al 5% en agua destilada
 - Solución patrón de fructosa (β -D-(-) fructosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA.) de 100 μ g / mL
- Se pesaron 0.1 g de fructosa y se aforó a 100 mL. Se tomaron 10 mL de la solución anterior y se aforó a 100 mL

4.2.1.1.2. TECNICA

- Se colocó 1 mL de muestra en un tubo de ensaye
- Se adicionó 1 mL de fenol al 5% y se mezcló
- Se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, cuidando que éste terminara de caer en 10 seg.
- Se dejó reposar 10 seg y después se agitó durante 10 seg
- Se dejó reposar 10 min más
- Se colocó en un baño de agua a 25-30 °C por 10-20 min para enfriar el tubo
- Las muestras se leyeron en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 490 nm contra un blanco de reactivos y agua destilada
- Los resultados se interpolaron en la curva patrón con un intervalo de concentraciones de 20 a 100 μ g de fructosa / mL

NOTA: Los tiempos de adición del ácido sulfúrico y de agitación se mantuvieron lo mas constantes posible para asegurar la reproducibilidad del método.

4.2.1.2. CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

METODO DE SOMOGYI - NELSON. (Nelson, 1944)

4.2.1.2.1. REACTIVOS

- Reactivo I.

Solución A.

En 800 mL de agua destilada se disolvieron uno a uno y con agitación constante los siguientes reactivos:

- 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4 , J.T. Baker, Xalostoc México)
- 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , J.T. Baker, Xalostoc México)
- 25 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , J.T. Baker, Xalostoc México)
- 25 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, J.T. Baker, Xalostoc México).
- Se aforó a 1 litro

Solución B.

En 30 mL de agua destilada se adicionaron una o dos gotas de ácido sulfúrico concentrado (98.2 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México) y se disolvieron 6 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, J.T. Baker, Xalostoc México). Se aforó a 50 mL.

Se mezclaron las soluciones B y A en una proporción de 1:25; esto es, 40 mL de la solución B y 1 litro de la solución A.

- Reactivo II.

Solución A.

En 800 mL de agua destilada se disolvieron:

- 42 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 98.2 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México)
- 50 g de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, J.T. Baker, Xalostoc México)

Solución B.

En 50 mL de agua destilada se disolvieron 6 g de arseniato de sodio ($\text{NaHASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ reactivo analítico, Mallinckrodt Inc. Alemania).

Se mezclaron con agitación las soluciones A y B, se aforaron a 1 litro. Se incubaron a 55 °C por 30 min y se almacenaron en un frasco ámbar.

NOTA: Al preparar el reactivo II se tuvo cuidado de manipular los reactivos con utensilios de plástico y vidrio porque el metal reacciona con las sales tornando la solución color verdoso lo cual afecta en las determinaciones.

- Solución patrón de fructosa.

Se disolvieron 50 mg de fructosa (β -D-(-)-fructosa, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA.) en agua destilada y se aforó a 100 mL. Esto dió una solución de 500 μ g de fructosa / mL.

4.2.1.2.2. TECNICA

- En un tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra
- Se adicionó 1 mL del Reactivo I
- Se incubó el tubo (tapado) en agua hirviendo por 20 min.
- Se retiró del baño y se enfrió
- Posteriormente se adicionó 1 mL del Reactivo II. Se agitó
- Se adicionaron 17 mL de agua destilada. Se agitó
- Se leyó la absorbancia de las muestras a 520 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) contra un blanco de reactivos y agua destilada
- Los resultados se interpolaron en la curva patrón con un intervalo de concentraciones de fructosa de 50 a 300 μ g / mL

4.2.1.3. CUANTIFICACION DE FRUCTOSA TOTAL.

METODO DE CISTEINA - CARBAZOL. (Kierstan, 1983)

4.2.1.3.1. REACTIVOS.

- Acido sulfúrico (H_2SO_4 98.2 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México) al 70 % en agua destilada
- L-Cisteina (Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA.) al 15% en agua destilada
- Carbazol ($C_{12}H_9N$ 95% pureza, Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA.) al 0.12% en etanol (anhidro, JT. Baker, Xalostoc México)
- Solución patrón de fructosa (β -D-(-)-fructosa, Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA.) de 1 mg / mL; diluir a 100 μ g / mL

4.2.1.3.2. TECNICA.

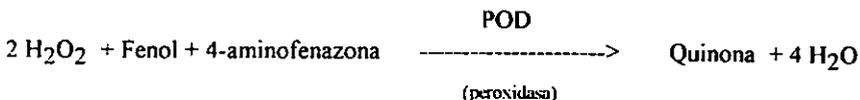
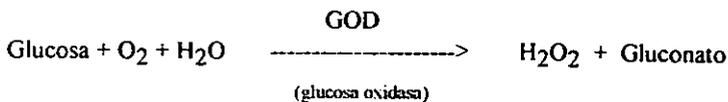
- En un tubo de ensaye se colocó 0.5 mL de muestra
- Se adicionó 0.1 mL de cisteína y 3 mL de ácido sulfúrico al 70%
- Se agitó
- Después se adicionó 0.1 mL de carbazol y se agitó nuevamente
- Se incubó el tubo a 60 °C por 20 min
- Se dejó enfriar en baño de agua a temperatura ambiente
- Se leyó la absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A)
- Los resultados se interpolaron en la curva patrón con un intervalo de concentraciones de fructosa de 5 a 30 µg / mL

En esta técnica se determina toda la fructosa presente en solución, tanto la fructosa libre como la fructosa polimerizada y / o unida a otros azúcares.

4.2.1.4. CUANTIFICACION DE GLUCOSA LIBRE.METODO ENZIMATICO - COLORIMETRICO GOD-POD

4.2.1.4.1. FUNDAMENTO:

La determinación de glucosa se efectúa mediante el método de Trinder según las siguientes reacciones:



La glucosa presente en la muestra reacciona con oxígeno y agua, y por la acción de la enzima glucosa oxidasa se produce peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el fenol y la 4-aminofenazona mediante la acción de la enzima peroxidasa, produciéndose la quinona que es un compuesto de color rosado, el cual se cuantifica espectrofotométricamente a una λ de 505 nm. La

cantidad de quinona producida es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. La técnica es específica para la glucosa, por lo cual no interfieren otros azúcares.

4.2.1.4.2. REACTIVOS.

Las siguientes soluciones venían incluidas en el ensayo enzimático para determinar glucosa libre por el método GOD-POD / Trinder de Spinreact (OLOT Gerona, España)

- Solución enzimática:

- Reactivo 1. Solución amortiguadora de TRIS pH 7.5, 92 mM; fenol 0.3 mM.
- Reactivo 2. Mezcla de enzimas: glucosa oxidasa (GOD) 15000 U / L; peroxidasa (POD) 1000 U / L y 4-aminofenazona 2.6 mM (indicador).

Se disolvieron las enzimas del reactivo 2 en el contenido del reactivo 1. Esta solución es estable un mes a 2 - 8 °C o 7 días a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

- Solución patrón de glucosa de 1 mg / mL

4.2.1.4.3. TECNICA.

La técnica consistió en colocar en tubos de ensaye la muestra y los reactivos en el orden en que se muestra en la siguiente tabla:

MUESTRAS REACTIVOS	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Solución patrón glucosa	---	20 µL	---
Agua	20 µL		
Muestra	---	---	20 µL
Solución Enzimática	2.00 mL	2.00 mL	2.00 mL

Se mezclaron e incubaron 10 min a 37 °C

Se leyeron las muestras en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 505 nm contra un blanco de reactivos.

Si la muestra contenía más de 5 mg de glucosa / mL, se realizó la dilución adecuada, ya que el método es lineal en concentraciones de aprox. 0.01 a 5 mg glucosa / mL. Esta dilución se tomó en cuenta para el cálculo de la concentración de glucosa en la muestra.

4.2.1.4.4. CALCULO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA.

$$\text{mg glucosa / mL} = \frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. patrón}} \times \text{Conc. patrón (mg / mL)} \times \text{dilución}$$

Donde:

Abs. muestra = absorbancia de la muestra a 505 nm.

Abs. patrón = absorbancia del patrón de glucosa a 505 nm

4.2.1.5. DETERMINACION DE AZUCARES NO LIBRES.

Estos se determinaron por diferencia entre los azúcares totales, determinados por el método de fenol-sulfúrico, menos los azúcares reductores directos, determinados por el método de Somogyi-Nelson, ambos expresados en mg fructosa / mL. Por lo tanto representan a los azúcares que forman parte de oligosacáridos y polisacáridos, incluida la sacarosa.

4.2.1.6. HIDROLISIS CON INVERTASA.

Debido a que la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* empleada en el estudio hidroliza tanto a la inulina como a la sacarosa, el aguamiel se hidrolizó primero con invertasa para hidrolizar toda la sacarosa presente y dejar como único sustrato de la inulinasa a la inulina y a los polifruktanos presentes (que no son hidrolizados por la invertasa). De esta manera se cuantificaron los azúcares reductores liberados por la invertasa y la inulina por separado, sin tener la posibilidad de falsos

resultados por la hidrólisis de la sacarosa durante la hidrólisis y cuantificación de los polifruktanos o inulina

4.2.1.6.1. REACTIVOS.

- Solución amortiguadora de acetatos (acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; cristales, J.T. Baker S.A., Xalostoc, México) / ácido acético (glacial, J. T. Baker, Xalostoc, México)) 0.1 M a pH 5.0
- Suspensión de enzima invertasa (E.C. 3.2.1.26, β -D-fructofuranosidasa fructanohidrolasa) de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0, con una actividad de 72 U / mL

La suspensión de enzima se almacenó en viales de 1 mL de capacidad y en congelación. Cada vez que se realizó una determinación se descongeló la cantidad necesaria de enzima para evitar que los ciclos de congelación-descongelación afectaran la estructura de la proteína provocando la pérdida de actividad.

- Reactivos I y II del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores (ver sección 4.2.1.2)
- Solución enzimática y solución patrón de glucosa del método enzimático-colorimétrico GOD-POD para determinar glucosa (ver sección 4.2.1.4.)

4.2.1.6.2. TECNICA.

- La muestra se diluyó con solución amortiguadora de acetatos pH 5.0 a una concentración aproximada de 10 mg azúcares no libres / mL
- Se colocaron en un tubo de ensaye 9 mL de la solución anterior y 1 mL de la enzima invertasa
- Se incubó a 45 °C por 1 hora en un baño de temperatura controlada
- Posteriormente se inactivó la enzima sumergiendo el tubo en agua a ebullición por 1 min y se enfrió inmediatamente
- Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson y glucosa liberada por el método enzimático GOD-POD

4.2.1.6.3. CALCULO DE LOS AZUCARES REDUCTORES LIBERADOS POR LA INVERTASA.

Para calcular los azúcares reductores liberados por la invertasa y la glucosa liberada por la misma, se emplearon las siguientes fórmulas:

$$AL_{inv} = AL_{t inv} - AL_i$$

(Fórmula 1)

Donde:

AL_{inv} = azúcares reductores liberados por la invertasa

$AL_{t inv}$ = azúcares reductores libres totales presentes después de 60 min de hidrólisis con invertasa. Incluyen a los azúcares reductores directos

AL_i = azúcares reductores directos

$$GL_{inv} = GL_{t inv} - GL_i$$

(Fórmula 2)

Donde:

GL_{inv} = glucosa liberada por la invertasa

$GL_{t inv}$ = glucosa libre total presente después de 60 min de hidrólisis con invertasa. Incluye la glucosa libre inicial

GL_i = glucosa libre inicial

La fructosa liberada por la invertasa (FL_{inv}) se calculó como sigue:

$$FL_{inv} = AL_{inv} - GL_{inv} \quad \text{(Fórmula 3)}$$

Posteriormente se determinó la relación glucosa / fructosa de los azúcares reductores liberados por la invertasa, mediante la división de FL_{inv} / GL_{inv} , si esta relación resultaba ser de 1 / 1, entonces el resultado obtenido como AL_{inv} se expresó como sacarosa.

4.2.1.7. CUANTIFICACION DE INULINA.

La cuantificación de inulina se realizó por hidrólisis con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 aislada y purificada según Cruz-Guerrero y col. (1995). La hidrólisis se llevó a cabo en el mismo tubo en el que se realizó la hidrólisis con invertasa, ya que en éste ya no se tenía sacarosa que pudiera ser hidrolizada por la inulinasa, limitando así a ésta a hidrolizar los posibles polifruktanos presentes.

La enzima utilizada mostró su máxima actividad a 50 °C y pH 5.0 (Cruz-Guerrero y col., 1995).

4.2.1.7.1. REACTIVOS

- Solución amortiguadora de acetatos (acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; cristales, J.T. Baker S.A., Xalostoc, México) / ácido acético (glacial; J. T. Baker, Xalostoc, México)) 0.1 M , pH 5.0
- Enzima inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, aislada y purificada según Cruz-Guerrero y col. (1995) con una actividad de 599.93 μg fructosa / min \cdot mL y suspendida en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0

La suspensión de enzima se almacenó en viales de 1 mL de capacidad y en congelación. Cada vez que se realizó una determinación se descongeló la cantidad necesaria de enzima para evitar que los ciclos de congelación-descongelación afectaran la estructura de la proteína provocando la pérdida de actividad.

- Reactivos I y II del método de Somogyi-Nelson para determinación de azúcares reductores (ver sección 4.2.1.2.)
- Solución enzimática y solución patrón de glucosa del método enzimático-colorimétrico GOD-POD para determinar glucosa (ver sección 4.2.1.4.)

4.2.1.7.2. TECNICA.

- Al tubo donde se cuantificó la sacarosa se adicionó enzima inulinasa en una relación 9:1 (sustrato:enzima).
- Se incubó la muestra en un baño de temperatura controlada a 50 °C por 24 horas.
- Después de las 24 horas de hidrólisis se inactivó la enzima sumergiendo el tubo en un baño de agua hirviendo por 1 minuto y posterior enfriamiento en baño de agua a temperatura ambiente
- Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson y glucosa liberada por el método enzimático GOD-POD
- De este tubo se tomó la muestra para correr la cromatografía en capa fina

4.2.1.7.3. CALCULO DE LA CONCENTRACION DE POLIFRUCTANOS.

Para calcular la cantidad de polifruktanos presentes, se calculó la cantidad de azúcares reductores y la glucosa liberados por la inulinasa. Hay que tomar en cuenta los azúcares reductores liberados anteriormente por la invertasa, para ello se emplearon las siguientes fórmulas:

$$AL_{inu} = AL_t - AL_{inv} - AL_i$$

(Fórmula 4)

Donde:

AL_{inu} = azúcares reductores liberados como resultado de la hidrólisis con inulinasa

AL_t = azúcares reductores libres totales presentes después de 60 min de hidrólisis con invertasa y después de 24 horas de hidrólisis con inulinasa, más los azúcares reductores directos

AL_{inv} = azúcares reductores liberados por la invertasa (calculados según la fórmula 1)

AL_i = azúcares reductores directos

La cantidad de glucosa liberada se calculó de manera similar.

$$GL_{inu} = GL_t - GL_{inv} - GL_i$$

(Fórmula 5)

Donde:

GL_{inu} = glucosa liberada por la inulinasa

GL_t = glucosa libre total presente después de 60 min de hidrólisis con invertasa y después de 24 horas de hidrólisis con inulinasa, más la glucosa inicial

GL_{inv} = glucosa liberada por la invertasa (calculada según la fórmula 2)

GL_i = glucosa libre inicial

La fructosa liberada por la inulinasa se calculó como sigue:

$$FL_{inu} = AL_{inu} - GL_{inu}$$

(Fórmula 6)

Posteriormente se determinó la relación glucosa / fructosa de los azúcares liberados por la inulinasa, mediante la división de **FL inu** / **GL inu**. Esta relación nos da una idea del grado promedio de polimerización de los polifruktanos.

4.2.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

4.2.2.1. REACTIVOS

- Placas: de silica gel (Kodak Eastman hoja cromatográfica para TLC) de 10 cm de altura
- Fase móvil: acetona: agua: cloroformo: metanol (75:5:10:10). (Stahl, 1969)
 - acetona (99.5 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México)
 - metanol (anhidro absoluto, reactivo analítico, Mallinckrodt Inc. Alemania.)
 - cloroformo (90 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México)
 - agua destilada
- Soluciones patrón:
 - Solución de glucosa (D-(+)-glucosa anhidra, Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA) al 1 % en agua destilada
 - Solución de fructosa (β-D-(-)-fructosa, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA.) al 1 % en agua destilada
 - Solución de sacarosa (J.T. Baker, Xalostoc México) al 1 % en agua destilada
 - Solución de inulina (de tubérculos de Dalia, Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) al 1 % en agua destilada

Nota: Se corrieron los patrones en una placa por separado para conocer el orden en que corrian. Una vez identificado el orden de corrimiento, se preparó una solución con los 4 azúcares y esta solución es la que se uso como patrón para correr las placas con las muestras.

- Solución reveladora: ácido sulfúrico (H_2SO_4 98.2 % pureza, J.T. Baker, Xalostoc México) al 20% en metanol (anhidro absoluto, reactivo analítico, Mallinckrodt Inc. Alemania.)

4 2.2.2. TECNICA. (Shinoyama y Yasui, 1988)

Se aplicaron 2 μL de muestra a una distancia de 2 cm del borde inferior de la placa, a 1cm de los bordes laterales y con 1.5 cm de espaciamento entre muestras (como se muestra en la figura 4 2.2.2.1.). Se dejó secar. Se aplicaron después 2 μL más y se dejaron secar. Este proceso se repitió hasta completar 6 μL en total.

Se colocó la placa en la cámara cromatográfica previamente saturada con la fase móvil, y con aproximadamente 1 cm de altura de ésta. Se tuvo la precaución de que la fase móvil no mojara las muestras directamente. Se dejó eluir hasta que el frente del solvente alcanzó aproximadamente 0.5 cm abajo del borde superior de la placa. El frente de la placa se marcó con lápiz tan pronto se sacó ésta de la cámara. Se dejó evaporar el eluyente antes de revelar la placa.

Las placas requirieron de 5 corrimientos para lograr una separación significativa entre la glucosa y la fructosa.

La solución reveladora de ácido sulfúrico se aplicó por aspersión sobre la placa. La placa fue revelada en estufa a 100 - 150 °C por 10 min hasta la aparición de manchas café bien definidas.

Los R_f se calcularon según la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{D_m}{F}$$

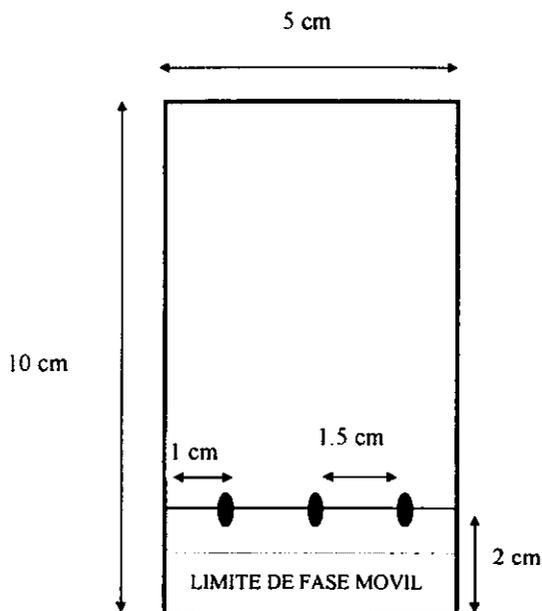
Donde:

D_m = Distancia recorrida por la mancha desde su punto de aplicación, expresada en cm

F = Frente. Distancia recorrida por la fase móvil, medida desde el punto de aplicación de las muestras, expresada en cm.

Nota: Las muestras se corrieron junto con la solución patrón, todas en una misma placa.

FIGURA 4.2.2.2.1. APLICACION DE MUESTRAS EN LA PLACA CROMATOGRAFICA.



4.3. OBTENCION DE POLISACARIDOS DE *Agave tequilana*.

El objetivo de hacer esta precipitación fue el comprobar que en la familia de los agaves existe la inulina como polisacárido de reserva y tener un punto de comparación.

4.3.1. OBTENCION DE LOS POLISACARIDOS.

El precipitado fue obtenido a partir del corazón de *Agave tequilana* procedente de Tequila, Jalisco. Se pesó 1 kg del corazón y se procedió a la extracción de los polifruktanos según lo descrito por Blanco-Sánchez. (1979). El procedimiento general se muestra en la Figura 4.3.1.1.

4.3.1.1. OBTENCION DEL JUGO CRUDO DE AGAVE

- 1 kg de corazón de agave se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm³
- Se desgarró en licuadora por 3 min
- La pasta se maceró con 700 mL de agua destilada a 60-70 °C / 15-20 min en baño de temperatura controlada
- Se decantó el jugo obtenido de la maceración
- El material fibroso se envolvió en gasa y se presionó con las manos hasta la completa extracción del jugo
- El jugo extraído se mezcló con el jugo decantado

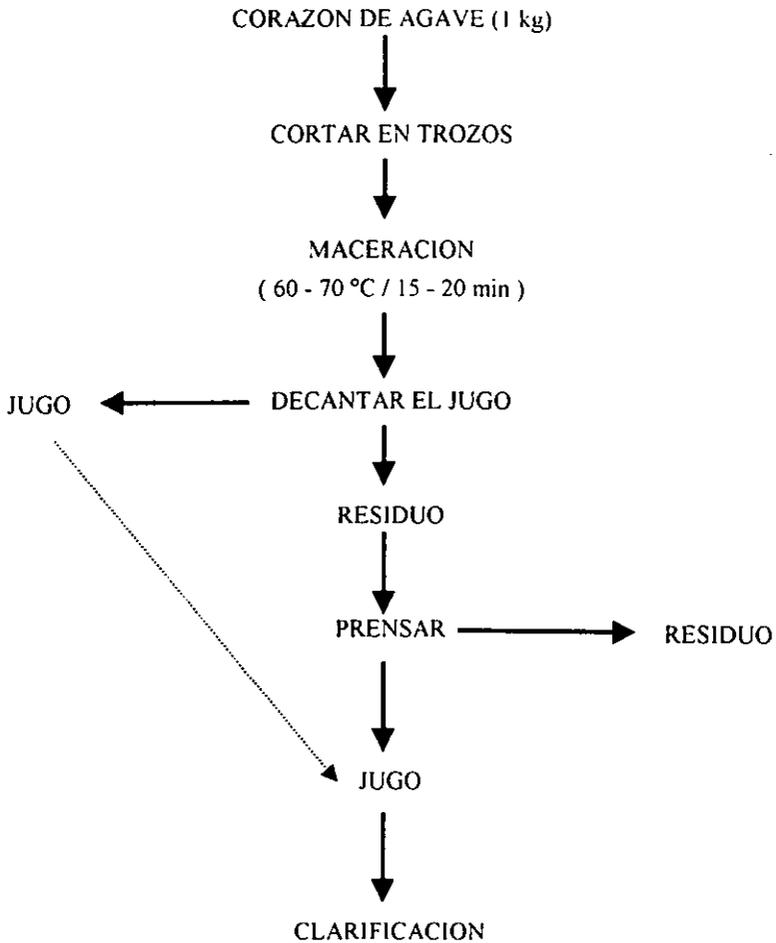
4.3.1.2. CLARIFICACION DEL JUGO CRUDO DE AGAVE

4.3.1.2.1. REACTIVOS.

- Solución saturada de acetato de plomo en agua destilada
- Solución de ácido oxálico al 10 % en agua destilada

4.3.1.2.2. TECNICA.

- Por cada 200 mL de jugo de agave crudo se adicionaron 35 mL de solución saturada de acetato de plomo y se agitó vigorosamente
- Se dejó reposar 2 horas antes de filtrar
- Al filtrado se le adicionó solución de ácido oxálico hasta la completa neutralización del acetato de plomo
- Posteriormente se filtró para eliminar el precipitado de oxalato de plomo
- Se obtuvo un licor cristalino

FIGURA 4.3.1.1. OBTENCION DEL JUGO DE *Agave tequilana*

4.3.1.3. PRECIPITACION DE POLISACARIDOS.

Se realizó según lo establecido por Srinivasan y Bathia, (1953) y Blanco-Sánchez, (1979). El procedimiento general se muestra en la figura 4.3.1.3.1.

4.3.1.3.1. REACTIVOS.

- Etanol (anhidro, J.T. Baker. Xalostoc México) al 90 % (v / v) en agua destilada
- Acido acético (glacial, J. T Baker, Xalostoc, México)

4.3.1.3.2. TECNICA

- Se mezcló el jugo clarificado de agave con etanol al 90 % en la misma proporción (1:1, v/v)
- Se dejó reposar 2 horas en refrigeración a aproximadamente 4 °C
- El precipitado obtenido se separó por centrifugación a 10 000 rpm, a 4 °C, 10 min (PRECIPITADO 1)
- Posteriormente el sobrenadante se concentró en rotavapor a la mitad del volumen original
- Se adicionó mas etanol al 90 % manteniendo la relación 1:1 (v / v)
- Se refrigeró a 4 °C / 2 horas
- El precipitado obtenido se separó por centrifugación a 10 000 rpm / 10 min / 4 °C (PRECIPITADO 2)
- El sobrenadante se mezcló con ácido acético glacial en una proporción 1:1 (v / v)
- Se dejó reposar 12 horas a temperatura ambiente
- El precipitado obtenido se separó por centrifugación a 10 000 rpm / 15 min / 4 °C (PRECIPITADO 3)
- Los precipitados obtenidos se secaron, por separado, en un vidrio de reloj en estufa a 50 °C y se pesaron

4.3.2. CARACTERIZACION DE LOS PRECIPITADOS.

Para su caracterización, los precipitados se disolvieron en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0, a una concentración de 10 mg precipitado / mL. El proceso general se muestra en la figura 4.3.2.1.

Se realizaron las siguientes determinaciones, empleándose las mismas técnicas descritas en la sección 4.2.1.:

- azúcares totales (método de fenol-sulfúrico)
- azúcares reductores directos (método de Somogyi-Nelson)
- fructosa total (método de cisteína -carbazol)
- glucosa libre (método de GOD-POD)
- azúcares no libres

hidrólisis con invertasa.

inulina (hidrólisis con inulinasa)

y cromatografía en capa fina de los precipitados sin hidrolizar y después de hidrolizados.

4.3.3. HIDROLISIS CON INVERTASA.

Se realizó según lo descrito en la sección 4.2.1.6. Dado que la solubilidad de la sacarosa en etanol (1 g / 170 mL etanol) es menor que en agua (1 g / 0.5 mL agua), existe la posibilidad de que al precipitar los polifruktanos, una parte de la sacarosa presente en el corazón del agave haya sido arrastrada junto con ellos, quedando como parte del precipitado.

Para calcular la cantidad de azúcares reductores liberados por la invertasa se utilizan las mismas fórmulas 1, 2 y 3 descritas en la sección 4.2.1.6.3.

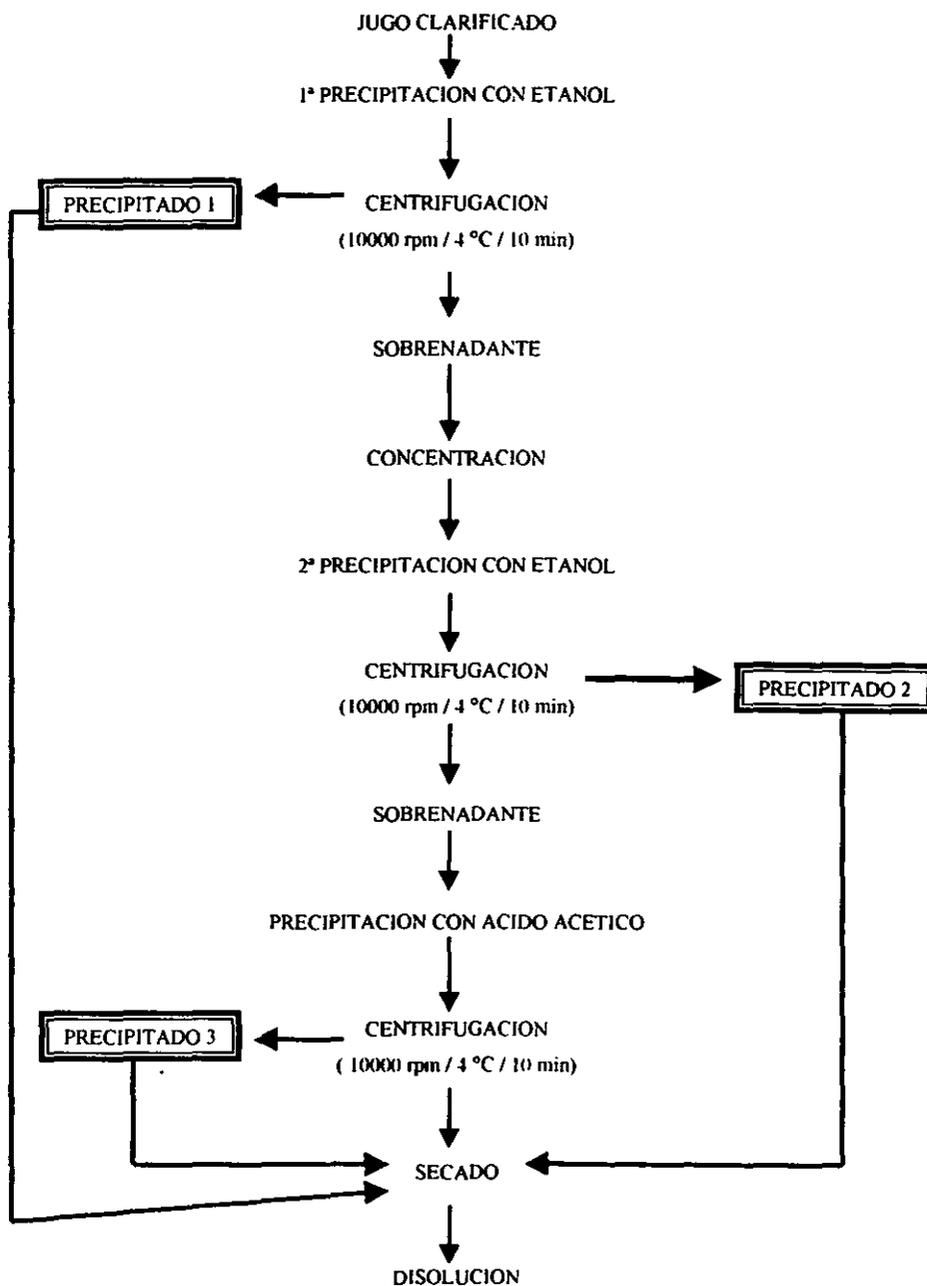
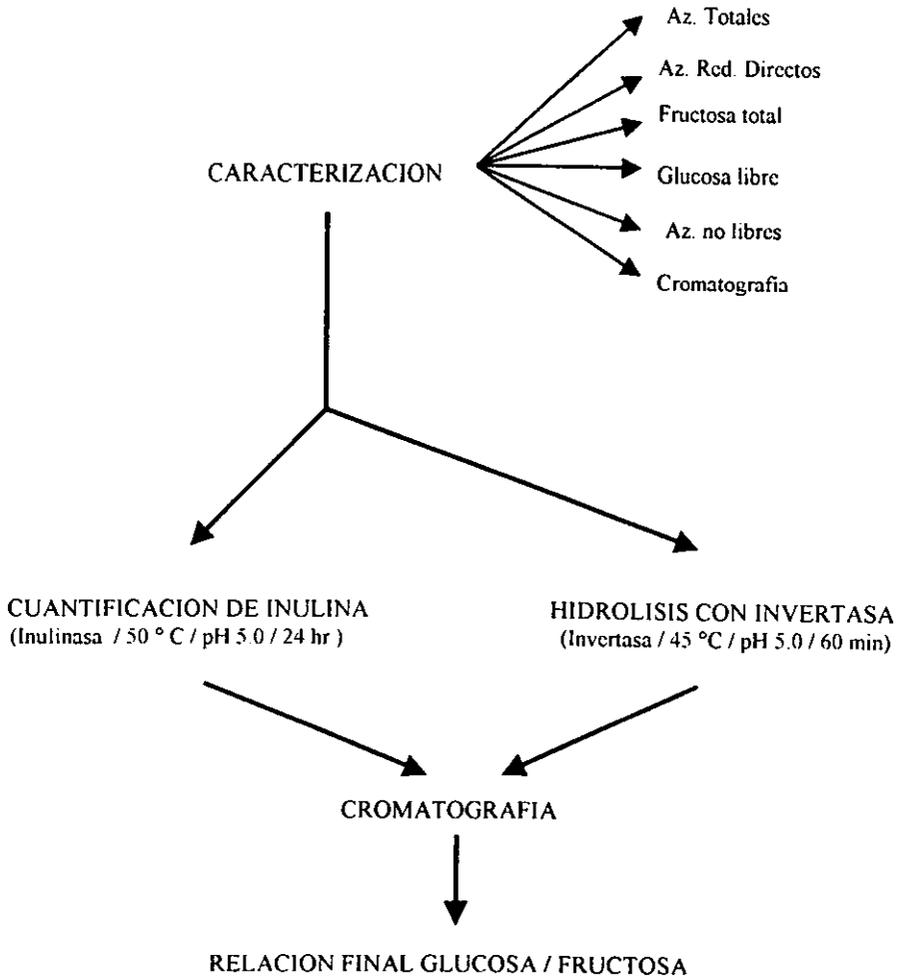
FIGURA 4.3.1.3.1 PRECIPITACION DE LOS POLISACARIDOS DE *Agave tequilana*.

FIGURA 4.3.2.1. CARACTERIZACION DE LOS PRECIPITADOS DE *Agave tequilana*



4.3.4. CUANTIFICACION DE INULINA.

Se realizó con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*, siguiendo la misma técnica que se describió en la sección 4.2.1 7.

En este caso la hidrólisis con inulinasa se realizó por separado de la hidrólisis con invertasa, es decir, el sustrato fue la solución de precipitado original, sin previa hidrólisis con invertasa, por lo que la cantidad de inulina o polifruktanos presentes se calculó como sigue:

$$AL_{inu} = AL_t - AL_i$$

(Fórmula 7)

Donde:

AL_{inu} = azúcares reductores liberados por la inulinasa

AL_t = azúcares reductores libres totales presentes después
24 hr de hidrólisis con inulinasa, incluyen a los
azúcares reductores directos

AL_i = azúcares reductores directos

La cantidad de azúcares reductores liberados por la inulinasa se consideraron como inulina o polifruktanos, dependiendo de la relación glucosa / fructosa que se obtuvo.

$$GL_{inu} = GL_t - GL_i$$

(Fórmula 8)

Donde:

GL_{inu} = glucosa liberada por la inulinasa

GL_t = glucosa liberada después de 24 hr de hidrólisis con
inulinasa, incluye a la glucosa libre inicial

GL_i = glucosa libre inicial

La fructosa liberada por la inulinasa se calculó como sigue:

$$FL_{inu} = AL_{inu} - GL_{inu} \quad (Fórmula 9)$$

Posteriormente se determinó la relación glucosa / fructosa de los azúcares liberados por la inulinasa, mediante la división de FL_{inu} / GL_{inu} . Esta relación nos da una idea del grado promedio de polimerización de los polifruktanos.

4.4. TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Todas las determinaciones de azúcares se hicieron por duplicado en tres diferentes días, por lo que al final se tuvieron seis datos de cada determinación. Con estos datos se obtuvo una media y la desviación estándar de los mismos (n-1), mostrándose ésta debajo de los resultados experimentales en la sección 5 (Resultados y Discusiones)

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

5.1. CARACTERIZACION DEL AGUAMIEL.

5.1.1. CUANTIFICACION DE AZUCARES INICIALES.

Se realizó la cuantificación de diferentes azúcares con el objeto de tener un perfil general de los mismos y conocer la proporción de éstos en el aguamiel, y determinar cuales eran los aguamieles con mayor posibilidad de contener inulina en mayor proporción. En la tabla 5.1.1.1. se muestran los resultados obtenidos.

TABLA 5.1.1.1. CARACTERIZACION DE LOS AGUAMIELES.

Aguamiel Azúcares	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
TOTALES (mg / mL)	154.5 ± 0.59	200.5 ± 3.89	154.3 ± 7.93	206.3 ± 1.05	121.2 ± 3.12	190.4 ± 4.43	184.9 ± 4.99
RED. DIRECTOS (mg / mL)	26.5 ± 0.62	14.9 ± 0.42	55.8 ± 1.73	41.8 ± 0.16	55.7 ± 1.19	15.9 ± 0.36	19.4 ± 0.37
NO LIBRES (mg / mL)	128.0	185.6	98.5	164.4	65.4	174.5	165.5
GLUCOSA LIBRE INICIAL (mg / mL)	1.5 ± 0.12	3.2 ± 0.24	8.5 ± 1.69	5.2 ± 0.05	26.0 ± 1.07	1.9 ± 0.06	4.8 ± 0.10
FRUCTOSA TOTAL (mg / mL)	ND	74.4 ± 0.00	ND	86.4 ± 1.37	ND	ND	ND

Nota:

- ND: No determinado

- A1 - A7 son las identificaciones de las diferentes muestras de aguamiel descritas en la sección 4.1.1.

Como podemos observar en la tabla 5.1.1.1., la cantidad de azúcares reductores directos y glucosa libre es muy variable entre los aguamieles, ninguno presentó la misma proporción de azúcares, aún cuando los agaves crecieron en la misma zona y tienen el mismo tiempo de haber sido capados. Posiblemente el hecho de que si el maguey fué capado a tiempo o no, influye en la composición del aguamiel provocando que exista esta variabilidad.

Se ha reportado que en el aguamiel existen otros azúcares además de la glucosa y la fructosa. Aguilar-Hernández (1956) reportó haber encontrado arabinosa, xilosa y galactosa en una concentración acumulada de 4.7 mg / mL, siendo el resto de los azúcares presentes glucosa y fructosa. Con base en esto, podríamos considerar que la mayoría de los azúcares reductores directos son en su mayoría fructosa y glucosa libres, además de otros azúcares como xilosa, arabinosa y galactosa, que constituyen una mínima parte.

En los aguamieles A1, A3, A5, A6 y A7 no se realizó la cuantificación de fructosa total porque al momento de hacer esta determinación (que fué la última determinación que se hizo), ya no estaban disponibles.

Para la posterior hidrólisis con invertasa y cuantificación de inulina se tomaron solo los aguamieles con el mayor contenido de azúcares no libres (A2, A4, A6 y A7) ya que son los que tenían más posibilidades de contener inulina en mayor proporción que los otros.

5.1.2. HIDROLISIS CON INVERTASA.

Considerando que la inulinasa empleada en este estudio hidroliza tanto a la sacarosa como a los polifruktanos, se hizo una primera hidrólisis con invertasa para hidrolizar toda la sacarosa presente en los aguamieles y dejar como único sustrato de la inulinasa a los posibles polifruktanos que no son hidrolizados por la invertasa.

Los resultados que se muestran en la tabla 5.1.2.1. nos revelan que en los aguamieles A2, A6 y A7, la mayor parte de los azúcares no libres presentes al inicio (ver tabla 5.1.1.1.) son hidrolizados por la invertasa. Por la relación glucosa / fructosa que se obtuvo en estos aguamieles después de la hidrólisis con invertasa, se puede asegurar, para aquellos aguamieles en los cuales esta relación fue cercana a 1/1 (A2, A6 y A7), que lo que se hidrolizó fué sacarosa.

En el aguamiel A4, la relación glucosa / fructosa es de 1.3, con lo que podemos comprobar lo que mencionan Hestrin y col. (1955) acerca de que la invertasa es capaz de hidrolizar a los polifruktanos de bajo peso molecular (oligofruktanos), con esto también podemos presumir la presencia de éstos en el aguamiel. En el caso de este aguamiel parece no haber sacarosa, pero probablemente se encuentra enmascarada por los oligofruktanos, es decir, en el aguamiel se encuentra una mezcla de polifruktanos de diferente contenido de fructosa que son hidrolizados por la invertasa además de la sacarosa, por lo que al final la relación promedio glucosa / fructosa nos da 1 / 3.

**TABLA 5.1.2.1. HIDROLISIS DE LOS AGUAMIELES
CON INVERTASA DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

AGUAMIEL	A2	A4	A6	A7
AZUCARES				
AZ. RED. LIBERADOS POR INVERTASA (mg / mL) ¹ (AL inv)	101.0	55.2	144.1	148.7
GLUCOSA LIBERADA POR INVERTASA (mg / mL) ² (GL inv)	41.2	13.5	74.4	69.0
FRUCTOSA LIBERADA POR INVERTASA (mg / mL) ³ (FL inv)	59.8	41.7	69.7	79.7
RELACION final GLUC / FRUC	1 / 1.4	1 / 3.1	1 / 1	1 / 1.1
% AZÚCARES HIDROLIZADOS POR INVERTASA **	54.4	33.6	82.6	89.8
%POLISACARIDOS RESTANTES POTENCIALMENTE HIDROLIZABLES. **	45.6	66.4	17.4	10.2

** Se tomaron como el 100 % los azúcares no libres calculados en la tabla 5.1.1.1. Los azúcares hidrolizados por invertasa indican el porcentaje de sacarosa presente en los aguamieles para los cuales la relación glucosa / fructosa es de 1:1.

^{1,2 y 3} Datos obtenidos según las fórmulas 1, 2 y 3 respectivamente, descritas en la sección 4.2.1.6.3., que se refieren a los azúcares liberados por acción de la invertasa.

5.1.3. CUANTIFICACION DE INULINA.

Se realizó la hidrólisis con inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* posterior a la hidrólisis con invertasa y en el mismo tubo, de esta manera sólo se cuantificaron los polifruktanos presentes.

Observamos en la tabla 5.1.3.1 que si hay actividad de la inulinasa sobre el aguamiel (por la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis), lo que indica la presencia de polifruktanos. De los resultados que se muestran en la tabla 5.1.3.1. podemos observar que la cantidad de polifruktanos presentes es baja, en relación con la cantidad de azúcares que no se hidrolizaron y con la cantidad de azúcares reductores liberados previamente por la invertasa.

En el caso del aguamiel A4, la cantidad de polifruktanos fué elevada, en este caso se consideran como tales los azúcares reductores liberados por la invertasa, (con una relación glucosa / fructosa de 1.3) que fueron de 33.6 % y los liberados por inulinasa con una relación glucosa / fructosa de 1.13 que fueron de 8.1 % para dar el total de 41.7 %.

Podemos observar también que la relación glucosa / fructosa, y por lo tanto el tamaño promedio de los fructanos, es muy variable, varía desde 2 (A7) hasta 31 (A2). Esto se puede explicar por la variación existente en los agaves. Como ya habíamos mencionado antes, aún cuando todos los agaves tienen el mismo tiempo de haber sido capados y de estar siendo raspados, las condiciones en que se realizó la capazón influyen en la composición del aguamiel, ya que si el maguey se capó joven, la cantidad de azúcares libres es baja porque aún no se han hidrolizado por completo los polisacáridos de reserva de la planta, como se puede observar para los aguamieles A2 y A4, que presentan una cantidad menor de sacarosa y oligofruktanos respectivamente que los otros dos aguamieles (AL inv. ver tabla 5.1.2.1.), también observamos que el tamaño promedio de los polifruktanos hidrolizados por la inulinasa es más grande en estos aguamieles (en el aguamiel A2 observamos incluso la presencia de inulina, con 30 unidades de fructosa), además de que el porcentaje de azúcares que no se hidrolizaron es de alrededor del 50 % (ver tabla 5.1.3.1.), los cuales probablemente pertenecen a las gomas presentes en el aguamiel, lo que indicaría que se caparon jóvenes. En los magueyes capados en el momento de alcanzar su madurez, antes de iniciar la floración, esta relación es inversa, hay mayor cantidad de azúcares libres y de polisacáridos de bajo peso molecular, tal es el caso de los aguamieles A6 y A7, donde el contenido de sacarosa es elevado, al realizar la hidrólisis con inulinasa, encontramos que el tamaño promedio de los polifruktanos hidrolizados es pequeño y el porcentaje de polisacáridos no hidrolizados es menor del 8 %.

TABLA 5.1.3.1. CUANTIFICACION DE INULINA EN AGUAMIELES
CON INULINASA DE *Kluyveromyces marxianus*.

AGUAMIEL		A2	A4	A6	A7
AZUCARES					
AZ. RED. LIBERADOS POR INULINASA (mg/mL) ⁴ (AL inu)		8.0	13.4	17.7	7.1
GLUCOSA LIBERADA POR INULINASA (mg/mL) ⁵ (GL inu)		0.2	0.9	2.4	2.0
FRUCTOSA LIBERADA POR INULINASA (mg/mL) ⁶ (FL inu)		7.8	12.5	15.3	5.1
RELACION GLUC / FRUC		1 / 30.7	1 / 13.5	1 / 6.4	1 / 2.5
% AZUCARES HIDROLIZADOS **	Por invertasa	54.4	33.6	82.6	89.8
	Por inulinasa	4.3	8.1	10.1	4.3
	totales	58.7	41.7	92.7	94.1
% POLIFRUCTANOS ***		4.0	33.2	9.3	3.9
% POLISACARIDOS NO HIDROLIZADOS **		41.3	58.3	7.2	5.9

** Expresados en relación a los azúcares no libres presentes en los aguamieles (ver tabla 5.1.1.1.)

*** Expresados como porcentaje de los azúcares totales presentes en el aguamiel (ver tabla 5.1.1.1.)

^{4,5 y 6} Datos obtenidos según las fórmulas 4, 5 y 6, respectivamente, descritas en la sección 4.2.1.7.3., que se refieren a la cantidad de azúcares reductores liberados por la inulinasa.

En el aguamiel A7 encontramos un dato interesante, el polifrufructano hidrolizado por la inulinasa tiene una relación glucosa / fructosa de 1:3, y no fué hidrolizado por la invertasa. Si observamos la tabla 5.1.2.1., podemos ver que este aguamiel es el que presenta el mayor contenido de sacarosa, a diferencia de los otros aguamieles. En este caso pudo suceder que como el contenido de sacarosa es elevado, la invertasa sólo hidrolizó a ésta en el período que se dejó actuar a la enzima, no

alcanzando a hidrolizar a los oligofructanos presentes, por lo cual al realizar la hidrólisis con inulinasa, ésta si los hidroliza.

5.1.4. COMPOSICION DE LOS AGUAMIELES HIDROLIZADOS.

En la tabla 5.1.4.1. se muestra la composición en porcentaje de los aguamieles analizados, donde puede observarse mejor su variabilidad. Los porcentajes se calcularon con base en el contenido de azúcares totales presentes en cada aguamiel (ver tabla 5.1.1.1.), tomando éstos como el 100 %. También observamos que en los aguamieles A6 y A7 el porcentaje de sacarosa es elevado, en comparación con los otros dos aguamieles. El porcentaje de polifructanos es muy variable entre los diferentes aguamieles, presentándose en el aguamiel A4 el mayor porcentaje (33.2 %).

En la tabla 5.1.4.1. se observa que para los aguamieles A2 y A4 los porcentajes de liberación de fructosa por las enzimas invertasa e inulinasa son del 90.7 y 62.8 % respectivamente respecto a la fructosa total presente en el aguamiel, en estos casos no podemos hablar de un 100 % de liberación de fructosa ya que parte de la fructosa total es fructosa libre que se encuentra presente en el aguamiel de manera natural (está considerada dentro de los azúcares reductores directos, ver tabla 5.1.1.1.), pero no esta cuantificada.

Por los resultados obtenidos podemos decir que en el aguamiel sí están presentes los polifructanos. Estos se encuentran en baja proporción respecto a los azúcares no libres presentes en el aguamiel, sin embargo, su presencia indica que posiblemente en los tejidos de la planta, estos polifructanos se encuentren en mayor proporción o bien, si se estudiara el jugo del agave pulquero en un estadio de madurez temprano, tal vez se pueda encontrar una mayor cantidad de polifructanos y tal vez con un tamaño mayor.

**TABLA 5.1.4.1. COMPOSICION EN PORCENTAJE
DE LOS AGUAMIELES HIDROLIZADOS.**

AGUAMIEL	A2	A4	A6	A7
%				
% AZ. RED. DIRECTOS	7.4	20.3	8.3	10.5
% GLUCOSA LIBRE	1.6	2.5	1.0	2.6
% AZ. NO LIBRES	92.6	79.7	91.6	89.5
% FRUCTOSA TOTAL	37.1	41.9	ND	ND
% SACAROSA	50.4	**	75.7	80.4
% POLIFRUCTANOS	4.00	33.2	9.3	3.8
% FRUCTOSA LIBERADA INVERTASA E INULINASA	90.7	62.8	ND	ND
% AZÚCARES NO LIBERADOS	38.2	46.5	6.6	5.2

** En este caso no se da un porcentaje de sacarosa ya que la relación glucosa / fructosa de los azúcares liberados por la invertasa fué de 1 / 3

ND: No determinado

5.1.5. CROMATOGRAFIA DE LOS AGUAMIELES.

En la tabla 5.1 5.1. se muestran los resultados de las cromatografias realizadas a los aguamieles. Se corrieron los aguamieles sin hidrolizar y después de hidrolizarlos con invertasa e inulinasa para observar si habia algún cambio en el patrón cromatográfico de éstos.

En la figura 5.1 5.1. solo se muestran las cromatografias de los aguamieles A2 y A4 ya que fueron los que presentaron polifruktanos mas grandes y por tanto se esperaba ver un cambio mayor en las intensidades de las manchas por una mayor liberación de azúcares.

TABLA 5.1.5.1. CROMATOGRAFIA DE AGUAMIELES SIN HIDROLIZAR E HIDROLIZADOS.

CROMATOGRAFIA DE AGUAMIEL A2

PM	PATRON	Rf	AGUAMIEL SIN HIDROLIZAR (Rf)	AGUAMIEL HIDROLIZADO INVERTASA E INULINASA (Rf)
1	Inulina	0.0000	0.0000	0.0000
2	Sacarosa	0.1176	0.1029	-----
3	Glucosa	0.2647	0.2353	0.1911
4	Fructosa	0.3676	0.3235	0.2941

CROMATOGRAFIA DE AGUAMIEL A4

PM	PATRON	Rf	AGUAMIEL SIN HIDROLIZAR (Rf)	AGUAMIEL HIDROLIZADO INVERTASA E INULINASA (Rf)
1	Inulina	0.0000	0.0000	0.0000
2	-----	-----	0.0429	-----
3	Sacarosa	0.0986	-----	-----
4	Glucosa	0.2535	0.2286	0.2143
5	Fructosa	0.3521	0.3286	0.3000

TABLA 5.1.5.1. Continuación.....

CROMATOGRAFIA DE AGUAMIEL A6

PM	PATRON	Rf	AGUAMIEL SIN HIDROLIZAR (Rf)	AGUAMIEL HIDROLIZADO INVERTASA E INULINASA (Rf)
1	Inulina	0.0000	0.0000	0.0000
2	Sacarosa	0.1083	0.0954	-----
3	Glucosa	0.2162	0.1987	0.1875
4	Fructosa	0.3044	0.2865	0.2349

CROMATOGRAFIA DE AGUAMIEL A7

PM	PATRON	Rf	AGUAMIEL SIN HIDROLIZAR (Rf)	AGUAMIEL HIDROLIZADO INVERTASA E INULINASA (Rf)
1	Inulina	0.0000	0.0000	0.0000
2	Sacarosa	0.0925	0.0832	-----
3	Glucosa	0.2472	0.2246	0.2045
4	Fructosa	0.3208	0.2934	0.2587

PM : Posición de la mancha en el cromatograma.

Podemos observar en la figura 5.1.5.1. que en los aguamieles sin hidrolizar aparecen las manchas de los polisacáridos (inulina, polifruktanos y posiblemente gomas), de sacarosa, glucosa y fructosa libres. En los aguamieles hidrolizados, sigue apareciendo la misma mancha en el punto de aplicación, la cual es característica de polisacáridos como la inulina, pero puede pertenecer también a las posibles gomas presentes en el aguamiel, que finalmente son polisacáridos.

En todas las placas se observó un ligero aumento en la intensidad de las manchas de la glucosa y la fructosa después de las hidrólisis con invertasa e inulinasa en relación con los aguamieles sin hidrolizar (ver figura 5.1.5.1.), esto es debido al incremento en la concentración de estos azúcares después de las hidrólisis (ver tablas 5.1.1.1., 5.1.2.1. y 5.1.3.1.).

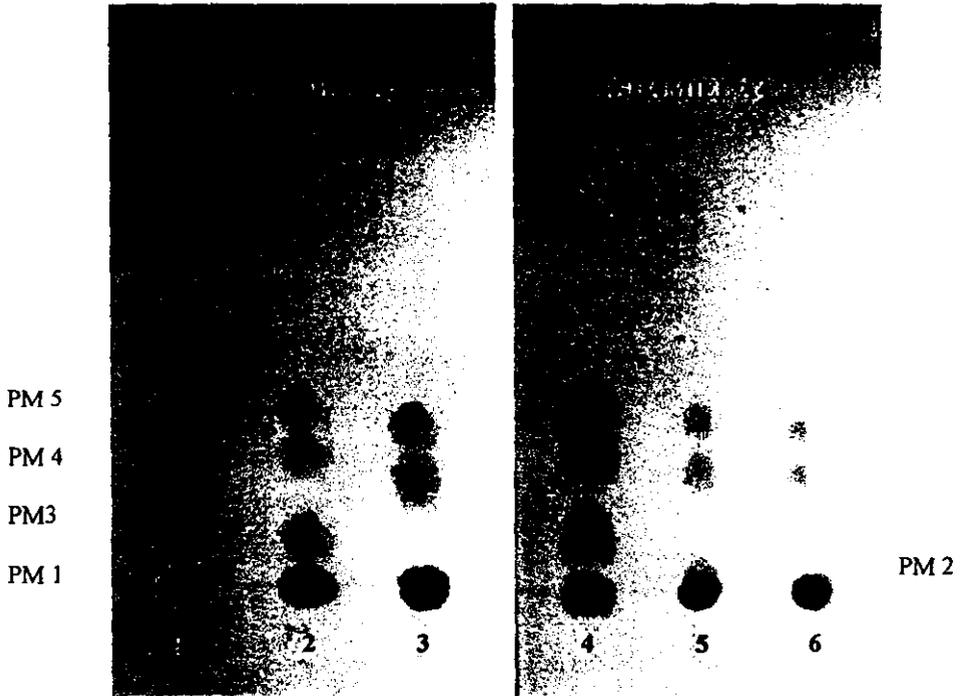
En la tabla 5.1.5.1., observamos que hay una ligera variación en los Rf de los patrones y de los aguamieles sin hidrolizar, esto puede deberse a que los aguamieles no son soluciones puras de

azúcares, sino que contienen otras sustancias que posiblemente están interfiriendo en el corrimiento. Según Touchstone (1992), si un soluto tiene mayor interacción con la fase móvil que con el adsorbente, el corrimiento de las muestras será menor, posiblemente esto es lo que suceda en nuestro caso. En los aguamieles hidrolizados, la variación en los R_f es más pronunciada debido probablemente a la interacción de las enzimas con la fase móvil, que producen el mismo efecto mencionado anteriormente. Sin embargo, a pesar de las variaciones en los R_f , el patrón de las manchas en las placas cromatográficas es el mismo para los aguamieles sin hidrolizar y para las soluciones patrón, así como para los aguamieles sin hidrolizar e hidrolizados, por lo que asumimos que las manchas de las muestras de aguamieles corresponden con las soluciones patrón.

En la misma figura podemos observar que en el aguamiel A4 aparece una mancha cerca del punto de aplicación cuyo R_f no corresponde a la sacarosa (0.0429); si observamos la tabla 5.1.2.1, vemos que en este aguamiel la invertasa hidrolizó un oligofructano de 3 unidades de fructosa, por lo que podemos suponer que esta mancha corresponde a dicho oligofructano.

No se detectaron otro tipo de azúcares a parte de la sacarosa, glucosa y fructosa, lo que indica que si existe otro azúcar diferente en el aguamiel, éste se encuentra por debajo del límite de detección del método de revelado empleado, o bien no se logró separar con la fase móvil empleada.

FIGURA 5.1.5.1. CROMATOGRAMAS DE AGUAMIELES A2 Y A4 Y SUS HIDROLIZADOS.



PM: Posición de la mancha en el cromatograma

- PM 1: Inulina
- PM 2: Posiblemente un oligofructano
- PM 3: Sacarosa
- PM 4: Glucosa
- PM 5: Fructosa

1. Patrones: inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, en orden ascendente de corrimiento
2. Aguamiel A2, sin hidrolizar
3. Aguamiel A2, hidrolizado con invertasa e inulinasa
4. Patrones: inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, en orden ascendente de corrimiento
5. Aguamiel A4, sin hidrolizar
6. Aguamiel A4, hidrolizado con invertasa e inulinasa

5.2. POLISACARIDOS DE *Agave tequilana*

Considerando la posibilidad de que en los tejidos del *Agave atrovirens* se encontraran polifruktanos de mayor tamaño y en mayor cantidad que los encontrados en el aguamiel, se procedió a estudiar el corazón de *Agave tequilana* que al momento de realizar este estudio se encontraba disponible en el laboratorio. El estudio realizado a este agave se hizo con el propósito de corroborar que la inulina se encuentra presente en los tejidos de la planta como polisacárido de reserva en la familia de las Amarilidáceas.

En la tabla 5.2.1. se muestran las características generales de los precipitados obtenidos.

TABLA 5.2.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS
PRECIPITADOS DE *Agave tequilana*.

PRECIPITADO CARACTERISTICA	PRECIPITADO 1	PRECIPITADO 2	PRECIPITADO 3
g / kg CORAZON	0.9307	7.3636	15.4727
CONSISTENCIA	Sólida	chiclosa	chiclosa
COLOR	Café claro	ámbar	ámbar
SOLUBILIDAD	no es completamente soluble en agua aún despues de calentar a ebullición	fácilmente soluble en agua a temperatura ambiente	fácilmente soluble en agua a temperatura ambiente

Es de notar que el precipitado 1 es poco soluble en agua, aún cuando la solución se calentó a ebullición no se logró la solubilización total del precipitado. En contraste, los precipitados 2 y 3 son fácilmente solubles en agua a temperatura ambiente. La inulina que se utilizó como patrón en este trabajo se solubiliza completamente en agua a 55 °C, con base en esto podemos decir que tal vez en el precipitado 1 se encuentran polifruktanos de alto peso molecular, mientras que en los otros precipitados el tamaño de cadena de los polifruktanos puede ser pequeño. Phelps (1965), reporta que los precipitados de polifruktanos obtenidos a partir de etanol son mucho mas solubles que aquellos obtenidos a partir de agua, por lo que se esperaría que el precipitado 1 fuera soluble en agua.

Se observa también que la mayor cantidad de precipitado se obtiene con la precipitación con ácido acético (precipitado 3). El menor rendimiento de precipitación se obtiene con la primera precipitación con etanol (precipitado 1), lo cual puede deberse a que en este momento se realiza una precipitación "gruesa", es decir, en este precipitado se obtiene polifruktanos así como otros polisacáridos que pueden ser gomas vegetales presentes también en el corazón de agave.

5.2.1. CUANTIFICACION DE AZUCARES INICIALES.

Se realizó la cuantificación de los azúcares iniciales con el objeto de tener un perfil de los azúcares presentes al inicio en cada precipitado, así como la proporción en la que se encuentran.

Los resultados se muestran en la tabla 5.2.1.1. y se expresan en mg de azúcar / g de precipitado.

TABLA 5.2.1.1. CARACTERIZACION DE LOS PRECIPITADOS
DE *Agave tequilana*.

PRECIPITADO AZUCARES	PRECIPITADO 1	PRECIPITADO 2	PRECIPITADO 3
TOTALES mg / g	664.9 -30.07	981.0 ± 53.11	961.6 ± 24.43
REDUCTORES DIRECTOS mg / g	19.5 - 0.46	237.2 ± 7.89	260.6 ± 3.41
NO LIBRES mg / g	646.3	762.8	701.0
GLUCOSA LIBRE mg / g	6.0 - 0.48	2.3 ± 0.55	3.1 ± 0.27
FRUCTOSA TOTAL mg / g	459.2 - 7.69	886.1 ± 12.75	924.6 ± 9.61

Observamos que para el precipitado 1, la cantidad de azúcares totales es menor que para los otros dos precipitados, esto se debe a que como éste fué el primer precipitado que se obtuvo, junto con los polisacáridos probablemente se precipitaron parte de las proteínas que no fueron eliminadas

por la precipitación con acetato de plomo, lo cual hace que sea menor la cantidad de azúcares presentes en el precipitado.

En ninguno de los tres precipitados se pudo obtener un 100 % de azúcares, ya que contienen un poco de agua que no fué eliminada durante el secado, además como se almacenaron a temperatura ambiente, pudieron haberse hidratado ligeramente en esta etapa.

Por la cantidad de fructosa total en los precipitados, podemos asegurar que lo que se precipitó fueron polifruktanos, ya que en los precipitados 2 y 3 el 90 % de los azúcares totales están formados por fructosa.

Observamos también que hay presencia de azúcares reductores directos en los precipitados, lo cual se debe a que la solubilidad de los azúcares decrece cuando se encuentran en etanol (ver tabla 5.2.1.2.), por lo que parte de los azúcares libres del jugo se arrastraron junto con los polisacáridos. En el precipitado 3, los azúcares reductores libres se encuentran en mayor proporción que en los otros dos precipitados; estos azúcares provienen probablemente por una parte de la precipitación, y por otra de la hidrólisis de los polifruktanos durante la precipitación o durante el almacenamiento, ya que ambas se realizaron a temperatura ambiente, pudiéndose hidrolizar parte de los polifruktanos en esta etapa también.

**TABLA 5.2.1.2. SOLUBILIDAD DE ALGUNOS AZUCARES
EN ETANOL Y AGUA A 20 °C.**

DISOLVENTE AZUCAR	ETANOL	AGUA
FRUCTOSA	1 g / 15 mL	completamente soluble
GLUCOSA	poco soluble	1 g / 1 mL
SACAROSA	1 g / 170 mL	1 g / 0.5 mL

Fuente: The MERCK Index (1983)

5.2.2. HIDROLISIS CON INVERTASA.

Dado que la solubilidad de la sacarosa en etanol es menor que en agua (ver tabla 5.2.1.2.) existe la posibilidad de que al precipitar los polifruktanos, una parte de la sacarosa presente en el corazón del agave haya sido arrastrada junto con ellos, quedando como parte del precipitado, por lo que se realizó la hidrólisis con invertasa para determinar si ésta se encontraba presente en los precipitados.

En la tabla 5.2.2.1. se muestran los resultados obtenidos después de la hidrólisis con invertasa. Podemos observar que sí hay liberación de azúcares reductores, quedando en mayor proporción la fructosa. Por la relación glucosa / fructosa, observamos que hay presencia de oligofruktanos en los precipitados y que la invertasa es capaz de hidrolizarlos.

Es de notar que en el precipitado 1, la relación glucosa / fructosa es de 1 / 2, lo que puede indicar la presencia de sacarosa pero en una concentración baja. Los otros precipitados presentan una relación glucosa / fructosa de 1 / 4, lo que indica la presencia de oligofruktanos.

En ninguno de los tres casos podemos descartar la presencia de sacarosa, porque la invertasa hidroliza oligómeros de fructosa, hidrolizando entre ellos a la sacarosa, pero al final la relación glucosa / fructosa se inclina hacia la fructosa lo que hace imposible determinar si se hidrolizó sacarosa o no. Si observamos la placa cromatográfica (figura 5.2.5.1.), no se observa la mancha de sacarosa en el precipitado 3, pero en el precipitado 2 sí hay presencia de sacarosa, aunque ésta se encuentra en una concentración apenas detectable por la cromatografía.

**TABLA 5.2.2.1. HIDROLISIS DEL PRECIPITADO DE *Agave tequilana*
CON INVERTASA DE *Saccharomyces cerevisiae***

PRECIPITADO AZUCARES	PRECIPITADO 1	PRECIPITADO 2	PRECIPITADO 3
AZ. RED. LIBERADOS POR INVERTASA ⁷ mg / g (AL inv)	8.0	42.5	60.0
GLUCOSA LIBERADA POR INVERTASA ⁸ mg / g (GL inv)	2.8	7.9	12.7
FRUCTOSA LIBERADA POR INVERTASA ⁹ mg / g (FL inv)	5.2	34.7	47.3
RELACION GLUCOSA / FRUCTOSA	1 / 2	1 / 4	1 / 4

^{7, 8 y 9} Datos obtenidos según las fórmulas 1, 2 y 3 respectivamente, descritas en la sección 4.2.1.6.3.

5.2.3. CUANTIFICACION DE INULINA.

Considerando que los azúcares que hidrolizó la invertasa fueron oligofruktanos (en su mayor parte, porque no tenemos una certeza de la cantidad de sacarosa realmente presente en los precipitados), se procedió a realizar la hidrólisis con inulinasa, para hacer la cuantificación de polifruktanos.

En la tabla 5.2.3.1. observamos que hay una considerable liberación de fructosa después de la hidrólisis con inulinasa, en este caso la inulinasa hidrolizó los mismos polímeros que hidrolizó la invertasa y aparte hidrolizó los polifruktanos de mayor peso molecular que no fueron hidrolizados por la invertasa.

Se presenta una gran variabilidad en cuanto a los tamaños promedio de los polifruktanos en los tres diferentes precipitados, desde 9 hasta 27 (ver la relación glucosa / fructosa en la tabla 5.2.3.1.), lo que indica que en la planta los polifruktanos son desdoblados en cadenas pequeñas que son fácilmente metabolizadas para el crecimiento de la planta. En la práctica no se ha podido establecer un tamaño definido para las cadenas de inulina. Normalmente se denomina como inulina a las cadenas de 30 o más unidades de fructosa, y a las cadenas con menos unidades de fructosa se les denomina polifruktanos.

TABLA 5.2.3.1. CUANTIFICACION DE INULINA EN PRECIPITADOS
DE *Agave tequilana*

PRECIPITADO	PRECIPITADO 1	PRECIPITADO 2	PRECIPITADO 3
AZUCARES			
AZ. RED. LIBERADOS POR INULINASA ¹⁰ (mg / g)	56.8	303.8	202.1
GLUCOSA LIBERADA POR INULINASA ¹¹ (mg / g)	5.7	11.0	10.5
FRUCTOSA LIBERADA POR INULINASA ¹² (mg / g)	51.4	292.7	191.6
RELACION GLUC / FRUCT	1 / 9	1 / 27	1 / 18

^{10,11 y 12} Datos obtenidos según las fórmulas 7, 8 y 9 descritas en la sección 4.3.2.

5.2.4. COMPOSICION DE LOS PRECIPITADOS HIDROLIZADOS.

En la tabla 5.2.4.1. se muestra la composición final en porcentaje de los precipitados obtenidos del corazón de agave tequilero, después de haber sido hidrolizados con inulinasa. Los porcentajes están calculados con base en el contenido de azúcares totales del precipitado (ver tabla 5.2.1.1.) tomando éstos como el 100 % , excepto en los casos que se especifique otra cosa.

Tomando la fructosa liberada por la inulinasa podemos calcular el porcentaje de fructosa liberada por la enzima con base en la fructosa total presente en los precipitados. Observamos que los porcentajes de liberación son de 11.5, 33.0 y 20.7 % para los precipitados 1, 2 y 3 respectivamente, siendo el precipitado 2 el que muestra el mayor porcentaje.

Dada la concentración de azúcares totales en los precipitados 1 y 2 (ver tabla 5.2.1.1.), podemos considerar que el precipitado 2 es mas puro que el 1 debido a que en el precipitado 1 se pudieron arrastrar junto con los azúcares, algo de las proteínas que no se eliminaron durante la precipitación con acetato de plomo, además en el precipitado 2 la relación azúcares totales / fructosa total es mayor que en el precipitado 1, indicando que en el precipitado 2 la proporción de polifruktanos es mayor que en el precipitado 1. En cuanto al precipitado 3, éste se considera como la última recuperación de polifruktanos, estando este formado también en su mayor parte por polifruktanos, ya que el porcentaje de fructosa total también es alto, con respecto al porcentaje de azúcares totales (que en la tabla 5.2.4.1. se consideraran como el 100 %).

En comparación con el aguamiel de agave pulquero, la cantidad de polifruktanos presentes en el agave tequilero es mayor, así como el tamaño promedio de éstos.

TABLA 5.2.4.1. COMPOSICION DE LOS PRECIPITADOS HIDROLIZADOS
DE *Agave tequilana*

PRECIPITADO AZUCARES	PRECIPITADO 1	PRECIPITADO 2	PRECIPITADO 3
% AZ. EN PRECIPITADO	66.5	98.1	96.2

% AZ. RED. DIRECTOS *	2.9	24.2	27.1
% GLUCOSA LIBRE *	0.9	0.2	0.3
% AZ. NO LIBRES *	97.2	77.7	72.9
% FRUCTOSA TOTAL *	65.2	90.3	96.2
% AZ. RED. LIBERADOS POR INVERTASA ***	1.2	5.6	8.5
% AZ. RED. LIBERADOS POR INULINASA ***	8.8	39.8	28.8
% FRUCTOSA LIBERADA POR INULINASA **	11.0	33.0	20.7
% POLISACARIDOS NO LIBERADOS POR INULINASA ***	91.2	60.2	71.2

* Calculados tomando como el 100 % la cantidad de azúcares totales presentes en los precipitados.

** Calculado en base a la fructosa total presente en cada precipitado (ver tabla 5.2.1.1.)

*** Expresados como porcentaje de los azúcares no libres presentes inicialmente en los precipitados (ver tabla 5.2.1.1.)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

5.2.5. CROMATOGRAFIA DE LOS PRECIPITADOS DE *Agave tequilana*.

En la tabla 5.2.5.1. se muestran los Rf de los precipitados de agave tequilero y de sus hidrolizados, y en la figura 5.2.5.1. se muestra el cromatograma donde se pueden apreciar claramente las diferentes manchas. Se corrieron las muestras originales, después de hidrolizarlas con invertasa y después de la hidrólisis con inulinasa para observar si había algún cambio en el cromatograma. Solo se corrieron los precipitados 2 y 3 ya que el precipitado 1 no presenta una hidrólisis significativa por lo que no se esperaría una variación detectable en el cromatograma.

En el carril de los patrones, la glucosa y la fructosa se logran separar ligeramente (PM 4 y 5 respectivamente). En las muestras no se alcanza a percibir la glucosa ya que la concentración de ésta es muy baja en comparación con la de fructosa (ver tablas 5.2.2.1. y 5.2.3.1.), además considerando que las muestras están diluidas, la cantidad de glucosa presente se vuelve aún mas pequeña.

Los Rf de las manchas 1 y 5 (PM 1 y 5) corresponden a los polifruktanos y a la fructosa respectivamente. En el caso de la mancha 1 (PM 1), la intensidad disminuye después de la hidrólisis con invertasa y esta disminución es más pronunciada después de la hidrólisis con inulinasa, respecto a los precipitados sin hidrolizar (ver figura 5.2.5.1.). Para el caso de la mancha 5 (PM 5), la intensidad aumenta después de las hidrólisis con invertasa, siendo también más pronunciado el incremento después de la hidrólisis con inulinasa, ya que se produce gran cantidad de fructosa (ver tablas 5.2.2.1. y 5.2.3.1.).

En la tabla 5.2.5.1. es interesante observar que en los precipitados sin hidrolizar aparece una mancha muy cerca del punto de aplicación (PM 2), la cual seguramente corresponde a un oligofruktan, el cual es hidrolizado por la invertasa, ya que esta mancha desaparece después de la hidrólisis con ésta (ver figura 5.2.5.1.).

En ninguno de los dos precipitados aparece la mancha de la sacarosa (PM 3), por lo que podemos presumir que ésta, o bien no esta presente, o por su baja concentración no es detectable por la cromatografía.

TABLA 5.2.5.1. CROMATOGRAFIA DE LOS PRECIPITADOS DE *Agave tequilana* SIN HIDROLIZAR E HIDROLIZADOS

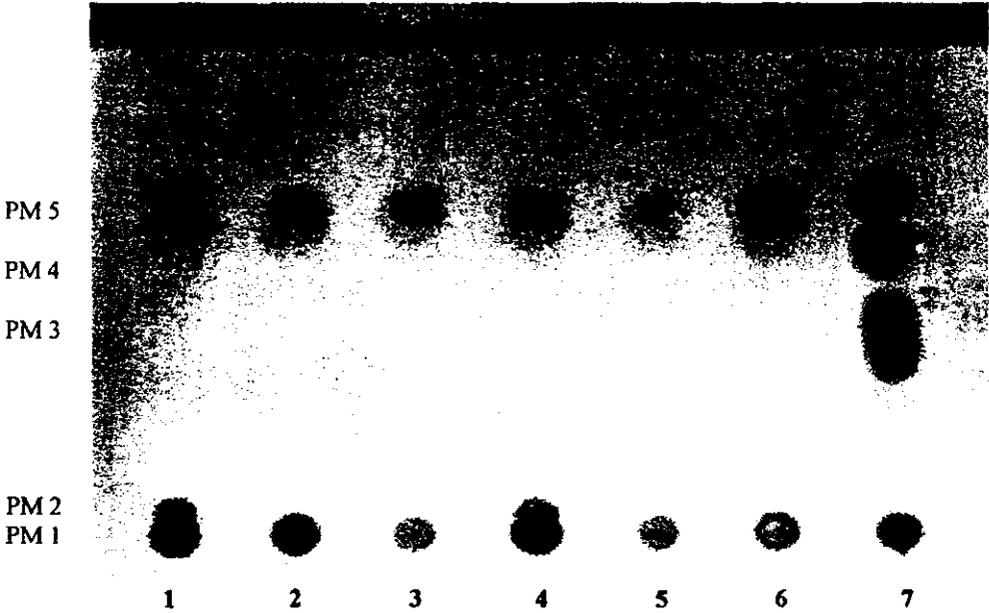
PATRON	Rf	PATRON	Rf
Inulina PM 1	0.0000	Glucosa PM 4	0.6216
Sacarosa PM 3	0.4181	Fructosa PM 5	0.6757

PP \ PM	PP 2 sin hidrólisis	PP 2 hidrólisis invertasa	PP 2 hidrólisis inulinasa	PP 3 sin hidrólisis	PP 3 hidrólisis invertasa	PP 3 hidrólisis inulinasa
1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0270	---	---	0.0405	---	---
3	---	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---	---
5	0.6622	0.6622	0.6622	0.6757	0.6622	0.6622

PM : Posición de la mancha en el cromatograma (ver figura 5.2.5.1.)

PP : Precipitado

**FIGURA 5.2.5.1. PLACAS CROMATOGRÁFICAS DE
LOS PRECIPITADOS DE *Agave tequilana***



PM: Posición de la mancha en el cromatograma

PM 1: Inulina

PM 2: Posiblemente un oligofructano

PM 3: Sacarosa

PM 4: Glucosa

PM 5: Fructosa .

1. Precipitado 2, sin hidrolizar
2. Precipitado 2, hidrolizado con invertasa
3. Precipitado 2, hidrolizado con inulinasa
4. Precipitado 3, sin hidrolizar
5. Precipitado 3, hidrolizado con invertasa
6. Precipitado 3, hidrolizado con inulinasa
7. Patrones: inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, en orden ascendente de corrimiento

5.4. DISCUSION FINAL.

En el aguamiel de *Agave atrovirens* encontramos aproximadamente entre 8 - 17 g de polifruktanos por litro de aguamiel ¹ que son de cadena corta (de 13 unidades de fructosa en promedio, pero se logró identificar incluso inulina en el aguamiel A2); mientras que en el corazón de *Agave tequilana* encontramos 23.7 g polifruktanos / kg corazón ² que, en general, son de cadena mas larga (de hasta 27 unidades de fructosa en promedio, lo cual se considera como inulina) que los del aguamiel.

Con estos resultados podemos pensar que tal vez en los tejidos del *Agave atrovirens* se encuentran polifruktanos de peso molecular mas alto que los encontrados en el aguamiel porque, dado que el aguamiel es la savia que nutre a la planta, para ésta es más fácil metabolizar los azúcares de bajo peso molecular que los polimeros grandes. Además hay que considerar que los magueyes de pulque se capan una vez que han alcanzado la madurez y están prontos a iniciar la floración, esto provoca que los polisacáridos de reserva sean hidrolizados por las enzimas propias de la planta para producir polimeros de menor tamaño, azúcares libres y sacarosa que son fácilmente metabolizados para favorecer el desarrollo de la flor, mientras que en el *Agave tequilana* los polifruktanos se encuentran aún en su estado nativo, prácticamente sin hidrolizar y en mayor cantidad.

Si se estudiaran los tejidos del agave pulquero en un estado de madurez menos avanzado, existe la posibilidad de encontrar mayor proporción de polifruktanos e incluso encontrar a la inulina como tal (con 30 unidades de fructosa).

Es interesante observar que en el corazón de agave tequilero se encuentran polimeros de, en promedio, 27 unidades de fructosa, siendo que en la literatura se reporta que la inulina extraída de tubérculos de alcachofa de Jerusalem y de raices de achicoria, tiene de 30 a 50 unidades de fructosa, considerando que se trata de especies diferentes, es interesante observar la variabilidad interespecies de la inulina.

¹ Calculados tomando en cuenta la liberación por inulinasa de entre 8 y 17 mg de az. reductores / mL de aguamiel (ver tabla 5.1.3.1.)

² Se obtienen por la relación por kg de corazón de los g de precipitado obtenidos. Es decir, sumando la cantidad de azúcares liberados por la inulinasa en los tres precipitados, lo cual nos da 362.65 mg por 23.76 g de precipitado (que es la suma de los pesos obtenidos de los tres precipitados).

Cabe mencionar que en la actualidad existen en el mercado jarabes con alto contenido de fructosa elaborados a partir de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) en los que se declara un contenido de 90 a 92 % de fructosa (en base seca), tal es el caso de la miel de agave NATUREL® elaborada por IIDEA (Industrializadora Integral del Agave) en el estado de Jalisco, con usos industriales potenciales en jugos, mermeladas y panificación. Existe también otra compañía productora de miel de agave, MIELAGAVE, ubicada en Jalisco que elabora el producto conocido como AGAVEN® con un contenido de hasta 96 % de fructosa (en base seca).

También se obtuvo información acerca de la invertasa de *Sacharomyces cerevisiae*, observando que tanto en el aguamiel como en los precipitados de agave tequilero es capaz de hidrolizar oligofructanos.

6. CONCLUSIONES

- ◆ Al final de la hidrólisis con inulinasa, la cantidad de fructosa liberada es mayor que la de glucosa, por lo cual se deduce que en el aguamiel existen cadenas de fructosa (polifruktanos).
- ◆ Hay variabilidad en el contenido de polifruktanos (determinados como la cantidad de azúcares reductores liberados después de la hidrólisis con inulinasa) entre las distintas muestras de aguamiel.
- ◆ La relación glucosa / fructosa obtenida después de la hidrólisis con inulinasa es un indicio del grado promedio de polimerización de los polifruktanos presentes, encontrándose que hay variabilidad entre las diferentes muestras de aguamiel.
- ◆ Se observó que la composición de azúcares de los aguamieles es muy variable, dependiendo de las condiciones de cultivo, del clima, de la forma y del grado de madurez en que fueron capados los magueyes.
- ◆ Se comprobó que en el corazón de agave tequilero existen los polifruktanos como polisacáridos de reserva, lo cual hace muy probable que en el corazón del agave pulquero también se encuentren estos polifruktanos.
- ◆ En los precipitados de agave tequilero se encontraron polifruktanos de diferente grado de polimerización, desde 5 hasta 29, mientras que en el aguamiel del agave pulquero, el grado de polimerización de los polifruktanos va desde 4 hasta 31.
- ◆ En el corazón de agave tequilero se encontraron 23.7 g de polifruktanos / kg, mientras que en los aguamieles de agave pulquero se encontraron de 8 a 17 g de polifruktanos / L.
- ◆ Se observó que la enzima invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* tiene actividad hidrolítica sobre los oligofruktanos de hasta 4 unidades de fructosa en promedio.

7. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados y las conclusiones obtenidas en el presente trabajo se hacen las siguientes recomendaciones para completar el estudio de los polifruktanos en el agave pulquero (*Agave atrovirens*):

- 1.- Hacer la cuantificación de inulina en otras partes de la planta tales como las hojas y el corazón para detectar en donde se localiza la mayor concentración de polifruktanos
- 2.- Realizar el estudio indicado en el punto 1 pero en las diferentes etapas de crecimiento de la planta para poder determinar en que estadio de madurez la planta produce la mayor cantidad de polifruktanos y poder tener un mejor aprovechamiento de ésta.
- 3.- Realizar la identificación de los azúcares presentes mediante métodos más sensibles tales como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- 4.- Una vez que se detecte la etapa de madurez y la parte de la planta en donde se encuentra la mayor concentración de polifruktanos, se podría proponer un proceso de hidrólisis enzimática con inulinasa para la obtención de jarabes de alta fructosa, o bien de fructosa pura .

8. BIBLIOGRAFIA.

- **Aguilar Hernández M. E.** (1956); Determinación de azúcares en el *Agave atrovirens* por cromatografía. TESIS, UNAM, Fac. Química, México.
- **Avigad G. y Bauer S.** (1966); Fructan hydrolases, en: Gingsburg V., Neufeld E. F., **Methods in Enzymology.**, Academic Press, New York, 18, 621 - 628.
- **Badui Dergal S.** (1981); Química de los alimentos, 1ª. Edición, 95 - 96, Ed. Alhambra, México.
- **Bajpai P. y Margaritis A.** (1985); Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulase activity in open pore gelatin matrix: 2. Application for high fructose syrup production., **Enzyme Microb. Technol.**, 7 (9), 459 - 461.
- **Bajpai P. y Margaritis A.** (1986); Optimization studies for production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke using alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*, **Process Biochem.**, 21 (1), 16 - 18.
- **Barquet Fuentes A.**, (1976); Aspectos científicos actuales del problema del pulque en México, TESIS, Fac. Química, UNAM, México.
- **Blanco Sánchez G.** (1979); Obtención de fructosa a partir de la hidrólisis de inulina por diferentes métodos, TESIS, Fac. Química, UNAM, México.
- **Byun M, y Nahm H. B.** (1978); Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis, **J. Food Sci.**, 43, 1871 - 1873.
- **Cravioto R. O., Massieu H. G., Guzmán G. J. y Calvo de la Torre J.**, (1951); Composición de los alimentos mexicanos, **Ciencia**, 11 (5-6), 129 - 155.
- **Cruz-Guerrero A., García-Peña I., Barzana E., García-Garibay M. y Gómez-Ruiz L.**, (1995); *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain, **J. Ferm. Bioeng.** 80 (2), 159 - 163

- Doty T. E. y Vanniken E., (1975); Crystalline fructose: use as food ingredient expected to increase, **Food Technol.**, 29 (11), 34 - 38.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. y Smith F., (1956); Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, **Anal. Chem.**, 28 (3), 350 - 356.
- Fleming, S. E. y GrootWassink, J. W. D., (1979); Preparation of high fructose syrups from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Heliantus tuberosus L.*), **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 11, 1 - 28.
- García-Garibay M. y López-Munguía C. A., (1993); Bebidas alcohólicas no destiladas, en: García-Garibay M., Quintero R. R. y López-Munguía C. A., **Biología Alimentaria**, Ed. Limusa, México, 301 - 306.
- Gerhartz W., (1990); Enzymes in Industry: production and applications, Ed. VCH, 92 - 108, Alemania.
- Goldstein A. y Lampen O. J., (1975); β -D-Fructofuranoside fructohydrolase from yeast, en: Wood W. A., **Methods in Enzymology**, Academic Press, New York, 17, 504 - 511, (1975)
- Hestrin S., Feingold D. S. y Schramm M., (1955); Hexoside Hydrolases, en: Colowick P. y Kaplan N. O., Preparation and Assay of Enzymes, **Methods in Enzymology**, Academic Press, 1, 251 - 257, New York.
- Kierstan M., (1983); Studies on enzymic methods for extraction of inulin from Jerusalem artichokes, **Enzyme Microb. Technol.**, 5, 445 - 448.
- Kim W. Y. y Byun M., (1982); Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose, **Enzyme Microb. Technol.**, 4 (7), 239 - 244.
- Kim C. H. y Rhee S. K., (1989); Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin, **Biotechnol. Lett.**, 11 (3), 201 - 206.
- López-Munguía C. A., (1993); Edulcorantes, en: García-Garibay M., Quintero R. R. y López-Munguía C. A., **Biología Alimentaria**, Ed. Limusa, México, 519 - 551.

- Loyola M. E., (1956); La industria del pulque, Banco de México, Depto. de Investigaciones Industriales
- MacAllister, R. V., (1980); Manufacture of high fructose corn syrups using immobilized glucose isomerase, en Wayne H., **Inmobilized Enzymes for Food Processing**, CRC Press, 81 - 111, USA.
- Manzoni M. y Cavazzonni V., (1992); Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem artichoke) fructans by extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 54, 311 - 315
- Mc.Donald E. J., (1946); The polyfructosans and difructose anhydrides, en: Pigman W. W., Wolfrom M. L., y Peat S., **Adv. in Carbohydrate Chemistry**, Vol. 2, Academic Press, 253 - 277, New York.
- Murguía Rosete E., (1960); Acetificación de azúcares del *Agave tequilana*, TESIS, Fac. Química; UNAM, México.
- Negro H.N., (1978); Inulase from *Kluyveromyces fragilis*, **J. Ferment. Technol.**, 56 (2), 102 - 107.
- Nelson N., (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, **J. Biol. Chem.**, 153 (2), 375 - 380.
- Onodera S. y Shiomi N., (1988); Purification and substrate specificity of endo type inulinase from *Penicillium purpurogenum*, **Agr. Biol. Chem.**, 52 (10), 2569 - 2576
- Phelps C. F., (1965); The physical properties of inulin solutions, **Biochem. J.**, 95, 41 - 47.
- Quemener B., Thibault J.-F. y Coussement P., (1994); Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fiber, **Lebensm.-Wiss. Technol.**, 27 (2), 125 - 132.
- Rahway N. J., (1983); The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, Ed. Martha Windholz, 10^a Edición, USA.
- Rodríguez Beauregard R. L., (1950); Estudio químico comparativo entre productos envasados derivados del aguamiel y el pulque común, TESIS, Esc. Nal. de Ciencias Químicas, UNAM, México

-
- Rutherford P. P. y Weston E. W., (1968); Carbohydrate changes during cold storage of some inulin containing roots and tubers, **Phytochemistry**, 7, 175 - 180.
 - Rutherford P. P. y Deacon A. C., (1972); The mode of action of Dandelion root β -fructofuranosidases on inulin, **Biochem. J.**, 129, 511 - 512.
 - Rutherford P. P. y Deacon A. C., (1972); β -fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber), **Biochem. J.**, 126, 569 - 573.
 - Salminen S. y Hallikainen A., (1990); Sweeteners, en: Branen L. A., Davidson M. P., y Salminen S., **Food Additives**, Ed. Marcel Decker, New York, 297 - 323.
 - Sanchez-Marroquin A. y Hope P. H., (1953); Fermentation and chemical composition studies of some species of agave juice, **J. Agr. Food Chem.**, 1 (3), 246 - 249.
 - Scott G. H., (1982); Agaves of Continental North America, The University Arizona Press, Arizona USA.
 - Shinoyama H. y Yasui T., (1988); Superiority of *Aspergillus niger* β -xilosidase for the enzymatic synthesis of alkyl- β -xilosidases in the presence of a variety of alcohols, **Agr. Biol. Chem.**, 52 (9), 2197 - 2202.
 - Soto Portilla M. A., (1960); Estudio sobre el aguamiel, TESIS, Esc. Nal. de Ciencias Quimicas, UNAM, México.
 - Spiegel J. E., Rose R., Karabell P., Frankos V. H. y Schmitt D. F., (1994); Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients, **Food Technol.**, 48 (1), 85 - 89.
 - Srinivasan M. y Bhatia I. S., (1953); The carbohydrates of *Agave veracruz Mill.*, **Biochem. J.**, 55, 286 - 289.
 - Stahl E., (1969); Thin layer chromatography. A laboratory handbook, Ed. Springer-Verlag, Alemania, 812 - 834.
 - Thonat Ph, Roblain D., Rikir R., (1988), Improvemnet of inulin hydrolysis yeast cell reactor by mutants selection, **Appl. Biohem. Biotechnol.**, 17, 193-202.

- Tokunaga T., Oku T. y Hosoya N., (1986); Influence of chronic intake of new sweetener, fructooligosaccharides (Neosugars) in rats. **J. Nutr.**, 119, 553 - 559.
- Tombs M. P., (1991), *Biotechnology in the food industry*, Ed. Prentice Hall , USA, 47 - 70.
- Touchstone J.C., (1992); *Practice of thin layer chromatography*, 3^a Ed., Ed. John Wiley & Sons, USA, 89 - 90
- Tsang E. W. T. y GrootWassink W. D.N., (1988); Extraordinarily rapid appearance of a β -fructofuranosidase (exo-inulase)-hyperproducing mutant in continuous culture of *Kluyveromyces fragilis*, **J. Gen. Microb.**, 134, 679 - 688
- Tucker G. A. y Woods L. F. J., (1991); *Enzymes in food processing*, Ed. AVI Publishers, New York, 221 - 231.
- Vandamme E. J. y Derycke D. J., (1983); Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications, en: Laskin A. I., **Adv. in Appl. Microb.**, 29, Ed. Academic Press, New York, 139 - 176.
- Whitaker R. J., (1972). *Principles of enzymology for the food sciences*, Ed. Marcel Decker Inc., New York, 429 - 465.
- Workman W. E. y Day. D. F., (1984); Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells, **Biotechnol. Bioeng.**, 26, 905 - 910.