

CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE TALLOS DE *AGAVE SALMIANA* OTTO EX SALM DYCK Y *A. TEQUILANA* F.A.C. WEBER EN MADUREZ FISIOLÓGICA PLENA

CHARACTERIZATION OF FRUCTANS FROM STEMS OF *AGAVE SALMIANA* OTTO EX SALM DYCK AND *A. TEQUILANA* F.A.C. WEBER AT FULL PHYSIOLOGICAL MATURITY

 EVELYN REGALADO RENTERÍA¹,  CÉSAR IvÁN GODÍNEZ-HERNÁNDEZ^{1*},  JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA¹,
 ROSA MARÍA CAMACHO RÚIZ² Y  BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES¹

¹ Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P, México.

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: cesar.godinez@uaslp.mx

Resumen

Antecedentes: La fisiología de la materia prima en los procesos de extracción de fructanos es imprescindible para establecer criterios que garanticen homogeneidad en la calidad del producto. Así, la madurez fisiológica plena (MFP) para la extracción de fructanos en las especies de *Agave* puede reducir la variabilidad de su calidad.

Pregunta: ¿La MFP de los agaves y el uso exclusivo de su tallo influye en el perfil de carbohidratos y en el grado medio de polimerización (GP) de sus fructanos, para su estandarización?

Especies de estudio: *Agave salmiana* y *A. tequilana*.

Sitio de estudio y periodo de investigación: El estudio fue realizado durante la primavera de 2019, con cabezas de maguey mezcalero potosino recolectadas en agostaderos ejidales del municipio de Charcas, San Luis Potosí, y con cabezas de maguey tequilero cosechadas en Arandas, Jalisco.

Métodos: Por medio de HPTLC, HPLC y HP-SEC se caracterizó y estimó la distribución del perfil de carbohidratos y el promedio del GP de los fructanos de tallos de ASE y ATE con MFP y con el mismo proceso orgánico de extracción; como contraste se analizaron también fructanos comerciales de *A. tequilana* y de *Cichorium intybus* (IC).

Resultados: Se encontró un GP de 14.46, 16.20, 18.25 y 21.11 para IC, ASE, ATC y ATE, respectivamente.

Conclusión: La MFP de las plantas de *Agave*, el uso exclusivo de sus tallos y la extracción orgánica de los fructanos permitió confirmar (estandarización) el GP para ASE (16) y por primera vez se documenta un GP de 21 para *A. tequilana*.

Palabras clave: Extracción orgánica, fibra soluble, grado de polimerización, maguey mezcalero, maguey tequilero, tallos de maguey.

Abstract

Background: In the fructans extraction processes the physiology of the raw material is essential to establish criteria that guarantee a homogeneous quality of the product; thus, the optimal physiological maturity in the *Agave* species can reduce the variability of its quality.

Questions: Does the full physiological maturity of agaves and the exclusive use of their stem influence the profile of carbohydrates and the average degree of polymerization (DP) of their fructans for its standardization?

Study species: *Agave salmiana* y *A. tequilana*.

Study site and research period: The study was carried out with heads of maguey mezcalero potosino gathered in ejidal ranges in the municipality of Charcas, San Luis Potosí, and with heads of maguey tequilero harvested in Arandas, Jalisco, during the spring of 2019.

Methods: The fructans average DP of ASE and ATE with full physiological maturity and with organic extraction process, as well as commercial fructans of *A. tequilana* and chicory (IC) was characterized and estimated by HPTLC, HPLC and HP-SEC.

Results: A DP of 14.46, 16.2, 18.25 and 21.11 was found for IC, ASE, ATC and ATE, respectively. When comparing ASE and ATE, with similar full physiological maturity, the proportion of fructans with DP > 10 was 73.2 and 83.74 %, respectively, was recorded.

Conclusion: The MFP of *Agave* plants, the exclusive use of their stems and the organic extraction of fructans allowed to confirm (standardization) the GP for ASE (16) and for the first time a GP of 21 for *A. tequilana*.

Keywords: Degree of polymerization, maguey mezcalero, maguey tequilero, maguey stems, organic extraction, soluble fiber.

Los fructanos son polímeros de fructosa que utiliza la industria alimentaria como ingrediente o como sustrato debido a sus propiedades físicas, químicas, tecnológicas y funcionales ([Moreno-Vilet *et al.* 2017](#)). Las aplicaciones de estos compuestos naturales dependen de sus cualidades como polímero. Estas cualidades se analizan por medio de métodos analíticos directos e indirectos para conocer su composición y concentración del perfil de carbohidratos de los fructanos, y estimar su grado de polimerización (GP). Estas propiedades y estructuras que desarrollan los fructanos son variables durante las diferentes etapas de desarrollo de cada especie vegetal ([Pollock & Jones 1979](#)). Así, es común que, al procesarse materia prima en estadios contrastantes de madurez, tanto en la investigación como en la industria, se imposibilita tener una composición homogénea entre lotes ([Camacho-Ruiz 2016](#)) y por ello se altera la reproducibilidad de los resultados ([Pollock 1986](#), [Ronkart *et al.* 2007](#)). Con independencia del nivel tecnológico disponible sin tomar en cuenta la biología y fisiología de la planta utilizada como materia prima, los procesos de extracción de fructanos serán más caros y el producto será de menor calidad ([Aires-Barros & Azevedo 2017](#)).

Los fructanos que desarrolla cada especie de planta tienen estructuras diferentes debido a los enlaces que unen a sus monómeros fru- β (2-1), fru- β (2-6) y glu- β (2-6), a su eficiencia metabólica y a la capacidad de elongarse y ramificarse con la adición de residuos fructosil ([Pollock & Cairns 1991](#), [Livingston *et al.* 1993](#), [Kaur & Gupta 2002](#), [Olvera *et al.* 2007](#)).

En el género *Agave* los fructanos son almacenados en el tallo durante el periodo vegetativo ([Aguirre-Rivera *et al.* 2001](#), [Babb & Haigler 2001](#)), y la concentración máxima de fructanos almacenados se alcanza al iniciarse la fase reproductora, momento considerado como el estado de madurez fisiológico pleno (MFP) e ideal para su aprovechamiento ([Aguirre-Rivera *et al.* 2001](#)). Después de dicho estadio los fructanos acumulados son hidrolizados en monosacáridos (glucosa y fructosa) y removidos del tallo para cubrir las demandas energéticas de la reproducción, tanto asexual (producción de hijuelos) como sexual (inflorescencia o escapo floral, frutos y semillas) ([Wang & Nobel 1998](#)); así, la cantidad de mono y disacáridos en la planta dependerá del intercambio dinámico entre sus órganos, según la etapa fisiológica en que se encuentre ([Claassen *et al.* 1991](#)). La mayor cantidad de estos azúcares libres en la planta de maguey se registra en la etapa de crecimiento y durante la reproducción ([Godínez-Hernández 2017](#)); por lo tanto, el estado fisiológico y el órgano vegetal determi-

narán la concentración y la composición de los fructanos extraídos.

En los agaves la MFP y óptima para la extracción de fructanos se identifica en el campo por el adelgazamiento del cogollo, y porque las puntas de sus últimas pencas por desplegar se encuentran por debajo del ápice de las ya desplegadas ([Aguirre-Rivera *et al.* 2001](#)). Este estado fisiológico en el campo es reconocido como maguey “quito-tillo” para el caso de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, y como maguey “novillo” para *A. tequilana* F.A.C. Weber ([Godínez-Hernández *et al.* 2016a](#)).

Actualmente la industria de los fructanos de *Agave* utiliza como materia prima a las cabezas (conjunto del tallo y bases foliares) completas de la especie *A. tequilana*, con una madurez que depende principalmente de los años de establecida la plantación, con hijuelos de tamaño variable ([Arrizon *et al.* 2010](#)). Esta madurez fisiológica variable de la materia prima y los compuestos presentes en las bases de penca de la cabeza, contaminan los fructanos, y por ello requieren de ser refinados con solventes, filtración con carbón activado, con membranas de intercambio aniónico y catiónico ([Alvarado *et al.* 2014](#)), y con técnicas de ultra y nanofiltración con membranas de celulosa hidrofilica. Estos procesos de refinación se requieren también para separar mono y disacáridos (fructosa y sacarosa), para cumplir la normativa NOM-002-SAGARPA-2016 ([SAGARPA 2016](#)), que en suma no deben superar el 20 %, el doble de lo permitido para los fructanos comerciales de achicoria (*Cichorium intybus* L.) ([Camacho-Ruiz 2016](#), [Godínez-Hernández *et al.* 2016b](#)), así como otros compuestos minoritarios (minerales, clorofillas, fibra, ceras, etc.), con la finalidad de incrementar su calidad y pureza ([Moreno-Vilet *et al.* 2017](#), [Reynoso-Ponce *et al.* 2017](#)). Además con la finalidad de justificar dichos procesos de refinación se ha propuesto la separación de los fructanos íntegros en fracciones de alto o bajo GP para destacar las características físicas, químicas, tecnológicas y funcionales que aporta cada fracción para diversos propósitos en la industria alimentaria; así, los fructanos con GP > 10 son incorporados a diversos productos alimentarios como emulsificantes y sustitutos de grasa, y los fructooligosacáridos (FOS) con GP entre 3 y 10 se añaden como endulzante bajo en calorías ([Olvera *et al.* 2007](#), [García-Gamboa *et al.* 2018](#)). Sin embargo, ya se ha documentado la extracción de fructanos íntegros con escasa variabilidad, de magueyes con MFP, es decir, con rendimiento máximo, extraídos de los tallos de manera simple y orgánica ([Godínez-Hernández 2017](#)), sin que se contaminen con otros compuestos presentes en las bases foliares, que tengan que ser eliminados posteriormente.

Así, el objetivo del presente trabajo fue conocer la composición y concentración del perfil de carbohidratos (GP) de los fructanos extraídos de tallos de *Agave salmiana* (ASE) y *A. tequilana* (ATE) con similar estado de MFP y proceso de extracción simplificado, así como de fructanos comerciales de *A. tequilana* (ATC) y de *Cichorium intybus* (IC).

Materiales y métodos

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos (dos especies, *A. salmiana* y *A. tequilana*), y seis repeticiones (seis tallos utilizados como unidades experimentales de cada especie). Las variables evaluadas fueron, la composición de carbohidratos por HPLC y su grado medio de polimerización por HP-SEC. Además, como contraste complementario se analizaron fructanos comerciales de *A. tequilana* y de *Cichorium intybus*.

Reactivos. Para la identificación cualitativa de carbohidratos por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés), para la cuantificación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y para la estimación del GP por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HP-SEC, por sus siglas en inglés) se utilizaron estándares de fructosa, glucosa, sacarosa, nittosa, 1-cestosa, inulina y FOS de achicoria y dextranos (Sigma-Aldrich®, San Luis Misuri, EE.UU.), maltopen-tosa, maltohexosa y maltoheptosa (Supelco, EE.UU.). Para contrastarlos, se utilizaron fructanos comerciales de *A. tequilana* (Inufib™, Jalisco, México) (ATC) y fructanos comerciales de achicoria (*Cichorium intybus*) (Orafti® Synergy 1, Tienen, Bélgica) (IC) declarados como una mezcla de FOS e inulina (~ 92 %).

Extracción de fructanos de tallos de ASE y ATE. Se procesaron seis cabezas de cada especie de maguey, todas con MFP, esto es, con la máxima concentración de fructanos ([Aguirre-Rivera et al. 2001](#)). Las cabezas de maguey mezcalero potosino ASE en estadio quiotillo fueron recolectadas en agostaderos ejidales del municipio de Charcas, San Luis Potosí; las cabezas del maguey tequilero (ATE) se cosecharon en una plantación de Arandas, Jalisco. A todas las cabezas les fueron retiradas las bases foliares y solamente el tallo fue utilizado para la extracción del concentrado de fructanos (CF), el cual, está compuesto de 85 % fructanos mayores a 3 GP ([Godínez-Hernández 2017](#)) y

en menor proporción cenizas, mono y disacáridos y saponinas.

El CF de los tallos de ambas especies se obtuvo de acuerdo con el método desarrollado por [Godínez-Hernández et al. \(2016c\)](#): a partir de trozos del tallo, con un extractor centrífugo comercial (International EXS, CD, México, México) se generó un jugo primario (JP), y por compresión del bagazo residual con una prensa hidráulica de 20 t (Urrea 2471, Jalisco, México) se generó un jugo secundario (JS); ambos jugos se estabilizaron independientemente en baño María (53 °C/1hr); posteriormente se eliminaron los minerales insolubles (rafidios de oxalatos de calcio) mediante centrifugación a 2,000 rpm/15 min/0 °C (DAMON PR-6000, California, EE. UU.) y el sobrenadante se evaporó parcialmente a 42 °C a baja presión (152 mm Hg) hasta alcanzar 50 ° Brix (J. P. Selecta Gastrovac, Barcelona, España). Finalmente, los jugos concentrados se secaron en un horno de aire forzado (36 h / 55 °C) (Shel-Lab FX-14, Oregón, EE. UU.) y el CF en escamas resultante de cada tallo se pulverizó y almacenó en recipientes herméticos libres de humedad a temperatura ambiente; este proceso se realizó de manera independiente para cada unidad experimental (tallos).

Contenido de cenizas totales del CF. Las cenizas totales se obtuvieron mediante calcinación de las muestras. Para ello se pesaron 5 g del CF libre de humedad y se calcaron en una mufla (LINDBERG SB, 51844, Wisconsin, EE. UU.) a 550 °C por 2 h. Las muestras calcinadas se colocaron en un desecador para alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente fueron pesadas para obtener el porcentaje de cenizas totales mediante la diferencia entre el peso inicial y final.

Identificación cualitativa de carbohidratos por HPTLC. Se prepararon soluciones de las muestras de fructanos (ASE, ATE, ATC e IC) y estándares de 20 mg/mL en agua destilada y se atomizaron 2 µL de forma semiautomatizada (CAMAG LINOMAT, 5 Muttenz, Suiza). Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica Nano-SIL NH2/UV254 de 20 × 10 cm (Macherey-Nagel, Alemania) y como fase móvil una mezcla de n-butanol, metanol, agua y ácido acético 50:25:20:1 (v/v/v/v) con tiempo de corrida de 2 h. Posteriormente la placa fue calentada a 180 °C/10 min (Corning™ PC-420, Nueva York, EE.UU.) y atomizada con una mezcla de etanol, ácido sulfúrico y anisaldehído, 18:1:1 (v/v/v); enseguida se calentó a 180 °C/10 min y se revelaron sus componentes a luz visible (400-700 nm).

Cuantificación de carbohidratos por HPLC. La cuantificación de carbohidratos se hizo en un HPLC (Agilent Technologies, serie 1100, California, EE. UU.) con un detector de índice de refracción a 50 °C. Como fase estacionaria se utilizó una columna de intercambio iónico HP-Aminex 87-C (7.8 × 300 mm) (Bio Rad, Philadelphia, EE. UU.) a 75 °C, y como fase móvil se utilizó agua grado HPLC (Fermont®, México) con flujo de 0.5 mL/min, y tiempo de corrida por muestra de 20 min. Los carbohidratos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los estándares de referencia ([Godínez-Hernández *et al.* 2016c](#)).

Estimación del GP por HP-SEC. El perfil de distribución del peso molecular de los carbohidratos y GP basado en su longitud de cadena fue estimado por medio de cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño, por medio de un equipo HPLC (Waters-E2695, Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un detector con índice de refracción (RI-2414). Como fase estacionaria se utilizó una precolumna y una columna Ultrahydrogel™ DP 120 A (7.8 × 300 mm) a 61.7 °C y amplitud de exclusión de tamaño de 100 a 5,000 KDa (Waters, Massachusetts, EE.UU.). La fase móvil fue agua HPLC tridestilada, filtrada (con membranas de polisulfona de 0.45 µm), y acidificada con ácido fosfórico hasta alcanzar pH = 4.5-5, con un flujo de 0.36 mL/min ([Moreno-Vilet *et al.* 2017](#)). Para el control del funcionamiento del sistema y el análisis de datos se utilizó la ChemStation con el software Agilent OpenLAB. El cálculo del peso molecular promedio en número (Mn), del peso molecular promedio en peso (Mw), el índice de dispersión (D), el grado de polimerización de fructanos (GPn) y del peso promedio del grado de polimerización de fructanos (GPw) se realizó con las fórmulas detalladas por [Moreno-Vilet *et al.* \(2017\)](#). Todos los análisis fueron llevados a cabo por triplicado y los resultados se presentan en promedios con su desviación estándar ($X \pm DE$).

Resultados

Rendimiento de fructanos. La morfología de las cabezas de ASE y ATE en MFP es muy diferente; la cabeza de ASE es de mayor tamaño (79.90 kg), con menor número de bases de penca y más suculenta; las cabezas de ATE son de menor tamaño (44.20 kg), con mayor número de hojas y menos suculentas ([Tabla 1](#)). La proporción de tallo en la cabeza fue 8.30 y 22 % para ASE y ATE respectivamente; de cada tallo se obtuvo en promedio 976.5 y 1611.60 g de CF, respectivamente.

Identificación cualitativa de carbohidratos. El perfil de bandas generado por el análisis cromatográfico de las muestras de fructanos y FOS ([Figura 1](#)) evidencia que todas tienen nistosa, 1-cestosa y sacarosa. En la parte inferior de la cromatoplaca se observan los fructanos con GP > 10 como una banda oscura. Se confirmó que la muestra de inulina comercial (carril 8) es una mezcla de FOS y fructanos. En las muestras de fructanos de tallos de ATE (carriles 10-13) y de ASE (carriles 15-18) se observan componentes similares, como se esperaría al ser especies del mismo género y extraídos de la misma forma.

Cuantificación de carbohidratos por HPLC. En la [Tabla 2](#) se resumen los resultados de la cuantificación de cenizas totales y carbohidratos por HPLC. El contenido de fructanos > 4 GP fue de 943.31, 923.29, 889.92 y 805.65 mg /g CF para ATC, ATE, ASE e IC; todos los fructanos tuvieron fructosa pero en menor cantidad los ASE (5.50 mg/g CF) y ATE (3.93 mg/g CF), de igual forma la glucosa estuvo presente en todas las muestras pero en la IC se registró la mayor cantidad que las demás (25.89 mg/g CF).

Estimación del GP por HP-SEC. La estimación del GP por HP-SEC ([Tabla 3](#)) y la caracterización del perfil de distribución ([Figura 2A](#)) evidencian que la inulina comercial es una mezcla de fructanos con GP > 10 (51.75 %) y de FOS con GP entre 3 y 10 (43 %), GP de 14.46 e índice de dispersión (D) de 1.63.

En los fructanos de tallos con similar MFP (quiotillos) de ASE ([Tabla 3](#)) se registró el menor porcentaje (0.7 %) de sacáridos libres (sacarosa, glucosa y fructosa) de todos los fructanos evaluados, un GP de 16.2, proporción de fructanos con GP > 10 fue 73.2 % y 26.1 % de FOS.

En el presente estudio se documenta por primera vez que los fructanos extraídos sin refinamientos de los tallos de ATE con MFP tienen un GP (21.11), superior a ASE (16.20) bajo las mismas condiciones de extracción, y una proporción 83.74 % de fructanos con GP > 10 y 14.12 % de FOS; en contraste, los fructanos ATC presentaron GP de 18.25, la proporción de fructanos con GP > 10 fue de 75 % y de FOS 16.19 % ([Figura 2B](#)). Los fructanos ATC presentaron 8.56 % de mono y disacáridos.

Al comparar los fructanos obtenidos de tallos de ASE y ATE en MFP e igual proceso de extracción ([Figura 2C](#)), la proporción de fructanos con GP > 10 fue de 83.74 % y de 73.2 % para ATE y ASE respectivamente, y de FOS fue de 26.1 % y 14.2 % para ASE y ATE, respectivamente.

Tabla 1. Rendimiento de fructanos extraídos en laboratorio de tallos de *Agave* en madurez fisiológica plena, n = 6.

Variable	<i>A. salmiana</i>	<i>A. tequilana</i>
Peso de la cabeza fresca (kg)	79.90 ± 21.30	44.20 ± 14.00
Peso del tallo fresco (kg)	6.70 ± 2.10	9.80 ± 3.30
Concentrado de fructanos (g)	976.50 ± 235.90	1,611.60 ± 630.50

Discusión

Rendimiento de fructanos. Los resultados mostrados en el presente trabajo confirman los obtenidos por [Godínez-Hernández et al. \(2016c\)](#) sobre el rendimiento de fructanos extraídos de tallos de ASE y ATE en MFP y proceso de extracción similar, y también la estimación indirecta de que ASE contiene aproximadamente sólo la mitad de los azúcares fermentables que ATE ([Aguirre-Rivera et al. 2001](#)). Esta mayor riqueza en carbohidratos de ATE y su mayor proporción del tallo explican el rendimiento de CF totales mayor que el de ASE.

Identificación cualitativa de carbohidratos por HPTLC. En las muestras de fructanos obtenidos del JS de cada especie de maguey (carriles 14 para ATE y 19 para ASE) se presentó en la parte superior de la cromatoplaca una banda intensa color marrón (fructosa), en contraste con la muestra de fructanos extraídos del JP. Esto sugiere que en el proceso de extracción establecido por [Godínez-Hernández et al. \(2016c\)](#), la manipulación del bagazo podría hidrolizar una parte de los fructanos; sin embargo, la cantidad de fructosa que se registra en el JS es mucho menor que en los fructanos industriales de ATC (carril 9), extraídos normalmente de cabezas, con las bases foliares

más ricas en sacáridos. En los carriles 7 y 8 correspondientes a FOS e inulina de achicoria, se observa una banda similar a la glucosa, lo cual se confirma con el contenido mayor de glucosa libre cuantificada por HPLC, pero no precisamente se debe a enlaces β 2-6 de glucosa residual en los fructanos, pues se sabe que los fructanos de inulina desarrollan enlaces fructosil β 2-1. La HPTLC es una técnica básica y rápida de barrido para discriminar entre fructanos de *Agave* y de achicoria, así como para evaluar su calidad comercial ([Alvarado et al. 2014](#)).

Cuantificación de carbohidratos por HPLC y cenizas. En los fructanos de *Agave* se encontró menor contenido de 1-cestosa que en IC. En estudios previos con la misma metodología se obtuvieron resultados por HPLC para ASE ([Godínez-Hernández et al. 2016c](#)) y para ATE ([Godínez-Hernández et al. 2016a](#)) concordantes con los obtenidos en el presente estudio, con lo cual se confirman estos resultados. En el CF de tallos de plantas en MFP y con el método simple de extracción los fructanos > 4 GP en ASE y ATE fueron superiores a 850 mg/g de MS ([Tabla 2](#)) y a los publicados por [Mancilla-Margalli & López \(2006\)](#) extraídos con etanol de distintas especies de maguey (360 a 740 mg/g MS), pero similares a los fructanos comerciales de IC y de ATC extraídos de manera industrial. En cuanto

Tabla 2. Composición (mg/g base seca) de carbohidratos del concentrado de fructanos (HPLC) y contenido de cenizas por calcinación.

Compuesto	TR (min)	IC	ATC	ATE	ASE
("Inulina") GP > 4	7.74	805.65 ± 72.89	943.31 ± 26.82	923.29 ± 37.01	889.92 ± 44.79
1-Cestosa	8.62	112.64 ± 25.56	12.51 ± 5.79	14.08 ± 5.26	23.56 ± 4.72
Sacarosa	9.62	34.49 ± 3.10	6.39 ± 0.48	10.99 ± 5.28	32.63 ± 8.82
Glucosa	11.65	25.89 ± 7.21	2.34 ± 1.55	2.91 ± 1.33	3.58 ± 0.72
Fructosa	15.85	18.45 ± 9.43	19.53 ± 9.44	3.93 ± 0.86	5.50 ± 1.98
CH solubles		997.12	984.08	955.20	955.19
Cenizas	-	2.02	10.3	16.4	24.7

TR: tiempo de retención; CH: carbohidratos, Media ± DE; n = 6.

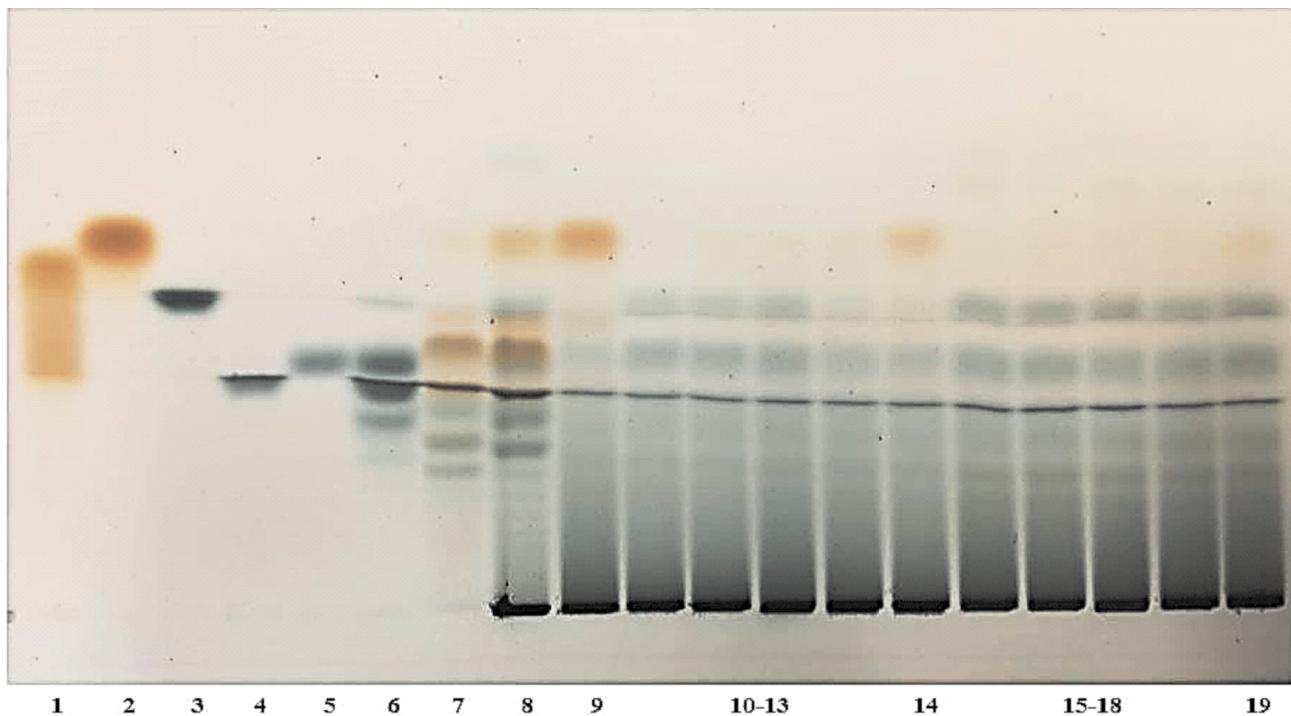


Figura 1. Cromatoplaca de estandares de referencia y de muestras de fructanos (1: glucosa, 2: fructosa, 3: sacarosa, 4: nistosa (GP = 4), 5: 1-cestosa (GP = 3), 6: FOS de *A. tequilana*, 7: FOS de inulina, 8: inulina comercial, 9: fructanos comerciales de *A. tequilana*, 10-13: fructanos de tallos de ATE, 14: fructanos de jugo secundario de *A. tequilana*, 15-18: fructanos de tallos de ASE, 19: fructanos de jugo secundario de *A. salmiana*).

al contenido de fructosa, en ASE y ATE fue inferior al rango presentado por [Mancilla-Margalli & López \(2006\)](#) de 40 a 130 mg/g MS, para varias especies de maguey. Esta discrepancia seguramente se debe al indicador de madurez cronológico impreciso que usaron dichas autoras.

El contenido de cenizas por g de CF fue mayor en los fructanos de ASE y ATE (24.70 y 16.4 mg/g CF respectivamente) que en los de IC y ATC (2.02 y 10.30 mg/g CF, respectivamente), ya que los desmineralizan en su extracción industrial ([Tabla 2](#)); en cambio, a los fructanos de ASE y ATE sólo se le decantaron los cristales de oxalato de calcio por centrifugación. Por ello, el contenido de cenizas de ASE y ATE fueron inferiores a los publicados por [Godínez-Hernández *et al.* \(2016a\)](#) para muestras de fructanos de ambas especies, pero sin la separación de los cristales de oxalato de calcio.

Estimación del GP por HP-SEC. Los resultados de ATC (GP:18.25, fructanos > 10 GP: 75.25 % y FOS de 3-10 GP: 16.19 %) son similares a los encontrados por [Moreno-Vile *et al.* \(2017\)](#) para fructanos de cabezas de *A. tequilana* con 6 años de plantado (GP: 18.19, fructanos > 10 GP 76.48 % y FOS de 3-10 GP 3-10: 17.9 %); pero en

cabezas de esta especie con 4 años de plantada el GP fue de sólo 14.48, el GP > 10, 58.95 %, con 33.58 % de FOS y 7.48 % de monosacáridos. Dichos autores ([Moreno-Vile *et al.* 2017](#)) también evaluaron dos fructanos comerciales y encontraron las siguientes diferencias entre ellos: GP de 14.98 y 19.49, GP > 10 de 64.94 y 76.62 %, y FOS de 26.36 y 17.52 %, y contenido de monosacáridos de 8.71 y 5.86 %. Estos resultados evidencian la heterogeneidad del GP que se puede encontrar en los fructanos comerciales de *A. tequilana*, debido a la fuerte variación en madurez fisiológica de la materia prima.

El GP del CF de tallos de plantas con MFP de ASE fue de 16, en concordancia con los resultados de [Godínez-Hernández \(2017\)](#) para la misma especie procesada con igual enfoque metodológico, pero discrepan de los resultados de [Michel-Cuello *et al.* \(2012\)](#) para esta misma especie (GP de 8); esta discrepancia es atribuible a las diferencias en el método de extracción y en el órgano utilizado para su extracción (cabeza completa y madurez variable).

El GP de los CF de tallo con MFP de ATE fue superior (21.11) al de ASE (16.20) bajo las mismas condiciones de extracción y análisis, incluso que ATC; además fue superior su rendimiento de fructanos por kg de materia

prima que el de ASE. Estas dos especies son importantes en nivel nacional, ATE es la especie que mayormente se cultiva en México para la producción de tequila y ASE es la especie silvestre de mayor distribución en el territorio mexicano, y ambas se han estudiado para múltiples propósitos como aguardiente, jarabe de maguey, fructanos, etc. La ventaja de ASE sobre ATE es que sus productos tienen mayores posibilidades de certificarse como orgánicos por ser espontáneo las condiciones naturales en las que crece.

Según [López et al. \(2003\)](#), el GP de los fructanos de *A. tequilana* oscila entre 3 y 29 unidades. Por su parte, [Mancilla-Margalli & López \(2006\)](#) estimaron el GP de diversas especies del género *Agave* distribuidas en México con edad cronológica similar (años de la plantación), y presentan valores para *A. tequilana* de Jalisco (18.12) y de Guanajuato (7.13), para *A. angustifolia* de Oaxaca (31.75) y de Sonora (13.07), para *A. potatorum* (15.34) y *A. cantala* (11.17) de Oaxaca, y para *A. fourcroydes* (6.66) de Yucatán. Estas diferencias sólo pueden atribuirse parcialmente a la especie, pues no se controló la edad fisiológica ni otras características de la materia prima analizada.

La estimación del grado de polimerización también depende de la metodología analítica utilizada (HP-SEC y MALDI-ToF-MS o Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry); [Moreno-Vilet et al. \(2019\)](#) contrastaron ambas metodologías con muestras de fructanos de *Agave* y encontraron que ambas metodologías son equivalentes. Sin embargo, los resultados del GP fue diferente entre las muestras de *Agave* pues oscilaron entre 5 y 16 GP debido a la madurez variable de *Agave tequilana*.

Los fructanos ATC presentaron mayor proporción de mono y disacáridos. En efecto, [Alvarado et al. \(2014\)](#), en

tres marcas de fructanos comerciales de la misma especie, registraron entre 3.1 y 7.5 % de mono y disacáridos, lo cual evidencia la heterogeneidad al respecto en los fructanos del mercado. Cabe resaltar que, al utilizar exclusivamente el tallo del maguey de ATE como materia prima para la extracción de sus fructanos, se redujo el porcentaje de azúcares libres (2.14 %), sin necesidad de añadir etapas de purificación al proceso, como sucede con las marcas comerciales.

Ambos tipos de fructanos extraídos en laboratorio (ASE y ATE) presentaron menor proporción de monosacáridos que los fructanos de ATC, lo cual podría deberse a una menor hidrólisis con nuestra extracción en laboratorio, pero es más claro que este resultado se debió al uso exclusivo del tallo del maguey como materia prima para su extracción, pues con ello se evita incorporar sacáridos de las bases de penca al CF. La NOM-002-SAGARPA-2016 ([SAGARPA 2016](#)) establece un límite máximo de 5 % de sacarosa, 6 % de glucosa y 9 % de fructosa en los fructanos comerciales de maguey; así, se permite hasta 20 %, esto es, el doble de lo tolerado para los fructanos comerciales de achicoria (10 %).

Si bien la metodología HP-SEC había resultado adecuada para la obtención del GP y del perfil de distribución del peso molecular de diversas fuentes de fructanos ([Moreno-Vilet et al. 2017](#)), también resultó ser una herramienta robusta para distinguir los fructanos estandarizados de *A. salmiana* de los de *A. tequilana*, por lo que podría ser utilizada para caracterizar los fructanos de diversas especies de maguey, aunque su reproducibilidad analítica dependerá de que los magueyes sean elegidos con similar MFP, como lo realizado en este estudio.

En la actualidad hay gran interés por fraccionar los fructanos de acuerdo con su GP, para añadir las fraccio-

Tabla 3. Distribución del peso molecular (g/mol), grado de polimerización y contenido de azúcares de diferentes tipos de fructanos por HP-SEC.

Fructanos	Mn	Mw	GP	GPw	D	GP > 10 (%)	FOS GP 3-10 (%)	Mono y disacáridos (%)
IC	2,362.13 ± 16.78	3,866.34 ± 17.99	14.46 ± 0.10	23.74 ± 0.11	1.63 ± 0.00	51.75 ± 0.34	43.00 ± 0.37	5.26 ± 0.04
ATC	2,976.58 ± 29.93	3,992.79 ± 14.71	18.25 ± 0.18	24.52 ± 0.08	1.35 ± 0.01	75.25 ± 0.76	16.19 ± 0.47	8.56 ± 0.30
ATE	3,439.32 ± 26.73	4,258.69 ± 22.99	21.11 ± 0.16	26.16 ± 0.14	1.24 ± 0.01	83.74 ± 0.92	14.12 ± 0.26	2.14 ± 0.77
ASE	2,651.10 ± 49.77	3,459.50 ± 135.91	16.20 ± 0.31	21.20 ± 0.84	1.30 ± 0.03	73.20 ± 0.47	26.10 ± 0.87	0.70 ± 0.41

Mn: peso molecular medio en número; Mw: peso molecular medio en peso; GP: grado de polimerización promedio; GPw: grado de polimerización promedio en peso; D: índice de dispersión. Media ± DE n= 4.

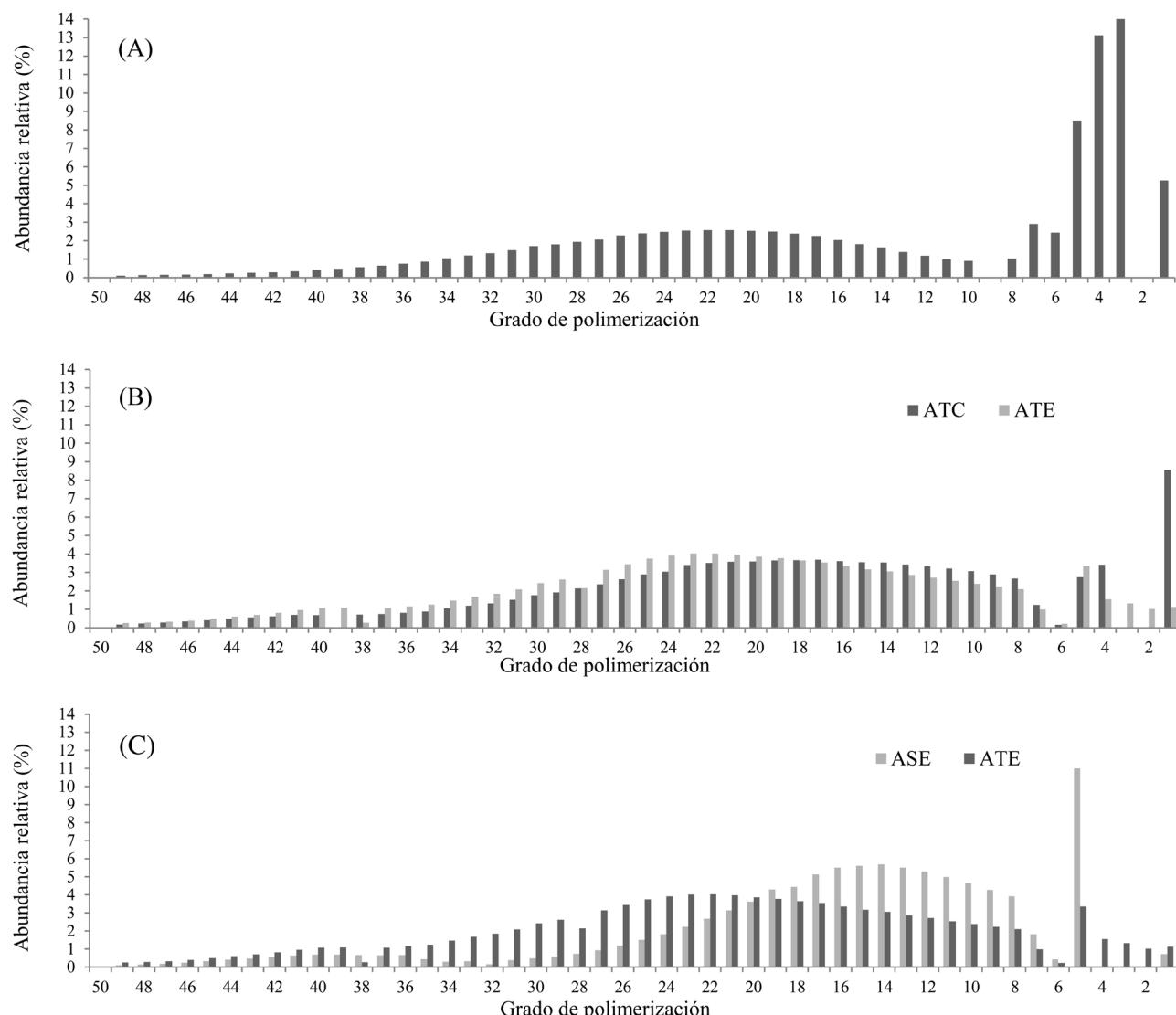


Figura 2. Distribución del GP obtenido con HP-SEC. (A) Inulina comercial (Sinergy 1®), (B) Fructanos comerciales de *A. tequilana* (ATC) y extraídos en el laboratorio (ATE); (C) Fructanos de *A. salmiana* (ASE) y *A. tequilana* (ATE) extraídos en el laboratorio.

nes a diversos productos alimentarios, por sus diferencias físicas, químicas, tecnológicas y funcionales ([García-Gamboa *et al.* 2018](#)). Sin embargo, utilizar el concentrado de fructanos íntegro para evaluaciones analíticas y biológicas, es decir, sin separaciones ni purificaciones, puede ser un método práctico y escalable también válido para la industria alimentaria. A la vez, en las evaluaciones biológicas experimentales con los fructanos íntegros o naturales se tendría una mezcla compleja de diferentes longitudes de cadena, propias de la síntesis metabólica de la planta, las cuales podrían ejercer beneficios en el organismo complementarios entre sí, con la ventaja de

ofrecer una mayor diversidad de sustratos fermentables para el amplio consorcio de bacterias colónicas, y posiblemente una mayor diversidad de respuestas fisiológicas en el organismo.

Las diferencias muy marcadas en el GP registrado en los fructanos de *Agave* por otros autores, fueron atribuidos a factores abióticos que repercuten en el crecimiento del maguey en las regiones propias de cada especie ([Mancilla-Margalli & López 2006](#)). Es razonable que existan diferencias entre especies, aunque comparten el mismo ambiente; sin embargo, los cambios en composición que tiene una planta de maguey durante un ciclo de vida son

de mucha mayor magnitud que los que pueden deberse a factores climáticos estacionales o de más corto plazo. Por ello se debe recurrir al concepto de MFP para estandarizar la composición de la materia prima, y considerar como tal sólo a los tallos para evitar la contaminación de los extractos con mono y disacáridos y otras sustancias indeseables. Así, la supuesta edad de la planta, que en realidad se refiere al tiempo que ha estado plantada, debe descartarse como criterio de madurez, pues además es inaplicable a poblaciones silvestres ([Aguirre-Rivera et al. 2001](#), [Godínez-Hernández 2017](#)).

La elección de magueyes en MFP, el uso exclusivo de sus tallos y la extracción orgánica, permiten la cosecha (cultivada) o recolección (silvestre) de materia prima estandarizada, para la producción de fructanos de *Agave* de mejor calidad, de composición y GP homogéneo, reproducible y propio de cada especie. Se confirmó que el GP de fructanos de tallos de plantas en MFP de *Agave salmiana* es 16 y se presenta por primera vez un GP de 21 para *A. tequilana*

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral otorgada. ER y CIGH recibieron apoyo de la Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves (AGARED) para incluirlos en su plan de movilidad. Megafarma S.A. de C.V. proporcionó amablemente la inulina para el estudio. Al Ing. Manuel Pérez, Don Fernando Rodríguez y David Rodríguez, trabajadores de la fábrica de mezcal Laguna Seca, facilitaron la obtención de las cabezas de ASE y al Ing. Ismael Vicente Ramírez y M. C. Santiago Sánchez Preciado facilitaron la obtención de las cabezas de ATE.

Literatura citada

- Aguirre-Rivera JR, Charcas-Salazar H, Flores-Flores JL. 2001. *El Maguey Mezcalero Potosino*. San Luis Potosí, México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí / Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología: ISBN: 968767489X
- Aires-Barros MR, Azevedo AM. 2017. Fundamentals of biological separation processes. In: Pandey A, Couto TJA, eds. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Foundations of Biotechnology and Bioengineering*. Ámsterdam, Netherlands: Elsevier, pp. 187-237. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00007-X>
- Alvarado C, Camacho RM, Cejas J, Rodríguez JA. 2014. Profiling of commercial *Agave* fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **13**: 417-427.
- Arrizon J, Morel S, Gschaedler A, Monsan P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* **122**: 123-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>
- Babb VM, Haigler CH. 2001. Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiology* **127**: 1234-1242. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.010424>
- Camacho-Ruiz RM. 2016. Fructanos de agave. Retos en la estandarización. *Tecnoagave* **41**: 62-63.
- Claassen PAM, Budde MAW, De Ruyter HJ, Van Calker MH, Van EA. 1991. Potential role of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase in carbohydrate metabolism of cold stored tubers of *Solanum tuberosum* cv Bintje. *Plant Physiology* **95**: 1243-1249. DOI: <http://doi.org/10.1104/pp.95.4.1243>
- García-Gamboa R, Ortiz-Basurto RI, Calderón-Santoyo M, Bravo-Madrigal J, Ruiz-Álvarez BE, González-Ávila M. 2018. *In vitro* evaluation of prebiotic activity, pathogen inhibition and enzymatic metabolism of intestinal bacteria in the presence of fructans extracted from agave: A comparison based on polymerization degree. *LWT - Food Science and Technology* **92**: 380-387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.051>
- Godínez-Hernández CI. 2017. Estudios sobre los subproductos de la elaboración del mezcal, y usos alternativos del maguey. PhD Thesis. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Godínez-Hernández CI, Aguirre-Rivera JR, Juárez-Flores BI. 2016a. Yield and composition of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick and *A. tequilana* F.A.C. Weber fructans. In: A. Mora Gutiérrez, ed. *Sustainable and Integrated use of Agave*. Guadalajara, México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología / Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco/Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentables y Biotecnología de los Agaves. pp. 153-157. ISBN: 978-607-97421-6-4
- Godínez-Hernández CI, Aguirre-Rivera JR, Juárez-Flores BI. 2016b. Importancia creciente de los fruc-

- tanos del maguey. Retos y perspectivas, *Tecnoagave* **40**: 26-29.
- Godínez-Hernández CI, Aguirre-Rivera JR, Juárez-Flores BI, Ortiz-Pérez MD, Becerra-Jiménez J. 2016c. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* **22**: 59-72. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>
- Kaur N, Gupta AK. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, **27**: 703-714. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02708379>
- Livingston DP, Chatterton NJ, Harrison PA. 1993. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytologist* **123**: 725-734. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03783.x>
- López MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Díaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 7835-7840. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Mancilla-Margalli NA, López MG. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliuron* species. *Journal Agriculture and Food Chemistry* **54**: 7832-7839. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Michel-Cuello C, Ortiz-Cerda I, Moreno-Vilet L, Grajales-Lagunes A, Moscosa-Santillán M, Bonnin J, González-Chávez MM, Ruiz-Cabrera M. 2012. Study of enzymatic hydrolysis of fructans from *Agave salmiana* characterization and kinetic assessment. *The Scientific World Journal* 2012:1-10. DOI: <http://doi.org/10.1100/2012/863432>
- Moreno-Vilet L, Bostyn S, Flores-Montaña JL, Camacho-Ruiz RM. 2017. Size-exclusion chromatography (HPLC-SEC) technique optimization by simplex method to estimate molecular weight distribution of Agave fructans. *Food Chemistry* **237**: 833-840. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.020>
- Moreno-Vilet L, Bostyn S, Flores-Montaña JL, Camacho-Ruiz RM. 2019. Comparative data of molecular weight distribution of agave fructans fractions using MALDI-ToF and HPLC-SEC. *Data in Brief* **24**: 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103984>
- Olvera C, Castillo E, López-Munguía A. 2007. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología* **14**: 327-345.
- Pollock CJ. 1986. Tansley Review No. 5. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* **104**: 1-24. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00629.x>
- Pollock CJ, Cairns AJ. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 77-101. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.000453>
- Pollock CJ, Jones T. 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytologist* **83**: 9-15.
- Reynoso-Ponce H, Grajales-Lagunes A, Castillo-Andrade A, González-García R, Ruiz-Cabrera MA. 2017. Integration of nanofiltration and spray drying processes for enhancing the purity of powdered fructans from *Agave salmiana* juice. *Powder Technology* **322**: 96-105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.09.003>
- Ronkart SN, Blecker CS, Fourmanoir H, Fougnies C, Deroanne C, Van H JC, Paquot M. 2007. Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta* **604**: 81-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.073>
- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación]. 2016. Norma Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave. *Diario Oficial de la Federación*. 3ra Sección, 2 de diciembre de 2016.
- Wang N, Nobel PS. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* **116**: 709-714. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.709>

Editor de sección: Sol Cristians

Contribuciones de los autores: ERR desarrolló el trabajo de laboratorio, analizó los datos y redactó el documento; CIGH realizó el trabajo de campo y analizó e interpretó los datos; JRAR concibió el trabajo, diseñó el experimento, revisó el documento críticamente y aportó contenido intelectual importante; BIJF supervisó el trabajo de laboratorio y revisó el documento críticamente; RMCR revisó el documento críticamente.