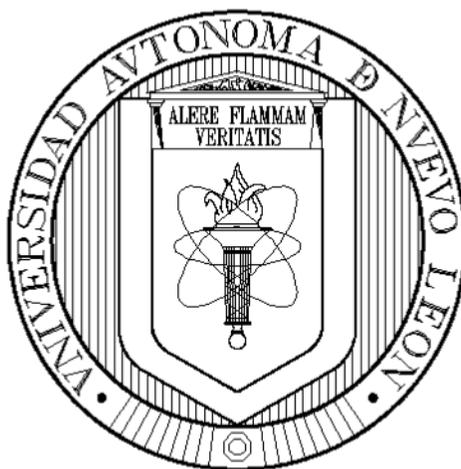


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS A PARTIR DE
PLANTAS DE SOTOL (*Dasyliirion spp.*) Y AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. azul)
MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS ASISTIDOS CON TECNOLOGÍAS DE
ULTRASONIDO Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

POR

M.C. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ MADRIGAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS**

ENERO, 2019

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS A PARTIR DE
PLANTAS DE SOTOL (*Dasyllirion* spp.) Y AGAVE (*Agave tequilana*
Weber var. azul) MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS
ASISTIDOS CON TECNOLOGÍAS DE ULTRASONIDO
Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

Dirección de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Director

Dr. Armando Quintero Ramos
Director externo

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS A PARTIR DE
PLANTAS DE SOTOL (*Dasyilirion spp.*) Y AGAVE (*Agave tequilana*
Weber var. azul) MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS
ASISTIDOS CON TECNOLOGÍAS DE ULTRASONIDO
Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS**

Comité de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Presidente

Dra. Sandra L. Castillo Hernández
Secretario

Dr. Carlos J. Aguilera González
Vocal

Dra. María Adriana Núñez González
Vocal

Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por permitirme seguir adelante y cumplir una más de mis metas.

A mi director de tesis el Dr. Carlos Amaya por brindarme su confianza.

A mi director de tesis externo el Dr. Armando Quintero por su paciencia, sus consejos, por compartir sus conocimientos, experiencia, orientación, sugerencias, etc. Y por todo lo realizado para la culminación de este proyecto con buenos resultados.

A la Dra. Carmen Meléndez y la Dra. Martha Gutiérrez por su ayuda y consejos brindados.

A todas las personas conocidas en el transcurso de este viaje; por su compañía y a algunos por su amistad sincera y ayuda brindada de corazón, no solo de compromiso. Y a todas aquellas que hicieron que el tiempo pasado en el laboratorio, fuera más ameno.

Asimismo, a todas las personas que llegaron en este transcurso, pero más agradezco a todas aquellas que se fueron y que demostraron y enseñaron lo que no quiero en mi vida.

Gracias a todos y repito a los que en algún momento me brindaron su ayuda de corazón para que este trabajo llegara a buen término.

A todas esas personas ¡MUCHAS GRACIAS! con toda sinceridad.

DEDICATORIAS

En primer lugar, a Dios por darme la fuerza y sobre todo la paciencia para seguir adelante con este estudio, pues realmente fue muy necesaria su ayuda. “Gracias Dios” por darme ánimo en todos esos momentos.

A mi hermana: Sacny por siempre brindarme su apoyo sincero, amor y comprensión y por haber estado siempre al pendiente de mí y apoyarme en los momentos en los que más necesitaba de su ayuda.

A mis sobrinas Michelle y Lorien por demostrarme lo que es el amor y el cariño incondicional y que no importa lo que uno sea pues esos sentimientos pueden más que cualquier otra cosa. Y que a pesar de la distancia y del tiempo que permanecemos separados cuando nos volvemos a ver ese cariño sigue siendo el mismo.

A mi mamá Lorena por su amor y apoyo constante durante todos estos años de estudio. Por su confianza, sus consejos y paciencia para emprender y terminar exitosamente todos los retos que me he propuesto.

A mi gran abuela, a mi querida Mamá María que, aunque ya no esté físicamente conmigo, yo sé que nunca me ha dejado de la mano y que me hubiera apoyado en la decisión que tomé al emprender este viaje para cumplir otra meta en mi vida. “Gracias Mamá María” por todas tus enseñanzas, tus consejos, tus regaños, por hacerme quien soy ahora, por haberme querido tanto y por cuidarme hasta el día de hoy desde donde estés.

A mi familia (a los que de verdad siente un cariño sincero) y que, a pesar de estar lejos, siempre me brindan su apoyo y cariño para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros que, aunque son pocos de uno u otro modo, formaron parte en la realización de este trabajo. Gracias por todo su apoyo y confianza.

A todas las personas que de una u otra forma formaron parte de mi vida durante la realización de este estudio, a las que están, a las que se fueron y a las que llegarán.

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Generalidades del agave y sotol.....	4
2.2. Fructanos.....	5
2.2.1. Generalidades de los fructanos.....	5
2.2.2. Estructura química de los fructanos.....	6
2.2.3. Características fisicoquímicas de los fructanos.....	9
2.2.4. Usos industriales de los fructanos (inulina).....	11
2.3. Métodos de extracción.....	12
2.4. Métodos alternativos de extracción en compuestos vegetales.....	13
2.4.1. Ultrasonido.....	15
2.4.1.1. Efectos del ultrasonido.....	17
2.4.1.2. Factores que afectan el ultrasonido.....	18
2.4.2. Enzimas degradantes de tejidos vegetales.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos particulares.....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Materiales.....	25

6.2. Químicos y reactivos.....	25
6.3. Estudio No. 1.....	26
6.3.1. Procedimiento experimental.....	26
6.3.2. Diseño experimental y análisis estadístico.....	27
6.4. Estudio No. 2.....	27
6.4.1. Procedimiento experimental.....	27
6.4.2. Diseño experimental y análisis estadístico.....	29
6.5. Estudio No. 3.....	29
6.5.1. Procedimiento experimental.....	29
6.5.2. Diseño experimental y análisis estadístico.....	30
6.6. Estudio No. 4.....	32
6.6.1. Materiales.....	32
6.6.2. Procedimiento experimental.....	32
6.6.2.1. Estudios preliminares de factores simples.....	32
6.6.2.2. Estudios preliminares de combinación de enzimas.....	33
6.6.2.3. Optimización de la mezcla de enzimas (concentración de enzimas) a través de un diseño ortogonal.....	34
6.6.2.4. Diseño ortogonal y análisis estadístico	35
6.6.2.5. Estudio de factores simples de la mezcla enzimática	35
6.6.2.6. Optimización de las condiciones de extracción de la mezcla enzimática a través de un diseño Box-Behnken.....	35
6.6.2.7. Análisis estadístico.....	36
6.6.2.8. Estudio de optimización de la extracción asistida con enzimas de polisacáridos de sotol	37
6.6.2.9. Análisis estadístico de datos.....	38
6.7. Estudio No. 5.....	40
6.7.1. Materiales.....	40
6.7.2. Procedimiento experimental.....	40
6.7.2.1. Estudios preliminares.....	40
6.7.2.2. Estudio de optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol	41

6.7.2.3. Análisis estadístico de datos.....	42
6.8. Estudio No. 6.....	44
6.8.1. Materiales.....	44
6.8.2. Procedimiento experimental.....	44
6.8.2.1. Extracción de antocianinas de maíz azul.....	44
6.8.2.2. Encapsulación de antocianinas de maíz azul mediante secado por aspersión	45
6.8.2.3. Análisis estadístico.....	45
6.9. MÉTODOS	46
6.9.1. Caracterización piñas de agave y sotol	46
6.9.1.1. Análisis proximal	46
6.9.1.2. Determinación de diámetro y peso de las piñas.....	46
6.9.1.3. pH.....	46
6.9.1.4. Determinación de sólidos solubles (°Brix).....	46
6.9.1.5. Determinación de la superficie específica total del polvo de sotol según el método Brunauer-Emmett-Teller.....	47
6.9.2. Cálculo de la densidad de potencia de ultrasonido (DPU).....	47
6.9.3. Cálculo de la potencia de ultrasonido (PU).....	48
6.9.4. Caracterización de los extractos de agave y sotol	48
6.9.4.1. Determinación de carbohidratos totales (CT).....	48
6.9.4.2. Determinación de azúcares reductores (AR).....	48
6.9.4.3. Determinación del rendimiento de extracción de carbohidratos (REC).....	49
6.9.4.4. Determinación del rendimiento de extracción de polisacáridos (REP).....	49
6.9.4.5. Determinación del contenido de fructanos totales (FRU).....	49
6.9.4.6. Caracterización de extractos de agave y de sotol por cromatografía de intercambio iónico.....	50
6.9.4.7. Hidrólisis de los extractos de agave y sotol	51
6.9.4.8. Determinación del grado de polimerización promedio (GP_n) de los extractos de agave y sotol	51

6.9.4.9. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_L).....	52
6.9.4.10. Determinación de la constante de velocidad enzimática (V_0).....	53
6.9.5. Determinación de la actividad de las enzimas	53
6.9.5.1. Actividad celulasa	53
6.9.5.2. Actividad pectinasa.....	54
6.9.5.3. Actividad xilanasa.....	55
6.9.5.4. Actividad hemicelulasa.....	55
6.9.5.5. Actividad de la mezcla de enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa).....	56
6.9.5.6. Cálculos para determinar la actividad enzimática.....	57
6.9.6. Caracterización física de los encapsulados de extracto de maíz azul	58
6.9.6.1. Densidad aparente.....	58
6.9.6.2. Determinación de humedad.....	58
6.9.6.3. Actividad de agua.....	58
6.9.6.4. Higroscopicidad.....	58
6.9.6.5. Determinación de pH.....	59
6.9.6.6. Índice de absorción de agua (IAA).....	59
6.9.6.7. Índice de solubilidad en agua (ISA).....	59
6.9.6.8. Temperatura de transición vítrea (T_g).....	59
6.9.6.9. Parámetros de color.....	60
6.9.6.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	61
6.9.7. Caracterización química de los encapsulados de extracto de maíz azul	61
6.9.7.1. Extracción de compuestos antioxidantes de los encapsulados de maíz azul.....	61
6.9.7.2. Determinación de antocianinas totales.....	62
6.9.7.3. Determinación de polifenoles totales.....	62
6.9.7.4. Determinación de actividad antioxidante.....	62
6.9.7.5. Determinación de antocianinas individuales por HPLC.....	63
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
7.1. Estudio No.1.....	64

7.1.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de <i>Agave tequilana</i> de diferentes edades.....	64
7.1.2. Extracción de carbohidratos de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul.....	67
7.1.3. Perfiles de los carbohidratos y GP _n de los extractos de agave obtenidos por HPAEC-PAD.....	69
7.2. Estudio No.2.....	74
7.2.1. Caracterización fisicoquímica de la planta de sotol.....	74
7.2.2. Ajuste del modelo.....	76
7.2.3. Extracción de carbohidratos totales (CT).....	76
7.2.4. Extracción de azúcares reductores (AR).....	80
7.2.5. Extracción de fructanos totales (FRU).....	80
7.2.6. Coeficiente de transferencia de masa (K_L) durante la extracción de fructanos.....	82
7.2.7. Contenido de glucosa.....	84
7.2.8. Contenido de fructosa.....	86
7.2.9. Perfiles HPAEC-PAD y grado de polimerización promedio (GP _n) de los fructanos.....	86
7.3. Estudio No. 3.....	91
7.3.1. Caracterización de la piña de sotol.....	91
7.3.2. Constantes de velocidad enzimática.....	91
7.3.3. Ajuste del modelo.....	93
7.3.4. Azúcares reductores.....	93
7.3.5. Carbohidratos totales.....	97
7.3.6. Contenido de fructanos totales (FRU).....	99
7.3.7. Constante de velocidad enzimática (V_0).....	99
7.3.8. Perfiles de azúcares individuales y grados de polimerización (GP _n)...	101
7.3.9. Optimización del proceso de extracción enzimática.....	104
7.3.10. Verificación.....	106
7.4. Estudio No. 4.....	109
7.4.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de sotol.....	109

7.4.2. Análisis de los experimentos de factores simples de la extracción de polisacáridos de sotol asistida con enzimas.....	110
7.4.2.1. Determinación de la relación líquido-sólido.....	110
7.4.2.2. Determinación del tiempo de extracción	111
7.4.2.3. Efecto del pH en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol.....	115
7.4.2.4. Efecto de la temperatura en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol.....	117
7.4.2.5. Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol.....	119
7.4.3. Efecto de la combinación de las enzimas en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol.....	122
7.4.4. Análisis ortogonal para la optimización de la concentración del complejo de enzimas.....	124
7.4.5. Optimización de los parámetros de extracción para la mezcla enzimática.....	125
7.4.5.1. Establecimiento de los niveles de los factores experimentales...	125
7.4.5.2. Análisis del diseño y ajuste del modelo.....	127
7.4.6. Diseño central compuesto para la optimización de los parámetros de extracción de la mezcla enzimática.....	131
7.4.6.1. Ajuste de modelo.....	131
7.4.6.2. Rendimiento de extracción de polisacáridos (REP).....	135
7.4.6.3. Azúcares reductores (AR).....	139
7.4.6.4. Contenido de fructanos totales (FRU).....	143
7.4.6.5. Grado de polimerización promedio (GP_n).....	147
7.4.7. Optimización del proceso de extracción de fructanos de sotol (<i>Dasyliirion wheeleri</i>) asistido con enzimas.....	151
7.5. Estudio No. 5.....	153
7.5.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de sotol.....	153
7.5.2. Efecto de diferentes tratamientos de extracción en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol (selección de tratamientos sinérgicos).....	153

7.5.3. Efecto de las variables independientes sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol.....	156
7.5.3.1. Efecto del tiempo de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos.....	156
7.5.3.2. Efecto de la relación líquido-sólido sobre el rendimiento de polisacáridos.....	157
7.5.3.3. Efecto de la potencia de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos.....	158
7.5.4. Estudio de optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de plantas de sotol.....	159
7.5.4.1. Establecimiento de las variables de extracción	159
7.5.4.2. Análisis del diseño y ajuste del modelo al proceso de extracción	160
7.5.4.3. Rendimiento de extracción de polisacáridos (REP).....	160
7.5.4.4. Azúcares reductores (AR).....	167
7.5.4.5. Azúcares individuales (glucosa, fructosa y sacarosa).....	169
7.5.4.6. Contenido de fructanos totales (FRU).....	171
7.5.4.7. Grado de polimerización promedio (GP _n).....	174
7.5.5. Optimización del proceso de extracción enzimática asistido con ultrasonido de fructanos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	177
7.6. Estudio No. 6.....	179
7.6.1. Caracterización del extracto de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.).....	179
7.6.2. Caracterización de los polvos.....	181
7.6.2.1. Propiedades físicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul.....	181
7.6.2.2. Densidad aparente.....	181
7.6.2.3. Contenido de humedad.....	183
7.6.2.4. Actividad de agua (a _w).....	185
7.6.2.5. Higroscopicidad.....	186
7.6.2.6. pH.....	187
7.6.2.7. Índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad en agua (ISA).....	187

7.6.2.8. Temperatura de transición vítrea (T_g).....	188
7.6.2.9. Color de los encapsulados de antocianinas de maíz azul.....	190
7.6.2.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	193
7.6.3. Propiedades químicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul.....	196
7.6.3.1. Antocianinas totales.....	196
7.6.3.2. Polifenoles totales.....	200
7.6.3.3. Actividad antioxidante.....	203
7.6.3.4. Antocianinas individuales.....	205
VIII. CONCLUSIONES.....	212
8.1. Estudio No. 1.....	212
8.2. Estudio No. 2.....	213
8.3. Estudio No. 3.....	214
8.4. Estudio No. 4.....	215
8.5. Estudio No. 5.....	216
8.6. Estudio No. 6.....	217
IX. PERSPECTIVAS.....	218
X. BIBLIOGRAFÍA.....	219
ANEXOS.....	245
ANEXO 1.....	245
ANEXO 2.....	246
ANEXO 3.....	248
ANEXO 4.....	249
ANEXO 5.....	250
ANEXO 6.....	253
ANEXO 7.....	255
ANEXO 8.....	256
ANEXO 9.....	257
ANEXO 10.....	258

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Variables de proceso y niveles usados en el diseño experimental de la extracción de fructanos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>) a diferentes potencias de ultrasonido y temperaturas.....	28
2	Combinación de las variables usadas en el diseño experimental para la extracción de carbohidratos de sotol asistido con ultrasonido.....	28
3	Variables de proceso y niveles usados en el diseño experimental de la extracción de fructanos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>) a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.....	30
4	Combinación de las variables usadas en el diseño experimental para la extracción de carbohidratos de sotol asistido con enzimas.....	31
5	Combinación de enzimas para la extracción de fructanos a partir de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	33
6	Diseño ortogonal para la combinación de enzimas.....	34
7	Variables independientes y sus niveles usados en el diseño Box-Behnken	36
8	Matriz del diseño Box-Behnken para la extracción de polisacáridos de sotol.....	37
9	Variables independientes y sus niveles usados en el diseño central compuesto.....	38
10	Combinación de las variables usadas en el diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	39
11	Variables independientes y sus niveles usados en el diseño central compuesto.....	42
12	Matriz del diseño central compuesto para la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol.....	43
13	Características físicas y químicas de plantas de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul de diferentes edades.....	64
14	Análisis de varianza del rendimiento de extracción de carbohidratos, fructanos y grado de polimerización.....	65
15	Rendimiento de extracción de carbohidratos, contenido de fructanos y grado de polimerización de plantas de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul de diferentes edades extraídas a diferentes potencias de ultrasonido y relaciones sólido-líquido.	66
16	Propiedades fisicoquímicas de la planta de <i>Dasyilirion wheeleri</i> silvestre.....	74
17	Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, fructanos, coeficiente de transferencia de masa, glucosa, fructosa y grado de polimerización promedio de extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>) obtenidos a diferentes potencias ultrasónicas y temperaturas.....	77
18	Análisis de varianza del contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, fructanos, coeficiente de transferencia de masa, glucosa, fructosa y grado de polimerización promedio de extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).	78

19	Coeficientes de regression del modelo de segundo orden ajustado para las diferentes variables de respuesta de los extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).	78
20	Caracterización física y química de la piña de sotol silvestre (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).	91
21	Azúcares reductores, glucosa, fructosa, fructanos, carbohidratos totales, constantes de velocidad enzimática, grado de polimerización promedio y contenido de sacarosa de extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>) obtenidos a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.....	94
22	Análisis de varianza del contenido de azúcares reductores, glucosa, fructosa, fructanos, carbohidratos totales, constante de velocidad enzimática, grado promedio de polimerización y contenido de sacarosa de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i> obtenidos a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.....	95
23	Coeficientes de regresión del modelo de segundo orden ajustado para las diferentes variables de respuesta relacionando las variables (concentración de enzima y sustrato) para extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	95
24	Valores experimentales y estimados de las variables de respuesta.....	108
25	Propiedades fisicoquímicas de las plantas de <i>Dasyilirion wheeleri</i> silvestre.....	109
26	Resultados del experimento ortogonal.....	125
27	Diseño Box-Behnken y resultados de rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de los extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	128
28	Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de los extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	129
29	Coeficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (temperatura, pH y relación L-S) para los extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	130
30	Resultados del diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	132
31	Análisis de varianza del diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	133
32	Coeficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (concentración de enzimas y temperatura) para los extractos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	134
33	Diseño central compuesto y resultados de rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	161

34	Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	162
35	Coefficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzima) para la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>).....	163
36	Características fisicoquímicas del extracto de maíz azul (<i>Zea mays</i> L.)...	179
37	Propiedades físicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.....	182
38	Propiedades físicas y térmicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.....	182
39	Parámetros de color de encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.....	192
40	Antocianinas totales, polifenoles totales y actividad antioxidante de los encapsulados de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.....	197
41	Contenido de antocianinas individuales de los encapsulados de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.....	209
42	Actividad enzimática de la celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa...	249

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Ejemplo de diferentes tipos de fructanos.....	7
2	Estructura de fructano de <i>Agave tequilana</i> var. azul (agavina)	8
3	Estructura química de las moléculas GF _n α-D-glucopiranosil-[β-D-fructofuranosil] _{n-1} -D-fructofuranósido y F _n β-D-fructopiranosil-[α-D-fructofuranosil] _{n-1} -D-fructofuranósido.....	9
4	Fenómeno de cavitación.....	16
5	Fenómeno de implosión de una burbuja de cavitación.....	17
6	Contenidos de glucosa (a); fructosa (b); y sacarosa (c) en extractos de plantas de <i>A. tequilana</i> de 6 y 7 años extraídos a diferentes DPU.....	70
7	Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos de plantas de <i>A. tequilana</i> de diferentes edades extraídas a 120 mW/mL y a una relación sólido:líquido de 1:3.....	72
8	Isotermas de adsorción y desorción del polvo de sotol. ♦ Desorción. ○ Adsorción.....	75
9	Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre los carbohidratos totales de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	79
10	Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre los azúcares reductores de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	81
11	Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el contenido de fructanos (a) y el coeficiente de transferencia de masa (b) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	83
12	Superficies de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el contenido de glucosa (a) y fructosa (b) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	85
13	Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de <i>Dasyilirion wheeleri</i> extraídas a diferentes potencias ultrasónicas y temperaturas de extracción.....	87
14	Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el grado de polimerización promedio (GP _n) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	89
15	Cinética enzimática de AR liberados <i>versus</i> tiempo de extracción. ■ Tratamiento 2 (150 U/mL de enzima con 8 g/100 mL de sustrato). ○ Tratamiento 5 (0 U/mL de enzima con 16.5 g/100 mL de sustrato).....	92
16	Superficie de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de azúcares reductores (a), glucosa (b) y fructosa (c) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	96
17	Superficie de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de carbohidratos totales de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	98

18	Superficies de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de fructanos (a) y la constante de velocidad enzimática (b) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	100
19	Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de <i>Dasyilirion wheeleri</i> extraídas a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.....	102
20	Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de <i>Dasyilirion wheeleri</i> extraídas a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.....	103
21	Superficies de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el grado de polimerización promedio (a) y el contenido de sacarosa (b) de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i>	105
22	Región optimizada obtenida para los diagramas de contorno de las características químicas de los extractos de <i>Dasyilirion wheeleri</i> obtenidos por extracción enzimática (AR, CT, FRU, V_0 , GP _n , y contenido de glucosa, fructosa y sacarosa).....	107
23	Rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol a diferentes relaciones líquido-sólido.	110
24	Cinética enzimática de liberación de azúcares reductores.....	111
25	Cinética enzimática de extracción de polisacáridos de sotol, mediante diferentes enzimas.....	113
26	Efecto del pH de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulasa, b) pectinasa, c) xilanas, d) hemicelulasa.....	116
27	Efecto de la temperatura de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulasa, b) pectinasa, c) xilanas, d) hemicelulasa.	118
28	Efecto de la concentración de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulasa, b) pectinasa, c) xilanas, d) hemicelulasa.....	120
29	Resultados de la extracción de polisacáridos de sotol a partir de la combinación de enzimas (celulasa, pectinasa, xilanas y hemicelulasa)....	123
30	Resultados del análisis de factores simples para el complejo de enzimas encontrado con el diseño ortogonal. a) temperatura, b) pH, c) relación L-S, d) tiempo.....	126
31	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanas (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanas (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanas-hemicelulasa (f) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.....	137
32	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-	

	temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanas-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.....	138
33	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanas (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanas (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanas-hemicelulasa (f) sobre el contenido de azúcares reductores.....	140
34	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanas-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el contenido de azúcares reductores....	142
35	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanas (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanas (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanas-hemicelulasa (f) sobre el contenido de fructanos totales.....	144
36	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanas-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el contenido fructanos totales.....	146
37	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanas (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanas (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanas-hemicelulasa (f) sobre el GP _n	149
38	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanas-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el GP _n	150
39	Región optimizada de la superposición de las gráficas de contorno de los extractos de sotol obtenidos por extracción asistida con enzimas, manteniendo fijas las concentraciones de las enzimas pectinasa, xilanas y hemicelulasa en 4%. FRU, REP, AR.....	152
40	Efecto de diferentes tratamientos de extracción sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol (<i>Dasyilirion wheeleri</i>). E-U _s : tratamiento enzimático asistido con ultrasonido (simultáneo); U-E: tratamiento asistido con ultrasonido seguido de enzimático; E-U: tratamiento enzimático seguido de ultrasonido; tratamiento control a 85 °C.	154
41	Cinética de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol.....	156

42	Efecto de la relación líquido-sólido sobre el rendimiento de polisacáridos de sotol.....	157
43	Efecto de la potencia de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos de sotol.....	158
44	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.....	165
45	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el contenido de azúcares reductores.....	168
46	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a, d) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b, e) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c, f) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W), sobre en contenido de glucosa y fructosa, respectivamente.....	170
47	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre en contenido de sacarosa.....	172
48	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el contenido de fructanos totales.....	173
49	Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el GP _n	176
50	Región optimizada de la superposición de las gráficas de contorno de los extractos de sotol obtenidos por tratamientos enzimáticos asistidos con ultrasonido, manteniendo fija la potencia de ultrasonido en 45 W. FRU, REP, AR.....	178

51	Polvos encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con fructanos de agave. a) 6%, b) 8%, c) 10%, d) 12%.....	191
52	Microscopía electrónica de barrido de los encapsulados de antocianinas de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave. (a) 6%, (b) 8%, (c) 10%, (d) 12% y (e) fructanos de agave.....	194
53	Contenido de antocianinas totales de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave.....	198
54	Contenido de polifenoles totales de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave.....	202
55	Actividad antioxidante de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave.....	204
56	Cromatogramas de los estándares (a) y del extracto de maíz azul (b).....	206
57	Cromatogramas de los encapsulados de extracto de maíz azul con diferentes concentraciones de fructanos de agave. (a) 6%, (b) 8%, (c) 10%, (d) 12%.....	210

RESUMEN

Durante esta investigación se estudió el efecto individual o combinado del ultrasonido con y sin la utilización de enzimas degradantes de pared celular con procesos de extracción térmica convencional de fructanos provenientes de piñas maduras de planta de sotol (*Dasyilirion wheeleri*), y de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) a diferentes condiciones de extracción. Este trabajo de tesis consistió en el desarrollo de diferentes estudios; en el primero, se evaluó el efecto de la extracción asistida con ultrasonido a diferentes potencias ultrasónicas y diferentes relaciones sólido-líquido en la extracción de carbohidratos de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) de dos diferentes edades. En un segundo estudio se evaluó la extracción de fructanos de plantas de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a diferentes condiciones de potencia de sonicación y temperatura, determinando porcentajes de extracción de carbohidratos y otros cambios físicos y químicos que ocurren durante el proceso. Durante el tercer estudio se evaluaron las condiciones de una extracción asistida con enzima usando una mezcla enzimática comercial (Pectinex Ultra SP-L) para obtener fructanos a partir de sotol (*Dasyilirion wheeleri*); de esta manera se optimizó la concentración de enzima y la concentración de sustrato en este caso el sotol. En el estudio número 4 se obtuvo una mezcla enzimática con de cuatro enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa) para la extracción de carbohidratos de plantas silvestres de sotol (*Dasyilirion wheeleri*); estudiándose en primer lugar las condiciones de extracción de cada enzima (concentración, temperatura, pH y tiempo), con los datos obtenidos se optimizó la concentración de cada una de las enzimas dentro de la mezcla enzimática propuesta. Como quinto estudio o fase del proyecto; con el mejor tratamiento del coctel enzimático obtenido se evaluó el efecto de este tratamiento, así como el de ultrasonido en forma individual y combinada, evaluando los cambios químicos (azúcares reductores y totales), rendimientos de extracción de fructanos. Con los resultados obtenidos en los diferentes estudios se establecieron condiciones de proceso que derivaron en la obtención de fructanos con buenos rendimientos y calidad. Por último, como estudio número seis se evaluó el efecto de fructanos tipo inulina de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) como acarreador o material de pared en diferentes concentraciones para la microencapsulación de pigmentos naturales presentes en el maíz azul (antocianinas) mediante secado de aspersión.

ABSTRACT

During this research, the individual or combined effect of ultrasound, with and without the use of degrading cell wall enzymes, with conventional thermal extraction processes of fructans from sotol heads (*Dasyllirion wheeleri*) and agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) were studied at different extraction conditions. This work consisted in the development of different studies. Firstly, the effect of ultrasound-assisted extraction at different ultrasonic powers and different solid-liquid ratios in the extraction of carbohydrates of agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) of two different ages was evaluated. In a second study the extraction of fructans from sotol plants (*Dasyllirion wheeleri*) was evaluated at different conditions of sonication power and temperature, determining the carbohydrate extraction yields and other physical and chemical changes that occur during the process. During the third study the conditions of an enzyme-assisted extraction were evaluated using a commercial enzyme mixture (Pectinex Ultra SP-L) to obtain fructans from sotol (*Dasyllirion wheeleri*); the enzyme concentration and the substrate concentration (amount of sotol) were optimized. In study number 4, an enzymatic mixture was obtained with 4 enzymes (cellulase, pectinase, xylanase and hemicellulase) for the extraction of carbohydrates from wild sotol plants (*Dasyllirion wheeleri*); studying firstly the conditions of extraction of each enzyme (concentration, temperature, pH and time), with the data obtained the concentration of each enzyme within the proposed enzymatic mixture was optimized. As the fifth study; with the best treatment of the enzymatic cocktail obtained, the effect of this treatment was evaluated, as well as combined with ultrasound, evaluating the chemical changes (reducing and total sugars), and fructan extraction yields. With the obtained results in the different studies, process conditions were established that led to obtaining fructans with good yields and quality. Finally, as a study number six, the effect of type-inulin fructans of agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) as a carrier or wall material in different concentrations was evaluated for the microencapsulation of natural pigments of blue maize (anthocyanins) by spray drying.

I. INTRODUCCIÓN

Los fructanos son carbohidratos de reserva constituidos principalmente por cadenas de fructosa unidos por enlaces fructosil-fructosa de forma lineal o ramificada. Estos carbohidratos se encuentran en cantidades significativas en algunas frutas y vegetales. Entre las plantas que los contienen se encuentran las plantas de la familia Agavaceae, de la que México ha sido considerado el centro de origen y biodiversidad del género agave. Dentro de éstas se encuentra el *Agave tequilana* que posee un contenido importante de estos polisacáridos; aunque su destino principal está dirigido a la obtención de tequila, la producción de fructanos tipo inulina puede considerarse como procedimiento alternativo. Otra de las plantas, y con algunas similitudes a las agaváceas es el sotol (*Dasyliirion* spp.) perteneciente a la familia Nolinaceae, ésta se cultiva en el norte de México específicamente en el Estado de Chihuahua, y actualmente es utilizada para la producción de una bebida alcohólica de denominación de origen llamada “sotol”. Además, esta planta está siendo estudiada para su cultivo en forma controlada y de esta forma crear alternativas para su expansión en las zonas semi-desérticas del estado de Chihuahua.

Es importante señalar que el conocimiento acerca del contenido de estos carbohidratos en la planta de sotol es escaso por lo que este estudio representa además de las alternativas económicas y sociales, la generación de nuevo conocimiento acerca del contenido y de las características químicas, físicas y estructurales, proveniente de esta planta. Aún, cuando tradicionalmente el destino de la piña de sotol ha sido dirigido a la producción de bebidas alcohólicas, la demanda para el desarrollo y producción de alimentos funcionales ha conducido a que parte de estos cultivos sean explorados y en algunos casos (agave) destinados a la obtención de fructanos tipo inulina, oligofructanos y mieles utilizadas en formulaciones de alimentos como sustitutos de grasas, fuente de fibra y como edulcorantes.

Industrialmente el método empleado para la extracción de fructanos es térmico, e incluye la purificación con carbonatación ácida y resinas de intercambio iónico; este método es preferido sobre los demás ya que no exige costos elevados ni riesgos industriales. Sin embargo, la aplicación de altas temperaturas durante la extracción deriva en un incremento del consumo de energía, sumando a esto, los efectos en los rendimientos y daño que pueda generarse sobre la molécula durante el proceso y en etapas posteriores a éste. Los fructanos

tipo inulina se consideran de alta calidad cuando se encuentran en su estructura completa, es decir, cuando no ha sufrido ninguna hidrólisis. Dentro de las alternativas para mejorar la metodología del proceso de extracción de este tipo de componentes a partir de tejidos vegetales están la utilización de tecnologías no convencionales o emergentes, como el ultrasonido ya que su uso permite la extracción a menores temperaturas, reduciendo de manera significativa el tiempo de proceso y favoreciendo el rendimiento de la extracción. Adicionalmente las piñas del sotol pueden pre-tratarse con enzimas (celulasas, pectinasas, xilanasas y hemicelulasas) en condiciones controladas, generando cambios en la pared celular y facilitando la liberación de fructanos. En nuestro laboratorio algunos resultados de estudios indican una mejora en la extracción de azúcares, componentes solubles y de fructanos, indicando una mejora durante la aplicación de pre-tratamientos enzimáticos asistidos con ultrasonido, durante el proceso de extracción.

Acorde a estos resultados, en esta investigación se estudió el efecto individual o combinado del ultrasonido con y sin la utilización de enzimas degradantes de pared celular con procesos de extracción térmica convencional de fructanos provenientes de piñas maduras de planta de sotol (*Dasyilirion spp.*), y de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) a diferentes condiciones de extracción. Este trabajo de tesis consistió en el desarrollo de diferentes estudios; en el primero, se evaluó el efecto de la extracción asistida con ultrasonido a diferentes potencias ultrasónicas y diferentes relaciones sólido-líquido en la extracción de carbohidratos de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) de dos diferentes edades. En un segundo estudio se evaluó la extracción de fructanos de plantas de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a diferentes condiciones de potencia de sonicación y temperatura, determinando porcentajes de extracción de carbohidratos y otros cambios físicos y químicos que ocurren durante el proceso. Durante el tercer estudio se evaluaron las condiciones de una extracción asistida con enzima usando una mezcla enzimática comercial (Pectinex Ultra SP-L) para obtener fructanos a partir de sotol (*Dasyilirion wheeleri*); de esta manera se optimizó la concentración de enzima y la concentración de sustrato en este caso el sotol. En el estudio número cuatro se obtuvo una mezcla enzimática de cuatro enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa) para la extracción de carbohidratos de plantas silvestres de sotol (*Dasyilirion wheeleri*); estudiándose en primer lugar las condiciones de extracción de cada enzima (concentración, temperatura, pH y

tiempo), con los datos obtenidos se optimizó la concentración de cada una enzima dentro de la mezcla enzimática propuesta. Como quinto estudio o fase del proyecto; con el mejor tratamiento del coctel enzimático obtenido se evaluó el efecto de este tratamiento, así como el de ultrasonido en forma individual y combinada, evaluando los cambios químicos (azúcares reductores y totales), rendimientos de extracción de fructanos. Con los resultados obtenidos en los diferentes estudios se establecieron condiciones de proceso que derivaron en la obtención de fructanos con buenos rendimientos y calidad. Por último, como estudio número seis se evaluó el efecto de fructanos tipo inulina de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) como acarreador o material de pared en diferentes concentraciones para la encapsulación de pigmentos naturales presentes en el maíz azul (antocianinas) mediante secado de aspersión.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del agave y sotol

El agave es considerado originario de México en donde existen una gran diversidad de plantas de agave con alrededor de 200 especies reportadas (Peña-Álvarez *et al.*, 2004). Es un cultivo de importancia a nivel agroindustrial en el país, ya que cuenta con una amplia superficie cosechada ya que crece y se desarrolla adecuadamente en diferentes y a veces contrastantes atmósferas ambientales (Mancilla-Margalli y López 2006). Desde el punto de vista económico varias especies de agave son importantes para la producción de bebidas alcohólicas como el pulque y el mezcal. Dentro de estas especies una de las más importantes es el *Agave tequilana* Weber var. azul, comúnmente conocido como Agave azul (Waleckx *et al.*, 2008), el cual constituye la materia prima para la producción de la bebida alcohólica con denominación de origen “Tequila” (Peña-Álvarez *et al.*, 2004). Otra planta similar al agave y que es de interés sobre todo en la zona norte del país que es donde mayormente se produce en forma silvestre o se cultiva, debido a la prevalencia de condiciones climáticas extremas (Mancilla-Margalli y López 2006), específicamente en el desierto Chihuahuense es el sotol (*Dasylyrion* spp.) el cual es destinado principalmente para la producción de la bebida denominada con el mismo nombre “Sotol”. Este tipo de plantas del tipo “suculentas”, como el agave y el *Dasylyrion* spp. debido a que han sufrido adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir en condiciones adversas y que se han adaptado a regiones áridas y semiáridas, pueden almacenar grandes cantidades de carbohidratos, provenientes del “metabolismo ácido de las crasuláceas” (CAM) por su abreviatura en inglés (López *et al.*, 2003).

El CAM, es un metabolismo de respiración, en donde las estomas de la planta se abren durante la noche para consumir CO₂ y liberar agua, sin embargo, debido a que la temperatura es más fría por la noche, las pérdidas de agua por evaporación son mínimas, acción indispensable para las plantas sometidas a estrés hídrico. En el CAM las estomas de la planta se cierran durante el día y el CO₂ liberado internamente por la planta, no puede escapar de la hoja, teniendo que reducirse a carbohidrato dando lugar al producto fotosintético principal del CAM que son los fructanos, los cuales se almacenan como carbohidratos de reserva (López *et al.*, 2003).

Es por esto por lo que además de producir bebidas alcohólicas con este tipo de plantas debido a su elevado contenido de azúcares, alternativamente por a su alto contenido de fructanos éstas pueden destinarse para la producción de otros productos de interés comercial tal como la inulina o fructanos con un menor grado de polimerización (GP), teniendo en cuenta sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (Leite *et al.*, 2007; Madrigal y Sangronis 2007).

2.2. Fructanos

Los fructanos son oligómeros o polímeros de fructosa con enlaces β -fructofuranósido, comúnmente solubles en agua y sintetizados a partir de la acumulación de sacarosa en la vacuola de las células de las plantas (Vijn y Smeekens 1999; Vizcaíno-Rodríguez *et al.*, 2012). En otras palabras, son compuestos en los cuales uno o más enlaces fructosil-fructosa constituyen la mayoría de los enlaces, es decir, están constituidos mayoritariamente de residuos de fructosa, incluso, se incluye el disacárido compuesto por dos unidades de fructosa, llamado inolubiosa. Los fructanos son en ocasiones llamados polifruetosilfructosa, relativo a los múltiples enlaces entre fructosas (Roberfroid, 2004).

2.2.1. Generalidades de los fructanos

Los fructanos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran como carbohidratos de reserva en aproximadamente 15% de las plantas de floración (Hendry, 1993), representando el segundo mecanismo más común de almacenamiento de energía (después de almidón). Actualmente las inulinas de achicoria y de alcachofa Jerusalem son fuentes importantes de fructanos industrialmente, mientras que los fructanos de *Agave* y *Dasyilirion* son la fuente de carbono para la fermentación de los procesos de bebidas alcohólicas tradicionales como Tequila, Mezcal, Bacanora y Sotol (de León-Rodríguez *et al.*, 2006; Waleckx *et al.*, 2008). También se ha reportado que los fructanos son producidos por microorganismos como bacterias ácido lácticas (Korakli y Vogel 2006) y por hongos.

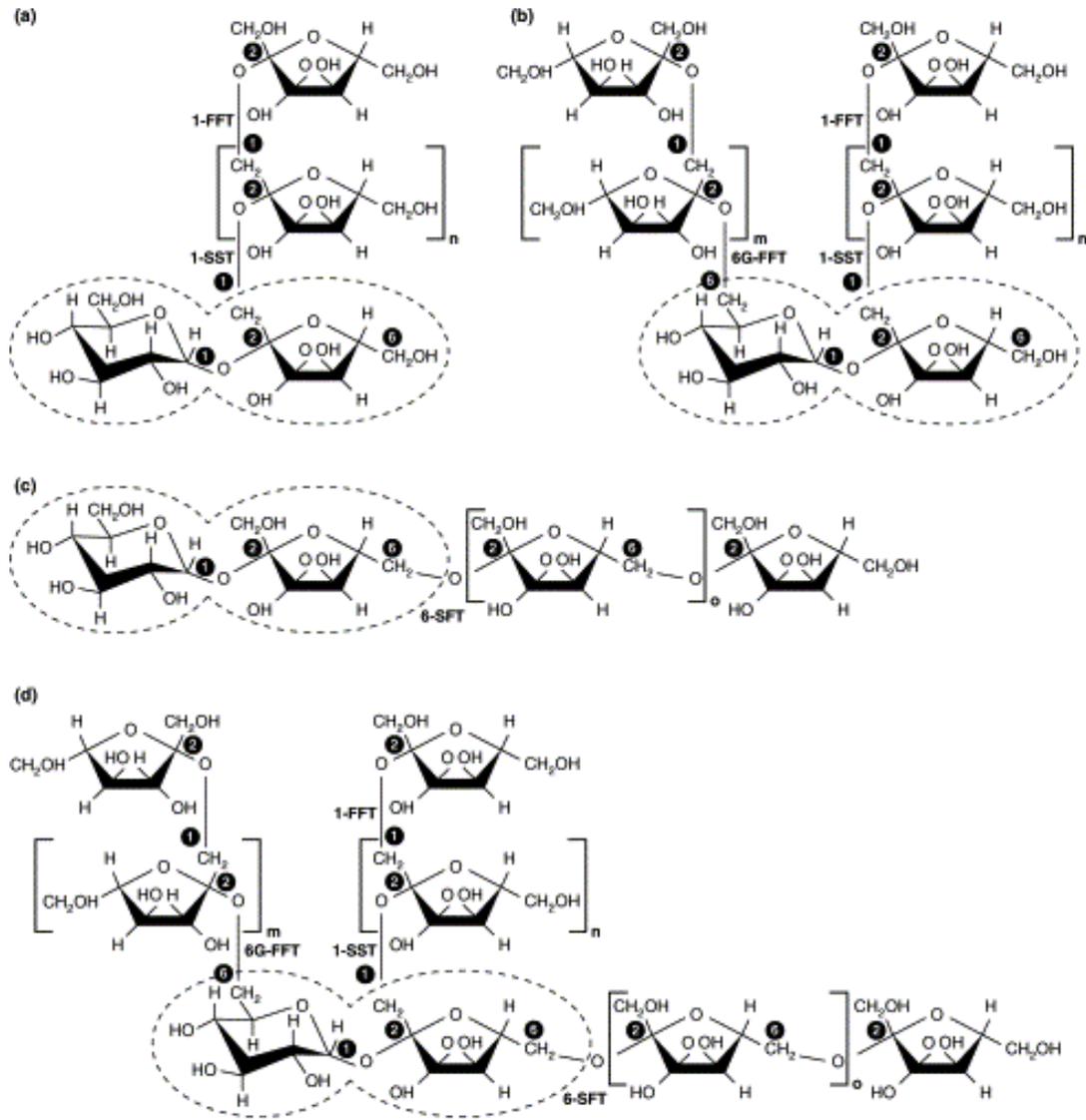
Hoy en día se conoce más de los beneficios los fructanos, ya que este tipo de compuestos ofrecen una exclusiva combinación de ventajas nutricionales y tecnológicas. Por lo anterior, los fructanos son un ejemplo práctico de ingredientes activos en alimentos lo cual

convierte al producto portador como “alimento funcional” (Franck, 2002). Los fructanos son legalmente clasificados como ingredientes alimenticios (no como aditivos), por varios países como Estados Unidos, Australia, Canadá, Japón, etc. Incluso Estados Unidos da el título de producto “Generalmente reconocido como seguro” o GRAS por sus siglas en inglés. Los fructanos son utilizados recientemente por la industria alimentaria, por su alta funcionalidad y versatilidad. Son fibra soluble dietética de sabor, color y olor neutro, bajos en calorías, con excelentes cualidades de gelificación, alta capacidad de retención de agua, sinérgico con gomas, y con la habilidad de estabilizar espumas y emulsiones. Estas propiedades únicas de los fructanos, los hacen el ingrediente ideal para remplazar la grasa en una gran variedad de alimentos como productos lácteos, cárnicos y horneados, bajando las calorías, adicionando fibra soluble dietética y como prebiótico (Castellanos-Pérez *et al.*, 2012).

2.2.2. Estructura química de los fructanos

Como ya se mencionó los fructanos son polímeros compuestos principalmente por unidades de fructosa, con al menos un enlace fructosil-glucosa, igual al de la sacarosa (disacárido de glucosa y fructosa) y cuando se presenta es común que sea el enlace precursor en la cadena polimérica. La presencia de una molécula inicial de sacarosa no es necesariamente una condición para que el compuesto pueda ser considerado como fructano; por esto, muchos fructanos comienzan con fructosa (Kelly, 2008). Estructuralmente, los fructanos pueden ser clasificados dependiendo del tipo de enlace predominante y del tamaño de la cadena. Por ejemplo, son clasificados como inulinas cuando predominantemente tienen enlaces glucosídicos β -(2→1) entre moléculas de fructosa (fructosil-fructosa). Las inulinas pueden ser de cadena lineal y con un grado de polimerización de 2-70 unidades. Las levanas son moléculas lineales de cadena corta unida por enlaces β -(2→6), con la presencia ocasional, o no, de uniones β -(2→1), que, a diferencia del resto de los fructanos, las levanas pueden ser de origen vegetal o fúngico. Las graminanas son un tipo de fructanos ramificados los cuales presentan los dos tipos de enlaces, β -(2→6) y β -(2→1), que pueden tener residuos de glucosa, principalmente polímeros de fructosa (Roberfroid, 2004). Las neoserias de inulina contienen una fracción de glucosa entre dos unidades de fructofuranosil extendidas por enlaces β -(2→1) y por último las neoserias de levana están formadas por enlaces β -(2→1) y β -(2→6) con

unidades de fructofuranosil en cualquiera de los extremos de una molécula central de sacarosa. Diferentes estructuras de fructanos se muestran en la Figura 1.



Current Opinion in Plant Biology

Figura 1. Ejemplo de diferentes tipos de fructanos. La sacarosa (dímero de glucosa y fructosa unido por enlace α -(1→2)), que es la molécula precursora de los fructanos, se resalta en círculos. (a) Inulina en cadena lineal unidas entre sí por enlaces fructosil-fructosa β -(2→1). (b) Neoserie de inulina que contiene dos cadenas lineales unidas entre sí mediante enlaces fructosil β -(2→1) y β -(2→6). (c) Levana con una cadena lineal de enlaces fructosil β -(2→6) unida al residuo fructosil de la sacarosa precursora (d)

Graminana que es un fructano ramificado, ambos tipos de enlace fructosil β -(1 \rightarrow 2) y β -(2 \rightarrow 6) están presentes y las ramificaciones pueden ocurrir en cualquier residuo fructosil (Ritsema y Smeekens 2003).

Además de todas estas estructuras a través de la ramificación, particularmente en la posición complementaria β -(2 \rightarrow 6) en el caso de las inulinas y β -(2 \rightarrow 1) en el caso de las levanas) se pueden derivar una serie de estructuras complejas. Este es el caso de los fructanos del *Agave tequilana* var. azul, en los cuales su alto grado de ramificación llevó a nombrarlos como agavinas (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López 2006) (Figura 2).

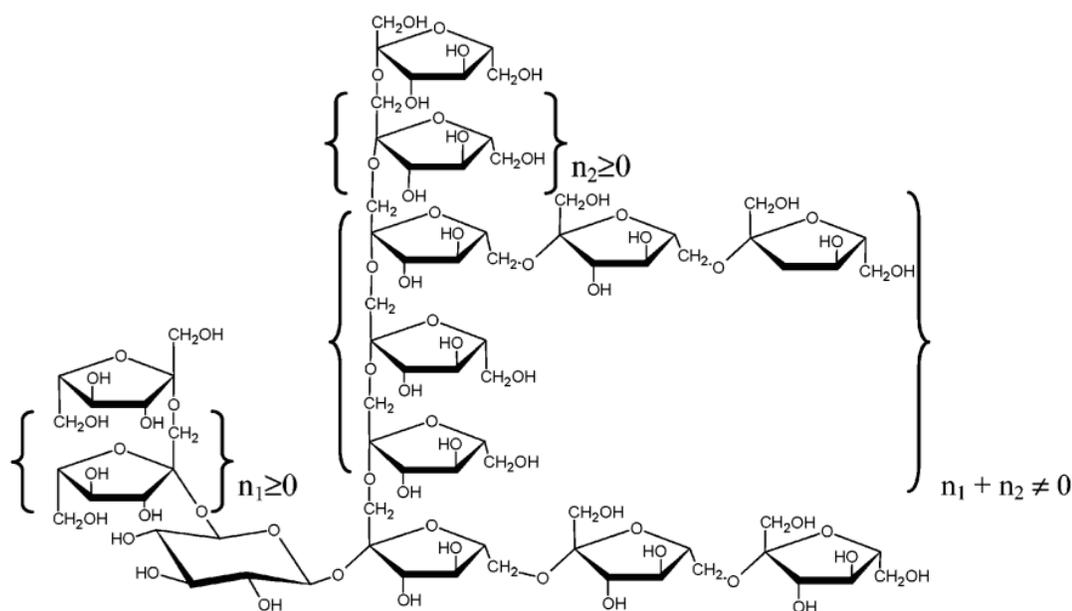


Figura 2. Estructura de fructano de *Agave Tequilana* var. azul (agavina) propuesta por Mancilla-Margalli y López (2006).

Las inulinas con una unidad de glucosa terminal son llamadas α -D-glucopiranosil- $[\beta$ -D-fructofuranosil] $_{n-1}$ -D-fructofuranósido o fructooligosacáridos (FOS), mientras que los que solo están constituidos por fructosa β -D-fructopiranosil- $[\alpha$ -D-fructofuranosil] $_{n-1}$ -D-fructofuranósido o inulooligosacáridos (Roberfroid, 2004). Por lo tanto, la fórmula general se puede representar como GF_n o F_n , con G como glucosa y F como fructosa y n caracteriza en número total de unidades de fructosa. En la Figura 3 se muestran un ejemplo de estas estructuras.

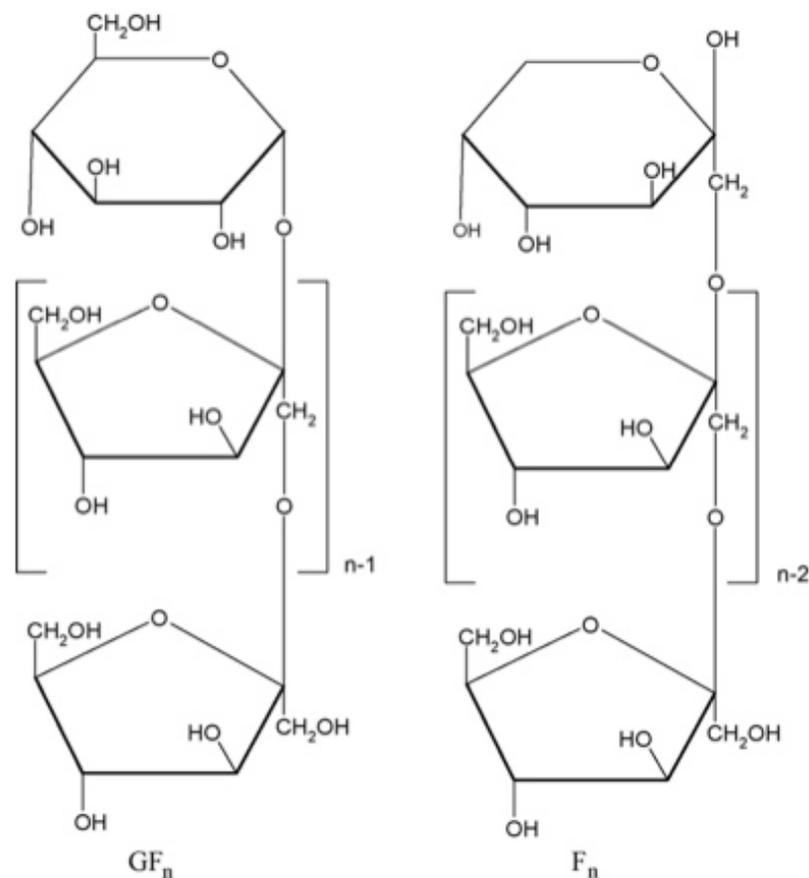


Figura 3. Estructura química de las moléculas GF_n α -D-glucopiranosil- $[\beta$ -D-fructofuranosil] $_{n-1}$ -D-fructofuranósido y F_n β -D-fructopiranosil- $[\alpha$ -D-fructofuranosil] $_{n-1}$ -D-fructofuranósido. n es el grado de polimerización o el número de unidades de β -D-fructofuranosa; G y F representan la glucosa y la fructosa, respectivamente (Ronkart *et al.*, 2007).

2.2.3. Características fisicoquímicas de los fructanos

Los fructanos presentan una serie de características químicas muy peculiares. Como se expuso con anterioridad, los grados de polimerización de los fructanos son variables según la fuente de donde se extraigan. De esta manera los fructanos de tipo inulina tienen un rango en grado de polimerización (GP) de 2 a 70 y los fructooligosacáridos (FOS) derivados de la hidrólisis de fructanos de 2 a 10 (Roberfroid, 2004; Chacón-Villalobos,

2006). Los pesos moleculares de los fructanos son muy variables según la fuente, con pesos moleculares que oscilan en el intervalo entre 1000 y 4500 Da (Chacón-Villalobos, 2006). A diferencia del almidón que es mayoritariamente insoluble, los fructanos son totalmente solubles en agua. Los fructanos “nativos”, aquellos que no se han purificado, contienen moléculas de glucosa, fructosa, sacarosa y pequeños oligosacáridos (Franck, 2006), presentan un porcentaje de disolución a una temperatura de 25 °C del 12% (Roberfroid, 2004). En presencia de agua e incrementando la temperatura, la solubilidad de los fructanos tipo inulina aumenta, por ejemplo, presentan una solubilidad en agua igual a 60 g/L a una temperatura de 10 °C y de 330 g/L a 90 °C. Además, la inulina en su estado sólido puro suele presentar formas cristalinas, las cuales suelen ser higroscópicas y difíciles de mantener en forma liofilizada a no ser que se empleen atmósferas modificadas. Estos cristales pueden tener puntos de fusión que van de los 199 °C a los 200 °C cuando se trata de fructanos de bajo grado de polimerización. La solubilidad es también apreciable en etanol al 80% especialmente a una elevada temperatura de alrededor de 80 °C. La capacidad de ser hidrosolubles otorga a los fructanos propiedades humectantes por lo tanto pueden emplearse para usos distintos en la industria; por ejemplo, en la industria alimenticia se aprovecha la solubilidad de los fructanos para la creación de geles que proporcionen un aumento en la densidad del producto, así como texturas suaves y cremosas (Chacón-Villalobos, 2006).

La viscosidad de las disoluciones de los fructanos es generalmente más alta que la de los demás carbohidratos a la misma concentración, así como suele tener mayor estabilidad térmica (Franck, 2006). Como cualquier carbohidrato, los fructanos, se hidrolizan fácilmente por acción de ácidos o enzimas; la oligofructosa comercial es de hecho obtenida muchas veces por medio de una hidrólisis parcial de la inulina cruda. Los fructanos suelen ser muy estables a los rangos de pH encontrados en la mayoría de los alimentos (pH entre 4-7), así como estables en refrigeración (Chacón-Villalobos, 2006). La velocidad de hidrólisis de los fructanos depende de las propiedades del enlace glucosídico. En particular, el enlace glucosil-fructosa es de 4-5 veces más resistente a una hidrólisis ácida que el fructosil-fructosa. Sin embargo, una unidad terminal de fructosa es atacada más fácilmente que aquellas que se encuentran en el interior de la cadena y que debido a su conformación estructural no se encuentran expuestas al medio ácido (Barclay,

et al., 2010),

Otra forma de hidrolizar los fructanos es térmicamente. La velocidad de hidrólisis de la inulina en un pH neutro puede ser considerada insignificante en procesos a ≈ 60 °C, pero pueden ser más relevantes a temperaturas mayores, sobre todo si el pH decrece (Barclay, *et al.*, 2010).

Debido a la configuración β que presentan en el C₂ anomérico en sus monómeros de fructosa, las inulinas no pueden ser hidrolizadas por las enzimas digestivas del hombre y de los animales; por lo que permanecen intactas en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal (Roberfroid, 2005), pero son hidrolizadas y fermentadas en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colon). De esta manera este tipo de compuesto se comporta como fibra dietética o como prebiótico estimulando el crecimiento de las bifidobacterias intestinales y disminuyendo el crecimiento de bacterias dañinas (Madrigal y Sangronis, 2007). Además, la configuración β influye en el aporte calórico el cual es de 1.5 kcal/g de inulina, en comparación a la sacarosa el cual tiene un aporte de 3.75 kcal/g de sacarosa, haciendo de este carbohidrato un excelente compuesto para alimentos de bajo aporte calórico (Roberfroid, 2004). Los fructanos poseen un sabor neutral y ligeramente dulce, por ejemplo, los fructanos de más bajo peso molecular como los FOS pueden tener dulzores relativos del 10% de la sacarosa (Chacón-Villalobos, 2006).

2.2.4. Usos industriales de los fructanos (inulina)

A nivel industrial, la inulina, se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutro y sin efecto residual, mientras que los FOS, además de su presentación en polvo se consiguen como jarabe viscoso (oligofructosa) (75% de materia seca) (Franck, 2002).

La obtención de productos comerciales, proveniente del procesamiento industrial de la inulina nativa deriva en sustancias como oligofructanos y fructooligosacáridos los cuales son oligómeros de inulina con un GP < 10 o cadenas de inulina de 22 a 25 unidades (Tárrega *et al.*, 2010; Roberfroid, 2005). El grado de polimerización define la calidad del producto en el mercado y su costo.

Los fructanos nativos son empleados en la industria como sustituto de sacarosa debido al dulzor proporcionado por sus azúcares libres, sin embargo, los fructanos de tipo inulina

de alta pureza presentan menos dulzor, así como baja solubilidad, ya que están constituidos principalmente por cadenas largas lineales (95%) (Madrigal y Sangronis, 2007).

La viscosidad de la oligofructosa a 10 °C en solución acuosa, al 5% p/p, es la menor de los fructanos y es una característica clave para la formación de geles y de su uso como sustituto de grasa. La inulina, también mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa como estabilizante en diversos productos alimenticios (helados, salsas untables, postres cremosos, etc.) (Franck, 2002). Se observa una sinergia entre los fructanos de tipo inulina y otros agentes gelificantes como la gelatina, alginatos, carraginosos, gomas y maltodextrinas. En general, la inulina de alta pureza presenta mejores niveles de desempeño que los fructanos nativos, en relación con las propiedades antes mencionadas (Madrigal y Sangronis, 2007).

Los FOS son estables a altas temperaturas, con propiedades humectantes, reducen la actividad de agua y por tanto propician estabilidad microbiológica, y adicionalmente afectan los puntos de fusión y ebullición de diferentes productos. A pH menores de 4, los enlaces tipo β de las unidades de fructosa, tanto en los fructanos de tipo inulina como en el resto, se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa, lo que les hace tener propiedades tecnológicas similares a los jarabes de fructosa. Por esta razón, estos compuestos no pueden ser usados en alimentos ácidos (Madrigal y Sangronis, 2007). Por otra parte, el uso de fructanos como fibra, conduce a una mejora en el sabor y textura de productos panificados y cereales. Cuando se emplea en este tipo de productos, el efecto prebiótico es más notable, se observan incrementos tanto en la expansión como en el atributo de “crujiente”, en botanas y cereales extruidos, lo que a su vez incrementa la vida de anaquel. Asimismo, los fructanos mantienen la humedad y frescura de pasteles y panes (Franck, 2002).

2.3. Métodos de extracción

Dentro de los métodos utilizados en la extracción de fructanos tipo inulina proveniente de diferentes fuentes se encuentran: hidrólisis ácida, concentración con membranas de ultra y nanofiltración, hidrólisis enzimática, precipitación con alcoholes y extracción térmica (Lingyun *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha, el método industrial empleado en su

extracción es térmico e incluye purificación con carbonatación ácida y purificación por resinas de intercambio iónico; este método es empleado sobre los demás ya que no exige costos elevados ni riesgos industriales (Madrigal y Sangronis, 2007). Sin embargo, las temperaturas que se manejan en este tipo de procedimiento van de los 70 a los 80 °C y en algunos casos se alcanzan temperaturas de ebullición, haciendo elevado el gasto de energía y tiempos largos de extracción (aproximadamente de 1 hora) (Loginova *et al.*, 2009), lo que podría derivar una degradación parcial de la molécula. Los fructanos tipo inulina provenientes del agave son obtenida industrialmente, mediante procesamiento térmico.

La inulina se considera de alta calidad cuando no ha sufrido fragmentación, ya que su arreglo tridimensional le confiere sus propiedades. La extracción es el primer procedimiento de procesamiento importante. Con la finalidad de incrementar la solubilidad de los compuestos activos y la velocidad de transferencia de masa, la extracción convencional es llevada a cabo por calentamiento, ebullición y reflujo.

2.4. Métodos alternativos de extracción en compuestos vegetales

El método de extracción convencional y más común de compuestos vegetales es la extracción por solvente, en donde se requiere de un compuesto químico capaz de disolver el compuesto vegetal deseado (biocompuesto) (Chemat *et al.*, 2001). La técnica de extracción por solvente es ampliamente empleada debido a que se encuentra bien estandarizada y es fácil de llevar a cabo (Puri *et al.*, 2012).

Algunos métodos han sido reportados para la extracción de diversas sustancias tales como compuestos funcionales, grasas, polifenoles (Xu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2007; Giannuzo *et al.*, 2003; Bocco *et al.*, 1998). Estas técnicas de extracción pueden causar la degradación de los compuestos de interés debido a altas temperatura y largos tiempos de extracción.

Estas desventajas de las tecnologías convencionales de extracción radican principalmente en el consumo elevado de energía (más del 70%, del total del proceso requiere de energía), altas generaciones de CO₂ y consumo de altas cantidades de químicos peligrosos. Estas grandes desventajas han forzado a las industrias química y de alimentos a encontrar nuevas tecnologías de separación, principalmente aquellas que sean contextualizadas

como “verdes” las cuales típicamente usan menos solvente y energía (Chemat *et al.*, 2001).

Ejemplos de técnicas alternativas o emergentes que se han empleado pueden ser: extracción por microondas, extracción por fluidos supercríticos, extracción por ultrasonido, extracción con pre-tratamientos enzimáticos, entre otras (Chemat *et al.*, 2001; Puri *et al.*, 2012). Las técnicas no convencionales de extracción implican un campo de investigación para la industria (Chemat *et al.*, 2001).

Dentro de las técnicas emergentes o no convencionales que se han empleado para la extracción de compuestos bioactivos de interés a partir de matrices sólidas, la cual ha cobrado fuerza en las últimas décadas, es la extracción asistida por ultrasonido, debido a que presenta alta reproducibilidad, tiempos cortos de extracción, es de fácil manejo, reduce los consumos de solvente y temperatura presentando bajos consumos de energía (Chemat *et al.*, 2008). Este método es fundamental en la aplicación de longitudes de ondas sonoras de intensidad y frecuencia altas, a través de un medio acuoso, que interactúan con el tejido, el proceso de cavitación causa hinchazón de la célula y la ruptura de la pared celular, lo cual permite la difusión de solutos de interés a alta velocidad a través de la pared celular en un primer caso o con un simple lavado del contenido celular como una segunda opción en el proceso (Lingyun *et al.*, 2006; Vinatoru, 2001). Adicionalmente otros factores tales como temperatura, solvente, presión pueden favorecer la recuperación del soluto o compuesto de interés, a través de una optimización de diversos factores en este método de extracción tales como: potencia de sonicación, frecuencia, tiempo de extracción y distribución de longitudes de onda (Wang y Weller, 2006). La tecnología de extracción ultrasónica ha sido ampliamente aplicada en la extracción de aceites, polisacáridos, proteínas, flavonoides a partir de plantas (Chen y Zhang, 2007; Zhang *et al.*, 2005) y en un estudio realizado por Lingyun *et al.* (2007) aplicaron algunos métodos de extracción, incluyendo convencionales y de ultrasonido para la extracción de inulina a partir de alcachofa, observándose el efecto benéfico de la aplicación del ultrasonido indirecto en una disminución en los tiempos de extracción, y menor daño en la molécula de inulina cuando se aplica los tratamientos de sonicación indirectos.

El pre-tratamiento del sólido que contiene al compuesto de interés, como es el caso de los fructanos contenidos en el tejido de agave o de sotol, podría favorecer la extracción de

este componente cuando se emplean en combinación con técnicas emergentes como el ultrasonido.

La hidrólisis enzimática ha sido empleada particularmente para el pre-tratamiento de material vegetal con posterior aplicación de métodos convencionales de extracción (Puri *et al.*, 2012). La maceración con ayuda de enzimas permite disgregar los tejidos vegetales, proporcionando suspensiones de células sueltas y agregados celulares. Este método presenta ventajas sobre la disgregación termo-mecánica, ya que conserva intactos sabores, pigmentos y los compuestos activos celulares (Whitaker *et al.*, 2003). Dentro de los pre-tratamientos asistidos a tecnologías emergentes como el ultrasonido, es la utilización de carbohidrasas tales como pectinasas, celulasas y hemicelulasas (Nyam *et al.*, 2009; Sørensen *et al.*, 2005; Landbo y Meyer, 2001) las cuales degradan la pared celular del tejido facilitando la lixiviación de los componentes de interés. La efectividad de estos pre-tratamientos en la mejora de la extracción de los compuestos de interés son dependientes de factores como el tipo de enzimas, concentración, relación enzima-sustrato, pH, temperatura, tiempo de exposición. Algunos estudios reportados han utilizado una combinación de enzimas, para mejorar los procesos de extracción de componentes (Li *et al.*, 2011; Kapchie *et al.*, 2008). Es importante mencionar que estas enzimas actúan sinérgicamente en la degradación de la pared celular. Por lo tanto, al evaluar la efectividad de la evolución de los procesos de extracción asistidos con tratamientos enzimáticos, tendrá que determinarse la actividad de estas enzimas en forma global o en base a las enzimas más importantes. Es por esto por lo que la extracción asistida con enzimas es objeto de investigaciones posteriores y tiene el potencial de ser comercialmente atractiva, pese a los costos que pudiera implicar el empleo de enzimas muy selectivas (Puri *et al.*, 2012).

2.4.1. Ultrasonido

El ultrasonido se puede definir básicamente como la energía generada por ondas sonoras de 20,000 o más vibraciones por segundo, por encima del espectro audible (Hoover, 2000). El modo de acción del ultrasonido es atribuido a un fenómeno llamado cavitación. Este se lleva a cabo cuando dentro del líquido las ondas sonoras que se propagan en él crean ciclos alternados, de baja presión (rarefacción) a alta presión (compresión). Estos

ciclos continuos de alta-baja presión crean pequeñas burbujas o huecos en el líquido que colapsan violentamente cuando ya no pueden absorber energía (en un fenómeno llamado "cavitación"), produciendo un intenso calentamiento local, altas presiones, corrientes en chorro de líquido y dramáticas velocidades de calentamiento y enfriamiento. La cavitación produce fuerzas de cizallamiento intensas y cambios en las propiedades físicas que permiten que el solvente penetre más profundo en el sólido, aumentando la velocidad de difusión de la molécula deseada al solvente (Zhang *et al.*, 2005). El colapso de las burbujas de cavitación es conocido como implosión que llega a dañar a las superficies sólidas que se encuentren cercanas a su punto de colapso. En sistemas acuosos a una frecuencia ultrasónica de 20 kHz, el colapso de cada burbuja de cavitación genera temperaturas de alrededor de 5000 °C y presiones alrededor de 2000 atm (Mason *et al.*, 2003). En la Figura 4 se puede observar el fenómeno de cavitación.

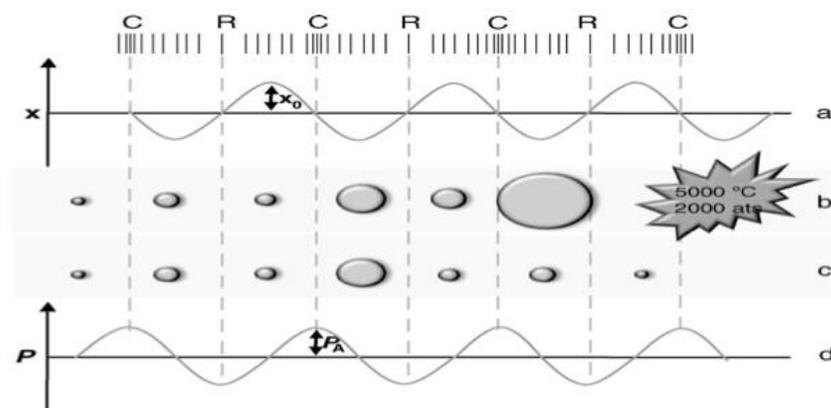


Figura 4. Fenómeno de cavitación. (x) eje x: (a) Desplazamiento de la onda; (b) cavitación trascendente, con burbujas que se forman, crecen e implotan; (c) cavitación estable, en donde las burbujas no llegan a colapsar; (d) punto de origen para las presiones generadas: durante la compresión (C) la presión es positiva y durante la rarefacción (R) la presión es negativa (Mason *et al.*, 2003).

La energía liberada por la cavitación de una burbuja es extremadamente pequeña, pero en este proceso millones de burbujas colapsan cada segundo. El efecto producido es muy intenso y ha sido utilizado para limpieza y desinfección de equipos y más recientemente para favorecer la difusión en procesos de algunas áreas de la industria, por ejemplo, en la

industria de alimentos se utiliza como sistema de mezclado y emulsificación, impregnación y extracción, en congelación y en la eliminación de espuma en bebidas entre otros. Por todo lo anterior a la sonicación se le atribuyen ventajas en los procesos de extracción relacionadas con la mejora de transferencia de masa y ruptura celular (Lida *et al.*, 2008; Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012).

2.4.1.1. Efectos del ultrasonido

Como ya se mencionó, por efecto sonomecánico el ultrasonido produce daños físicos y químicos. Al final de la cavitación, la burbuja implota, incrementando de sobremanera la presión y la temperatura en el punto del colapso, esto genera una “proyección de jet” que se focaliza sobre un punto dado del sólido adyacente, generando entonces daño físico (Figura 5) (Mason y Tiehm, 2001; Grönroos, 2010).

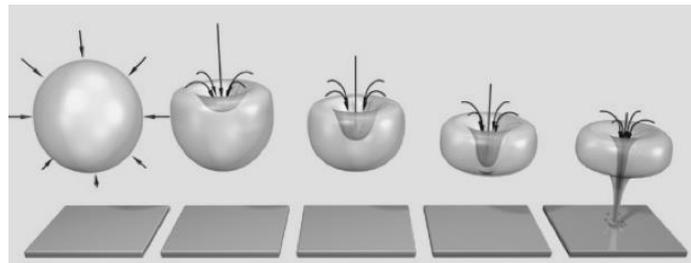


Figura 5. Fenómeno de implosión de una burbuja de cavitación. Cuando una burbuja de cavitación se expande hasta un punto máximo (punto de equilibrio), colapsa hacia su eje central ocasionando una propulsión de chorro focalizada, que daña una estructura sólida cercana debido a las altas temperaturas y presiones de la implosión (modificación del propuesto por Mason y Tiehm, 2001).

El daño físico ocasionado por efectos del ultrasonido sobre la pared celular de plantas ha sido reportado comprobado por diversos autores mediante análisis químicos, cuantificando compuestos derivados de la pared celular (Ebringerová y Hromádková, 2010) y mediante microscopía, revelando orificios ocasionados por la implosión de burbujas sobre la pared celular (Toma *et al.*, 2001; Narváez-Flores *et al.*, 2015).

Otro efecto de las altas temperatura y presiones del colapso, pueden conducir a la

disociación de las moléculas del agua en radicales hidroxilos (OH^\cdot) y átomos de hidrógeno (H^\cdot). Siendo radicales extremadamente reactivos y responsables de daños oxidativos a compuestos orgánicos (Mason y Tiehm, 2001; Grönroos, 2010; Duan y Kasper, 2011). Se ha reportado que ultrasonido puede depolimerizar los carbohidratos presentes, tanto de los polímeros componentes de la pared celular de plantas como de los mismos azúcares que se encuentran dentro (Lingyun *et al.*, 2007; Grönroos, 2010). Sin embargo, también reportan que es necesaria más evidencia para evaluar el efecto del ultrasonido sobre la extracción de compuestos como la inulina, encontrando los factores adecuados como el tiempo, frecuencia e intensidad adecuados para lograr una mayor extracción sin dañar las moléculas.

2.4.1.2. Factores que afectan el ultrasonido

El efecto del ultrasonido durante la extracción de compuestos vegetales depende de la combinación de diferentes factores directamente relacionados con la aplicación del ultrasónico como: frecuencia, intensidad y tiempo de exposición; así como los factores directamente relacionados con el efecto de lixiviación, como: solvente, relación sólido-líquido y temperatura (Toma *et al.*, 2001). Los factores antes mencionados deben ser elegidos adecuadamente de acuerdo con la matriz vegetal de donde se pretende extraer el compuesto (Toma *et al.*, 2001), ya que la cavitación ultrasónica es un fenómeno físico cuyo rendimiento depende de dichos factores (Grönroos, 2010).

2.4.2. Enzimas degradantes de tejidos vegetales

Las enzimas son proteínas ideales para asistir en la extracción, modificación o síntesis de biocompuestos de origen natural (Puri *et al.*, 2012). La extracción enzimática se basa en la habilidad inherente de las enzimas de catalizar reacciones muy específicas y selectivas. Así como en la habilidad de funcionar en soluciones acuosas a pH y temperatura específicas (Puri *et al.*, 2012). Las enzimas tienen la capacidad de degradar o desestabilizar las paredes celulares o membranas del tejido vegetal, favoreciendo y mejorando la extracción de biocompuestos (Whitaker *et al.*, 2003; Puri *et al.*, 2012). Estudios recientes sobre la extracción asistida por métodos enzimáticos han demostrado una rápida extracción, alta recuperación, y la reducción de solvente, así como una disminución en la energía del proceso con respecto a los métodos sin asistencia enzimática

(Puri *et al.*, 2012). Enzimas como pectinasas, celulasas y hemicelulasas han sido ampliamente usadas para el rompimiento de la matriz de la pared celular y mejorar la extracción de compuestos como: polisacáridos, almidón de semillas de cebada (Zheng y Bhatta, 1998) y almidón de jícama (Ramos de la Peña *et al.*, 2011).

Estudios detallados sobre aspectos de transferencia de masa y parámetros cinéticos en los procesos de extracción de inulina son escasos. En nuestro laboratorio se han realizado algunos trabajos, donde se muestra el potencial de aplicación de estos modelos en la extracción de fructanos, asistidos con ultrasonido. Asimismo, los aspectos de calidad de las moléculas de fructanos, relacionados con las condiciones de extracción, así como el uso de ultrasonido y estudios de la combinación de este método asistidos con pre-tratamientos con enzimas degradantes de pared celular, que favorezcan las lixiviación de la fructanos en plantas de sotol y agave y permitan determinar las mejores condiciones de extracción, relacionando aspectos de la calidad en la molécula del fructano. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de estos métodos de manera que resulten en operaciones de proceso óptimos y de calidad de estos compuestos. Esto sugiere la necesidad de desarrollar modelos de predicción para determinar las condiciones óptimas de proceso para la extracción de fructanos de agave y sotol. En este estudio se pretende evaluar el efecto individual o combinado de ultrasonido con y sin la utilización de enzimas hidrolíticas en la extracción de fructanos provenientes de plantas de agave y de sotol, a diferentes condiciones de extracción que conduzcan a determinar las mejores condiciones de extracción de fructanos de buena calidad.

III. JUSTIFICACIÓN

Estudios demuestran que en las últimas décadas se han desarrollado nuevos conceptos en nutrición, como consecuencia de nuevos estilos de vida y de retos para elevar la calidad de vida. Por esta razón se ha incrementado y acelerado el consumo de productos alimenticios que ofrezcan beneficios para la salud como los alimentos funcionales. En la actualidad, la presencia de ciertas cantidades de fructanos tipo inulina o sus derivados en la formulación de un producto alimenticio es condición suficiente para que dicho producto pueda ser considerado como alimento funcional (Roberfroid, 2004). La propiedad de los fructanos tipo inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico (Roberfroid, 2004), definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales. Entre otras propiedades benéficas a la salud, se mencionan: el refuerzo de las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Franck, 2006). A nivel industrial, la inulina se obtiene de la raíz de la achicoria y se usa como ingrediente en alimentos, ofreciendo ventajas tecnológicas e importantes beneficios a la salud (Franck, 2006). Sin embargo, estos carbohidratos también se encuentran en cantidades significativas en plantas de la familia Agavaceae y Nolinaceae, como el agave y el sotol, respectivamente. Aunque estas dos plantas se utilizan para la producción de bebidas alcohólicas, éstas pueden ser utilizadas para la producción los fructanos tipo inulina como un procedimiento alternativo. Industrialmente el método empleado para la extracción de inulina es con agua a altas temperaturas, sin embargo, este método demanda gran consumo de energía, pudiendo ocasionar también un mayor daño a la molécula, debido a la hidrólisis que ocurre por causa del tratamiento térmico, mermando la calidad y el precio del producto final. Esto es importante ya que la inulina se considera de alta calidad cuando se encuentra en su estructura completa, es decir cuando no ha sufrido ninguna hidrólisis. Dentro de las alternativas que pueden mejorar el proceso de extracción de fructanos tipo inulina a partir de este tipo de plantas es la utilización del ultrasonido ya que permite la extracción a partir de tejidos vegetales en menores tiempos y bajas temperaturas favoreciendo el rendimiento de extracción. Asimismo, una alternativa de extracción de

estos polisacáridos es el empleo de métodos enzimáticos (enzimas degradantes de la pared celular) asistidos con pre-tratamientos físicos para facilitar la liberación de este tipo de carbohidratos. Es por esto que mediante este estudio se pretendió evaluar diferentes condiciones durante el proceso de ultrasonido, asimismo con y sin la utilización de enzimas durante la extracción de fructanos a partir de plantas de agave y de sotol, para determinar su efectividad como pre-tratamientos individuales en la extracción de estos componentes. Todo esto con la finalidad de encontrar las mejores condiciones que conduzcan a la obtención de fructanos de buena calidad, mediante su caracterización fisicoquímica. De acuerdo con las características de los fructanos tipo inulina también es importante evaluarlos en su incorporación como ingrediente funcional. Una de sus posibles aplicaciones para aprovechar sus propiedades y beneficios en la salud puede ser su utilización como acarreador para la encapsulación de pigmentos naturales como las antocianinas presentes en el maíz azul. Esto debido a que se ha reportado que es posible sustituir con cierta proporción de inulina y fructooligosacáridos (FOS), algunos otros acarreadores como maltodextrina, almidón modificado, entre otros; con buenos resultados en la encapsulación de aceite esencial de romero y algunas bifidobacterias y lactobacilos, además de su uso como prebiótico (Beirão-da-Costa *et al.*, 2013; de Barros Fernandes *et al.*, 2014a,b; Fritzen-Freire *et al.*, 2012; Rajam y Anandharamkrishnan, 2015). Asimismo, se ha reportado el uso de inulina como acarreador en la encapsulación de diferentes pigmentos naturales como de betalainas presentes en la tuna roja (Saéñz *et al.*, 2009), de antocianinas de grosella negra (*Ribes nigrum* L.) (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011). Bustos-Garza *et al.* (2013) reportaron el uso de inulina de *A. tequilana* Weber como acarreador en combinación con otros acarreadores (maltodextrina, goma arábiga, proteína de suero) y en diferentes proporciones en la encapsulación de oleorresina de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*. La encapsulación de pigmentos (antocianinas) de maíces pigmentados ya se ha realizado; García-Tejeda *et al.* (2015) obtuvieron encapsulados de extracto de maíz morado usando como agentes acarreadores almidones de maíz (normal y ceroso) tanto hidrolizados como acetilados. Lao y Giusti (2017) usaron maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextrosa (ED) para encapsular antocianinas de maíz morado. Sin embargo, el uso de fructanos tipo inulina de *A. tequilana* Weber var. azul para encapsular los pigmentos naturales presentes en el maíz azul no se ha reportado.

IV. HIPÓTESIS

Pre-tratamientos con ultrasonido en forma individual o combinada, asistidos con tratamiento enzimático, mejora los rendimientos de extracción y propiedades físicas y químicas de fructanos a partir de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) y de sotol (*Dasyliirion* spp.) en comparación con el método de extracción convencional.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto individual o combinado del ultrasonido con y sin la utilización de enzimas degradantes de pared celular a diferentes temperaturas en la extracción de fructanos tipo inulina provenientes de piñas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) y de piñas de sotol (*Dasyllirion* spp.), determinando los rendimientos y calidad del extracto, así como la aplicación de los fructanos como acarreador para la microencapsulación de pigmentos naturales mediante secado por aspersión.

5.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar fisicoquímicamente piñas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) de diferentes edades y piñas de sotol (*Dasyllirion* spp.) maduras.
2. Realizar un proceso de extracción de fructanos a partir de las piñas de agave y plantas de sotol por método convencional.
3. Estudiar diferentes factores de proceso (relación soluto:solvente, tiempo y temperatura de extracción, y potencia ultrasónica), mediante la realización de experimentos preliminares y discriminar los de menor efecto durante la extracción para la obtención de las condiciones de cada estudio.
4. Realizar la extracción de fructanos partir de plantas de agave provenientes de diferentes edades a diferente potencia ultrasónica, evaluando cambios fisicoquímicos, contenido y calidad durante la extracción.
5. Realizar la extracción de fructanos partir de plantas maduras de sotol a diferente potencia ultrasónica y temperatura, evaluando cambios fisicoquímicos, contenido y calidad durante la extracción.
6. Modelar los mecanismos de transferencia de masa durante la extracción de fructanos a diferentes condiciones de potencia ultrasónica y temperatura.
7. Investigar y optimizar las condiciones de la extracción asistida con enzimas de fructanos a partir de piñas de sotol. en forma individual y combinada.
8. Realizar cinéticas de extracción de fructanos de piñas de sotol durante la extracción asistida con enzimas.

9. Investigar las condiciones de la extracción de fructanos a partir de piñas de sotol con cuatro enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa) en forma individual y combinada.
10. Obtener una mezcla enzimática con las cuatro enzimas mencionadas y optimizar la concentración de cada una para la extracción de fructanos de sotol.
11. Realizar extracciones de fructanos de sotol combinando tratamientos enzimáticos, potencia ultrasónica y temperatura y analizar las características físicas y químicas de los extractos.
12. Evaluar fructanos de agave en diferentes proporciones como acarreador o material de pared para la encapsulación de pigmentos naturales de maíz azul mediante secado por aspersión.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Se utilizaron piñas maduras de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) y de sotol (*Dasyliirion wheeleri*). Las piñas tanto de agave como de sotol se almacenaron a 4 °C y 90% de humedad relativa por tres días hasta su análisis. Estas se analizaron fisicoquímicamente en términos de diámetro, peso, contenido de sólidos solubles (°Brix), pH, así como en análisis proximal determinando el contenido de humedad, proteína, grasa, fibra cruda y cenizas de acuerdo con los métodos de la AOAC (1998).

Las enzimas que se utilizaron durante el estudio fueron: una mezcla comercial Pectinex Ultra SP-L de *Arpergillus aculeatus*, la cual contiene principalmente las enzimas pectintranseliminasa, poligalacturonasa, y pectinesterasa y pequeñas cantidades de hemicelulasas y celulasas. Asimismo, una celulasa (*endo*-1,4- β -D-glucanasa) de *Aspergillus niger*, una pectinasa (poligalaturonasa) de *Aspergillus niger*, una xilanasas (*endo*-1,4- β -xilanasas) de *Trichoderma longibrachiatum* y una hemicelulasa de *Aspergillus niger*, todas las enzimas fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Para el estudio de escapsulados se utilizaron fructanos de agave (Agaven®).

6.2. Químicos y reactivos

Se utilizaron como estándares D-glucosa ($\geq 99\%$), D-fructosa (≥ 99.5), D-sacarosa (≥ 99.5), inulina de achicoria, así como cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, cianidina 3,5-diglucósido y pelargonidina 3,5-diglucósido adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Como estándares también se utilizaron 1-kestosa, nistosa (1,1-kestotetraosa) y 1- β -fructofuranosilnistosa (1,1,1-kestopentaosa), asimismo se utilizó el kit enzimático para la determinación de fructanos y la mezcla de fructanasa *exo*- y *endo*-inulinasa adquiridos de Megazyme (Wicklow, Irlanda). Como sustratos para los ensayos de actividad enzimática se usaron carboximetilcelulosa, ácido poligalacturónico, xilano y goma de algarrobo y como monosacáridos para las curvas estándar glucosa, xilosa, ácido galacturónico, manosa y galactosa adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Otros reactivos y solventes grado analítico y HPLC para las diferentes determinaciones analíticas fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y J.T. Baker (Ciudad de México, México).

6.3. Estudio No. 1

Extracción asistida con ultrasonido de fructanos a partir de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) a diferentes potencias de ultrasonido y relaciones sólido-líquido

6.3.1. Procedimiento experimental

Para este estudio se obtuvieron dos piñas de *Agave tequilana* Weber var. azul de diferentes edades (6 y 7 años de crecimiento) de la misma zona de cultivo ubicada en municipio de El Rosario del estado de Sinaloa, México.

Las dos piñas de agave se cortaron transversalmente en dos mitades y luego en cuatro partes. Cada una de estas piezas se cortaron luego en secciones más pequeñas y se trituraron en una licuadora doméstica (Oster, modelo 6640, México) a la misma velocidad y tiempo (1 min). El agave fresco y molido se sometió inmediatamente a extracción a diferentes relaciones sólido:líquido (S:L) peso:volumen (p:v) de agave:agua (1:2, 1:3 y 1:6) y diferentes densidades de potencia ultrasónica (DPU_s) (40, 80 y 120 mW/mL) durante 35 min a 40 °C. El tiempo de extracción se determinó mediante análisis preliminares donde inició el comportamiento asintótico.

El ultrasonido fue aplicado usando una sonda S-450 de 400 W con potencia variable (Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, EUA) con un diámetro de 13 mm, que se mantuvo sumergida 3 cm por debajo de la superficie del medio líquido durante la sonicación. La temperatura durante la extracción se mantuvo constante mediante la recirculación de agua por fuera del recipiente dentro de un baño. Como controles se llevaron a cabo extracciones en ausencia de ultrasonido, pero en las mismas condiciones de relación S:L, tiempo y temperatura. Asimismo, se realizó una extracción a alta temperatura (90 °C) con la relación S:L intermedia y el mismo tiempo. Todas las extracciones se realizaron por duplicado. Al final de la extracción de cada tratamiento, el extracto resultante se filtró al vacío a través de papel Whatman No. 1. Los extractos fueron analizados en el rendimiento de extracción de carbohidratos (REC), contenido de fructanos (FRU), de fructosa, glucosa y sacarosa, así como el grado de polimerización promedio (GP_n).

6.3.2. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico de un experimento factorial completamente al azar de $3 \times 3 \times 2$ para determinar las influencias de la edad del agave, la DPU y la relación S:L en la extracción de carbohidratos. Los datos obtenidos de los diversos análisis experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Minitab versión 16 (Minitab, 2010). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

6.4. Estudio No. 2

Efecto del ultrasonido en la extracción de carbohidratos a partir de plantas de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a diferentes potencias y temperaturas

6.4.1. Procedimiento experimental

Para este estudio se obtuvo una piña de sotol silvestre *Dasyilirion wheeleri*, la cual fue recolectada en la temporada de invierno en el municipio de Madera del estado de Chihuahua, México. La piña de sotol con 8 años y 70% de humedad fue deshojada y pelada, cortada en tiras de 5 cm de ancho \times 10 cm de largo y secadas en un secador de charolas con aire caliente a 70 ± 5 °C hasta un nivel de humedad de aproximadamente 5%. El sotol deshidratado se molió en un molino de martillos y se tamizó para obtener un tamaño de partícula uniforme de 5×10^{-4} m (lo que pasó a través de malla 35 y se retuvo en malla 40). El polvo de sotol fue empacado herméticamente en bolsas de plástico hasta su análisis.

El polvo de sotol (20 g) fue sometido a extracción asistida con ultrasonido (EAU) a una relación sotol:agua de 1:24 (p/v) a diferentes temperaturas (20.85, 25, 35, 45 y 49.14 °C) y potencias de ultrasonido (32.13, 40, 59, 78 y 85.9 W) durante 10 min, de acuerdo al diseño experimental mostrado en las Tablas 1 y 2. Este tiempo de extracción fue determinado de acuerdo con estudios preliminares donde comenzó el comportamiento asintótico de la extracción.

Tabla 1. Variables de proceso y niveles usados en el diseño experimental de la extracción de fructanos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a diferentes potencias de ultrasonido y temperaturas.

Variables de proceso	Niveles de variación				
	-1.41421	-1	0	+1	+1.41421
Potencia de ultrasonido (W)	32.13	40	59	78	85.9
Temperatura (°C)	20.85	25	35	45	49.14

Los experimentos de extracción de carbohidratos asistida con ultrasonido se llevaron a cabo con una sonda ultrasónica de un equipo Branson Sonifier S-450 de 400 W con potencia variable (Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, EUA) usando un baño de agua para el control de temperatura. Los extractos obtenidos en cada combinación experimental se filtraron al vacío a través de papel Whatman No. 1 y se analizaron en el contenido de carbohidratos totales (CT), azúcares reductores (AR), fructanos totales (FRU), glucosa, fructosa y en el grado de polimerización promedio (GP_n).

Tabla 2. Combinación de las variables usadas en el diseño experimental para la extracción de carbohidratos de sotol asistido con ultrasonido.

Tratamiento	X_1	X_2	PU (W)	Temperatura (°C)	Y_i^*
1	-1	-1	40	25	-
2	1	-1	78	25	-
3	-1	1	40	45	-
4	1	1	78	45	-
5	-1.4142	0	32.13	35	-
6	+1.4142	0	85.9	35	-
7	0	-1.4142	59	20.85	-
8	0	+1.4142	59	49.14	-
9	0	0	59	35	-
10	0	0	59	35	-
11	0	0	59	35	-
12	0	0	59	35	-
13	0	0	59	35	-

* Y_i , Variable de respuesta, representada como la media \pm desviación estándar.

Además, se realizó una cinética de extracción de fructanos para cada combinación experimental, en la que se tomaron periódicamente muestras de extracto y se determinó el contenido de FRU, estos datos se usaron para calcular del coeficiente de transferencia de masa (K_L). Como control se realizó una extracción térmica tradicional a alta temperatura de 90 °C durante 40 min.

6.4.2. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño central compuesto rotatable de segundo orden y los resultados se analizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 1991; Myers, 1971). La PU y la temperatura de extracción fueron las variables independientes. El polinomio de segundo orden ajustado está dado por la Ecuación 1:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 + \varepsilon_i \quad \text{Ec. 1}$$

donde Y_i es la variable de respuesta para el experimento, X_1 es el valor de potencia ultrasónica para el experimento i ; X_2 es la temperatura de extracción para el experimento i ; y b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} y b_{12} son los coeficientes estimados del modelo; del intercepto, de los efectos lineales, efectos cuadráticos e interacciones, respectivamente, y ε es el error. Los cinco niveles de variación y las combinaciones de las variables de este diseño experimental se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. El diseño consistió en 13 tratamientos con 5 repeticiones en el punto central, 4 puntos factoriales y 4 puntos axiales (Tabla 2). Se utilizó el software Design Expert versión 6.01 (Stat-Ease, Inc. 2005, Minneapolis, EUA) para ajustar los modelos de superficie de respuesta a los datos experimentales y el software Minitab versión 16 (Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, EUA) fue utilizado para hacer comparaciones de medias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey. Las diferencias significativas se definieron como $P < 0.05$.

6.5. Estudio No. 3

Optimización de la extracción de fructanos asistida con enzimas a partir de plantas de sotol silvestre (*Dasyilirion wheeleri*)

6.5.1. Procedimiento experimental

Para este estudio se obtuvo una piña de sotol silvestre *Dasyilirion wheeleri* de 7 años de crecimiento la cual fue recolectada en la temporada de invierno en el municipio de Madera del estado de Chihuahua, México. La piña de sotol con un peso de 18.4 kg y 57.7% de humedad fue cortada en pequeñas piezas, de estos trozos de piña fresca se pesaron 100 g para cada tratamiento y se molieron usando una licuadora doméstica (Oster, modelo 6640,

México) a la misma velocidad durante 1 min. Posteriormente, se preparó una solución enzimática de la mezcla comercial Pectinex® Ultra SP-L en un buffer de acetato de sodio 50 mM a pH de 4.5, con ésta se prepararon diferentes concentraciones de enzima (0.0, 25.74, 87.87, 150 y 175.735 U/mL) agregando diferentes volúmenes de la misma mezcla enzimática y llevados a 100 mL con el mismo buffer de pH 4.5 para obtener la concentración de enzima deseada, luego se mezclaron con diferentes cantidades de sustrato (sotol molido) (4.4792, 8.0, 16.5, 25 y 28.5208 g/100 mL) para cada tratamiento de acuerdo con el diseño experimental que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables de proceso y niveles usados en el diseño experimental de la extracción de fructanos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*) a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.

Variables de proceso	Niveles de variación				
	-1.41421	-1	0	+1	+1.41421
[] de enzima (U/mL)	0	25.74	87.87	150	175.73
[] de sustrato (g/100 mL)	4.4792	8.0	16.5	25	28.52

Las mezclas (sustrato-solución enzimática) para cada tratamiento se colocaron en una incubadora Labnet (Modelo 211DS, Woodbridge, New Jersey, EUA) a 30 °C y se agitaron a 180 rpm. Para cada combinación experimental se evaluó la actividad enzimática, para esto durante la extracción se tomaron muestras de 1 mL a los 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos y se colocaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos para detener la actividad enzimática. Luego, a cada muestra se le cuantificó azúcares reductores para determinar la constante de velocidad enzimática (V_0). Después de 8 h (480 min) de extracción, los extractos obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron al vacío a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el contenido de carbohidratos totales (CT), azúcares reductores (AR), fructanos totales (FRU), glucosa, fructosa y sacarosa, así como en el grado promedio de polimerización (GP_n).

6.5.2. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño compuesto central rotatable de segundo orden y los resultados se analizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM). La concentración de enzima y la concentración de sustrato fueron las variables independientes. Los niveles

y las combinaciones experimentales se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. El polinomio de segundo orden ajustado a los datos (Montgomery, 1991; Myers, 1971) fue el siguiente:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 + \varepsilon_i \quad \text{Ec. 2}$$

donde Y_i es la variable de respuesta para el i -ésimo experimento; X_{1i} es la concentración de enzima (U/mL) para el experimento i ; X_{2i} es la concentración de sustrato (g/100 mL) para el experimento i ; $b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}$ y b_{12} son los coeficientes estimados del modelo, y ε es el término de error. De esta manera el diseño experimental consistió en 2 variables de estudio con 5 niveles de variación para la concentración de enzima y concentración de sustrato (Tabla 3), resultando en 13 tratamientos con 5 repeticiones en el punto central, 4 puntos factoriales y 4 puntos axiales. La Tabla 4, muestra la matriz genérica del diseño, así como las combinaciones experimentales de las variables de estudio. El software Design-Expert v. 7.0 (2005) fue utilizado para ajustar el modelo de superficie de respuesta a los datos experimentales. Las diferencias significativas se definieron como $P < 0.05$.

Tabla 4. Combinación de las variables usadas en el diseño experimental para la extracción de carbohidratos de sotol asistido con enzimas.

Tratamiento	X_1	X_2	Concentración de enzima (U/mL)	Concentración de sustrato (g/100 mL)	Y_i^*
1	-1	-1	25.74	8.00	-
2	1	-1	150.00	8.00	-
3	-1	1	25.74	25.0	-
4	1	1	150.00	25.0	-
5	-1.4142	0	0.00	16.55	-
6	1.4142	0	175.73	16.55	-
7	0	-1.4142	87.87	4.4792	-
8	0	1.4142	87.87	28.52	-
9	0	0	87.87	16.55	-
10	0	0	87.87	16.55	-
11	0	0	87.87	16.55	-
12	0	0	87.87	16.55	-
13	0	0	87.87	16.55	-

* Y_i , Variable de respuesta, representada como la media \pm desviación estándar.

6.6. Estudio No. 4

Extracción de fructanos asistida con enzimas a partir de plantas de sotol silvestre (*Dasyllirion wheeleri*): Proceso de optimización usando la metodología de la superficie de respuesta

6.6.1. Materiales

Para este estudio se obtuvieron dos piñas de sotol silvestre *Dasyllirion wheeleri* de aproximadamente 8 años de crecimiento las cuales fueron recolectadas en la temporada de invierno en el municipio de Madera del estado de Chihuahua, México. Las piñas de sotol con un peso promedio de 20.665 kg y una humedad de 56.46% fueron deshojadas y peladas, cortadas en tiras de 2 cm de ancho × 5 cm de largo y secadas con aire caliente a 55 ± 5 °C en un secador de charolas hasta un nivel de humedad de aproximadamente 0.053 kg agua/kg de materia seca. Las tiras de sotol deshidratadas se molieron en un molino de martillos para obtener un polvo, el cual se tamizó recuperando solo lo que pasó a través de malla No. 60 (250 μ m) y se retuvo en malla No. 80 (177 μ m) para uniformizar el tamaño de partícula. El polvo de sotol fue empacado herméticamente en bolsas de plástico hasta su análisis. Asimismo, se utilizaron 4 enzimas: una celulasa, una pectinasa, una xilanasa y una hemicelulasa adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA).

6.6.2. Procedimiento experimental

6.6.2.1. Estudios preliminares de factores simples

Primeramente, se realizaron estudios de extracción explorando los factores simples para cada enzima en diferentes condiciones de relación líquido-sólido, tiempo de extracción, pH, temperatura y concentración de enzima.

Se prepararon soluciones de cada enzima y se sometieron a extracción a diferentes relaciones líquido-sólido (20, 30, 40, 60 y 150 mL/g), los extractos obtenidos se analizaron en el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP) de sotol. Con la mejor relación líquido-sólido (L-S) se procedió a realizar cinéticas de extracción a diferentes tiempos de extracción y se analizaron en el REP y contenido de azúcares reductores (AR), que definieron el mejor tiempo de extracción. Una vez definido el tiempo de extracción se realizaron extracciones a diferentes pH's (3, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0) este varió de

acuerdo con la enzima usada; los extractos fueron analizados en el REP. Establecido el pH óptimo de cada enzima se procedió a realizar extracciones a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C) esta también varió de acuerdo con la enzima, ya obtenidos los extractos se determinó el REP. Una vez definidos los factores simples antes mencionados se realizaron extracciones a diferentes concentraciones de cada enzima (2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12%) en porcentaje peso/peso (% p/p) enzima/polvo de sotol, variando también según la enzima, el REP fue determinado para estos extractos.

6.6.2.2. Estudios preliminares de combinación de enzimas

Con los resultados obtenidos se fijaron las condiciones óptimas de pH, relación líquido-sólido, tiempo y concentración de enzima y como uno de los objetivos de este estudio fue obtener una mezcla de las 4 enzimas, se determinó si con el uso de las 4 en realidad se obtenía una mejor extracción. De esta manera, se realizaron extracciones con las enzimas individuales, combinándolas en pares, en tres y por último con las cuatro (Tabla 5). Los extractos obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el REP de sotol.

Tabla 5. Combinación de enzimas para la extracción de fructanos a partir de sotol (*Dasyilirion wheeleri*).

Tratamientos	Enzimas	Celulasa	Pectinasa	Xilanasa	Hemicelulasa
1	1	+	-	-	-
2	1	-	+	-	-
3	1	-	-	+	-
4	1	-	-	-	+
5	2	+	+	-	-
6	2	-	+	+	-
7	2	-	-	+	+
8	2	+	-	+	-
9	2	+	-	-	+
10	2	-	+	-	+
11	3	+	+	+	-
12	3	+	+	-	+
13	3	-	+	+	+
14	3	+	-	+	+
15	4	+	+	+	+
Control	0	-	-	-	-

+Enzima presente en el tratamiento de extracción.

6.6.2.3. Optimización de la mezcla de enzimas (concentración de enzimas) a través de un diseño ortogonal

Como los resultados arrojaron que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo con la combinación de las 4 enzimas se decidió estudiar la concentración necesaria de cada enzima en el coctel enzimático para la obtención de los mayores rendimientos de extracción de polisacáridos de sotol.

Para esto se prepararon soluciones de cada enzima pesando una cantidad definida de cada una de ellas por separado, luego se diluyeron con cierto volumen de buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a un pH de 4.5 para lograr la concentración requerida en % peso de enzima/peso de sustrato (sotol). Las 4 soluciones de enzimas se mezclaron a diferentes volúmenes de cada enzima para lograr la concentración deseada en cada tratamiento de acuerdo con el empleo de un diseño ortogonal (Tabla 6). Posteriormente, se llevaron a 30 mL con el mismo buffer de pH 4.5 para obtener la concentración de enzima, así como la relación líquido-sólido deseadas. Luego cada mezcla enzimática se colocó en un baño de agua a 40 °C; después cada una fue adicionada con 0.5 g de polvo de sotol (sustrato) y se colocaron en una incubadora Labnet (Modelo 211DS, Woodbridge, New Jersey, EUA) y se agitaron a 180 rpm. Después de 20 min de extracción, tiempo determinado en los estudios preliminares (Sección 7.4.2.2.), los extractos obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP) en %, el cual se obtuvo de acuerdo con el método descrito en la sección 6.9.4.4.

Tabla 6. Diseño ortogonal para la combinación de enzimas.

No.	Celulasa	Pectinasa	Xilanasa	Hemicelulasa	REP (%)
1	1 (10%)	1 (6%)	1 (6%)	1 (6%)	-
2	1	2 (8%)	2 (8%)	2 (8%)	-
3	1	3 (10%)	3 (10%)	3 (10%)	-
4	2 (11%)	1	2	3	-
5	2	2	3	1	-
6	2	3	1	2	-
7	3 (12%)	1	3	2	-
8	3	2	1	3	-
9	3	3	2	1	-

Concentración de enzima (% p/p).

6.6.2.4. Diseño ortogonal y análisis estadístico

Para investigar las concentraciones óptimas de celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa, se empleó un diseño de arreglo ortogonal L₉ (3⁴) con las condiciones de extracción de pH, temperatura, relación líquido-sólido y tiempos fijos de acuerdo con lo obtenido en los estudios de factores simples (Sección 7.4.2.2. – 7.4.2.4.). La Tabla 6 muestra que los experimentos se llevaron a cabo con 3 factores y 3 niveles, y el rango de cada factor se basó en los experimentos de factores simples para la concentración de cada enzima (Sección 7.4.2.5.). Cada uno de los tratamientos del diseño se realizó por triplicado.

6.6.2.5. Estudio de factores simples de la mezcla enzimática

De acuerdo con lo obtenido en el diseño ortogonal, se realizaron estudios de factores simples para la mezcla enzimática. Para esto, se preparó la solución de enzimas con la concentración óptima de cada una y se sometió a diferentes condiciones de extracción de temperatura, pH, relación líquido-sólido y tiempo. La temperatura se exploró en un rango de 35, 40, 45, 50 y 55 °C, el pH de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0, la relación líquido-sólido de 40, 60, 80, 100 y 120 mL/g y la cinética de extracción en el tiempo desde 2.5 min hasta 120 min en diferentes intervalos de tiempo.

6.6.2.6. Optimización de las condiciones de extracción de la mezcla enzimática a través de un diseño Box-Behnken

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de factores simples de la mezcla enzimática encontrada como óptima en el diseño ortogonal, se procedió a optimizar las condiciones de extracción. Esto se realizó preparando de nuevo soluciones de cada enzima a concentraciones definidas con el buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a 3 diferentes pH's (4, 4.5 y 5), luego se realizó la mezcla de las enzimas a la concentración obtenida en el diseño ortogonal y se llevaron a 3 diferentes volúmenes (30, 40 y 50 mL) para lograr la relación sólido-líquido deseada, posteriormente se colocaron a diferentes temperaturas (35, 40 y 45 °C) de acuerdo al diseño experimental utilizado y se adicionaron 0.5 g de polvo de sotol (sustrato). Por último, se colocaron en una incubadora Labnet (Modelo 211DS, Woodbridge, New Jersey, EUA) y se agitaron a 180 rpm. Después de 20

min de extracción (determinado en los estudios preliminares), los extractos obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), azúcares reductores (AR) y fructanos totales (FRU).

6.6.2.7. Análisis estadístico

El estudio de optimización se realizó a través de un diseño experimental Box-Behnken de 3 factores (X_1 , temperatura; X_2 , pH; X_3 , relación líquido-sólido) con 3 niveles para evaluar su efecto combinado en el REP, FRU, AR, glucosa, fructosa, sacarosa y GP_n. Para cada factor, el rango experimental fue elegido en base a un análisis de factores simples realizado para la mezcla enzimática obtenida en el diseño ortogonal. Como se observa en la Tabla 7, los niveles codificados y decodificados de las variables independientes son presentados en base a los resultados preliminares antes mencionados.

Tabla 7. Variables independientes y sus niveles usados en el diseño Box-Behnken.

Variables independientes	Niveles de variación		
	-1	0	1
X_1 , Temperatura	35	40	45
X_2 , pH	4	4.5	5
X_3 , Relación líquido-sólido	60	80	100

En la Tabla 8 se muestra el diseño completo el cual consistió en 17 puntos experimentales, todos los experimentos se llevaron a cabo en orden aleatorio para minimizar cualquier efecto sobre las respuestas observadas y por duplicado.

Para el análisis de los datos, se llevo a cabo un análisis de varianza y de regresión no lineal, utilizando el software Design Expert versión 6.01 (Stat-Ease, Inc. 2005, Minneapolis, EUA) para el análisis del diseño experimental, de varianza y de regresión de los datos experimentales. Los datos obtenidos fueron ajustados por la siguiente ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 b_{ij} X_i X_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. 3}$$

donde Y es la variable de respuesta, X_i y X_j son las variables independientes y b_0, b_i, b_{ii}, b_{ij} representan la constante, el coeficiente lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, ε_{ij} es el error.

Tabla 8. Matriz del diseño Box-Behnken para la extracción de polisacáridos de sotol.

Tratamientos	X_1 (Temperatura)	X_2 (pH)	X_3 (Relación L-S)	Y_i^*
1	-1 (35)	-1 (4)	0 (80)	-
2	1 (45)	-1 (4)	0 (80)	-
3	-1 (35)	1 (5)	0 (80)	-
4	1 (45)	1 (5)	0 (80)	-
5	-1 (35)	0 (4.5)	-1 (60)	-
6	1 (45)	0 (4.5)	-1 (60)	-
7	-1 (35)	0 (4.5)	1 (100)	-
8	1 (45)	0 (4.5)	1 (100)	-
9	0 (40)	-1 (4)	-1 (60)	-
10	0 (40)	1 (5)	-1 (60)	-
11	0 (40)	-1 (4)	1 (100)	-
12	0 (40)	1 (5)	1 (100)	-
13	0 (40)	0 (4.5)	0 (80)	-
14	0 (40)	0 (4.5)	0 (80)	-
15	0 (40)	0 (4.5)	0 (80)	-
16	0 (40)	0 (4.5)	0 (80)	-
17	0 (40)	0 (4.5)	0 (80)	-

Y_i , es la variable de respuesta, representada como la media \pm desviación estándar.

6.6.2.8. Estudio de optimización de la extracción asistida con enzimas de polisacáridos de sotol

Como segunda opción de optimización de la mezcla con las 4 enzimas se realizó otro estudio. Para esto se prepararon soluciones de cada enzima a una concentración definida diluyendo cada una de éstas en buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a un pH de 4.5, posteriormente se mezclaron diferentes volúmenes de cada enzima para lograr la concentración deseada en cada tratamiento de acuerdo con el diseño experimental utilizado (Tabla 9), después se llevaron a 40 mL con el mismo buffer de pH 4.5 para obtener la concentración de enzima, así como la relación líquido-sólido deseadas. Luego cada mezcla enzimática se colocó en un baño de agua a una temperatura de 20, 30, 40, 50 o 60 °C según el tratamiento del mismo diseño experimental (Tabla 10); después cada una fue adicionada con 0.5 g de polvo de sotol (sustrato) y se colocaron en una incubadora Labnet (Modelo 211DS, Woodbridge, New Jersey, EUA) y se agitaron a 180 rpm. Después de 20 min de extracción (determinado en los estudios preliminares), los extractos

obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), azúcares reductores (AR), fructanos totales (FRU), glucosa, fructosa y sacarosa, así como en el grado de polimerización promedio (GP_n).

6.6.2.9. Análisis estadístico de datos

Para explorar los efectos de las variables independientes sobre las respuestas dentro del rango de investigación, se llevó a cabo un diseño central compuesto (DCC) de cinco factores con 3 niveles por duplicado, para evaluar su efecto combinado en el REP, FRU, AR, glucosa, fructosa, sacarosa y GP_n. Estos factores fueron concentración de celulasa (X₁), concentración de pectinasa (X₂), concentración de xilanasa (X₃), concentración de hemicelulasa (X₄) y temperatura (X₅). Las variables independientes y sus niveles codificados y decodificados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Variables independientes y sus niveles usados en el diseño central compuesto.

Variables independientes	Niveles de variación				
	-2	-1	0	1	2
X ₁ , Concentración de celulasa (% p/p)	4	6	8	10	12
X ₂ , Concentración de pectinasa (% p/p)	2	4	6	6	10
X ₃ , Concentración de xilanasa (% p/p)	2	4	6	6	10
X ₄ , Concentración de hemicelulasa (% p/p)	2	4	6	6	10
X ₅ , Temperatura (°C)	20	30	40	50	60

En la Tabla 10 se muestra el diseño completo el cual consistió en 26 puntos experimentales, todos los experimentos se llevaron a cabo en orden aleatorio para minimizar cualquier efecto sobre las respuestas observadas. Las variables independientes y sus rangos fueron elegidos, en base a los resultados de los experimentos preliminares. Un modelo de segundo orden (Ec. 4) se ajustó a los datos experimentales mediante el procedimiento de regresión múltiple.

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 b_{ij} X_i X_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. 4}$$

donde Y_i son las variables de respuesta, respuesta predicha; b_0 , es el intercepto; b_i , b_{ii} , b_{ij} , ε_{ij} , representan los coeficientes lineales, cuadráticos y de las interacciones, así como el error, respectivamente.

El diseño completo consistió en 26 tratamientos experimentales, los cuales se llevaron a cabo en orden aleatorio. De acuerdo con el diseño se realizaron cinco réplicas (tratamientos 22-26) para permitir la estimación del error puro. Se utilizó el software Design Expert versión 6.01 (Stat-Ease, Inc. 2005, Minneapolis, EUA) para obtener el análisis de varianza, regresión y gráficos de superficie de respuesta. El software Minitab versión 16 (Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, EUA) fue utilizado para hacer comparaciones de medias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey. Las diferencias significativas se definieron como $P < 0.05$.

Tabla 10. Combinación de las variables usadas en el diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*).

Tratamientos	Celulasa (% p/p)	Pectinasa (% p/p)	Xilanasas (% p/p)	Hemicelulasa (% p/p)	Temperatura (°C)	Y_i^*
1	10	8	4	8	30	-
2	10	4	8	8	30	-
3	6	8	8	4	50	-
4	10	8	8	4	30	-
5	10	8	4	4	50	-
6	10	4	4	8	50	-
7	6	4	8	8	50	-
8	6	8	4	8	50	-
9	10	4	8	4	50	-
10	6	8	8	8	30	-
11	6	4	4	4	30	-
12	4	6	6	6	40	-
13	12	6	6	6	40	-
14	8	2	6	6	40	-
15	8	10	6	6	40	-
16	8	6	2	6	40	-
17	8	6	10	6	40	-
18	8	6	6	2	40	-
19	8	6	6	10	40	-
20	8	6	6	6	20	-
21	8	6	6	6	60	-
22	8	6	6	6	40	-
23	8	6	6	6	40	-
24	8	6	6	6	40	-
25	8	6	6	6	40	-
26	8	6	6	6	40	-

* Y_i , variable de respuesta, representada como la media \pm desviación estándar.

6.7. Estudio No. 5

Optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de plantas de sotol silvestre (*Dasyliirion wheeleri*)

6.7.1. Materiales

Para este estudio se obtuvieron dos piñas de sotol silvestre *Dasyliirion wheeleri* de aproximadamente 8 años de crecimiento las cuales fueron recolectadas en la temporada de invierno en el municipio de Madera del estado de Chihuahua, México. Las piñas de sotol con un peso promedio de 20.665 kg y una humedad de 56.46% fueron deshojadas y peladas, cortadas en tiras de 2 cm de ancho \times 5 cm de largo y secadas con aire caliente a 55 ± 5 °C en un secador de charolas hasta un nivel de humedad de aproximadamente 0.053 kg agua/kg materia seca. Las tiras de sotol deshidratadas se molieron en un molino de martillos para obtener un polvo, el cual se tamizó recuperando solo lo que pasó a través de malla No. 60 (250 μ m) y se retuvo en malla No. 80 (177 μ m) para uniformizar el tamaño de partícula. El polvo de sotol fue empacado herméticamente en bolsas de plástico hasta su análisis. Asimismo, se utilizaron 4 enzimas: una celulasa, una pectinasa, una xilanasa y una hemicelulasa adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Estas 4 enzimas se utilizaron para la obtención de la mezcla optimizada, encontrada con el diseño ortogonal del estudio anterior.

6.7.2. Procedimiento experimental

6.7.2.1. Estudios preliminares

Se realizaron experimentos preliminares, para determinar las condiciones experimentales del estudio de optimización. En primer lugar, se investigó si la extracción que se deseaba realizar era viable. Para esto se preparó buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5 y se prepararon soluciones de las enzimas celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa, dichas enzimas se mezclaron de acuerdo con la concentración óptima encontrada para el diseño ortogonal en el estudio anterior (Sección 7.4.4.), las cuales fueron 10%, 10%, 8% y 10%, respectivamente en % p/p, respecto a la cantidad de sotol. Con esta mezcla y con el buffer se realizaron 7 tratamientos de extracción: 1 tratamiento enzimático, 1 tratamiento solo con ultrasónico, 1 tratamiento enzimático asistido con

ultrasonido (simultáneamente), 1 tratamiento asistido primeramente con ultrasonido seguido de un tratamiento enzimático, 1 tratamiento asistido con enzimas seguido una extracción con ultrasonido, 1 tratamiento sin enzima; estos 6 tratamientos se llevaron a cabo a 40 °C (temperatura óptima de la mezcla enzimática) y por último 1 tratamiento de extracción a 85 °C, cada uno de estos tratamientos fue realizado por duplicado, en los cuales se determinó el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y diferencias de medias a través de la prueba de Tukey, empleando una $P < 0.05$. Además, se realizó una cinética del rendimiento de extracción de polisacáridos para determinar el tiempo en el cual se completa la extracción. También, se realizaron extracciones a diferentes relaciones líquido-sólido para determinar y establecer con cual se obtenía el mayor REP. Para la determinación del rango de las potencias de ultrasonido se realizaron diferentes extracciones cada una a cierto nivel en el equipo de ultrasonido y se cuantificó el REP de sotol. Todos estos experimentos se realizaron por duplicado y las determinaciones se realizaron por triplicado, reportando los valores medios \pm la desviación estándar.

6.7.2.2. Estudio de optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol

En base a los resultados obtenidos, se procedió a realizar la optimización de las principales variables que afectan dicha extracción. Para esto se prepararon soluciones de cada enzima a una concentración de 20 g/L con el buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5. Posteriormente, se mezclaron con el volumen necesario y suficiente para todos los tratamientos del diseño llevado a cabo en este estudio hasta obtener una mezcla con la concentración adecuada o correspondiente a lo encontrado en el estudio anterior. La relación de cada enzima en la mezcla, respecto a cantidad total de las 4 enzimas fue de 26.3% de celulasa, 26.3% de pectinasa, 21.1% de xilanasa y 26.3% de hemicelulasa. Asimismo, se preparó una cantidad en exceso del mismo buffer (hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5) el cual se separó en diferentes cantidades y se colocó a diferentes temperaturas de acuerdo con el diseño experimental (20, 30, 40, 50 y 60 °C). Con la solución enzimática preparada (20 g/L), se realizaron los cálculos correspondientes para la obtención de la concentración de enzima necesaria de acuerdo también con el

diseño experimental (0, 1, 2, 3 y 4 g/L). Una vez alcanzada la temperatura adecuada del buffer, de acuerdo con el diseño experimental, se procedió a agregar la cantidad de enzima mencionada anteriormente y completar a 300 mL con dicho buffer, el cual fue el volumen de extracción para todos los tratamientos. A dichos 300 mL se le agregaron 6 g de polvo de sotol (50:1) y se sometió a diferentes potencias de ultrasonido (11, 25, 39, 53 y 67 W) durante 20 min. El ultrasonido fue aplicado usando una sonda S-450 de 400 W con potencia variable (Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, EUA) con un diámetro de 13 mm, que se mantuvo sumergida 3 cm por debajo de la superficie del medio líquido durante la sonicación. La temperatura de extracción según el diseño se mantuvo constante mediante la recirculación de agua por fuera del recipiente dentro de un baño. Después de los 20 min de extracción (determinado en los estudios preliminares), los extractos obtenidos para cada tratamiento se enfriaron en hielo (0 °C) durante 15 minutos y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se analizaron en el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), azúcares reductores (AR) y fructanos totales (FRU), contenido de fructosa, glucosa y sacarosa, así como el grado de polimerización promedio (GP_n). Como control se realizó una extracción sin enzima a 85 °C a la misma relación líquido-sólido y el mismo tiempo. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado.

6.7.2.3. Análisis estadístico de datos

El estudio de optimización se realizó a través de un diseño central compuesto (DCC) de 3 factores (X_1 , potencia de ultrasonido; X_2 , temperatura; X_3 , concentración de enzima) con 5 niveles para evaluar su efecto combinado. Para cada factor, el rango experimental fue elegido de acuerdo es estudios preliminares y a los resultados obtenidos en los estudios anteriores. Como se observa en la Tabla 11, los niveles codificados y decodificados de las variables independientes son presentadas en base a lo mencionado anteriormente.

Tabla 11. Variables independientes y sus niveles usados en el diseño central compuesto.

Variables independientes	Niveles de variación				
	-2	-1	0	1	2
X_1 , Potencia de ultrasonido (W)	11	25	39	53	67
X_2 , Temperatura (°C)	20	30	40	50	60
X_3 , Concentración de enzima (g/L)	0	1	2	3	4

Los datos obtenidos fueron ajustados por la siguiente ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1 \times X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + \varepsilon_i \quad \text{Ec. 5}$$

donde Y_i son las variables de respuesta, b_0 , es el intercepto; b_1 , b_2 y b_3 son los coeficientes lineales; b_{11} , b_{22} y b_{33} son los coeficientes cuadráticos; b_{13} y b_{23} son los coeficientes de las interacciones y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes ε_i es el error. El diseño completo consistió en 20 tratamientos experimentales, los cuales se llevaron a cabo en orden aleatorio (Tabla 12). De acuerdo con el diseño se realizaron 5 réplicas (tratamientos 16-20) para la estimación del error puro. Se utilizó el software Design Expert v. 6.01 para ajustar el modelo propuesto a los datos experimentales, se realizó un análisis de varianza y regresión, empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$. Además, de un análisis de cordilleras para la determinación de los puntos críticos de cada respuesta.

Tabla 12. Matriz del diseño central compuesto para la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol.

Tratamientos	X_1 (Potencia de ultrasonido)	X_2 (Temperatura)	X_3 (Concentración de enzima)	Y_i^*
1	-1 (25)	-1 (30)	-1 (1)	-
2	1 (53)	-1 (30)	-1 (1)	-
3	-1 (25)	1 (50)	-1 (1)	-
4	1 (53)	1 (50)	-1 (1)	-
5	-1 (25)	-1 (30)	1 (3)	-
6	1 (53)	-1 (30)	1 (3)	-
7	-1 (25)	1 (50)	1 (3)	-
8	1 (53)	1 (50)	1 (3)	-
9	-2 (11)	0 (40)	0 (2)	-
10	2 (67)	0 (40)	0 (2)	-
11	0 (39)	-2 (20)	0 (2)	-
12	0 (39)	2 (60)	0 (2)	-
13	0 (39)	0 (40)	-2 (0)	-
14	0 (39)	0 (40)	2 (4)	-
15	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-
16	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-
17	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-
18	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-
19	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-
20	0 (39)	0 (40)	0 (2)	-

Y_i , es la variable de respuesta, representada como la media \pm desviación estándar.

6.8. Estudio No. 6

Aplicación de fructanos de agave (*Agave tequilana* var. azul) en la encapsulación de antocianinas de maíz azul (*Zea mays* L.) por secado por aspersión

6.8.1. Materiales

Para la realización de este estudio se utilizó maíz azul (*Zea mays* L.), adquirido en la región de Babícora, Chihuahua. Este se limpió y se almacenó en bolsas de polietileno a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Este grano fue usado como fuente de pigmentos naturales (antocianinas) para su posterior encapsulamiento. Asimismo, como material acarreador se utilizaron fructanos de agave (Agaven®).

6.8.2. Procedimiento experimental

6.8.2.1. Extracción de antocianinas de maíz azul

En primer lugar, se realizaron extracciones de los pigmentos encontrados en el maíz azul. Para esto 5 kg de maíz limpio se molieron en un molino de martillos marca Pulvex 200, de 10 kg/h de capacidad, con una malla de 2 mm de diámetro. El maíz molido fue almacenado en bolsas de polietileno con sellado hermético a temperatura ambiente. Antes de la extracción se preparó una mezcla de metanol:agua acidificada con HCl 1 N (85:15). Posteriormente, se realizaron extracciones pesando 75 g de maíz azul molido a los cuales se le agregaron 600 mL del solvente de extracción en un vaso de precipitado de 1 L. Luego la mezcla fue sonicada con una sonda S-450 de 400 W con potencia variable (Branson Ultrasonics Sonifier, Danbury, Connecticut, EUA) con un diámetro de 13 mm, que se mantuvo sumergida 3 cm por debajo de la superficie del medio líquido durante 15 min. Después, la mezcla fue sometida a agitación durante 105 min con un agitador magnético a temperatura ambiente, y cubierta de la luz. El sobrenadante fue separado por filtración usando papel filtro Whatman No. 4 en un embudo Buchner con vacío y el solvente fue evaporado en un rotavapor Büchi a 40 °C. Los extractos obtenidos de las diferentes extracciones se fueron almacenando a -20 °C hasta su posterior encapsulación.

6.8.2.2. Encapsulación de antocianinas de maíz azul mediante secado por aspersión

Antes del proceso de secado los extractos fueron descongelados. Posteriormente, se prepararon mezclas de extracto de antocianinas de maíz azul con fructanos de agave como material acarreador en diferentes concentraciones (6%, 8%, 10% y 12%), respecto al extracto (peso/volumen). Es decir, se colocaron 350 mL de extracto y se añadieron 21, 28, 35 y 42 g los cuales fueron mezclados con un agitador magnético durante 20 min a 120 rpm. Las mezclas homogenizadas fueron deshidratadas utilizando un secador por aspersión Niro A/S DK-2860 2001 (GEA Company, Soeberg, DK) acondicionado a una temperatura de entrada de 150 °C y 85 °C de temperatura de salida y 0.7 bar de presión de aire. Los polvos encapsulados obtenidos con un porcentaje final de sólidos secos de 10%, 12%, 14% y 16% de acuerdo con el diseño experimental, fueron almacenados en bolsas de polietileno con sellado hermético y en la oscuridad hasta su posterior análisis. Dichos encapsulados fueron analizados en sus propiedades físicas (densidad aparente, color, contenido de humedad, actividad de agua, índice de absorción y solubilidad en agua y temperatura de transición vítrea), químicas (pH, polifenoles totales, actividad antioxidante, antocianinas totales y antocianinas individuales) y morfológicas (a través de la microscopía electrónica de barrido). Los tratamientos de encapsulación se realizaron por duplicado y al azar.

6.8.2.3. Análisis estadístico

Este estudio de encapsulación de antocianinas de maíz azul con fructanos de agave, fue realizado a través de un diseño completamente al azar por duplicado. Este fue analizado por medio de un análisis de varianza de una vía, en el cual la variable de estudio fue el porcentaje de adición de fructanos en peso/volumen (6%, 8%, 10% y 12%). Para esto, se utilizó el programa estadístico Minitab versión 16 (Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, EUA) con un nivel de confianza de 0.05. Asimismo, se utilizó la prueba de Tukey para hacer comparaciones de medias entre los cuatro tratamientos. Las diferencias significativas se definieron como $P < 0.05$.

6.9. MÉTODOS

6.9.1. Caracterización piñas de agave y sotol

6.9.1.1. Análisis proximal

Las piñas de agave y de sotol se caracterizaron mediante un análisis proximal de acuerdo con los métodos de la AOAC (1998) el contenido de humedad se obtuvo por secado a 105 °C por 24 h (método 950.02); cenizas por incineración a 550 °C (método 923.03); extracción de grasa en soxhlet (método 920.39); fibra cruda (método 962.09); microKjeldahl para proteína (método 960.52), y el contenido de carbohidratos se estimó por diferencia.

6.9.1.2. Determinación de diámetro y peso de las piñas

El diámetro de las piñas de agave y sotol se determinó usando una cinta métrica flexible la cual se colocó alrededor de cada una de las piñas y se registró el valor indicado, lo anterior se realizó cinco veces y se obtuvo un valor promedio. Para el peso de las piñas, se colocaron en una balanza y se registró el valor indicado, esto se hizo tres veces para cada piña y se obtuvo un valor promedio.

6.9.1.3. pH

Para la determinación del pH se siguió el método 981.12 de la AACC (2000). Cada uno de los extractos se agitó utilizando una barra magnética a 1500 rpm y una temperatura de 25 °C; durante la agitación se introdujo el electrodo de un potenciómetro (Hanna Instruments, modelo EDGE HI2020, RI, EUA) y se tomó la lectura del pH. Esta determinación se hizo por triplicado para cada uno de los tratamientos.

6.9.1.4. Determinación de sólidos solubles (°Brix)

El contenido de sólidos solubles (°Brix) de las piñas de agave y de sotol se determinó mediante el método 932.12 de la AACC (2000). Se realizó por índice de refracción, usando un refractómetro Atago Abbe (Tokio, Japón), a una temperatura de 25 °C. Este se ajustó previamente a 0 °Brix con agua destilada a 25 °C. Se colocó una gota de extracto en la cámara del refractómetro previamente atemperada a 25 °C y se realizó la lectura. Esta determinación se hizo por triplicado para cada uno de los tratamientos.

6.9.1.5. Determinación de la superficie específica total del polvo de sotol según el método Brunauer-Emmett-Teller

Las propiedades de textura del polvo de sotol se caracterizaron mediante isothermas de adsorción-desorción con nitrógeno a 77 K utilizando un equipo comercial Autosorb-1C Quantacrome Instruments (Boynton Beach, Florida, EUA). Antes de la medición de la adsorción-desorción de las muestras, se introdujo 1 g de sotol en polvo con un tamaño de partícula de 5×10^{-4} m, dentro de la celda y se desgasificó a 473 K y 10^{-2} mbar durante 24 h. Los datos de adsorción-desorción obtenidos con N₂ se analizaron según la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller y la ecuación de Barrett-Joyner-Halenda para la determinación del área de superficie específica y la distribución del tamaño de poro, respectivamente.

6.9.2. Cálculo de la densidad de potencia de ultrasonido (DPU)

La potencia ultrasónica se calculó mediante Se utilizó el método calorimétrico descrito por Rawson *et al.* (2011) para calcular la potencia de ultrasonido transferida hacia el medio líquido. Se añadió agua destilada en el recipiente utilizado para la extracción de fructanos de agave. Posteriormente se inició con la aplicación de ultrasonido y se registró la temperatura en función del tiempo (cada minuto) con un termómetro digital, la cinética de incremento de temperatura se realizó por duplicado para cada potencia de ultrasonido utilizada. Los datos de incremento de temperatura debido a la cavitación se graficaron *vs.* el tiempo, y se aplicó la tendencia de los datos a una regresión de tipo polinomial de grado n y coeficientes a_n (Ecuación 6).

$$y = a_0x^0 + a_1x^1 + a_2x^2 + a_3x^3 + \dots a_nx^n \quad \text{Ec. 6}$$

La ecuación obtenida se derivó y en la ecuación resultante se sustituyeron los tiempos de medición (0, 1, 2, 3, 4, 5, - 35 min) y se obtuvieron los valores del incremento de la temperatura (T) con respecto al tiempo (t), y se expresaron como dT/dt , en unidades (°C/s). El valor dT/dt obtenido se empleó para calcular la potencia ultrasónica (PU) en (W), como lo indica la Ecuación 7.

$$PU = m \times C_p \left(\frac{dT}{dt} \right)_{t=0} \quad \text{Ec. 7}$$

donde m es la masa del solvente (kg), C_p es el calor específico del solvente usado en este caso el del agua (4.18 kJ/kg· °C), y dT/dt es el cambio de temperatura en el tiempo (°C/s).

Finalmente, se calculó la potencia ultrasónica disipada dentro el medio líquido con volumen determinado (V) usando la Ecuación 8 (Xu *et al.*, 2014):

$$DPU = \frac{PU}{V} \quad \text{Ec. 8}$$

donde DPU es la densidad de potencia ultrasónica; expresada en mW/mL, PU es la potencia ultrasónica obtenida con la Ec. 7 en mW y V es el volumen del solvente utilizado en mL.

6.9.3. Cálculo de la potencia de ultrasonido (PU)

El cálculo de la potencia ultrasónica se realizó de igual manera que lo descrito en la sección 6.4.2., con la diferencia que en la Ecuación 7 se usó el C_p del material extraído con un contenido promedio de $1.7^\circ\text{Brix} \pm 0.01$ ($1.149 \text{ kJ/kg} \cdot ^\circ\text{C}$), el cual fue calculado de acuerdo con Asadi (2007). Los valores calculados de PU fueron expresados en W.

6.9.4. Caracterización de los extractos de agave y sotol

6.9.4.1. Determinación de carbohidratos totales (CT)

La determinación de carbohidratos totales se realizó por el método Fenol-Sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). Se mezcló 1 mL de muestra con 1 mL de fenol al 5% en tubos de ensayo. A los tubos se les añadieron 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado y se dejaron reposar por 15 min, por último, se analizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a una longitud de onda de 490 nm. Se realizó una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se prepararon soluciones de 10-100 ppm utilizando fructosa (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, EUA) como estándar. Como blanco se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio para cada tratamiento.

6.9.4.2. Determinación de azúcares reductores (AR)

La determinación de azúcares reductores se realizó de acuerdo con el método de Miller (1959) el cual se basa en que el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él y se desarrolla un cambio de color que va desde el amarillo hasta el café. Se mezclaron 0.5 mL de muestra

con 0.5 mL del reactivo DNS en tubos de ensayo, los cuales se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría, inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se añadieron 5 mL de agua destilada y se agitaron los tubos, se reposaron durante 15 min y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm. Se realizó una curva con soluciones de 200-2000 ppm, utilizando fructosa (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, EUA) como estándar. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio para cada tratamiento.

6.9.4.3. Determinación del rendimiento de extracción de carbohidratos (REC)

El porcentaje del rendimiento de extracción de carbohidratos se calculó usando la Ecuación 9:

$$REC (\%) = \frac{C_t - C_r}{\text{masa del agave (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. 9}$$

donde C_t y C_r representan los contenidos de azúcares totales y reductores en gramos (g), respectivamente.

6.9.4.4. Determinación del rendimiento de extracción de polisacáridos (REP)

El rendimiento de extracción de polisacáridos (%) se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$REP (\%) = \frac{\text{Contenido de extracción de polisacáridos (g)}}{\text{Peso del polvo de sotol (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. 10}$$

6.9.4.5. Determinación del contenido de fructanos totales (FRU)

El contenido de fructanos se determinó de acuerdo con McCleary *et al.* (2000) usando el kit comercial para la determinación de fructanos (Megazyme, Irlanda). Este método consiste en la hidrólisis de dos soluciones (enzimas), una solución de sacarasa/amilasa para hidrolizar sacarosa a glucosa y fructosa y almidón a glucosa y una solución de fructanasa (*exo*-inulinasa y *endo*-inulinasa) para hidrolizar los fructanos a glucosa, luego estos azúcares son medidos por el método de azúcares reductores usando ácido p-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH) con un espectrofotómetro. Detalles más

completos sobre el ensayo se encuentran en las instrucciones del kit. Se colocaron 0.2 mL de extracto de cada tratamiento en tubos de ensayo y se añadieron 0.2 mL de la solución enzimática A (sacarasa/amilasa) y se incubaron durante 30 min a 40 °C. Luego, se adicionaron 0.2 mL de la solución de borohidruro alcalino, se agitaron vigorosamente y se incubaron nuevamente por 30 min a 40 °C. El siguiente paso fue agregar 0.5 mL de ácido acético (200 mM) y agitar vigorosamente en un vórtex; la solución hasta este paso fue denominada solución S. Para continuar con el proceso se tomaron tres alícuotas de 0.2 mL de la solución S de cada tratamiento y se colocaron en el fondo de tres tubos de ensayo diferentes, luego a dos de ellos se les agregó 0.1 mL de solución enzimática B (fructanasa; *exo*-inulinasa y *endo*-inulinasa), y al tercero (muestra blanco) 0.1 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, se sellaron los tres tubos con parafilm y se incubaron durante 30 min a 40 °C para completar la hidrólisis de los fructanos a fructosa y glucosa. A continuación, se adicionaron 5 mL de reactivo de trabajo PAHBAH a todos los tubos incluyendo el blanco, muestras, muestras blanco y estándares de fructosa y se incubaron en agua a ebullición por exactamente 6 min. Los tubos se removieron y sumergieron inmediatamente en un baño con agua fría (18-20 °C) por aproximadamente 5 min. Como último paso después del enfriamiento y lo más pronto posible se leyeron las absorbancias de las muestras contra el blanco en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a una longitud de onda de 410 nm. Las operaciones para determinar la concentración fueron efectuadas empleando la hoja de cálculo Mega-Calc de Megazyme. Las determinaciones se realizaron por duplicado y se obtuvo un valor promedio para cada tratamiento. El contenido de fructanos fue expresado como g/100 g b.s. de agave o sotol.

6.9.4.6. Caracterización de extractos de agave y de sotol por cromatografía de intercambio iónico

La separación de fructanos de los extractos de agave y sotol se llevó a cabo a través de cromatografía de intercambio iónico de alta resolución con detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) en un sistema Thermo-Scientific; Dionex (modelo ICS 5000⁺, Sunnyvale, California, EUA), equipado con un detector electroquímico con oro como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia de AgCl. Previamente, los

extractos fueron pasados a través de resinas anionica y catiónica, después de lo cual se diluyeron a una concentración apropiada con agua desionizada y se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 μm . Después se inyectó un volumen de muestra de 25 μL con un automuestreador a través de una columna analítica CarboPac PA-100 (4 x 250 mm) con un guarda columna (Thermo-Scientific Dionex, Sunnyvale, California, EUA) a una temperatura de 30 °C y una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los eluyentes usados fueron (A) NaOH 150 mM y (B) acetato de sodio 1 M diluido en NaOH 150 mM. El gradiente de elución usado fue de 0-10 min con 100% del eluyente A, 10-85 min con un gradiente lineal de 0 a 45% del eluyente B, y de 85-90 min con 45% a 0% del eluyente B. Como estándares para identificar y cuantificar los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras se usaron: glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa (GP 3), 1,1-kestotetraosa (GP 4), 1,1,1-kestopentaosa (GP 5), así como as e inulina de achicoria.

6.9.4.7. Hidrólisis de los extractos de agave y sotol

La hidrólisis de los extractos se realizó de acuerdo con el método descrito por Ronkart *et al.* (2007) con algunas modificaciones. El extracto de agave o sotol (1 mL) se ajustó a un pH de 4.5 mediante la adición de un buffer de acetato de sodio (9 mL) para crear las condiciones óptimas para la enzima fructanasa. A cada muestra se le añadieron 50 μL de una mezcla comercial de fructanasa (Megazyme Wicklow, Irlanda) que comprendía *exo*-inulinasa (2000 U/mL) y *endo*-inulinasa (65 U/mL), después todas las muestras se hidrolizaron a 50 °C con agitación durante 24 h y luego se colocaron en agua a ebullición durante 10 minutos para inactivar la enzima. El producto final de la reacción enzimática se diluyó hasta la concentración apropiada con NaOH 150 mM y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 μm antes de inyectarse en el sistema HPAEC-PAD para la cuantificación de glucosa y fructosa.

6.9.4.8. Determinación del grado de polimerización promedio (GP_n) de los extractos de agave y sotol

El procedimiento para determinar el GP_n se basa en los principios de análisis de López-Molina *et al.* (2005), donde el GP_n es el valor que corresponde al número total de unidades de glucosa y fructosa en una muestra de inulina dada, dividido entre el número total de

las moléculas de inulina, sin tomar en cuenta la glucosa, la fructosa y la sacarosa, la cuales están presentes inicialmente en la muestra. Glucosa, fructosa y sacarosa fueron cuantitativamente medidos utilizando el método HPAEC-PAD (descrito anteriormente) antes y después de la hidrólisis total de los fructanos de agave y sotol con una mezcla comercial de fructanasas *exo*- y *endo*-inulinasa (Megazyme, Irlanda). Mediante el cálculo de la relación fructosa/glucosa, el GP_n fue determinado como el número de unidades de fructosa por número de unidades de glucosa más uno mediante la siguiente Ecuación:

$$GP_n = \frac{F_{final} - F_{inicial}}{G_{final} - G_{inicial}} + 1 \quad \text{Ec. 11}$$

donde $F_{inicial}$ y F_{final} son las concentraciones de fructosa antes y después de la hidrólisis total, respectivamente, y $G_{inicial}$ y G_{final} son las concentraciones de glucosa antes y después de la hidrólisis total, respectivamente (Ronkart *et al.*, 2007).

6.9.4.9. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_L)

Para cada cinética de extracción se obtuvieron los coeficientes de transferencia de masa, considerando que el cambio del soluto o azúcares (N) con respecto al tiempo (t) es descrito por la Ecuación 12:

$$\frac{dN}{dt} = K_L a [C_s - C] \quad \text{Ec. 12}$$

donde $K_L a$ representa el coeficiente global de transferencia de masa a través de un área superficial externa total (m^3/s), y a (m^2), C (g/100 g) y C_s (g/100 g) representan las concentraciones de los carbohidratos en el solvente a cualquier momento, t (s), y en la condición de saturación, respectivamente (Heldman y Singh, 1981; Geankoplis, 1998). Si la extracción sólido-líquido se lleva a cabo en un proceso por lotes (batch) donde el volumen total, V , de la solución (m^3) se mantiene constante, se obtiene la siguiente expresión:

$$dN = V d \quad \text{Ec. 13}$$

Lo que conduce a obtener la siguiente ecuación:

$$C = C_s \left[1 - \exp\left(-\frac{K_L a}{V} t\right) \right] \quad \text{Ec. 14}$$

La ecuación 14 implica que el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (s^{-1}) influye en la velocidad a la que el solvente se acerca a la concentración de saturación. A partir de la cinética de extracción de fructanos para cada tratamiento, se obtuvieron las pendientes $(K_L a)/V$. El proceso fue por lotes a un volumen (V) de 0.0480 m^3 y con un área superficial determinada (a), se obtuvo el coeficiente de transferencia de masa (K_L) para cada tratamiento.

6.9.4.10. Determinación de la constante de velocidad enzimática (V_0)

La V_0 se obtuvo bajo condiciones en las que la liberación de AR fue constante, suponiendo que la velocidad inicial de hidrólisis es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato que se forma (Nidetzky y Steiner, 1993). Las constantes de velocidad enzimática fueron determinadas al graficar la concentración de AR (g AR(fructosa)/100 g sotol b.s.) contra el tiempo de extracción para cada tratamiento. Para esto, la concentración de AR obtenida en el tratamiento 5 del estudio No. 3 (Tabla 4), el cual no contenía enzima, se restó a los valores de AR de cada tratamiento para eliminar el efecto de los azúcares libres solubles contenidos en el sotol fresco. La pendiente (V_0 ; g AR/100 g b.s./min) se determinó a partir del comportamiento lineal debido a la alta liberación de AR en el medio de extracción.

6.9.5. Determinación de la actividad de las enzimas

Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de azúcar reductor (glucosa, xilosa o ácido poligalacturónico) equivalentes por minuto de su respectivo sustrato bajo las condiciones a las que se llevó a cabo el ensayo (Köning *et al.*, 2002).

6.9.5.1. Actividad celulasa

La actividad de la celulasa (*endo*-1,4- β -D-glucanasa) de *Aspergillus niger* adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA) fue estimada mediante el ensayo de glucosa usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato (Ghose, 1987). Se preparó una solución de enzima a una concentración de 10 mg/mL con buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5, la cual se diluyó 100 veces. Asimismo, se preparó una solución

de carboximetilcelulosa a 10 g/L. Se mezclaron 0.5 mL de sustrato (CMC) con 0.5 mL de enzima celulasa diluída en tubos de ensayo y se incubaron a 40 °C durante 30 min, después se detuvo la reacción añadiendo 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición por 7 min en baño de maría, luego se colocaron en baño de agua fría, se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitaron. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm, como blanco se utilizó un blanco de sustrato, es decir, 0.5 mL de CMC y 0.5 mL del buffer utilizado para la preparación de la solución de enzima. También se utilizó un blanco de enzima el cual consistió en 0.5 mL de CMC y 0.5 mL de enzima celulasa, con éste se corrigieron las absorbancias de las muestras, restándoles la absorbancia obtenida en el blanco de enzima. Se preparó una curva estándar de glucosa con soluciones de 0 - 2 mg/mL con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio. Una unidad de actividad celulasa (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de glucosa a partir de la CMC a pH de 4.5 y 40 °C.

6.9.5.2. Actividad pectinasa

La actividad pectinasa (*poligalaturonasa*) de *Aspergillus niger* adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA) fue estimada a través del ensayo de liberación de ácido galacturónico usando ácido poligalacturónico como sustrato de acuerdo con el método descrito por Bailey y Pessa (1990). Se preparó una solución de enzima a una concentración de 10 mg/mL con buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5, la cual se diluyó 1000 veces con el mismo buffer. De igual forma, se preparó una solución de ácido poligalacturónico al 1% (p/v) disuelta en el mismo buffer. Se mezclaron 0.5 mL de ácido poligalacturónico con 0.5 mL de enzima pectinasa diluída en tubos de ensayo y se incubaron a 40 °C durante 30 min, después se detuvo la reacción añadiendo 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición por 7 min en baño de maría, luego se colocaron en baño de agua fría, se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitaron. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm, como blanco se utilizó un blanco de sustrato, es decir, 0.5 mL de ácido poligalacturónico y 0.5 mL del buffer utilizado para la preparación de la solución de enzima. También se utilizó un blanco de enzima el cual consistió en 0.5 mL de ácido

poligalacturónico y 0.5 mL de enzima pectinasa, con éste se corrigieron las absorbancias de las muestras, restándoles la absorbancia obtenida en el blanco de enzima. Se preparó una curva estándar de ácido galacturónico con soluciones de 0 - 2 mg/mL con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio. Una unidad de actividad pectinasa (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ácido galacturónico a partir del ácido poligalacturónico por minuto a pH de 4.5 y 40 °C.

6.9.5.3. Actividad xilanasa

La actividad de xilanasa (*endo*-1,4- β -xilanasa) de *Trichoderma longibrachiatum* adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA) fue estimada a través del ensayo de liberación de xilosa usando xilano como sustrato (Bailey *et al.*, 1992). Se preparó una solución de enzima a una concentración de 10 mg/mL con buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5, la cual se diluyó 250 veces con el mismo buffer. Asimismo, se preparó una solución de xilano a 10 g/L. Se mezclaron 0.5 mL de xilano con 0.5 mL de enzima xilanasa diluída en tubos de ensayo y se incubaron a 40 °C durante 30 min, después se detuvo la reacción añadiendo 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición por 7 min en baño de maría, luego se colocaron en baño de agua fría, se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitaron. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm, como blanco se utilizó un blanco de sustrato, es decir, 0.5 mL de xilano y 0.5 mL del buffer utilizado para la preparación de la solución de enzima. También se utilizó un blanco de enzima el cual consistió en 0.5 mL de xilano y 0.5 mL de enzima xilanasa, con éste se corrigieron las absorbancias de las muestras, restándoles la absorbancia obtenida en el blanco de enzima. Se preparó una curva estándar de xilosa con soluciones de 0 - 2 mg/mL con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio. Una unidad de actividad xilanasa (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de xilosa a partir del xilano por minuto a pH de 4.5 y 40 °C.

6.9.5.4. Actividad hemicelulasa

La actividad hemicelulasa de *Aspergillus niger* adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis

MO, EUA) fue estimada a través del ensayo de liberación tanto de manosa, xilosa y galactosa usando goma de algarrobo como sustrato. Se preparó una solución de enzima a una concentración de 10 mg/mL con buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5, la cual se diluyó 10 veces con el mismo buffer. Asimismo, se preparó una solución de goma de algarrobo a 5 g/L. Se mezclaron 0.5 mL de goma de algarrobo con 0.5 mL de enzima hemicelulasa diluída en tubos de ensayo y se incubaron a 40 °C durante 30 min, después se detuvo la reacción añadiendo 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición por 7 min en baño de maría, luego se colocaron en baño de agua fría, se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitaron. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm, como blanco se utilizó un blanco de sustrato, es decir, 0.5 mL de goma de algarrobo y 0.5 mL del buffer utilizado para la preparación de la solución de enzima. También se utilizó un blanco de enzima el cual consistió en 0.5 mL de goma de algarrobo y 0.5 mL de enzima hemicelulasa, con éste se corrigieron las absorbancias de las muestras, restándoles la absorbancia obtenida en el blanco de enzima. Se prepararon tres curvas estándar una de manosa, otra de xilosa y otra de galactosa con soluciones de 0 - 2 mg/mL cada una, con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio. Una unidad de actividad hemicelulasa (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de manosa, de xilosa y de galactosa a partir de goma de algarrobo por minuto a pH de 4.5 y 40 °C.

6.9.5.5. Actividad de la mezcla de enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa)

La actividad de la mezcla de enzimas fue estimada a través del ensayo de liberación tanto de glucosa, ácido galacturónico, xilosa, manosa y galactosa usando CMC, ácido poligalacturónico, xilano y goma de algarrobo como sustrato. Se preparó una solución de cada enzima a una concentración de 10 mg/mL con buffer de hidrogenofosfato de disodio-ácido cítrico a pH de 4.5. Se obtuvo una mezcla con las 4 soluciones de enzimas y se diluyó con el mismo buffer dependiendo del sustrato usado. Como sustratos fueron usados las soluciones de CMC, ácido poligalacturónico, xilano y goma de algarrobo preparados para la determinación de la actividad enzimática individual. Se mezclaron 0.5

mL de cada sustrato en diferentes tubos de ensaye con 0.5 mL de mezcla de enzimas y se incubaron a 40 °C durante 30 min, después se detuvo la reacción añadiendo 3 mL de DNS. Los tubos se colocaron a ebullición por 7 min en baño de maría, luego se colocaron en baño de agua fría, se añadieron 10 mL de agua destilada y se agitaron. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA) a 540 nm, como blanco se utilizó un blanco de cada sustrato, es decir, 0.5 mL de CMC, ácido poligalacturónico, xilano y goma de algarrobo y 0.5 mL del buffer utilizado para la preparación de la solución de enzimas. También se utilizó un blanco de enzima el cual consistió en 0.5 mL de cada sustrato y 0.5 mL de mezcla de enzimas, con éste se corrigieron las absorbancias de las muestras, restándoles la absorbancia obtenida en el blanco de enzima. Se prepararon cinco curvas estándar una de glucosa, de ácido galacturónico, de xilosa, de manosa y otra de galactosa con soluciones de 0 - 2 mg/mL cada una, con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio. Se definió la unidad de actividad enzimática (U) de cada una de las enzimas a un pH de 4.5 y 40 °C.

6.9.5.6. Cálculos para determinar la actividad enzimática

Los cálculos se realizaron de acuerdo con lo reportado por Köning *et al.* (2002). Primeramente, como ya se mencionó se restó la absorbancia del blanco de enzima a las absorbancias de cada una de las muestras, y se obtuvo un valor promedio para cada determinación de actividad enzimática, dando como resultado el ΔOD_{540} . Se graficaron los valores de las absorbancias de los estándares de azúcares (eje x) contra las concentraciones calculadas de las mismas en $\mu\text{mol/mL}$; eje y). Se aplicó la regresión lineal a través del origen con la fórmula $y = mx$.

La actividad (U) de cada una de las enzimas se calculó con el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica en [U/g]} = \frac{\Delta OD_{540} \times D \times V}{m \times W \times t} \quad \text{Ec. 15}$$

donde D es el factor de dilución, V es el volumen de la solución de enzima, m es la pendiente de la curva estándar ($\text{mL}/\mu\text{mol}$), W es el peso de la muestra de enzima (g) y t el tiempo de incubación (min).

Para el cálculo de la actividad celulasa, se usó la pendiente de la curva estándar de glucosa, para la pectinasa se usó la pendiente del ácido galacturónico, para la xilanasas se usó la pendiente de xilosa y para la actividad hemicelulasa se probaron tanto la curva estándar de manosa, de xilosa y galactosa.

6.9.6. Caracterización física de los encapsulados de extracto de maíz azul

6.9.6.1. Densidad aparente

Se utilizó el método reportado por Mahdavi *et al.* (2016). La densidad aparente de los polvos encapsulados se midió pesando 1 g de muestra en una probeta graduada de 10 mL. La probeta fue golpeada a mano y la densidad aparente fue calculada como la relación entre la masa (g) del polvo contenido en la probeta y el volumen ocupado (cm³).

6.9.6.2. Determinación de humedad

El contenido de humedad de polvos encapsulados se determinó gravimétricamente por secado en estufa de aire forzado a 105 °C durante 24 h hasta peso constante, de acuerdo con el método 925.098 de la AOAC (1998).

6.9.6.3. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) se determinó utilizando un medidor de actividad de agua calibrado con los estándares adecuados (Aqualab Series 3 Quick Start; Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EUA). La medición de cada tratamiento se realizó por triplicado.

6.9.6.4. Higroscopicidad

La higroscopicidad de los encapsulados fue determinada de acuerdo con el método propuesto por Cai y Corke (2000) con algunas modificaciones. Se pesaron las muestras de polvos de cada tratamiento (aproximadamente 1 g) en cápsulas de porcelana a peso constante, las cuales se colocaron en un recipiente de plástico hermético con una solución saturada de Na₂SO₄ (81% de humedad relativa) a 25 °C. Después de 1 semana, las muestras fueron pesadas y la higroscopicidad fue expresada como g de humedad adsorbida por 100 g de sólidos secos (g/100 g).

6.9.6.5. Determinación de pH

Para la determinación del pH de las harinas se siguió el método 981.12 de la AACC (2000). Se preparó una suspensión con 1 g de polvo y 10 mL de agua destilada recientemente hervida y fría. La mezcla se agitó utilizando una barra magnética durante 20 min a 1500 rpm y una temperatura de 25 °C; en la mezcla en agitación se introdujo el electrodo de un potenciómetro (Hanna Instruments, modelo EDGE HI2020, RI, EUA) y se tomó la lectura del pH. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

6.9.6.6. Índice de absorción de agua (IAA)

El índice de absorción de agua se determinó a cada uno de los polvos encapsulados conforme al método descrito por Anderson *et al.* (1969). Se pesó 1 g de muestra y se suspendieron en 15 mL de agua destilada a 30 °C en un tubo para centrífuga con rosca previamente tarado. La suspensión se agitó vigorosamente de forma manual y se centrifugó a $3200 \times g$ en una centrífuga (Thermo IEC modelo CL3-R, EUA) durante 10 min a 25 °C. El sobrenadante se vertió cuidadosamente en una cápsula de porcelana previamente tarada y se pesó el sedimento formado en el tubo de la centrífuga. Lo anterior se realizó por triplicado. El IAA se calculó como el peso del sedimento después de la eliminación del sobrenadante entre el peso de la muestra (encapsulado).

6.9.6.7. Índice de solubilidad en agua (ISA)

Este índice representa el porcentaje de materia seca recuperada después de que se evapora el sobrenadante de la determinación del índice de absorción de agua. Se determinó de acuerdo con el método reportado por Anderson *et al.* (1969); donde el sobrenadante vertido en la cápsula se secó en una estufa (Fisher Scientific, EUA.) a 105 °C por 24 h y se pesó. Lo anterior se realizó por triplicado. El ISA se calculó como el porcentaje del peso de los sólidos secos del sobrenadante entre el de la muestra (encapsulado).

6.9.6.8. Temperatura de transición vítrea (T_g)

El análisis térmico se realizó a través de la determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g), siguiendo el método descrito por Ahmed *et al.* (2010b). Para esto se utilizó

un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments (TA Q-200, Crawley, Reino Unido). Se pesaron de 5-8 mg de polvo encapsulado en una celda de aluminio de 40 μL , la cual se selló herméticamente. Una celda vacía se usó como referencia para todas las mediciones. El programa de barrido de temperatura fue desde $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de un enfriamiento hasta $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y presión de una atmósfera de gas nitrógeno. Los termogramas fueron analizados usando el programa Universal Analysis (TA Instruments). La temperatura de transición vítrea se interpretó como el punto medio de las curvas obtenidas. Cada determinación se realizó por duplicado y se obtuvo un valor promedio para cada muestra.

6.9.6.9. Parámetros de color

El color de los polvos encapsulados de extracto de maíz azul fue medido usando un colorímetro de reflectancia triestímulo portátil Konica Minolta CR-400/410 (Minolta Co., Osaka, Japón), éste se calibró previamente con una placa blanca estándar de cerámica ($X = 94.9$, $y = 0.3185$, $x = 0.3124$). Se determinaron los parámetros de color L^* , a^* y b^* donde L^* es referente a la luminosidad o brillantez ($0 = \text{negro}$ y $100 = \text{blanco}$), a^* va del verde al rojo ($+a^* = \text{rojo}$; $-a^* = \text{verde}$) y b^* va del azul al amarillo ($+b^* = \text{amarillo}$; $-b^* = \text{azul}$). Se realizaron 15 disparos de medición para cada tratamiento. Con estos valores se calculó el ángulo hue $^{\circ}$, croma* y la diferencia total de color (ΔE).

El ángulo hue $^{\circ}$, el cual indica la percepción del color de la muestra y se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Hue}^{\circ} = \arctan(b^*/a^*) \quad \text{Ec. 16}$$

En el círculo cromático, los valores de hue $^{\circ}$ pueden variar de 0° a 360° (rojo) a través de un círculo de matiz de desvanecimiento continuo, cuyos otros valores de referencia son 90° (amarillo), 180° (verde) y 270° (azul).

El valor de croma* indica la pureza o saturación del color, el cual se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Croma}^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad \text{Ec. 17}$$

La diferencia total de color (ΔE) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 18}$$

donde ΔE es la diferencia total de color entre el color del extracto y de los encapsulados; L_0^* , a_0^* y b_0^* son los valores de L^* , a^* y b^* de los extractos con la adición de fructanos antes de su secado por aspersión. A cada encapsulado se le restó su correspondiente extracto inicial con diferente porcentaje de adición.

6.9.6.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los polvos encapsulados de extracto de maíz azul fueron examinados por microscopía electrónica de barrido. La morfología de las partículas de los polvos fue observada usando un microscopio de transmisión de electrones HITACHI, modelo SU3500. Los encapsulados fueron fijados en talones SEM con cinta adhesiva de doble cara y recubiertos con una capa fina de oro, con un equipo Denton vacuum (Desk II, Moorestown, NJ, EUA). para cada uno de los tratamientos. Luego, se obtuvieron las imágenes de cada tratamiento con una magnificación de 1000× a 15 kV.

6.9.7. Caracterización química de los encapsulados de extracto de maíz azul

6.9.7.1. Extracción de compuestos antioxidantes de los encapsulados de maíz azul

Para dicha extracción se siguió las técnicas utilizadas por Abdel-Aal y Hucl (1999) y por Robert *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 g de muestra y se añadieron 10 mL de metanol acidificado (85:15 v/v metanol/HCl 1 N). Esta dispersión fue agitada usando un Vórtex por 2 min y luego todas las muestras se introdujeron en un baño de ultrasonido (Branson 1800, EUA) durante 20 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3200 × g en una centrifuga (Thermo IEC modelo CL3-R, EUA) por 15 min a 4 °C y el sobrenadante se aforó a 10 mL con metanol acidificado. Lo anterior se realizó por triplicado para cada tratamiento. Los extractos obtenidos se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45 μm, y después se almacenaron en recipientes color ámbar a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.9.7.2. Determinación de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales fue determinado mediante el método descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999), con algunas modificaciones. Antes de la cuantificación el extracto de maíz azul se diluyó y se realizó un barrido (Anexo 7) para obtener el espectro de absorbancia, en un rango de 400-600 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA). Con los resultados obtenidos se leyó la absorbancia de las muestras a 530 nm, usando como blanco metanol acidificado. El contenido de antocianinas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = (A/\varepsilon) \times V \times MW \times (1/PM) \times 100 \quad \text{Ec. 19}$$

donde C = concentración de antocianinas totales (mg de cianidina 3-glucosido/100 g de muestra), A = absorbancia leída a 530 nm, ε = absortividad molar (cianidina 3-glucósido = 25,965 cm/M), V = Volumen total del extracto de antocianinas, MW = peso molecular de la cianidina 3-glucósido = 449.2 g/mol y PM = peso de la muestra.

6.9.7.3. Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de los encapsulados de maíz azul se determinó mediante una modificación del método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Se tomaron 30 μ L del extracto, 3 mL de agua destilada y 200 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, se colocaron en un tubo de ensaye dejando reaccionar por 10 min., a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se añadieron 600 μ L de una solución de carbonato de sodio al 20% y se incubaron por 20 min a 40 °C en un baño de temperatura controlada (Fisher Scientific, modelo 210, EUA). Se enfrió en un baño de hielo y el color desarrollado durante ese tiempo se midió a 760 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA.). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100 g) de muestra. Lo anterior se realizó por triplicado para cada tratamiento.

6.9.7.4. Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió usando el método del radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995). Esta metodología se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH por

antioxidantes. Se colocaron 0.1 mL del extracto en tubos de ensaye y se les agregó 3.9 mL de solución de DPPH 100 μ M en metanol, se agitaron vigorosamente y se mantuvieron en la oscuridad durante 3 h. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo Lambda 25 UV/VIS, EUA.). Los resultados se expresaron en μ mol equivalentes de trolox por gramo de muestra (μ mol ET/g). Dicha determinación se realizó por triplicado para cada tratamiento.

6.9.7.5. Determinación de antocianinas individuales por HPLC

Se determinaron las antocianinas individuales presentes en cada uno de los tratamientos por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los extractos obtenidos se pasaron a viales color ámbar para su análisis. El análisis por HPLC se realizó en un equipo Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC equipado con UV-visible y detector de arreglo de diodos (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, California, EUA). La separación se llevó a cabo con una columna Thermo Scientific Diosnex C18 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm). Los extractos fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0.45 μ m antes de la inyección. La lectura de las muestras se realizó a 520 nm por UV-visible integrado al HPLC. Los solventes que se emplearon (fase móvil) fueron los siguientes: el solvente A consistió en ácido fórmico acuoso al 8% (v/v) y el solvente B de metanol con ácido fórmico al 5% (v/v). El gradiente utilizado fue el siguiente: gradiente lineal de 20% B a 55% B en 30 min, seguido de un lavado y reacondicionamiento de la columna con 20% B de 30 – 45 min. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min a 30 °C y la inyección de la muestra fueron 40 μ L.

Las antocianinas en las muestras fueron identificadas de acuerdo con su tiempo de retención, usando los siguientes estándares: Se usaron como antocianinas de referencia: cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, cianidina 3,5-diglucósido y pelargonidina 3,5-diglucósido. La proporción de cada una de las antocianinas presentes en el extracto se calculó a partir del porcentaje del área de cada pico en el cromatograma obtenido. Lo anterior se realizó por triplicado para cada tratamiento obteniéndose un valor promedio (Sánchez-Madrigal *et al.*, 2015).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Estudio No. 1

Extracción asistida con ultrasonido de fructanos a partir de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) a diferentes potencias de ultrasonido y relaciones sólido-líquido

7.1.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de *Agave tequilana* de diferentes edades

El tamaño y dimensiones (diámetro y peso), así como pH, °Brix y composición proximal de las piñas de agave se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Características físicas y químicas de plantas de *A. tequilana* Weber var. azul de diferentes edades.

Características	Edad (años)	
	6	7
Diámetro (cm)	116.0 ± 0.50 ^b	118.1 ± 0.40 ^a
Peso (kg)	33.80 ± 0.08 ^b	34.73 ± 0.01 ^a
°Brix	2.00 ± 0.08 ^b	2.25 ± 0.05 ^a
pH	4.91 ± 0.04 ^b	5.22 ± 0.08 ^a
Composición proximal (%)		
Humedad	64.57 ± 0.19 ^a	63.21 ± 0.48 ^b
Fibra cruda	2.51 ± 0.06 ^a	2.49 ± 0.01 ^a
Cenizas	0.96 ± 0.03 ^b	1.16 ± 0.05 ^a
Proteína	0.46 ± 0.01 ^b	0.75 ± 0.02 ^a
Grasa	0.15 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.03 ^a
Carbohidratos	31.36 ± 0.22 ^b	32.20 ± 0.02 ^a

*Media ± desviación estándar. Medias entre edades con diferente letra presentan diferencias significativas, prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Se observa que el diámetro y el peso de las piñas de agave se incrementó de 1.01 y 1.02 veces, respectivamente con el paso de 1 año, es decir de 6 a 7 años. Los °Brix y el pH también fueron significativamente mayores en la piña de agave de mayor edad ($P < 0.05$). Los pesos y los diámetros de ambas piñas de agave fueron más bajos que los reportados por Arrizon *et al.* (2010) para una piña de agave de 6.5 años; sin embargo, un peso similar fue reportado por Iñiguez-Covarrubias *et al.* (2001) para un promedio de 30 cabezas de agave de 7-9 años. De acuerdo con estos resultados, Pinal *et al.* (2009) reportaron niveles más altos de °Brix en mostos de agaves de 8 años que en aquellos de agaves de 4 años. El

análisis de composición proximal reveló que después del contenido de humedad, los carbohidratos constituyen la mayor parte de de la planta, seguidos de la fibra cruda, cenizas, proteínas y grasa. Una composición similar, pero en materia seca, fue reportada previamente por Narváez-Flores *et al.* (2015) y Flores-Girón *et al.* (2016). El contenido de la mayoría de los componentes varió significativamente ($P < 0.05$) entre las cabezas de agave de diferentes edades: solo el contenido fibra cruda y grasa no presentó diferencia ($P > 0.05$). Todos los componentes, excepto la humedad, fueron mayores en la piña de agave de 7 años que en la planta más joven. También se identificaron diferencias entre los dos agaves en los tratamientos de extracción: en la Tabla 14 se observa el análisis de varianza (ANOVA) el cual reveló que la edad presentó un efecto significativo ($P < 0.05$) en el rendimiento de extracción de carbohidratos (REC), contenido de fructanos (FRU) y en el grado de polimerización promedio (GP_n).

Tabla 14. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de carbohidratos, fructanos y grado de polimerización.

Fuente	GL	REC	FRU	GP _n
Edad	1	0.000	0.000	0.000
<i>DPU</i>	2	0.000	0.000	0.000
Relación S-L	2	0.000	0.000	0.000
Edad* <i>DPU</i>	2	0.002	0.098	0.000
Edad*Relación S-L	2	0.289	0.036	0.110
<i>DPU</i> *Relación S-L	4	0.558	0.062	0.000
Edad* <i>DPU</i> *Relación S-L	4	0.006	0.893	0.096

Significativo a $P < 0.05$. *DPU*: densidad de potencia ultrasónica; S-L: sólido-líquido; REC: rendimiento de extracción de carbohidratos; FRU: fructanos; GP_n: grado de polimerización promedio.

Los resultados de la extracción de carbohidratos de ambas piñas de agave se muestran en la Tabla 15, donde se muestra que las concentraciones de carbohidratos aumentaron con la edad: siendo el REC y el contenido de FRU mayor en la piña de agave de 7 años que en la de 6 años. Esta diferencia puede atribuirse a cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en las plantas de agave a lo largo del tiempo (Mellado-Mojica *et al.*, 2009). Resultados similares fueron reportados por Arrizon *et al.* (2010), pero en agave de 2, 4 y 6.5 años. Mellado-Mojica y López (2012) también reportaron cambios en el contenido de FRU durante el crecimiento de agave; y Mellado-Mojica *et al.* (2009) encontraron que el contenido de FRU aumenta con la edad en agaves de 4, 6 y 8 años; y luego disminuye nuevamente en agave de 10 años.

Tabla 15. Rendimiento de extracción de carbohidratos, contenido de fructanos y grado de polimerización de plantas de *A. tequilana* Weber var. azul de diferentes edades extraídas a diferentes potencias de ultrasonido y relaciones sólido-líquido.

Determinaciones	Relación S-L	6 años				Control 90 °C
		DPU (mW/mL)				
		0	40	80	120	
REC (%)	1:2	12.22 ± 0.51 ^g	13.28 ± 1.17 ^g	14.50 ± 1.30 ^{efg}	15.97 ± 1.14 ^{def}	20.08 ± 1.99 ^{ab}
	1:3	12.55 ± 0.62 ^g	13.64 ± 1.35 ^{fg}	16.87 ± 1.66 ^{cde}	18.82 ± 0.69 ^{abc}	
	1:6	12.73 ± 0.62 ^g	14.43 ± 1.56 ^{efg}	17.59 ± 1.32 ^{bcd}	20.14 ± 1.47 ^a	
FRU (g/100 g b.s.)	1:2	30.79 ± 0.07 ^f	32.71 ± 0.57 ^{ef}	35.70 ± 0.93 ^{de}	38.50 ± 1.63 ^{cd}	53.28 ± 0.57 ^a
	1:3	32.78 ± 0.07 ^{ef}	35.09 ± 1.28 ^e	38.50 ± 1.20 ^{cd}	41.75 ± 0.45 ^c	
	1:6	38.53 ± 0.40 ^{cd}	40.40 ± 0.96 ^c	41.69 ± 0.40 ^c	47.38 ± 0.78 ^b	
GP _n	1:2	15.16 ± 0.42 ^{ab}	14.85 ± 0.02 ^b	14.76 ± 0.05 ^b	14.61 ± 0.20 ^b	11.79 ± 0.13 ^d
	1:3	14.93 ± 0.30 ^b	15.08 ± 0.55 ^{ab}	15.72 ± 0.03 ^a	14.68 ± 0.30 ^b	
	1:6	14.94 ± 0.49 ^b	15.13 ± 0.37 ^{ab}	14.92 ± 0.18 ^b	13.69 ± 0.31 ^c	
7 años						
REC (%)	1:2	12.99 ± 0.52 ^f	14.84 ± 0.25 ^e	16.86 ± 0.31 ^d	18.11 ± 0.46 ^{cd}	20.16 ± 1.03 ^{ab}
	1:3	13.28 ± 0.82 ^f	16.76 ± 1.03 ^d	17.70 ± 1.03 ^{cd}	19.60 ± 0.64 ^{ab}	
	1:6	15.27 ± 0.29 ^e	18.90 ± 0.25 ^{bc}	19.64 ± 1.23 ^{ab}	20.77 ± 0.67 ^a	
FRU (g/100 g b.s.)	1:2	33.03 ± 0.45 ⁱ	34.23 ± 0.48 ^{hi}	37.94 ± 0.87 ^{efg}	40.63 ± 0.84 ^{def}	58.62 ± 0.63 ^a
	1:3	36.51 ± 1.21 ^{ghi}	37.60 ± 0.61 ^{fgh}	43.67 ± 1.62 ^{cd}	45.79 ± 0.47 ^c	
	1:6	41.50 ± 0.01 ^e	43.32 ± 0.24 ^{cd}	46.77 ± 0.56 ^c	51.35 ± 1.84 ^b	
GP _n	1:2	16.60 ± 0.25 ^{bcd}	16.88 ± 0.14 ^{bc}	16.08 ± 0.03 ^d	14.67 ± 0.07 ^e	11.89 ± 0.01 ^g
	1:3	16.38 ± 0.04 ^{cd}	18.05 ± 0.03 ^a	17.12 ± 0.04 ^b	14.77 ± 0.71 ^e	
	1:6	16.41 ± 0.01 ^{cd}	17.82 ± 0.04 ^a	15.98 ± 0.01 ^d	13.70 ± 0.47 ^f	

*Media ± desviación estándar. Medias por filas para la DPU y por columnas para la relación S-L con diferente letra entre edades presentan diferencias significativas, prueba de Tukey ($P < 0.05$). DPU: densidad de potencia ultrasónica; S-L: sólido-líquido; REC: rendimiento de extracción de carbohidratos; FRU: fructanos; GP_n: grado de polimerización promedio.

Aunque en este estudio no se incluyeron plantas mayores de 7 años, las dos plantas evaluadas en este estudio muestran contenidos de carbohidratos adecuados para la extracción de fructanos de agave.

7.1.2. Extracción de carbohidratos de *A. tequilana* Weber var. azul

En la Tabla 15 se muestra el REC, el contenido de FRU así como el GP_n de las plantas de *A. tequilana* de 6 y 7 años de edad extraídas a diferentes DPU y relaciones S:L. Se encontró que la DPU tuvo un efecto significativo en la extracción de carbohidratos (Tabla 15). Se demostró que la sonicación promueve la extracción, ya que los contenidos de REC y FRU en cada relación S:L fueron más altos en las muestras sonicadas que en las muestras extraídas sin ultrasonidos a la misma temperatura (40 °C).

Los extractos obtenidos sin ultrasonido fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los extraídos con DPU de 80 y 120 mW/mL. Bajo algunas condiciones de tratamiento, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las muestras sonicadas y las extraídas en ausencia de sonicación, especialmente en el caso de relaciones S:L más altas (1:2 y 1:3). Estos hallazgos demuestran que la relación S:L, como la DPU, tuvieron un efecto marcado en la extracción de carbohidratos, como se muestra en los resultados del ANOVA (Tabla 15), donde las diferentes relaciones S:L arrojaron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los niveles más altos del REC y extracción de FRU se lograron con la máxima DPU probada (120 mW/mL) en combinación con la relación S:L de 1:6. Con estas condiciones de extracción se obtuvieron niveles de REC y FRU de 20.77% y 51.35 g/100 g b.s., respectivamente, en el agave de 7 años; y 20.14% y 47.38 g/100 g b.s., respectivamente, en el agave de 6 años. Estos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) entre las muestras extraídas con 80 *versus* 120 mW/mL, así como también entre las muestras extraídas con relaciones S:L de 1:3 *versus* 1:6. Solo en el caso de los niveles de REC en el agave de 7 años, las DPU de 80 y 120 mW/mL no presentaron diferencia significativa. Los niveles más altos de REC y FRU observados en muestras extraídas en presencia de ultrasonido, particularmente a las más altas DPU, pueden atribuirse a una intensificación del fenómeno de cavitación, que causa modificaciones y rupturas en la pared celular de la planta, facilitando así la transferencia o liberación de carbohidratos en el medio de

extracción (Pardo-Rueda *et al.*, 2015; Narváez-Flores *et al.*, 2015; Chemat *et al.*, 2017). A DPU más altas, más solvente (agua) puede entrar en las células y más carbohidratos pueden permear la membrana celular (Zou *et al.*, 2010), lo que explica la obtención de mejores rendimientos de carbohidratos a DPU más altas.

También se ha demostrado que el ultrasonido induce la ruptura química de polisacáridos complejos, lo que contribuye a una mayor cuantificación de carbohidratos (Ebringerová y Hromádková, 2010). Adicionalmente, debido a que la extracción asistida con ultrasonido (EAU) se llevó a cabo a baja temperatura (40 °C) dentro de los límites aceptables de cavitación, esto pudo influir y mejorar los rendimientos de extracción de carbohidratos. Ha sido reportado que el límite del umbral de cavitación aumenta a medida que disminuye la temperatura (Grönroos, 2010). Aunque esta temperatura no es la más adecuada para la solubilización de carbohidratos, ya que los rendimientos de extracción de carbohidratos aumentan con el aumento de la temperatura (Narváez-Flores *et al.*, 2015); también se ha demostrado que las temperaturas más altas reducen la cavitación durante la aplicación del ultrasonido, contrarrestando así su efecto (Zhang *et al.*, 2013; Pardo-Rueda *et al.*, 2015) disminuyendo el rendimiento de la extracción. Esto es debido a que a elevadas temperaturas se induce a un aumento de la presión de vapor, provocando que más vapores del solvente entren en la cavidad de la burbuja y numerosas burbujas de cavitación colapsen menos violentamente y reduzcan así el efecto de sonicación (Santos *et al.*, 2009; Chemat *et al.*, 2017).

Como ya se mencionó, en este estudio se demostró que la relación S:L afecta los rendimientos de extracción de carbohidratos y FRU de agave, donde se obtuvieron mayores rendimientos de extracción con relaciones S:L más bajas (1:6). Esta observación puede explicarse por la mayor diferencia de concentración entre el tejido y el solvente exterior en relaciones S:L más bajas, donde la diferencia de concentración da como resultado una mejor extracción como resultado de una mayor fuerza motriz que promueve la velocidad de difusión de carbohidratos solubles de la masa de la planta sólida al medio de extracción líquido, dando lugar a un aumento en la eficiencia de la extracción (Maran *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015).

Además, a bajas relaciones S:L se producen medios de extracción menos viscosos que a relaciones S:L más altas, lo que también afecta la eficiencia del fenómeno de cavitación

(Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014) y, por lo tanto, la eficiencia de extracción. De esta manera en este estudio, a mayores relaciones S:L (mayor cantidad de agave en el medio líquido), los rendimientos de extracción fueron menores debido a que la extracción de polisacáridos presentes en la materia prima no pudo completarse (Flores-Girón *et al.*, 2016), debido a una saturación de la fase líquida.

7.1.3. Perfiles de los carbohidratos y GP_n de los extractos de agave obtenidos por HPAEC-PAD

Los extractos de agave analizados por HPAEC-PAD (Fig. 6), revelaron que la fructosa es el principal monómero presente en los fructanos de *A. tequilana*, seguido del disacárido sacarosa y del monómero glucosa. A la relación S:L de 1:6, los niveles de liberación de glucosa, fructosa y sacarosa fueron más altos que a las otras relaciones S:L. De acuerdo con esto, en la Figura 6 solo se muestran los resultados de las muestras extraídas a esta relación 1:6 a diferentes DPU.

En la Fig. 6 se muestra claramente el efecto pronunciado del ultrasonido en la liberación de azúcares simples: las concentraciones más altas de glucosa 0.07486 g/100 g b.s. (Fig. 6a), de fructosa 3.7281 g/100 g b.s (Fig. 6b), y de sacarosa 0.3009 g/100 g b.s (Fig. 6c) se observaron en los extractos sonicados a 120 mW/mL.

Aunque se obtuvieron mayores concentraciones de azúcares simples en los extractos de la piña de agave de 6 años, tanto los extractos de agave de 6 y 7 años de edad exhibieron la misma tendencia, aumentando las concentraciones de carbohidratos al incrementar la DPU. La mayoría de los extractos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), particularmente a las potencias (DPUs) más altas (80 mW/mL y 120 mW/mL); excepto para el contenido de fructosa del agave de 7 años, que no difirió significativamente entre las DPUs (Fig. 6b). También se observó que el agave más viejo presentó contenidos más bajos de glucosa, fructosa y sacarosa y significativamente diferentes que el agave más joven ($P < 0.05$). Estos resultados concuerdan con los GP_ns determinados para las dos plantas (Tabla 15): 13.70-18.05 para la planta de 7 años y 13.69-15.72 para la planta de 6 años, lo que indica que fructanos más polimerizados, es decir, más largos están presentes en la planta de mayor edad. Estos GP_ns son similares a los reportados por Waleckx *et al.* (2008), quienes encontraron que el GP_n de los fructanos de *A. tequilana* es 13.6.

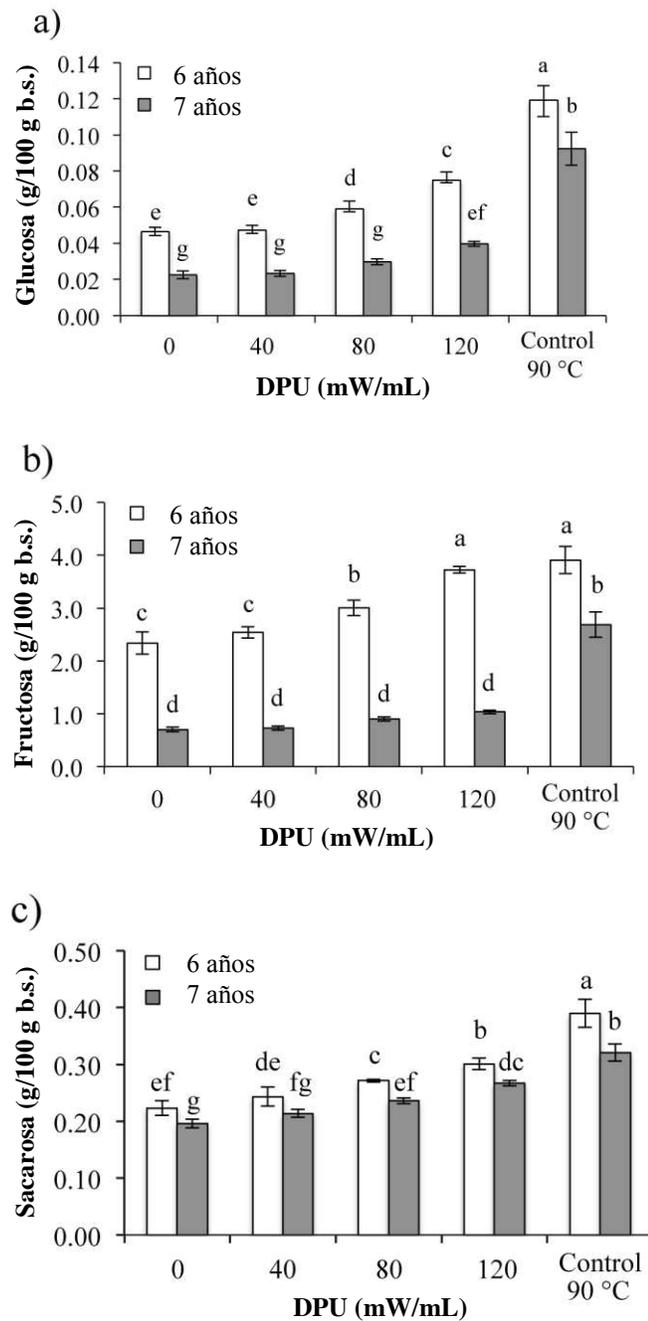


Figura 6. Contenidos de glucosa (a); fructosa (b); y sacarosa (c) en extractos de plantas de *A. tequilana* de 6 y 7 años extraídos a diferentes DPU. Barras con diferentes letras para los diferentes extractos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Los efectos del ultrasonido también fueron evidentes en los GP_ns: los extractos obtenidos a mayor DPU (120 mW/mL) presentaron GP_ns más bajos, lo que indica que una DPU alta puede degradar a los fructanos mediante el rompimiento del enlace glucosídico tanto de los polisacáridos estructurales y ramificados (Ebringerová y Hromádková, 2010; Pardo-Rueda *et al.*, 2015), lo que acorta la longitud de la cadena.

Este efecto también fue reportado por Lingyun *et al.* (2007). Este efecto de acortamiento de la cadena en fructanos puede considerarse una desventaja o no, dependiendo de su uso cuando se agregan a los alimentos como ingrediente funcional: ya que las propiedades de los fructanos incluyendo actividad prebiótica, digestibilidad, promovedor potencial de la salud, valor calórico, poder edulcorante y capacidad de retención de agua, dependen del GP_n (Apolinário *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Además, se han reportado alteraciones en componentes naturales durante la aplicación de ultrasonido, como en licopeno, ácido ascórbico, en el contenido fenólico total y antocianinas, β-caroteno, entre otros. La mayor degradación de estos componentes es atribuida a la generación de radicales H• y OH• formados durante la sonicación (Pingret *et al.*, 2013). Comparando con los extractos obtenidos a 90 °C sin ultrasonido, los extractos asistidos con ultrasonido tuvieron niveles de FRU más bajos (Tabla 15), pero GP_ns más altos, lo que indica una mayor degradación de fructanos en las muestras extraídas con alta temperatura sin sonicar. En términos de degradación de fructanos, por lo tanto, el procedimiento de EAU representa ser un mejor método para la extracción de fructanos de plantas de agave en comparación con el método tradicional (sin sonicación). Con estos resultados y considerando que las condiciones de extracción se realizaron a temperaturas más bajas con el método de EAU, éste podría representar una ventaja para posibles aplicaciones a nivel industrial en relación con el consumo de energía.

Por otra parte, la diferencia en los niveles de degradación de fructanos entre el método tradicional y el método de EAU también fue evidente en la separación de fructanos demostrada por HPAEC-PAD (Fig. 7): el perfil de fructanos para el extracto obtenido a 90 °C (Fig. 7c.) exhibió menos definición con picos más altos de glucosa, fructosa y sacarosa en comparación con el perfil de los extractos obtenidos por EAU (Fig. 7a y 7b), lo que indica una mayor degradación de fructanos en las muestras tratadas térmicamente.

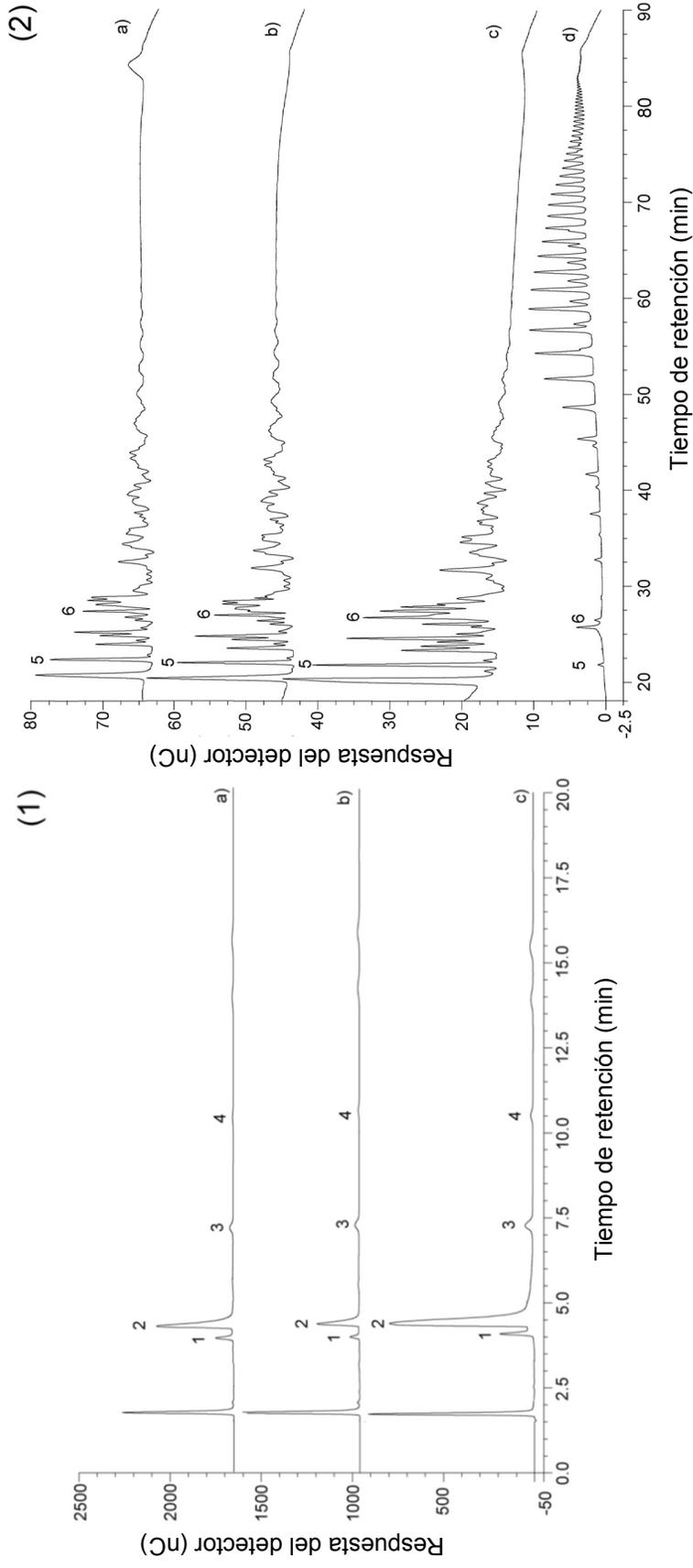


Figura 7. Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos de plantas de *A. tequilana* de diferentes edades extraídas a 120 mW/mL y a una relación sólido:líquido de 1:3. (a) 6 años; (b) 7 años; (c) control sin ultrasonidos a 90 ° C; y (d) inulina de la achicoria. Los picos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se identificaron por comparación con los estándares de tiempo de retención conocido y corresponden a glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 1,1-kestotetraosa y 1,1,1-kestopentaosa, respectivamente.

También se observaron niveles ligeramente más altos de fructanos polimerizados más largos en la planta de 7 años que en la de 6 años (Fig. 7b y 7a, respectivamente). Los cromatogramas de los fructanos de agave obtenidos por HPAEC-PAD revelaron la presencia de los fructooligosacáridos GP3, GP4 y GP5. 1-Kestosa (10.59 min), 1,1-kestotetraosa (22.75 min) y 1,1,1-kestopentaosa (27.80 min) se identificaron en todos los extractos; y no se observaron diferencias claras entre las edades para estos compuestos. Sin embargo, en los extractos obtenidos por tratamiento térmico (90 °C), los picos correspondientes a estos compuestos fueron mayores. Los perfiles mostrados en la Figura 7 concuerdan con el GP_ns presentado en la Tabla 15 y con los resultados mostrados en la Fig. 6, donde los contenidos de azúcares libres (glucosa, fructosa y sacarosa) disminuyeron de 6 a 7 años. Esta tendencia es similar a lo reportado por Arrizon *et al.* (2010) y Mellado-Mojica y López (2012), quienes encontraron disminuciones lineales en el contenido de azúcares libres con el aumento de las edades de las plantas de agave (de 2 a 6.5 años y de 2 a 7 años, respectivamente).

La identificación de moléculas con largos GPs en *A. tequilana* es difícil; porque sus fructanos existen como una mezcla compleja de neo-fructanos altamente ramificados con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre unidades de fructosa (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006), los cuales son más complejos que la serie de inulina simple (series lineales con enlaces β -(2-1)) de la achicoria.

La separación de los fructanos de los extractos de agave en este estudio (Fig. 7) no fue tan clara como la observada para la inulina de achicoria (Fig. 7d). Por esta razón, la estructura compleja determinada para los extractos de agave (Fig. 7) no permitió una cuantificación precisa del GP. Sin embargo, López *et al.* (2003), Mellado-Mojica *et al.* (2009), Arrizon *et al.* (2010), y Mellado-Mojica y López (2012), también identificaron una estructura compleja de fructanos en *A. tequilana* usando HPAEC-PAD y reportaron GPs de 3 a 29, 3 a 28, 8 a 30 y 6 a 23, respectivamente.

7.2. Estudio No. 2

Efecto del ultrasonido en la extracción de carbohidratos a partir de plantas de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a diferentes potencias y temperaturas

7.2.1. Caracterización fisicoquímica de la planta de sotol

El tamaño y dimensiones (diámetro y peso), así como pH, °Brix y composición proximal de la piña fresca de sotol silvestre y el área superficial específica del polvo deshidratado. se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Propiedades fisicoquímicas de la planta de *Dasyilirion wheeleri* silvestre.

Propiedades	Sotol fresco	Sotol deshidratado
Diámetro (m)	0.827 ± 0.011	----
Peso (kg)	8.50 ± 0.228	----
°Brix	12.33 ± 0.329	----
pH	5.39 ± 0.508	----
Área superficial específica (m ² ·g ⁻¹)	----	0.4019 ± 0.008
Composición proximal (%)		
Humedad	76.64 ± 0.03	6.34 ± 0.04
Fibra cruda	6.99 ± 0.22	32.25 ± 1.05
Cenizas	2.19 ± 0.55	4.05 ± 0.04
Proteína	0.86 ± 0.04	3.15 ± 0.06
Grasa	0.64 ± 0.10	2.12 ± 0.02
Carbohidratos	12.68 ± 0.06	52.09 ± 0.08

*Media de mediciones por triplicado ± error estándar.

Esta composición de la piña de sotol es similar a la reportada por Cruz-Requena *et al.* (2013) en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*) y para algunas Agavaceas (Narváez-Flores *et al.*, 2015; Flores-Girón *et al.*, 2016). Con respecto al área superficial específica, se observó que el polvo de sotol mostró una histéresis muy pequeña (Fig. 8). La histéresis resulta de los espacios interarticulares del polvo de sotol y no de la presencia de otro tipo de poros en el material. Por esta razón, el polvo de sotol tiene un área superficial baja (Tabla 16), lo que indica que es un material no poroso (Hu y Srinivasan, 1999). Este valor bajo de área superficial no pudo influir en la transferencia de masa durante el proceso de extracción. Un valor típico para un material vegetal fue reportado por Guevara-Amatón *et al.* (2010) para cáscara de nuez (0.708 m²/g) y altos valores en carbón activado de almendra y cáscara de coco fueron reportados por Marcilla *et al.* (2000) y Hu y Srinivasan (1999), respectivamente

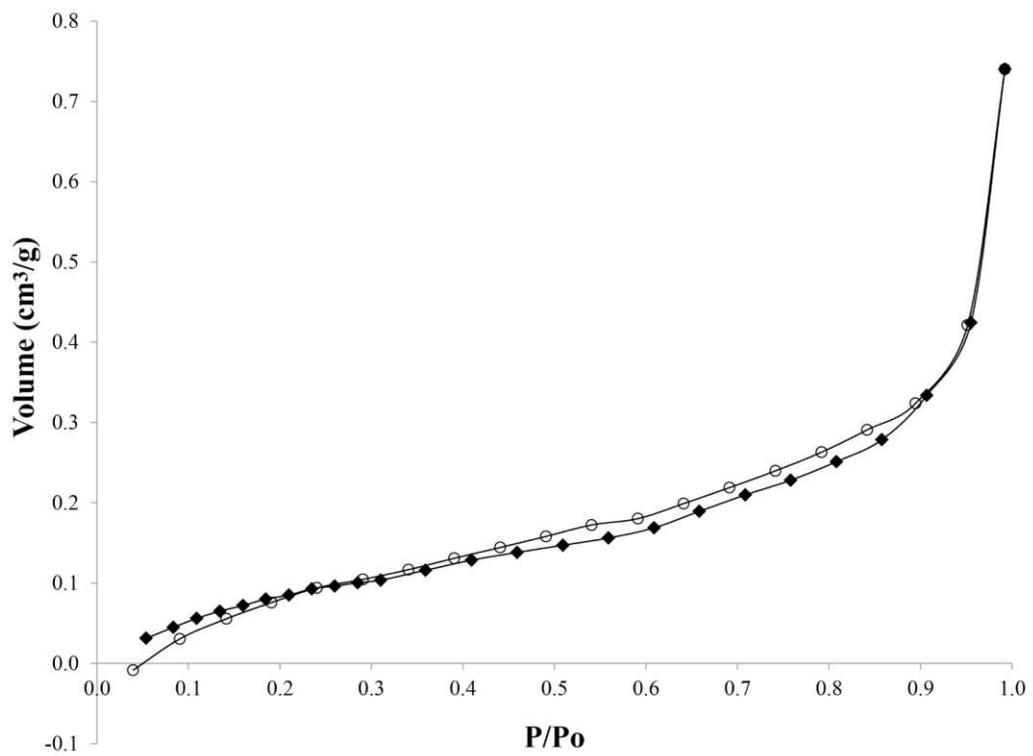


Figura 8. Isothermas de adsorción y desorción del polvo de sotol. ◆ Desorción.
○ Adsorción.

Algunos estudios muestran que muchos biopolímeros resultan con una gran superficie de sorción debido a la existencia de una estructura microporosa intrínseca en los materiales (Aguerre *et al.*, 1989). Además, estas diferencias resultan del número y tamaño de los poros en la matriz de carbohidratos, que determinan el área total de sorción. Por lo tanto, la velocidad y el grado de hidratación de los materiales están influenciados por las propiedades superficiales de los poros (Sing, 2001; Rosa *et al.*, 2010).

7.2.2. Ajuste del modelo

Los resultados obtenidos usando diferentes tratamientos para la extracción asistida con ultrasonido para CT, AR y FRU así como el coeficiente de transferencia de masa (K_L) y el GP_n son mostrados en la Tabla 17. La influencia de la PU y la temperatura sobre la extracción de carbohidratos se muestra en la Tabla 18. El análisis de varianza para todas las respuestas indicó un ajuste adecuado sin una falta significativa de ajuste, excepto para el contenido de CT. Los coeficientes de regresión se obtuvieron ajustando los datos experimentales al modelo de segundo orden (Tabla 19). Los modelos mostraron valores de R^2 satisfactorios, excepto para el modelo ajustado del contenido CT.

7.2.3. Extracción de carbohidratos totales (CT)

Los CT incluyen azúcares solubles extraídos durante el proceso de EAU. La temperatura de extracción tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) en la extracción de CT (Tabla 18). Sin embargo, el modelo de segundo orden no predijo adecuadamente el comportamiento de los datos ($R^2 = 0.6468$), mostrando una falta de ajuste ($P < 0.05$). Los efectos de la temperatura y la PU sobre la extracción de CT se muestran en la Figura 9. Incrementos en la temperatura aumentan el contenido de CT, alcanzando un valor máximo de 25.78 g/100 g sotal b.s. con una potencia de ultrasonido de 54.87 W y una temperatura de extracción de 36.5 °C. A pesar de estos resultados, los contenidos de CT obtenidos por EAU (Tabla 17) fueron menores ($P < 0.05$) que los obtenidos por tratamiento térmico-tradicional (30.95 g/100 g sotal b.s.). La tendencia presentada (Fig. 9) durante la EAU mostró incrementos en los contenidos de CT a medida que se aumentó la temperatura, alcanzando el valor máximo descrito anteriormente.

Tabla 17. Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, fructanos, coeficiente de transferencia de masa, glucosa, fructosa y grado de polimerización promedio de extractos de sotol (*Dasyliroon wheeleri*) obtenidos a diferentes potencias ultrasónicas y temperaturas.

Tratamiento	PU (W)	T (°C)	CT (g/100 g b.s.)	AR (g/100 g b.s.)	FRU (g/100 g b.s.)	K_L (m/s)	Glucosa (g/100 g b.s.)	Fructosa (g/100 g b.s.)	GP ⁿ
1	40	25	24.92 ± 0.81 ^{bc}	12.95 ± 0.61 ^e	7.31 ± 0.05 ^e	4.08 × 10 ⁻⁷ ± 1.2 × 10 ⁻⁸	3.53 ± 0.06 ^{bcd}	4.68 ± 0.05 ^a	7.52 ± 0.74 ^c
2	78	25	22.51 ± 1.29 ^d	12.70 ± 0.09 ^e	7.54 ± 0.08 ^{abc}	3.41 × 10 ⁻⁷ ± 2.4 × 10 ⁻⁸	3.84 ± 0.02 ^a	4.80 ± 0.02 ^a	5.87 ± 0.15 ^d
3	40	45	23.69 ± 0.39 ^{cd}	17.06 ± 0.22 ^b	7.45 ± 0.52 ^{bc}	3.10 × 10 ⁻⁷ ± 1.9 × 10 ⁻⁸	3.44 ± 0.03 ^{cde}	3.75 ± 0.22 ^{cd}	9.17 ± 0.59 ^{ab}
4	78	45	22.38 ± 0.75 ^d	17.16 ± 0.36 ^b	7.34 ± 0.31 ^{bc}	3.12 × 10 ⁻⁷ ± 2.3 × 10 ⁻⁸	3.21 ± 0.02 ^{fg}	4.60 ± 0.05 ^{ab}	5.03 ± 0.42 ^{de}
5	32.13	35	24.44 ± 1.10 ^{bc}	14.96 ± 0.17 ^d	7.45 ± 0.37 ^{bc}	4.39 × 10 ⁻⁷ ± 2.9 × 10 ⁻⁸	3.81 ± 0.05 ^a	4.53 ± 0.16 ^a	10.56 ± 0.67 ^a
6	85.9	35	25.68 ± 0.78 ^b	15.90 ± 0.34 ^c	7.42 ± 0.31 ^{bc}	2.97 × 10 ⁻⁷ ± 1.6 × 10 ⁻⁸	3.67 ± 0.04 ^{ab}	4.76 ± 0.59 ^a	5.61 ± 0.59 ^{de}
7	59	20.85	20.74 ± 0.20 ^e	10.47 ± 0.25 ^f	7.77 ± 0.60 ^{abc}	3.77 × 10 ⁻⁷ ± 3.9 × 10 ⁻⁸	3.35 ± 0.02 ^{def}	4.09 ± 0.04 ^{abc}	7.79 ± 0.72 ^{bc}
8	59	49.14	24.86 ± 0.63 ^{bc}	16.77 ± 0.62 ^b	7.94 ± 0.10 ^{abc}	3.34 × 10 ⁻⁷ ± 2.2 × 10 ⁻⁸	3.26 ± 0.02 ^{efg}	4.59 ± 0.09 ^{ab}	5.37 ± 0.49 ^{de}
9	59	35	25.71 ± 0.60 ^b	16.06 ± 0.60 ^{bc}	7.93 ± 0.18 ^{ab}	5.32 × 10 ⁻⁷ ± 6.0 × 10 ⁻⁸	3.16 ± 0.07 ^g	3.40 ± 0.07 ^d	4.73 ± 0.43 ^e
10	59	35	25.94 ± 0.42 ^b	17.06 ± 0.39 ^{bc}	8.12 ± 0.07 ^{ab}	5.18 × 10 ⁻⁷ ± 2.5 × 10 ⁻⁸	3.11 ± 0.01 ^g	3.33 ± 0.03 ^d	4.44 ± 0.15 ^e
11	59	35	26.27 ± 0.43 ^b	15.84 ± 0.11 ^{bc}	8.02 ± 0.15 ^{ab}	5.56 × 10 ⁻⁷ ± 4.1 × 10 ⁻⁸	3.26 ± 0.02 ^g	3.51 ± 0.01 ^d	4.62 ± 0.09 ^e
12	59	35	25.72 ± 0.64 ^b	16.92 ± 0.16 ^{bc}	7.96 ± 0.24 ^{ab}	5.27 × 10 ⁻⁷ ± 6.3 × 10 ⁻⁸	3.15 ± 0.01 ^g	3.38 ± 0.02 ^d	4.73 ± 0.04 ^e
13	59	35	24.98 ± 0.64 ^b	17.02 ± 0.61 ^{bc}	7.97 ± 0.16 ^{ab}	5.05 × 10 ⁻⁷ ± 1.5 × 10 ⁻⁸	3.08 ± 0.01 ^g	3.34 ± 0.02 ^d	4.37 ± 0.06 ^e
SE	--	--	0.3578	0.1442	0.0471	1.298 × 10 ⁻⁸	0.0277	0.0748	0.1997
Control	0	90	30.95 ± 0.71 ^a	20.27 ± 0.35 ^a	8.26 ± 0.29 ^a	----	3.61 ± 0.05 ^{bc}	3.94 ± 0.07 ^{bc}	3.65 ± 0.33 ^f

*Los valores presentados son el promedio de mediciones por triplicado ± la desviación estándar. PU, potencia ultrasónica; T, temperatura; CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; K_L , coeficiente de transferencia de masa; GPⁿ, grado de polimerización promedio, EE, error estándar.

Tabla 18. Análisis de varianza del contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, fructanos, coeficiente de transferencia de masa, glucosa, fructosa y grado de polimerización promedio de extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Fuente	Cuadros medios							
	GL	CT	AR	FRU	K_L	Glucosa	Fructosa	GP _n
Modelo	5	4.29	10.46*	0.16*	2.178×10^{-14} *	0.15*	0.80*	8.51*
A-Potencia ultrasónica	1	0.48	0.17	8.858×10^{-4}	8.895×10^{-15} *	1.876×10^{-3}	0.21	20.46*
B-Temperatura	1	2.50	38.24*	4.357×10^{-3}	4.419×10^{-15} *	0.087*	0.021	0.86
AB	1	0.30	0.031	0.031	1.193×10^{-15}	0.073*	0.14	1.55
A ²	1	1.50	1.57 ^a	0.73*	4.948×10^{-14} *	0.57*	2.63*	17.06*
B ²	1	17.69*	13.25*	0.089	5.718×10^{-14} *	0.032	1.47*	4.63*
Residual	7	1.67	0.27	0.028	7.205×10^{-16}	0.010	0.071	0.52
Falta de ajuste	3	3.60*	0.23	0.042	1.207×10^{-15}	0.018	0.16*	0.93
Error puro	4	0.23	0.31	0.017	3.554×10^{-16}	5.145×10^{-3}	5.714×10^{-3}	0.21
R ²		0.6468	0.9646	0.8050	0.9560	0.9093	0.8893	0.9213

*Significancia a $P < 0.05$. CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; K_L , coeficiente de transferencia de masa; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 19. Coeficientes de regresión del modelo de segundo orden ajustado para las diferentes variables de respuesta de los extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Coefficientes	CT	AR	FRU	K_L	Glucosa	Fructosa	GP _n
b_0	25.71	16.61	7.97	5.278×10^{-7}	3.17	3.40	4.74
b_1	-0.24	0.15	0.011	-3.335×10^{-8} *	-0.015	0.16	-1.60*
b_2	0.56	2.19*	0.023	-2.350×10^{-8} *	-0.10*	-0.051	-0.33
b_{12}	0.28	0.088	-0.088	1.727×10^{-8}	-0.13*	0.18	-0.62
b_{11}	-0.46	-0.47	-0.032*	-8.433×10^{-8} *	0.29*	0.61*	1.57*
b_{22}	-1.59*	-1.38*	-0.11	-9.066×10^{-8} *	0.068	0.46*	0.82*

*Significancia a $P < 0.05$. CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; K_L , coeficiente de transferencia de masa; GP_n, grado de polimerización promedio.

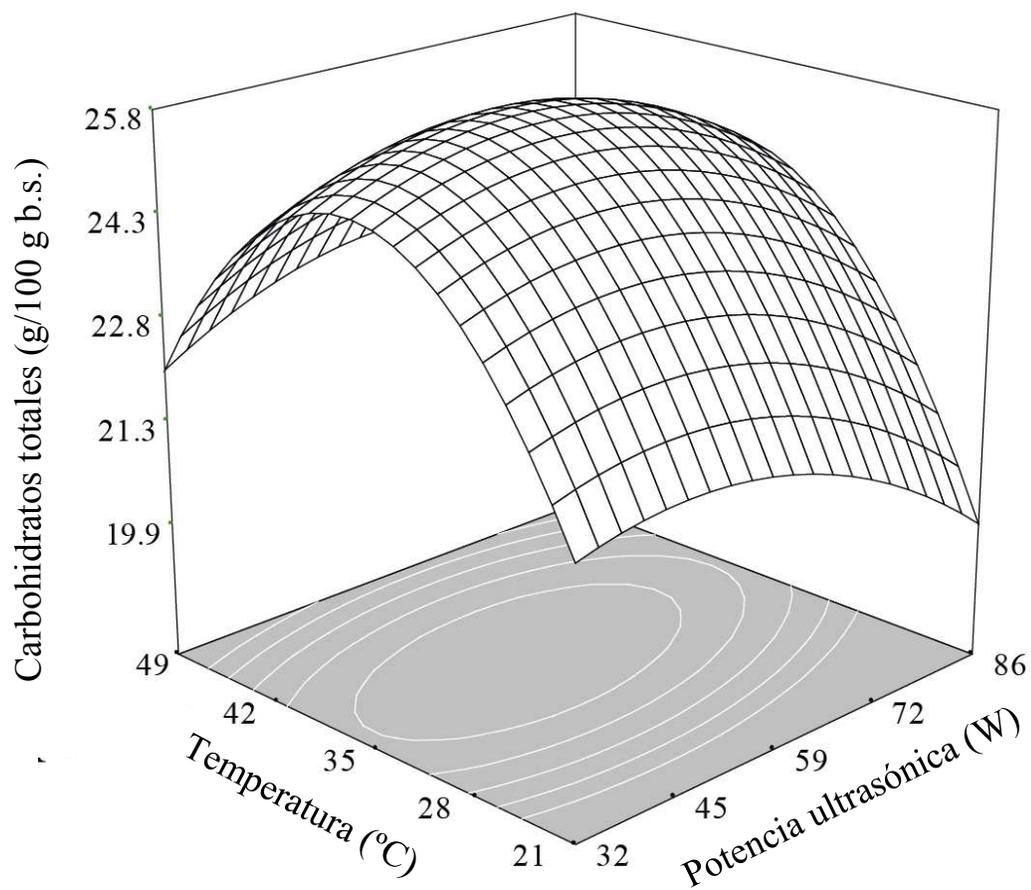


Figura 9. Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre los carbohidratos totales de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

Esto puede ser debido a que la solubilidad de los azúcares es favorecida por los incrementos de temperatura (Pardo-Rueda *et al.*, 2015; Narváez-Flores *et al.*, 2015). Sin embargo, incrementos adicionales de temperatura causaron una disminución en el contenido de CT. Algunos reportes han mostrado que los aumentos de temperatura minimizan el efecto de cavitación (Grönroos, 2010; Pardo-Rueda *et al.*, 2015), disminuyendo la extracción de componentes, como se observó en este estudio. Los CT obtenidos en este estudio fueron más altos que los reportados por Pardo-Rueda *et al.* (2015) quienes llevaron a cabo una extracción sonotérmica a 40 °C de plantas de sotol (*Dasyilirion leiophyllum*).

7.2.4. Extracción de azúcares reductores (AR)

La extracción de azúcares reductores fue significativamente afectada ($P < 0.05$) por la PU y la temperatura. El modelo de segundo orden se ajustó adecuadamente para obtener una R^2 de 0.9646 (Tabla 18) y una topografía de valor máximo de 17.49 g/100 g sotol b.s. para las condiciones de PU y temperatura de 63.36 W y 43 °C, respectivamente. La Fig. 10 representa el comportamiento AR a diferentes niveles de temperatura y PU, mostrando que a medida que estas variables aumentan, los valores de AR también aumentan, alcanzando un valor máximo en las condiciones descritas anteriormente. Los contenidos de AR obtenidos en todos los tratamientos de la EAU dieron como resultado valores más bajos ($P < 0.05$) que el tratamiento térmico tradicional (20.27 g/100 g sotol b.s.). Esto indica una mayor hidrólisis de polisacáridos complejos por altas temperaturas durante la extracción térmica. Resultados similares fueron reportados durante la extracción sonotérmica y térmica de carbohidratos de sotol a 40 °C, con una mayor liberación de AR por tratamientos térmicos en comparación con el tratamiento sonotérmico a 40 °C (Pardo-Rueda *et al.*, 2015).

7.2.5. Extracción de fructanos totales (FRU)

Los fructanos son polímeros compuestos de unidades de fructosa. La extracción de fructanos fue afectada significativamente por el término cuadrático de la PU ($P < 0.05$). El modelo se ajustó adecuadamente a los datos experimentales, dando un $R^2 = 0.8050$ (Tabla 18) así como los coeficientes ajustados por modelo que se muestran en la Tabla 19.

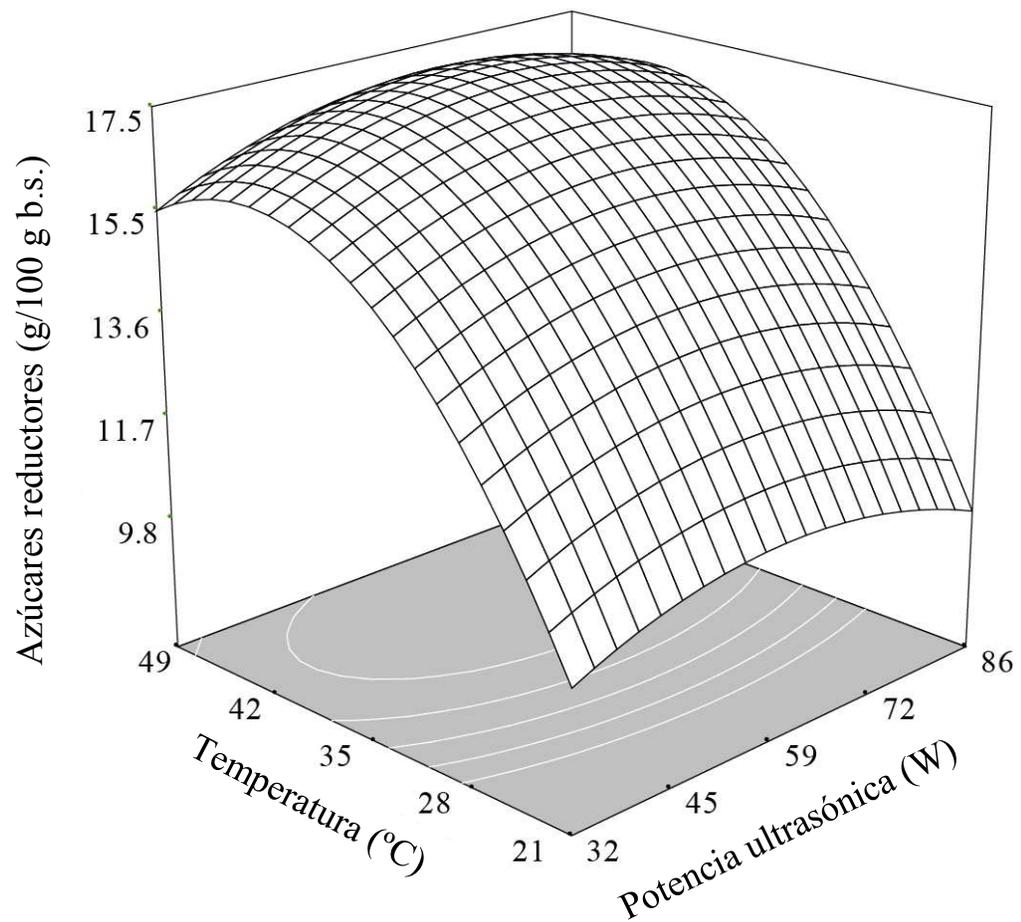


Figura 10. Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre los azúcares reductores de los extractos de *Dasyilirion wheeleri*.

Los efectos de ambas variables independientes sobre la extracción de FRU se muestran en la Fig. 11a, con valores que variaron de 7.31 a 8.12 g/100 g soto b.s. Incrementos en la PU resultaron en un aumento del contenido de fructanos, alcanzando un valor máximo de 7.97 g/100 g soto b.s. a 36 °C y 59.05 W. El máximo contenido de FRU obtenido en el tratamiento con ultrasonido fue similar ($P > 0.05$) al del tratamiento térmico tradicional, sin mostrar una mejoría en la extracción de FRU. Sin embargo, el tratamiento ultrasonido requirió temperaturas más bajas y tiempos de procesamiento más cortos (10 min). Incrementos o decrementos en la PU disminuyeron la extracción de fructanos (Fig. 11a). Esta contribución mínima de la temperatura de extracción en el contenido de fructanos fue reportada por Narváez-Flores *et al.* (2015) durante la extracción de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul; a pesar de obtener un efecto significativo para la temperatura de extracción, esto no se reflejó en la extracción de estos compuestos bioactivos. Para el rango de temperatura evaluada (20-40 °C), se observó una solubilidad limitada de fructanos en el agua, excepto a 40 °C, la cual está cerca del límite de solubilidad de estos componentes. Una tendencia similar se observó en este estudio; la temperatura no presentó un gran efecto en la extracción de fructanos, pero estuvo cerca del límite de solubilidad de estos componentes, y por lo tanto la extracción alcanzó valores máximos a temperaturas cercanas a 40 °C. Las condiciones de extracción a más altas temperaturas conducen a una disminución en la extracción de fructanos. Esto se puede atribuir a un efecto contrario del mecanismo de cavitación, lo cual minimiza la extracción de componentes (Santos *et al.*, 2009; Grönroos, 2010; Pardo Rueda *et al.*, 2015; Chemat *et al.*, 2017).

7.2.6. Coeficiente de transferencia de masa (K_L) durante la extracción de fructanos

El coeficiente de transferencia de masa (K_L) para la extracción de fructanos indicó que la velocidad de extracción de estos componentes fue dependiente de las condiciones experimentales (Tabla 17). La Tabla 18 muestra que la temperatura y la PU presentaron efectos significativos tanto lineales como cuadráticos ($P < 0.05$). El modelo mostró un ajuste satisfactorio ($R^2 = 0.9560$) en la descripción del coeficiente de transferencia de fructanos (K_L) durante la EAU. Incrementos en la temperatura y en la PU provocaron un aumento de los valores de K_L , alcanzando un valor máximo de 9.33×10^{-7} m/s a 33.5 °C y 54.96 W (Fig. 11b).

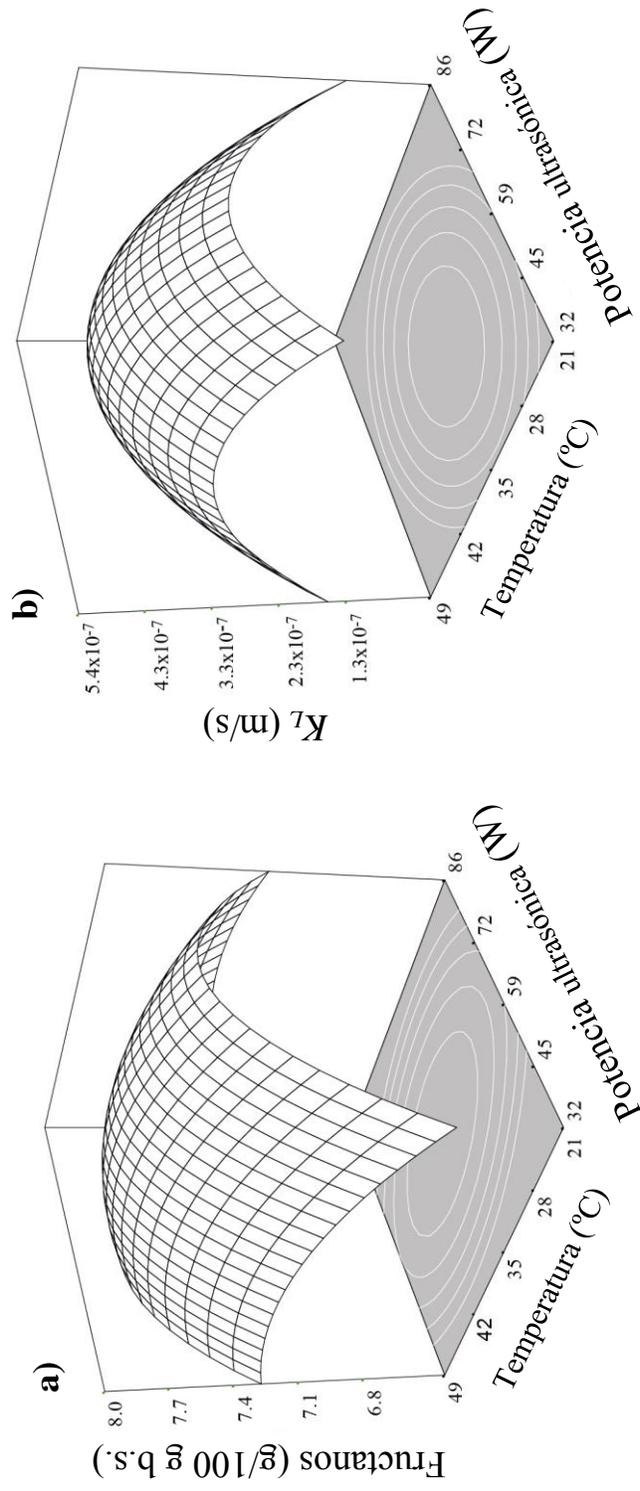


Figura 11. Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el contenido de fructanos (a) y el coeficiente de transferencia de masa (b) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

Las condiciones experimentales fuera de este rango condujeron a una disminución en los valores de K_L . Las mismas condiciones para la PU y la temperatura a la cual el K_L alcanzó un máximo fueron similares a las condiciones óptimas para la extracción máxima de fructanos. Estos resultados concuerdan con estudios recientes que muestran que la PU afecta significativamente el coeficiente volumétrico de transferencia de masa durante la extracción de fructanos de agave, con mayores velocidades de extracción obtenidas a bajas temperaturas y altos potencias de ultrasonido (Narváez-Flores *et al.*, 2015). Estos resultados indican que el ultrasonido causa cambios y rupturas en la pared celular, favoreciendo la transferencia de carbohidratos al medio de extracción (Ebringerová y Hromádková, 2010). Sin embargo, el uso de temperaturas más altas no resulta en mejoras significativas en la extracción de fructanos. Como ya se describió, esto es debido a que a altas temperaturas se contrarresta el efecto de la cavitación (Groöroos, 2010; Pardo Rueda *et al.*, 2015).

7.2.7. Contenido de glucosa

La glucosa es un azúcar reductor que se libera durante la EAU de los carbohidratos. Los valores de glucosa en el rango experimental oscilaron entre 3.08 y 3.84 g/100 g sotoI b.s. (Tabla 17). Los valores más altos de temperatura y PU resultaron en una disminución del contenido de glucosa (Fig. 12a), mostrando un mínimo a 64.19 W y 45.5 °C con un valor de 3.10 g/100 g sotoI b.s., mientras que combinaciones de ambas variables (alta temperatura-baja PU y alta PU-baja temperatura) resultan en altos contenidos de glucosa. Estos cambios son causados por el efecto combinado de la sonicación y la temperatura. La sonicación puede romper los componentes de la pared celular y liberar los azúcares simples de los fructanos como la glucosa bajo ciertas condiciones, como fue reportado por Toma *et al.* (2001) y Pardo-Rueda *et al.* (2015). Incrementos de la temperatura causan un aumento de la solubilidad de la glucosa. Resultados similares fueron reportados por Pardo-Rueda *et al.* (2015) durante la extracción térmica de carbohidratos de sotoI; donde el contenido de glucosa se incrementó en las extracciones realizadas desde 40 °C a 70 °C.

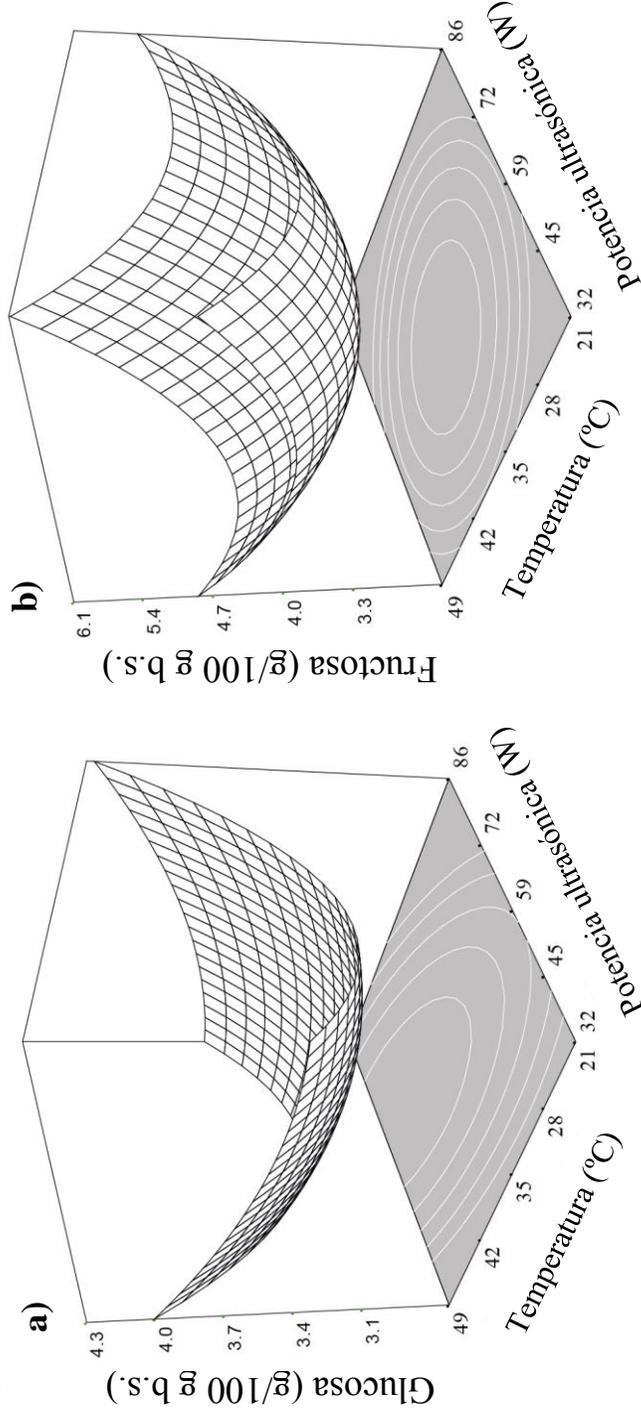


Figura 12. Superficies de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el contenido de glucosa (a) y fructosa (b) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

7.2.8. Contenido de fructosa

La fructosa es la principal unidad estructural de los fructanos, la cual fue significativamente afectada ($P < 0.05$) por los términos cuadráticos de la temperatura y la PU (Tabla 18). El modelo estimó la variabilidad de los datos en un 88.9% y mostró un valor mínimo de fructosa (3.38 g/100 g soto b.s.) a 56.3 W y 36 °C (Fig. 12b). La mayoría de los valores de fructosa obtenidos por el tratamiento de EAU fueron similares ($P > 0.05$) a los obtenidos por el tratamiento térmico (3.94 g/100 g soto b.s.), excepto por los tratamientos realizados a las más altas PU (Tabla 17) los cuales mostraron los mayores contenidos de fructosa ($P < 0.05$). Esto indica que, en ambos tratamientos, se produce cierta hidrólisis de polisacáridos complejos.

De manera similar, la presencia de fructosa en los extractos obtenidos mediante sonicación no solamente indicó la ruptura de la pared celular, como lo describió en Narváez-Flores *et al.* (2015), sino que también causó la ruptura de moléculas de fructanos, liberando azúcares simples como la fructosa y la glucosa. Adicionalmente, este resultado es consistente con los encontrados en la extracción de fructanos (Fig. 11a), en la cual, bajo condiciones similares de PU y temperatura, se obtuvo una liberación mínima de fructosa y un contenido máximo de fructanos.

7.2.9. Perfiles HPAEC-PAD y grado de polimerización promedio (GP_n) de los fructanos

Los extractos de soto analizados por HPAEC-PAD, revelaron de acuerdo con los estándares de los azúcares individuales y de inulina de achicoria (Fig. 13c), que en los tratamientos de la Fig. 13a-d, y el tratamiento de la extracción térmica tradicional (Fig. 13e- f) se identificaron los fructooligosacáridos 1-kestosa (GP3), 1,1-kestotetraosa (GP4) y (1,1,1-kestopentaosa) (GP5) (estándar con mayor GP utilizado en este estudio). De la misma manera, se pudieron observar picos posteriores, lo que indica la presencia de GPs mayores de 5 unidades de fructosa. La identificación de estos fructooligosacáridos ya ha sido reportada por Alvarado *et al.* (2014) y Chávez-Rodríguez *et al.* (2016) en fructanos secados por aspersión de *A. tequilana*.

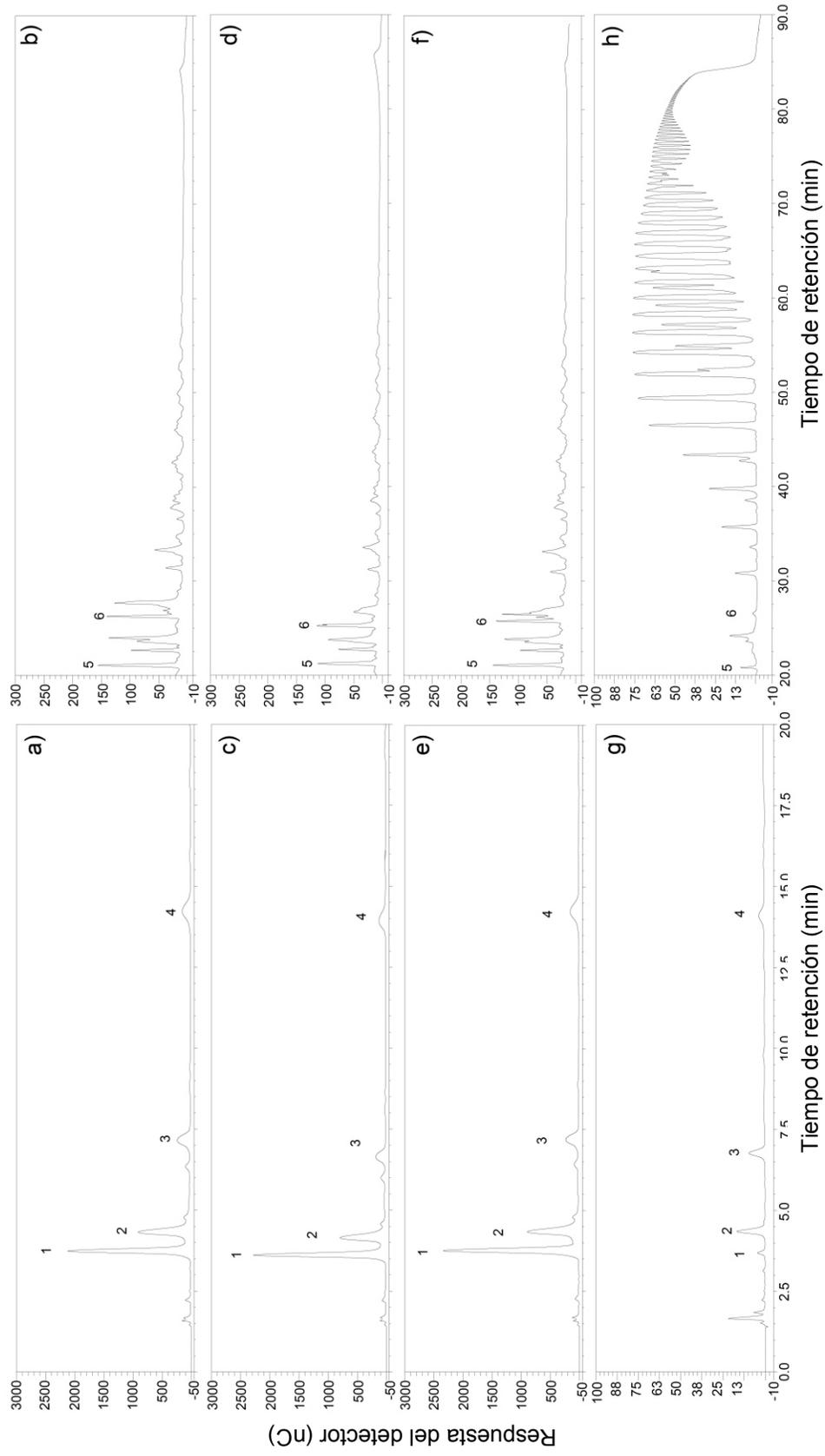


Figura 13. Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de *Dasyliiron wheeleri* extraídas a diferentes potencias ultrasónicas y temperaturas de extracción. (a-b) 32.13 W y 35 °C, (c-d) 85.9 W y 35 °C, (e-f) control sin ultrasonido a 90 °C y (g-h) inulina de achicoria. Los picos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se identificaron por comparación con los estándares de tiempo de retención conocido y corresponden a la glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 1,1-kestotetraosa y 1,1,1-kestopentaosa, respectivamente.

A pesar de la identificación de algunos picos utilizando los estándares para la separación e identificación de fructanos de los extractos de sotol, como se puede ver en la Fig. 13, no se observó una diferencia clara entre los tratamientos sonicados (Fig. 13a-d) y el tratamiento térmico tradicional. Los perfiles de sotol encontrados en todos los tratamientos fueron similares a los reportados por López *et al.* (2003), Mancilla-Margalli y López (2006), Waleckx *et al.* (2008), y Chávez-Rodríguez *et al.* (2016) para *A. tequilana* Weber var. azul. Como se puede observar, estos cromatogramas no fueron tan claros como los obtenidos para la inulina de achicoria (Figura 13g-h). Esto se debe a que la identificación de fructanos con GP largos para *D. wheeleri* en este estudio es difícil; según lo informado por Arrizon *et al.* (2010) y Waleckx *et al.* (2008) en fructanos de *A. tequilana*. Esto es atribuido a que los fructanos de este tipo de plantas existen como una mezcla compleja de neo-fructanos altamente ramificados con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre unidades de fructosa (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006), la cual es más compleja que la serie simple de inulina (serie lineal de enlaces β -(2-1)) de la achicoria. Por esta razón, los GPs los cuales, reflejan el número de unidades estructurales (fructosas) que forman una molécula de fructano se cuantificaron de acuerdo con López-Molina *et al.* (2005) como GP_n , y estos resultados se muestran en la Tabla 17.

Aunque con los perfiles obtenidos por HPAEC-PAD no se observaron diferencias claras entre los tratamientos sonicados y con el tratamiento térmico-tradicional, en la Tabla 17 se observa el efecto de la PU en el GP_n . Esta respuesta fue dependiente tanto del efecto lineal como cuadrático de la PU y la temperatura del efecto cuadrático ($P < 0.05$) (Tabla 18). El modelo de segundo orden se ajustó para explicar la variabilidad de los datos en un 92.13% (Tabla 18). El GP_n de los diferentes extractos mostró valores que fluctuaron entre 4.37 y 10.56, encontrando que a altas PU los GP_n s encontrados fueron menores y significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los tratamientos extraídos a las PU más bajas (32.13 y 40 W). La topografía de la superficie de esta respuesta alcanzó un valor mínimo de 4.18 a 39.3 °C y 70.32 W (Fig. 14). En general, los valores de GP_n encontrados en los extractos obtenidos por sonicación fueron mayores que los obtenidos por extracción térmica tradicional (3.65), con valores altos de GP_n ($P < 0.05$) en los tratamientos EAU con PU más baja (Tabla 17).

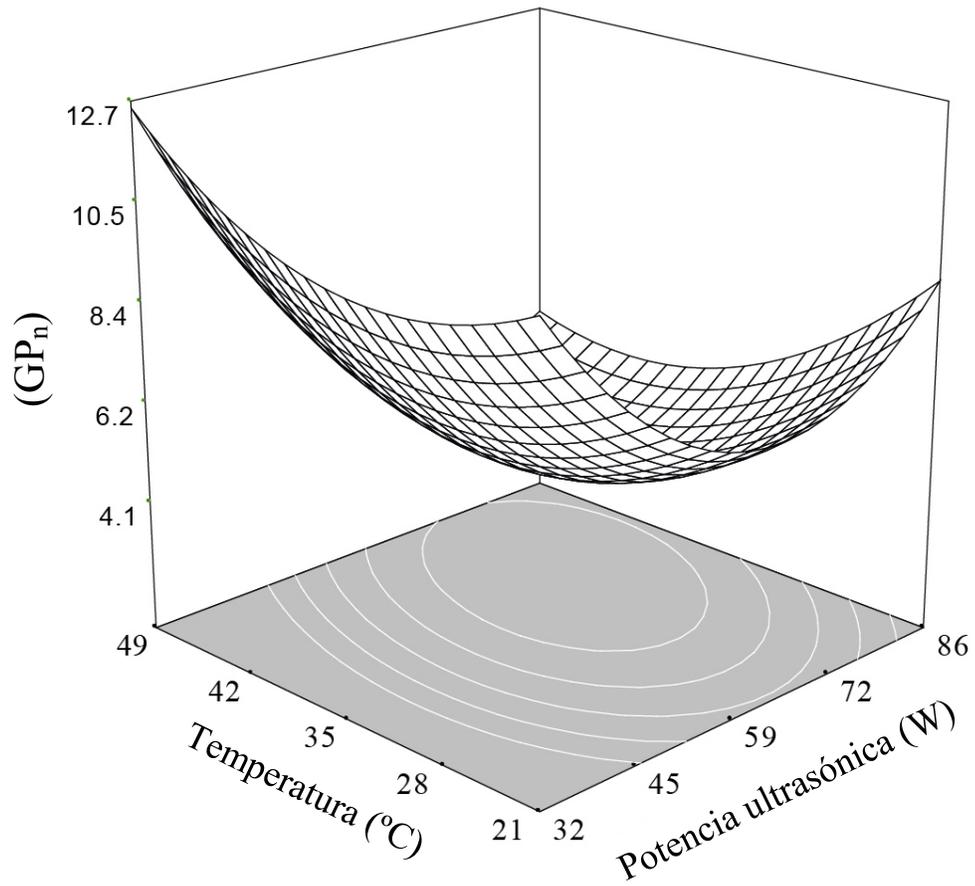


Figura 14. Superficie de respuesta para el efecto de la potencia ultrasónica y la temperatura de extracción sobre el el grado de polimerización promedio (GP_n) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

Estos resultados indican que altas PU provocan la ruptura de las moléculas de fructanos, dando como resultado extractos con bajo GP. Altas PU pueden degradar los fructanos a través del rompimiento del enlace glucosídico tanto en los polisacáridos estructurales y ramificados (Ebringerová y Hromádková, 2010; Pardo-Rueda *et al.*, 2015). Resultados similares han sido reportados por Lingyun *et al.* (2007). El valor más bajo de GP_n (3.65) en el tratamiento térmico tradicional indica una mayor degradación de los fructanos. Por lo tanto, en términos de degradación de fructanos, el proceso de EAU representa un mejor método para la extracción de fructanos a partir de plantas de sotol en comparación con el método tradicional.

7.3. Estudio No. 3

Optimización de la extracción de fructanos asistida con enzimas a partir de plantas de sotol silvestre (*Dasyilirion wheeleri*)

7.3.1. Caracterización de la piña de sotol

El tamaño y dimensiones (diámetro y peso), así como pH, sólidos solubles (°Brix) y composición proximal de la piña de fresca de sotol se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Caracterización física y química de la piña de sotol silvestre (*Dasyilirion wheeleri*).

Propiedades	Sotol fresco
Diámetro (m)	0.35 ± 0.05
Peso (kg)	18.4 ± 0.07
°Brix	2.85 ± 0.07
pH	5.62 ± 0.08
Composición proximal (%)	
Humedad	57.76 ± 0.59
Fibra cruda	6.80 ± 0.23
Cenizas	0.92 ± 0.02
Proteína	0.99 ± 0.08
Grasa	0.55 ± 0.06
Carbohidratos	32.99 ± 0.32

*Media ± desviación estándar.

La composición química fue similar a la reportada por Cruz-Requena *et al.* (2013) para sotol (*D. cedrosanum*), excepto por los contenidos de carbohidratos y humedad. Estas diferencias pueden atribuirse a las diferencias en variedad, edad y condiciones climáticas. Además, la composición mostró similitudes con las reportadas por Montañez-Soto *et al.* (2011), Narváez-Flores *et al.* (2015), y Flores-Girón *et al.* (2016) para *Agave tequilana* Weber var. azul.

7.3.2. Constantes de velocidad enzimática

En general, la producción de AR es un indicador de la extracción enzimática (Gan *et al.*, 2003; Hammed *et al.*, 2013). El contenido de AR mostró un comportamiento exponencial con una tendencia lineal en los primeros minutos de contacto entre el sotol fresco y la solución enzimática, y posteriormente alcanzó un comportamiento asintótico, como se muestra en la Fig. 15 para el tratamiento 2 (150 U/mL de enzima con 8 g/100 mL de sustrato) y tratamiento 5 (0 U/mL de enzima con 16.5 g/100 mL de sustrato).

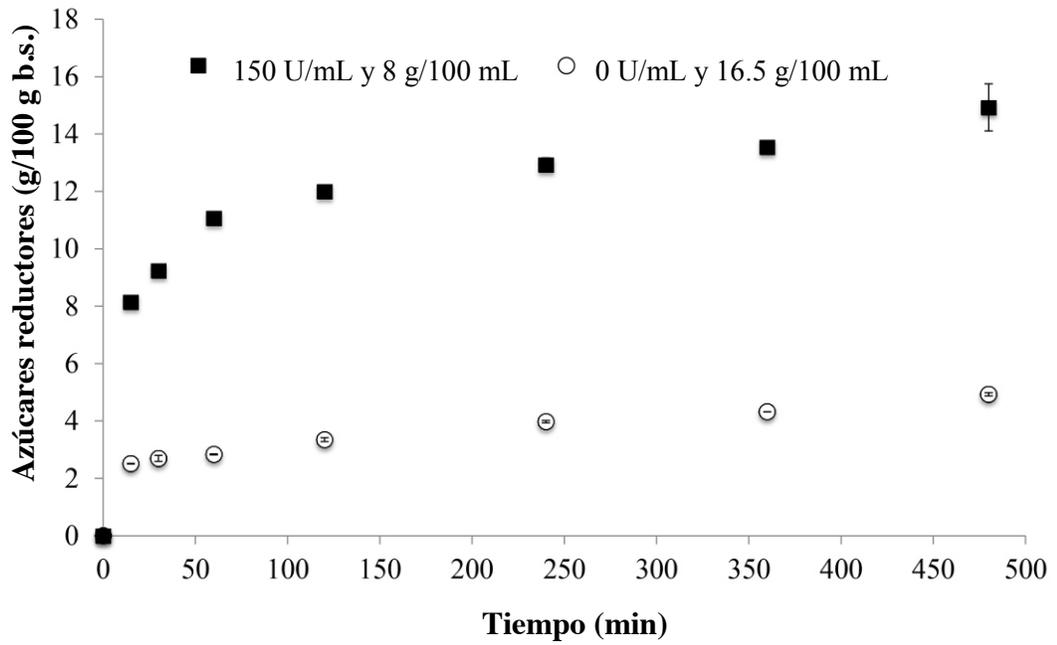


Figura 15. Cinética enzimática de AR liberados *versus* tiempo de extracción. ■ Tratamiento 2 (150 U/mL de enzima con 8 g/100 mL de sustrato). ○ Tratamiento 5 (0 U/mL de enzima con 16.5 g/100 mL de sustrato).

Para una mayor concentración de enzima, se observó una tendencia lineal en AR hasta 90 min, seguida de una estabilización a los 120 min de extracción. Mientras que, en el tratamiento sin enzima, se observa una pobre liberación de AR, con una tendencia lineal alargada sin alcanzar el equilibrio, en comparación con los tratamientos enzimáticos. La liberación de AR en el tratamiento sin enzima se atribuye a los azúcares solubles libres contenidos en el sotol. Ambas cinéticas mostraron efectos contrastantes del tratamiento enzimático sobre los carbohidratos complejos contenidos en las paredes celulares de la planta, causando una mayor liberación de AR al medio de extracción.

7.3.3. Ajuste del modelo

Los resultados obtenidos utilizando diferentes tratamientos de extracción asistida con enzimas para los AR, CT y FRU, así como para las constantes de velocidad enzimática (V_0) y GP_n se muestran en la Tabla 21. Los resultados del análisis de varianza para todas las respuestas se presentan en la Tabla 22 y los coeficientes de regresión obtenidos por el modelo de segundo orden ajustado a los datos experimentales para cada variable de respuesta se encuentran en la Tabla 23. En general, las concentraciones de enzima y sustrato afectaron significativamente ($P < 0.05$) a los AR, FRU y V_0 . El GP_n fue afectado ($P < 0.05$) por la concentración del sustrato, mientras que el contenido de CT no fue significativamente influenciado por las concentraciones de sustrato o enzima. El modelo de segundo orden ajustado explicó satisfactoriamente la variabilidad de los datos para la mayoría de las respuestas analizadas (Tabla 22).

7.3.4. Azúcares reductores

Los azúcares reductores liberados a los extractos es el resultado de la ruptura del enlace glucosídico entre dos unidades de carbohidratos por carbohidrasas, como celulasas, pectinasas y xiloglucanasas, entre otros (Kashyap *et al.*, 2001). Durante la extracción asistida por enzimas, el contenido de AR varió desde 4.93 g/100 g b.s. a 15.89 g/100 g b.s. (Tabla 21). Tanto las concentraciones de enzima como de sustrato afectaron significativamente ($P < 0.05$) la extracción de AR (Tabla 22). El modelo de segundo orden se ajustó adecuadamente, explicando el 94.61% de la variación (Tabla 22).

Tabla 21. Azúcares reductores, glucosa, fructosa, fructanos, carbohidratos totales, constantes de velocidad enzimática, grado de polimerización promedio y contenido de sacarosa de extractos de sotol (*Dasyliroia wheeleri*) obtenidos a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.

Tratamiento	Enzima (U/mL)	Sustrato (g/100 mL)	AR (g/100 g b.s.)	CT (g/100 g b.s.)	FRU (g/100 g b.s.)	V_0 (g AR/100 g b.s./min)	GP _n	Glucosa (g/100 g b.s.)	Fructosa (g/100 g b.s.)	Sacarosa (g/100 g b.s.)
1	25.74	8.0	9.93 ± 0.34	40.34 ± 1.55	37.76 ± 0.87	17.13 ± 1.62	9.38 ± 0.23	3.06 ± 0.12	1.91 ± 0.17	0.25 ± 0.25
2	150.00	8.0	14.93 ± 0.58	41.88 ± 1.49	38.06 ± 0.54	27.56 ± 0.21	9.60 ± 0.08	5.18 ± 0.09	3.22 ± 0.29	0.24 ± 0.24
3	25.74	25.0	9.29 ± 0.18	38.97 ± 2.21	29.54 ± 0.52	15.76 ± 2.51	5.70 ± 0.01	2.05 ± 0.02	1.78 ± 0.04	0.16 ± 0.16
4	150.00	25.0	10.91 ± 0.56	41.06 ± 0.29	29.71 ± 0.30	10.82 ± 0.44	5.87 ± 0.14	3.10 ± 0.02	2.04 ± 0.43	0.29 ± 0.29
5	0.00	16.5	4.93 ± 0.04	40.15 ± 0.08	35.51 ± 2.29	0.00 ± 0.00	6.54 ± 0.01	0.99 ± 0.02	1.66 ± 0.12	0.13 ± 0.13
6	175.73	16.5	14.29 ± 0.72	39.28 ± 0.67	34.13 ± 0.61	22.40 ± 2.36	6.52 ± 0.01	3.98 ± 0.06	2.85 ± 0.07	0.29 ± 0.29
7	87.87	4.48	15.89 ± 0.91	44.32 ± 1.61	39.20 ± 0.02	23.41 ± 1.36	16.18 ± 0.12	4.83 ± 0.08	1.58 ± 0.07	0.25 ± 0.24
8	87.87	28.52	11.45 ± 0.22	42.02 ± 1.13	26.72 ± 0.11	13.36 ± 0.87	5.48 ± 0.01	2.47 ± 0.03	2.37 ± 0.14	0.49 ± 0.49
9	87.87	16.5	10.45 ± 0.22	43.00 ± 0.97	36.95 ± 0.42	13.98 ± 0.12	6.51 ± 0.01	3.38 ± 0.02	2.30 ± 0.05	0.71 ± 0.71
10	87.87	16.5	11.27 ± 0.17	40.00 ± 1.20	36.76 ± 0.28	15.84 ± 0.59	7.05 ± 0.03	3.31 ± 0.01	2.29 ± 0.05	0.61 ± 0.61
11	87.87	16.5	11.28 ± 0.22	40.91 ± 1.19	36.64 ± 0.09	17.11 ± 2.33	6.59 ± 0.09	3.44 ± 0.02	2.33 ± 0.01	0.57 ± 0.56
12	87.87	16.5	11.40 ± 0.22	39.43 ± 0.32	35.32 ± 0.63	14.75 ± 0.73	6.48 ± 0.01	3.37 ± 0.04	2.43 ± 0.17	0.44 ± 0.44
13	87.87	16.5	11.72 ± 0.04	45.38 ± 0.01	37.28 ± 0.66	21.24 ± 0.71	6.78 ± 0.01	3.09 ± 0.03	2.16 ± 0.02	0.36 ± 0.26

*Los valores presentados son el promedio de las mediciones por triplicado. CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; V_0 , constante de velocidad enzimática; GP_n, grado promedio de polimerización.

Tabla 22. Análisis de varianza del contenido de azúcares reductores, glucosa, fructosa, fructanos, carbohidratos totales, constante de velocidad enzimática, grado promedio de polimerización y contenido de sacarosa de los extractos de *Dasyliirion wheeleri* obtenidos a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.

Fuente	Cuadrados medios									
	GL	AR	CT	FRU	V_0	GP _n	Glucosa	Fructosa	Sucrosa	
Modelo	5	16.23*	3.63	34.77*	82.84*	17.73*	2.73*	0.35	0.058*	
A-Enzima	1	42.52*	0.71	0.27	172.69*	0.019	6.82*	1.32*	0.016	
B-Sustrato	1	14.96*	3.71	146.34*	130.60*	63.52*	5.16*	4.469×10 ⁻³	0.011	
AB	1	2.86	0.078	5.0×10 ⁻³	59.06	6.25×10 ⁻⁴	0.29	0.28	5.391×10 ⁻³	
A ²	1	8.24*	10.59	5.96*	26.07	0.77	0.83*	5.144×10 ⁻⁴	0.22*	
B ²	1	9.88*	1.69	23.94*	19.09	22.84*	0.39*	0.12	0.066	
Residual	7	0.66	4.07	0.47	19.80	1.41	0.054	0.12	0.014	
Falta de ajuste	3	1.25	1.54	0.30	35.31	3.22*	0.10	0.26	8.137×10 ⁻³	
Error puro	4	0.22	5.97	0.60	8.16	0.056	0.019	9.413×10 ⁻³	0.019	
R ²		0.9461	0.3887	0.9814	0.7493	0.8996	0.9730	0.6822	0.7416	

*Significancia a $P < 0.05$. CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; V_0 , constante de velocidad enzimática; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 23. Coeficientes de regresión del modelo de segundo orden ajustado para las diferentes variables de respuesta relacionando las variables (concentración de enzima y sustrato) para extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Coeficientes	Cuadrados medios									
	AR	CT	FRU	V_0	GP _n	Glucosa	Fructosa	Sacarosa		
b_0	11.22	41.74	36.61	16.58	6.68	3.32	2.30	0.54		
b_1	2.31*	0.30	-0.18	4.65*	0.049	0.92*	0.41*	0.045		
b_2	-1.37*	-0.68	-4.28*	-4.04*	-2.82*	-0.80*	-0.024	0.37*		
b_{12}	-0.84	0.14	-0.036	-3.84	-0.012	-0.27	-0.26	0.037		
b_{11}	-1.09*	-1.23	-0.93*	-1.94	-0.33	-0.35*	8.599 × 10 ⁻³	-0.18*		
b_{22}	1.19*	0.49	-1.86*	1.66	1.81*	0.24*	-0.13	-0.097		

*Significancia a $P < 0.05$. CT, carbohidratos totales; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; V_0 , constante de velocidad enzimática; GP_n, grado de polimerización promedio.

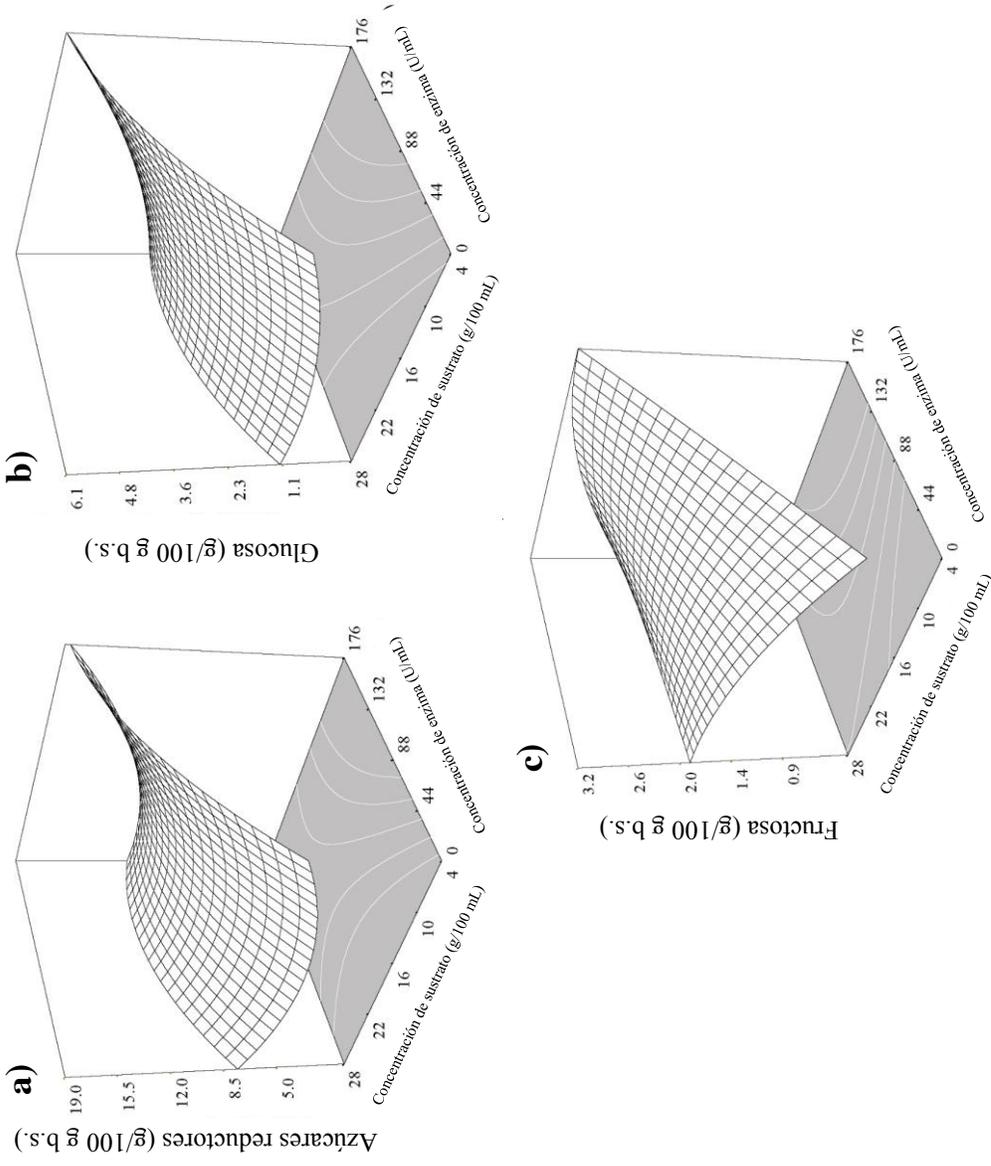


Figura 16. Superficie de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de azúcares reductores (a), glucosa (b) y fructosa (c) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

La topografía de punto silla se muestra en la Fig. 16a, donde se observa un fuerte efecto de la concentración de enzima. A altas concentraciones de enzima, la extracción de AR se incrementó. Los AR alcanzaron valores altos a bajas concentraciones de sustrato cuando la concentración de enzima fue mayor de 87.87 U/mL. Resultados similares han sido reportados por Fan *et al.* (2015), Liu *et al.* (2014), y Xu *et al.* (2015) para sistemas enzimáticos similares, es decir, encontraron una alta extracción de polisacáridos a altas concentraciones de enzima. Las tendencias de AR observadas son consistentes con las encontradas para los azúcares individuales, como la glucosa (Fig. 16b) y la fructosa (Fig. 16c); debido a su efecto reductor, están relacionados con esta respuesta.

7.3.5. Carbohidratos totales

Los CT obtenidos de los diferentes extractos no se correlacionaron significativamente ($P > 0.05$) con la concentración de enzima y con la cantidad de sotol en el medio. El modelo ajustado de segundo orden no predijo adecuadamente la extracción CT ($R^2 = 0.388$). La Fig. 17 resume el efecto de las concentraciones de enzima y sustrato sobre los CT de los extractos de sotol. A concentraciones intermedias de enzimas, se observaron valores altos de CT, e incrementos o disminuciones en las concentraciones de enzima resultaron en disminuciones de la concentración de CT. Esta tendencia en CT no mostró un efecto claro con respecto a la actividad enzimática, ya que los CT se pueden liberar de diferentes fuentes (celulosa, pectinas, hemicelulosa y fructanos) debido a la heterogeneidad del sistema de extracción (Gan *et al.*, 2003). Otro factor que pudo influir en la liberación de CT es la alta solubilidad de los azúcares, esto debido a que las moléculas de carbohidratos tienen un alto carácter hidrófilo, debido a los fuertes y altamente localizados puentes de hidrógeno presentados por los sistemas agua-carbohidratos (Cardoso *et al.*, 2012); lo cual pudo minimizar el efecto de la actividad enzimática de esta respuesta en los diferentes tratamientos. Los CT obtenidos en este estudio en todos los tratamientos (Tabla 21) fueron mayores que los reportados por Pardo-Rueda *et al.* (2015) (36.35 g/100 g b.s.) quienes realizaron una extracción enzimática con Pectinex-Ultra SP-L a 40 °C de plantas de sotol (*Dasyilirion leophyllum*).

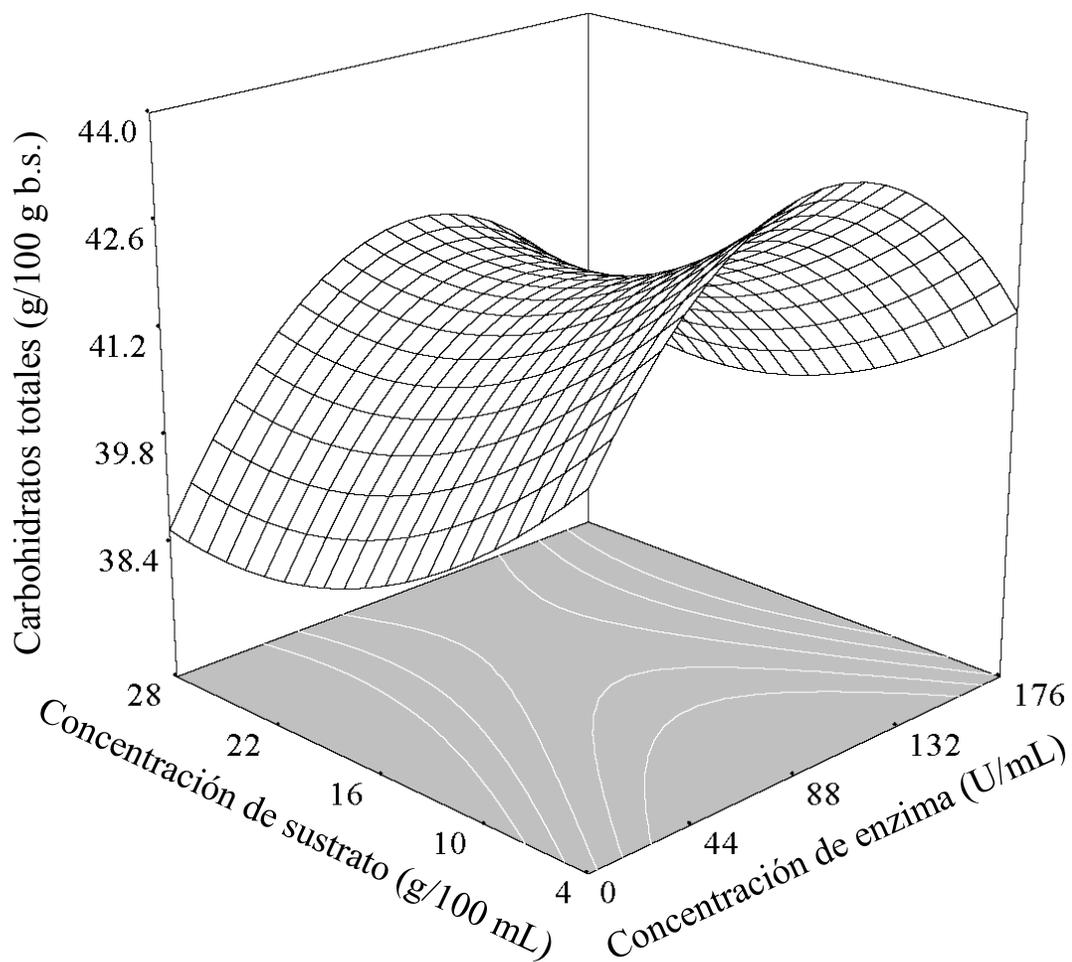


Figura 17. Superficie de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de carbohidratos totales de los extractos de *Dasyilirion wheeleri*.

7.3.6. Contenido de fructanos totales (FRU)

El análisis de varianza (Tabla 22) mostró un efecto cuadrático significativo de la concentración de enzima y efectos lineales y cuadráticos significativos de la concentración de sustrato ($P < 0.05$) en la extracción de FRU. El modelo de segundo orden predijo adecuadamente la variabilidad de los datos (98.1%). La Fig. 18a muestra la topografía con un valor máximo (39.08 g/100 g) a concentraciones de enzima de 83.04 U/mL con 6.70 g/100 mL de sustrato. A concentraciones bajas de sustrato (cantidad de sotol) con concentraciones intermedias de enzimas, el contenido de FRU tendió a aumentar, hasta alcanzar los niveles máximos de FRU. Incrementos adicionales en la concentración de enzima dieron como resultado una disminución del contenido de FRU. Tendencias similares fueron reportadas por Liu *et al.* (2014) y Xu *et al.* (2015) durante la extracción asistida por enzimas de polisacáridos de *Lycium barbarum* y grosella negra (*Ribes nigrum* L.), respectivamente, en los que una concentración de enzima que excede el óptimo provocó una disminución en el rendimiento de extracción. Por otro lado, Pardo-Rueda *et al.* (2015) reportaron un menor contenido de FRU (29.55 g/100 g b.s.) extraído de la planta de sotol mediante un tratamiento pre-enzimático con Pectinex Ultra SP-L a 40 °C, que el obtenido en este estudio para la mayoría de los tratamientos (Tabla 21).

7.3.7. Constante de velocidad enzimática (V_0)

La Tabla 22 muestra que las concentraciones de enzima y sustrato afectaron significativamente ($P < 0.05$) la V_0 . El comportamiento de la V_0 fue descrito satisfactoriamente por el modelo ajustado de segundo orden (74.9%). Una topografía de punto silla con una solución en un punto crítico de 87.63 U/mL de enzima con 26.81 g/100 mL de sotol para obtener una V_0 de 14.2 g/100 g b.s./min se observa en la Fig. 18b. Además, se demostró que, a bajas concentraciones de sustrato y altas concentraciones de enzimas, se obtuvieron altos valores de V_0 . Esta tendencia fue similar a la obtenida para AR (Fig. 16a), glucosa (Fig. 16b) y fructosa (Fig. 16c) en los extractos resultantes de la acción enzimática. Gan *et al.* (2003) reportaron tendencias similares durante la simulación de un modelo de hidrólisis de celulosa, encontrando que al aumentar la concentración de la enzima la velocidad de reacción inicial fue más rápida, así como la productividad de azúcar y la velocidad de conversión del sustrato fueron más altas.

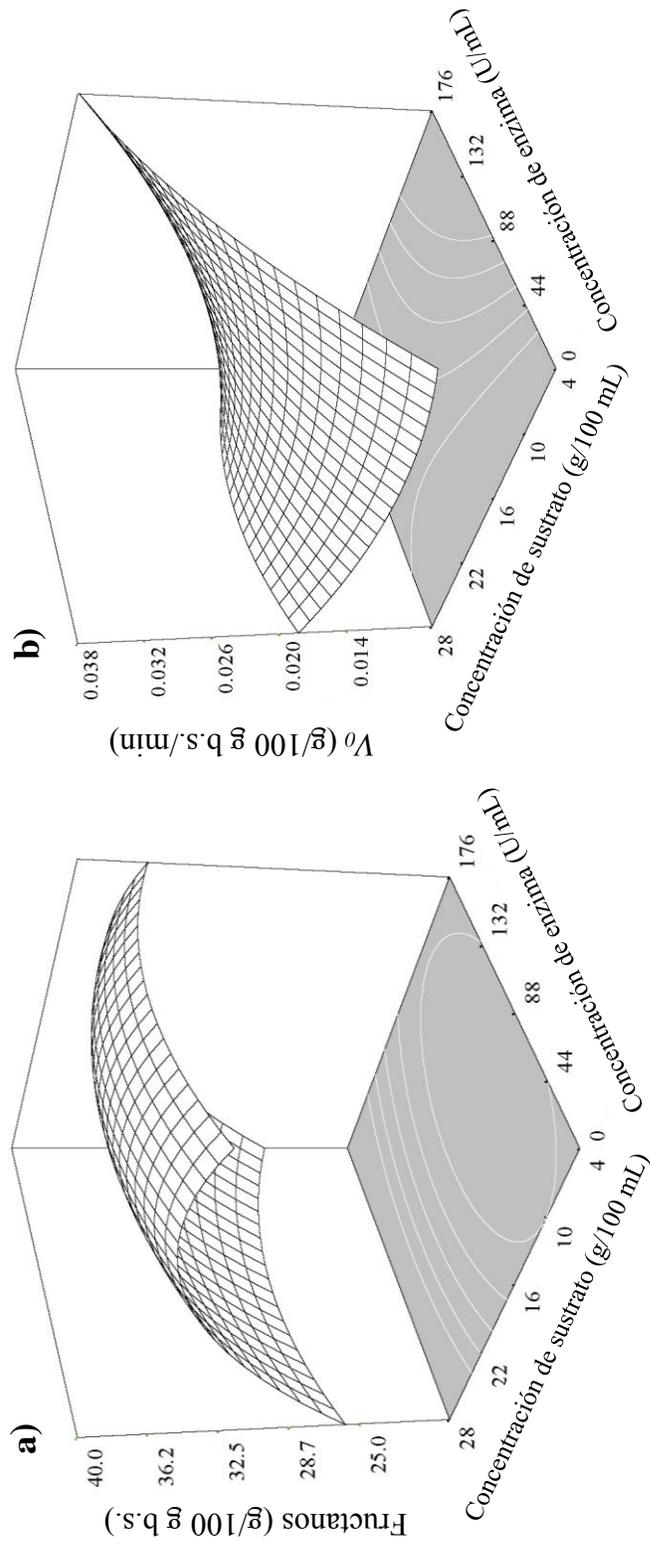


Figura 18. Superficies de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el contenido de fructanos (a) y la constante de velocidad enzimática (b) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

Los valores bajos de V_0 a una alta concentración de sustrato se pueden atribuir a un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática, como se describió anteriormente (Whitaker *et al.*, 2003), disminuyendo la velocidad de liberación del producto.

7.3.8. Perfiles de azúcares individuales y grados de polimerización (GP_n)

Los análisis de los azúcares individuales de algunos extractos se muestran en la Fig. 19 para estándares comerciales con diferentes grados de polimerización, como glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa (GP 3), nistosa (1,1-kestotetraosa) (GP 4) y 1,1,1-kestopentaosa (GP 5) (a), para el estándar de inulina de achicoria (b), y una muestra del tratamiento 1 (25.74 U/mL de enzima y 8 g/100 mL sustrato) (d), donde los picos corresponden a los azúcares individuales de cada tratamiento identificados de acuerdo con los estándares. Además, la Fig. 19 muestra el estándar de achicoria (c) desde el GP 4 y el cromatograma del tratamiento 1 (e), en el cual se identificó la 1,1,1-kestopentaosa (GP 5). Del mismo modo, se pudieron observar picos posteriores, indicando la presencia de GPs con más de 5 unidades de fructosa. El tratamiento enzimático (T6) condujo a incrementos en el contenido de glucosa y fructosa (Fig. 20c), con picos más grandes que el tratamiento 5 (Fig. 20a), además del pico identificado como el fructooligosacárido (FOS) 1,1,1-kestopentaosa de GP 5 aumentó claramente (Fig. 20d) en comparación con el tratamiento 5 (Fig. 20b), el cual contenía la misma cantidad de sustrato, pero no contenía la enzima. De acuerdo con Hammed *et al.* (2013) el uso de enzimas resultará en oligosacáridos de diferentes tamaños moleculares debido a la segmentación de polisacáridos con la suposición de que siempre se producirán azúcares. A pesar de la identificación de algunos picos utilizando los estándares para la separación e identificación de fructanos de los extractos de sotol en este estudio, los resultados no fueron tan claros como los obtenidos para la inulina de achicoria (Fig. 19a). Esto es probablemente debido a que la estructura compleja de los extractos de sotol no permite la cuantificación precisa de los GPs usando este procedimiento. Así, los fructanos con altos valores de GP para sotol en este estudio, así como aquellos encontrados en extractos de agave por López *et al.*, (2003) y Mancilla-Margalli y López (2006), existen como una mezcla compleja de neofructanos altamente ramificados con enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre las unidades de fructosa, y esto es más complejo que las series de inulina simple (serie lineal con enlaces β -(2-1)) de la achicoria.

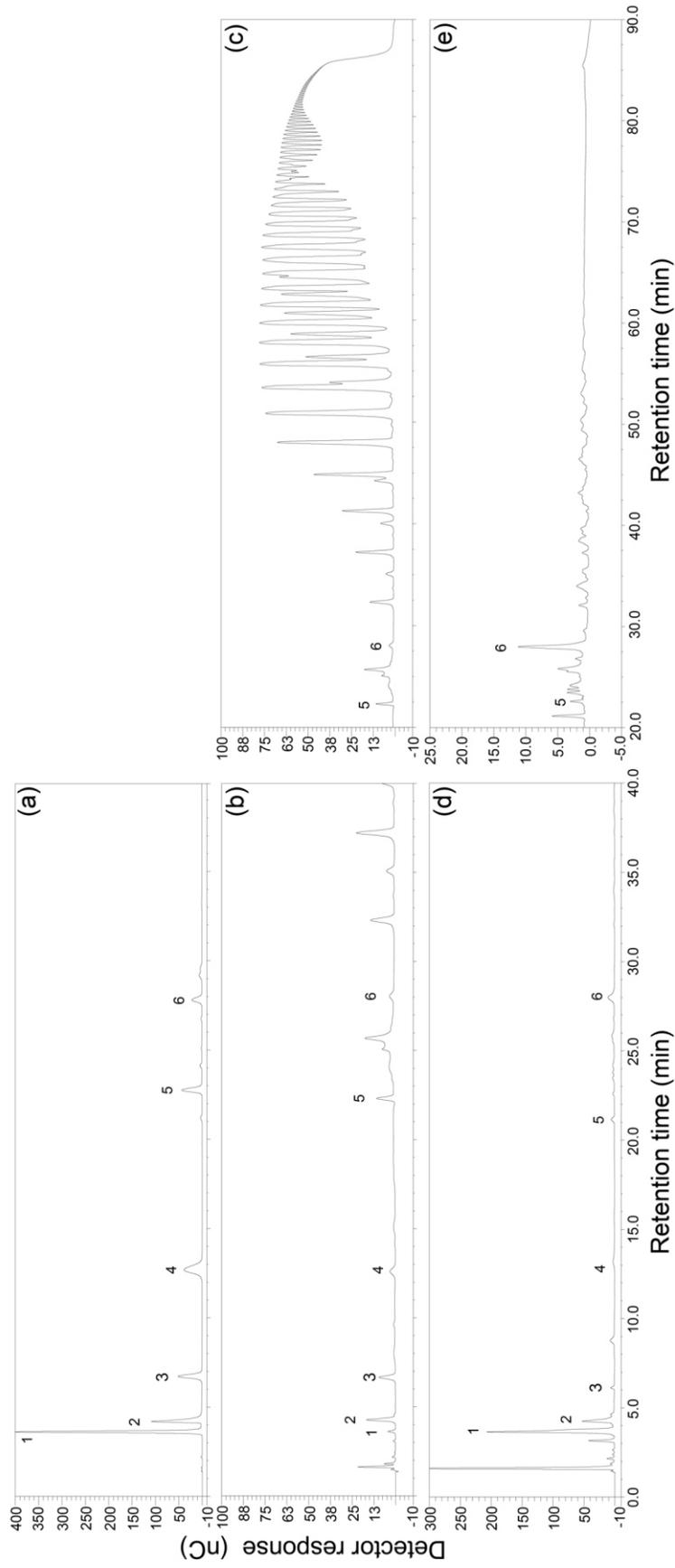


Figura 19. Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de *Dasylium wheeleri* extraídas a diferentes concentraciones de enzima y sustrato. (a) Estándares comerciales de glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 1,1-kestotetraosa y 1,1,1-kestopentaosa; correspondientes a los picos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, (b-c) inulina de achicoria, y (d-e) extracto de sotol del tratamiento 1 (25.74 U/mL de enzima y 8 g/100 mL de sustrato).

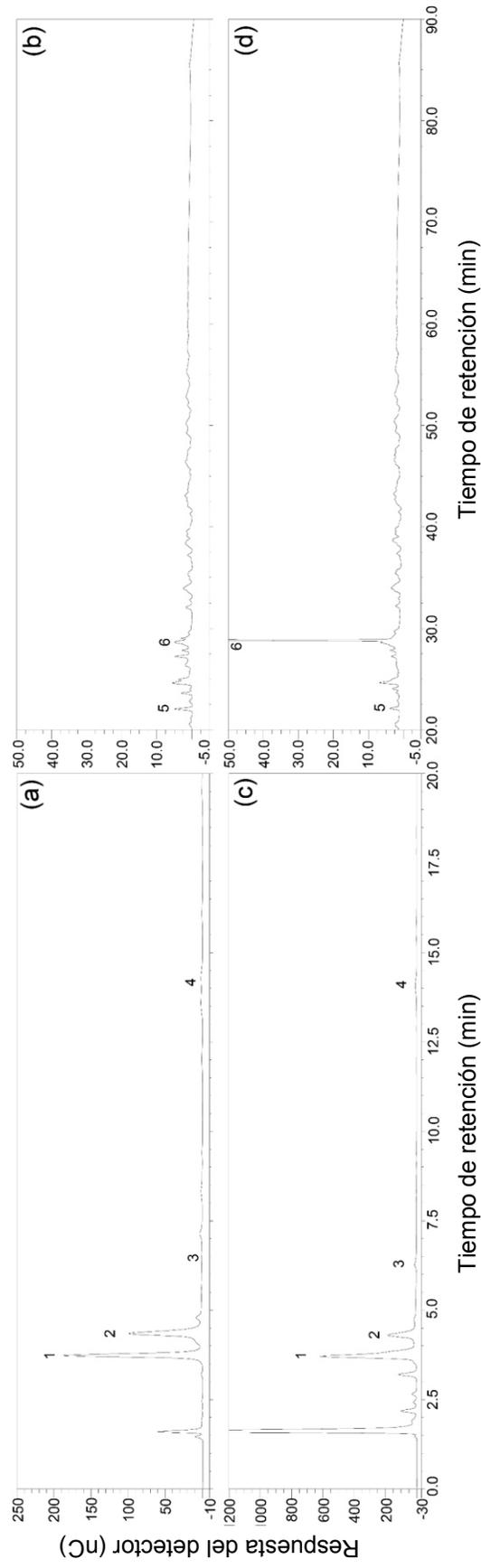


Figura 20. Perfil HPAEC-PAD de fructanos obtenidos a partir de plantas de *Dasylium wheeleri* extraídas a diferentes concentraciones de enzima y sustrato. (a-b) Tratamiento 5 (0 U/mL de enzima con 16.5 g/100 mL de sustrato) y (c-d) tratamiento 6 (175.73 U/mL de enzima con 16.5 g/100 mL de sustrato).

Por esta razón, los GPs se cuantificaron de acuerdo con López-Molina *et al.* (2005) como GP_n , y estos resultados se muestran en la Tabla 21. El GP_n se vio significativamente afectado por la concentración del sustrato en sus efectos lineales y cuadráticos ($P < 0.05$). El modelo de segundo orden explicó satisfactoriamente la variabilidad de los datos (89.9%) (Tabla 22), mostrando una topografía de punto de silla con una solución en un punto crítico de 5.58 GP_n a una concentración de enzima de 90.87 U/mL con 23.09 g/100 mL de sotol en el medio de extracción (Fig. 21a). A medida que la concentración de sustrato se incrementó, el GP_n disminuyó, y esto se atribuyó a un aumento gradual del contenido de sacarosa (Fig. 21b) debido a la actividad de la enzima fructosiltransferasa (contenida en Pectinex Ultra SP-L); esto pudo contribuir a la formación de FOS de bajos GPs (Ghazi *et al.*, 2005; 2007; Tanriseven y Aslan, 2005). Adicionalmente, se observaron valores máximos de sacarosa a concentraciones intermedias de enzima y sustrato, como se muestra en la Fig. 21b, dando como resultado valores de GP_n de 5.5 (Fig. 21a). Resultados similares han sido reportados, reflejando la actividad de la fructosiltransferasa en presencia de sacarosa (Ghazi *et al.*, 2005; 2007; Montilla *et al.*, 2011; Tanriseven y Aslan, 2005). Además, la tendencia del GP_n a aumentar se observó a concentraciones intermedias de enzima (81-87 U/mL) con concentraciones de sustrato de sotol inferiores a 16 g/100 mL, donde la liberación de fructanos es máxima (Fig. 18a) como resultado de la actividad enzimática a nivel de pared celular, lo que favorece la extracción de fructanos con altos GPs. Los resultados de GP_n fueron similares a los reportados para *A. tequilana* por Montañez-Soto *et al.* (2011) para FOS y por Waleckx *et al.* (2008) para fructanos.

7.3.9. Optimización del proceso de extracción enzimática

Utilizando un análisis canónico (Myers, 1971), se localizaron puntos estacionarios para las respuestas AR, CT, FRU, V_0 , GP_n , glucosa, fructosa y sacarosa. Las respuestas importantes con respecto a la calidad fueron FRU y GP_n con bajos contenidos de azúcares reductores individuales. Usando las técnicas gráficas de optimización de múltiples respuestas (Gómez-Moriel *et al.*, 2012; Quintero-Ramos *et al.*, 2002), se agruparon los valores estacionarios para seleccionar un óptimo general para el proceso. En esta optimización gráfica, se identificaron las condiciones necesarias para obtener los valores más altos de fructanos con GP_n en el rango de 8-10 y bajos contenidos

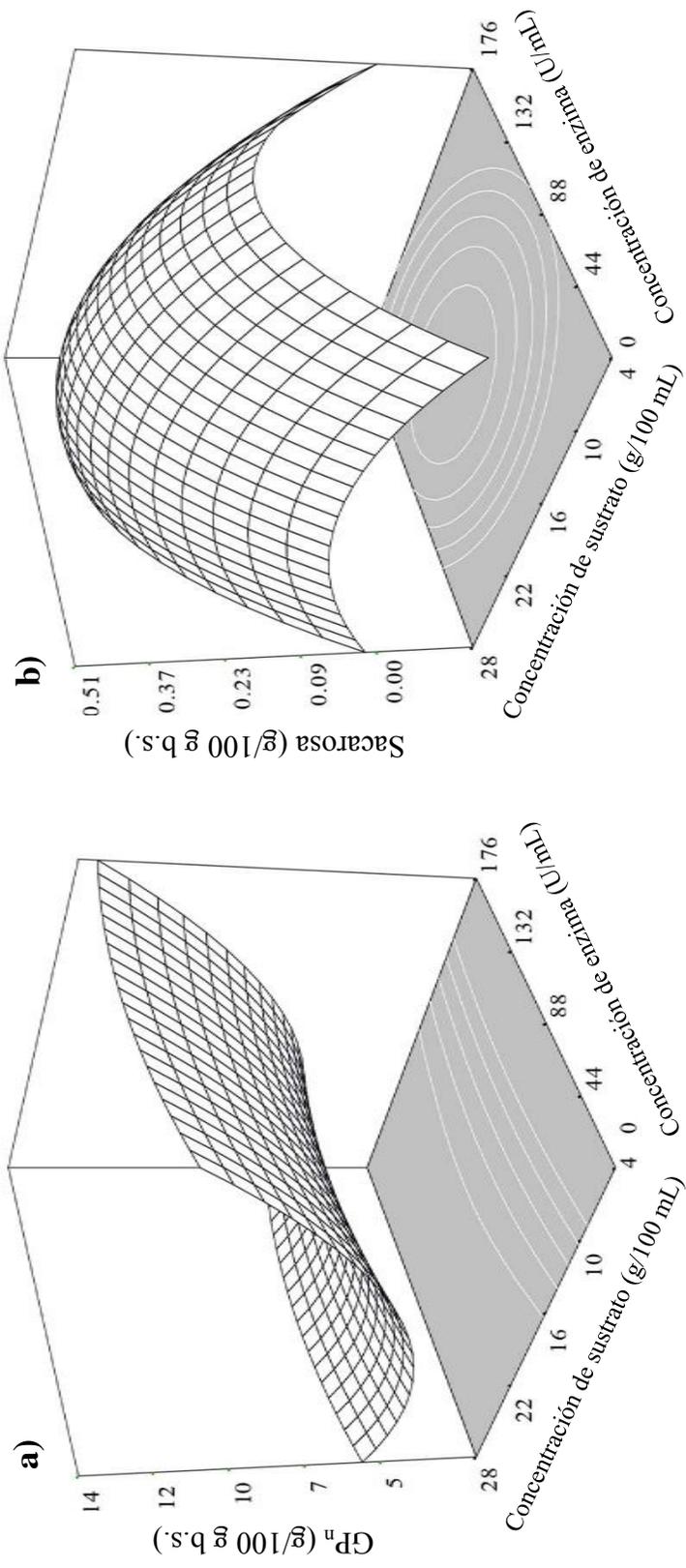


Figura 21. Superficies de respuesta para los efectos de las concentraciones de enzima y sustrato sobre el grado de polimerización promedio (a) y el contenido de sacarosa (b) de los extractos de *Dasyliirion wheeleri*.

de fructosa. La condición óptima, basada en el procedimiento gráfico, se basó en la región que satisface este criterio de optimalidad. La superposición de los diagramas de contorno para el contenido de fructanos, GP_n y contenido de fructosa se utilizó para determinar la región óptima, indicada por el área sombreada en la Fig. 22. Las condiciones óptimas fueron 11.6-45.6 U/mL de enzima con cantidades de sotol de 9.15 a 12.56 g/100 mL, resultando en 7.8-10.6 g/100 g b.s. para el contenido de AR, CT de 37.15-39.01 g/100 g b.s., fructanos de 37.58-38.58 g/100 g b.s., GP_n de 8-10, glucosa de 2.2-3.19 g/100 g b.s., fructosa de 1.80-1.81 g/100 g b.s. y 0.17-0.33 g/100 g de sacarosa.

7.3.10. Verificación

Las condiciones óptimas identificadas se verificaron realizando dos experimentos independientes. Estos experimentos se realizaron con una piña diferente de sotol silvestre, esto para observar la variabilidad del modelo en la extracción de carbohidratos con plantas de diferentes características. Por esta razón, se probaron dos combinaciones de sustrato y enzima dentro de la región óptima. La Tabla 24 muestra los valores experimentales obtenidos y los valores estimados por el modelo para el proceso de optimización. Los valores experimentales y predichos para la mayoría de las respuestas son razonablemente cercanos. Sin embargo, algunas respuestas como AR, FRU y GP_n presentaron una baja concordancia (Tabla 24). Esto puede deberse al hecho de que los tratamientos de verificación se realizaron con una piña de sotol más joven (6-6.5 años), causando una mayor variabilidad entre los valores experimentales y estimados, lo que incrementó el error relativo. En algunos reportes, se ha demostrado que, en plantas como el Agave, el contenido de carbohidratos cambia con la edad, con un mayor contenido de AR en plantas más jóvenes, que disminuye a medida que aumenta la edad (Mellado-Mojica y López, 2012; Sánchez-Madriral *et al.*, 2017a). Sin embargo, con el contenido de fructanos y el grado de polimerización ocurre lo contrario, el cual es mayor en las plantas de mayor edad (Arrizon *et al.*, 2010; Mellado-Mojica y López, 2012; Sánchez-Madriral *et al.*, 2017a). También se puede observar con las dos combinaciones probadas, que los valores estimados presentaron la misma tendencia que los datos experimentales obtenidos, siendo más altos en todas las respuestas con un GP_n menor en la combinación de 11 g/100 mL de sotol con 30 U/mL de enzima que la de 10 g/100 mL con 20 U/mL (Tabla 24).

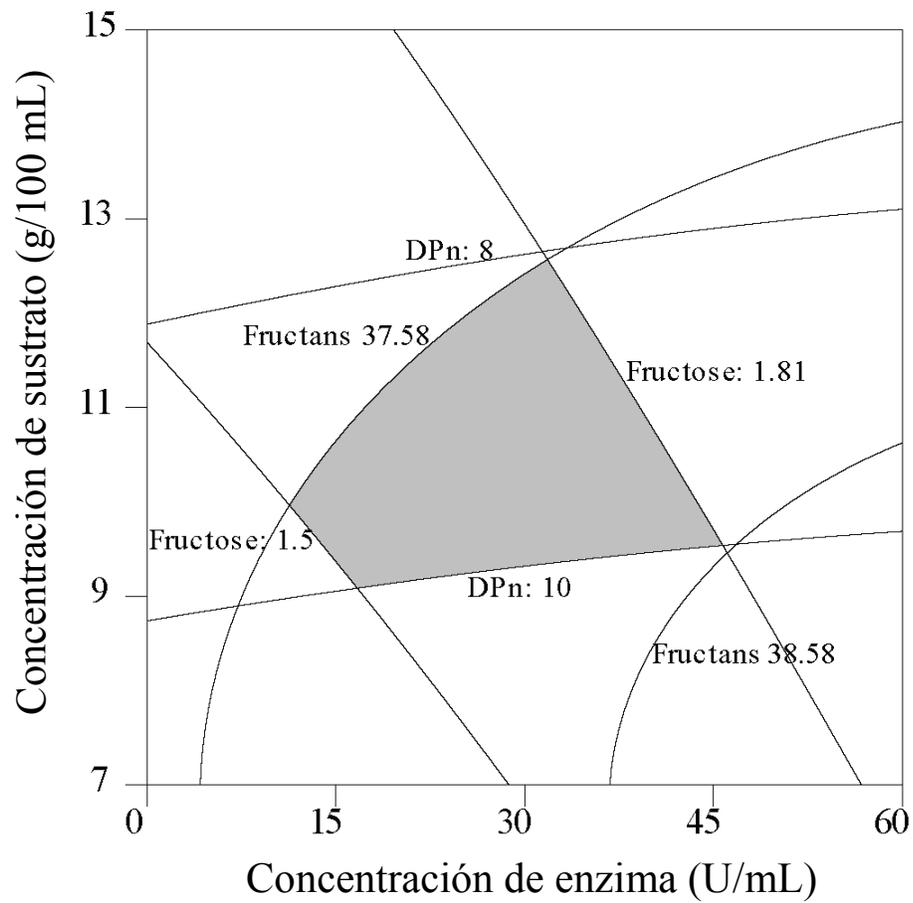


Figura 22. Región optimizada obtenida para los diagramas de contorno de las características químicas de los extractos de *Dasyliirion wheeleri* obtenidos por extracción enzimática (AR, CT, FRU, V_0 , GP_n , y contenido de glucosa, fructosa y sacarosa).

Tabla 24. Valores experimentales y estimados de las variables de respuesta

Variables de respuesta	Verificación 1 ^a			Verificación 2 ^b		
	Experimental	Estimado	% Error	Experimental	Estimado	% Error
Azúcares reductores (AR)	12.84 ± 0.05	8.43	52.38	13.08 ± 0.12	9.00	45.42
Carbohidratos totales (CT)	38.56 ± 1.68	37.71	2.27	40.45 ± 2.06	38.28	5.68
Fructanos totales (FRU)	13.89 ± 0.11	15.99	13.07	14.31 ± 0.16	16.03	10.72
GP _n	8.08 ± 0.05	9.40	14.03	7.68 ± 0.07	8.91	13.71
Glucosa	2.83 ± 0.01	2.42	17.22	2.85 ± 0.07	2.61	9.47
Fructosa	1.54 ± 0.08	1.58	2.00	1.78 ± 0.08	1.72	3.57
Sacarosa	0.21 ± 0.01	0.21	0.09	0.25 ± 0.01	0.28	10.03

*Los valores presentados son el promedio de las mediciones por triplicado. GP_n, grado de polimerización promedio.

^aSustrato: 10 g/100 mL y enzima: 20 U/mL.

^bSustrato: 11 g/100 mL y enzima: 30 U/mL.

7.4. Estudio No. 4

Extracción enzimática de fructanos de plantas de sotol silvestre (*Dasyilirion wheeleri*): Proceso de optimización usando la metodología de la superficie de respuesta

7.4.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de sotol

En la Tabla 25 se muestran los valores promedios del diámetro, peso, pH y °Brix de las dos piñas frescas de sotol silvestre; asimismo se muestra la composición proximal promedio tanto de las piñas frescas como deshidratadas.

Tabla 25. Propiedades fisicoquímicas de las plantas de *Dasyilirion wheeleri* silvestre.

Propiedades*	Sotol fresco	Sotol deshidratado
Diámetro (m)	1.142 ± 0.025	----
Peso (kg)	20.66 ± 1.555	----
°Brix	2.76 ± 0.254	----
pH	5.14 ± 0.508	----
Composición proximal (%)*		
Humedad	56.46 ± 1.16	7.11 ± 0.03
Fibra cruda	7.57 ± 1.64	11.12 ± 0.04
Cenizas	1.91 ± 0.22	3.43 ± 0.44
Proteína	1.59 ± 0.19	3.60 ± 0.14
Grasa	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.04
Carbohidratos	31.97 ± 0.91	74.23 ± 0.51

*Las medias ± desviación estándar pertenecen a dos piñas de sotol.

Respecto a la composición proximal encontrada en ambas piñas de sotol fue similar a otros estudios realizados con sotol; Cruz-Requena *et al.* (2013) quienes trabajaron con sotol (*D. cedrosanum*) reportaron contenidos similares de cenizas, grasa, fibra cruda y proteína, siendo un tanto diferentes en el contenido de humedad y carbohidratos pudiendo atribuirse a las diferencias en variedad, edad y condiciones climáticas. Asimismo, fueron similares tanto las propiedades físicas como químicas a lo reportado por Sánchez-Madrugal *et al.* (2018) en sotol de la misma especie (*Dasyilirion wheeleri*) y de la misma zona de cultivo. En comparación con algunas agavaceas el contenido proximal así como las propiedades físicas también fueron similares a lo reportado por Montañez-Soto *et al.*

(2011), Narváez-Flores *et al.* (2015), Flores-Girón *et al.* (2016) y Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017a para *Agave tequilana* Weber var. azul.

7.4.2. Análisis de los experimentos de factores simples de la extracción de polisacáridos de sotol asistida con enzimas

Los efectos de la relación líquido-sólido, tiempo, pH, temperatura y la concentración de cada enzima se estudiaron primeramente mediante un diseño de factores individuales de la siguiente manera: un factor se modificó mientras que los otros factores se mantuvieron constantes en cada experimento. El efecto de cada factor se evaluó determinando el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP).

7.4.2.1. Determinación de la relación líquido-sólido

La relación líquido-sólido para cada enzima se determinó colocando diferentes cantidades de sotol en el medio de extracción para mantener la misma concentración de enzima en todos los tratamientos. En la Figura 23 se observan los resultados obtenidos para una enzima ya que se obtuvo el mismo comportamiento para todas las enzimas.

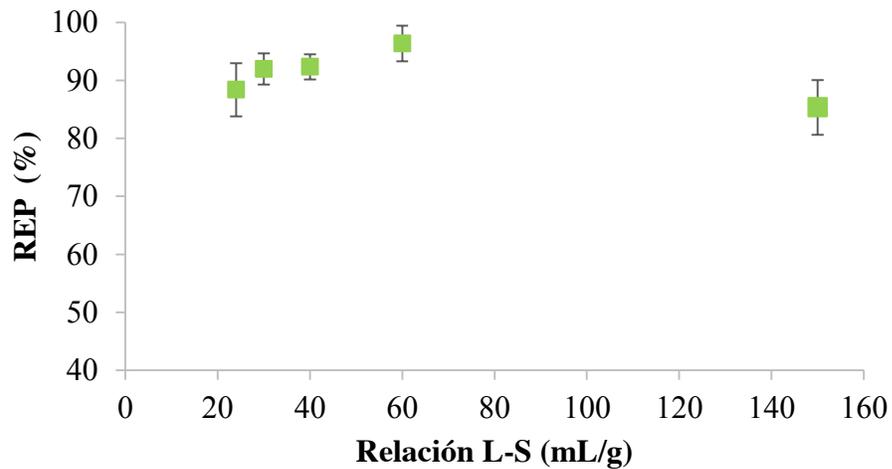


Figura 23. Rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol a diferentes relaciones líquido-sólido.

El mejor rendimiento de extracción de polisacáridos (REP) fue obtenido a relación líquido-sólido de 60 mL/g, el cual fue elegido para continuar estudiando los demás factores de extracción.

7.4.2.2. Determinación del tiempo de extracción

El tiempo de extracción es un parámetro importante que puede influenciar la eficiencia de extracción (Wang *et al.*, 2013). Varios estudios han demostrado que largos tiempos de extracción favorecen el rendimiento de extracción (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, un excesivo alargamiento del tiempo de extracción puede inducir a cambios en la estructura de la molécula del polisacárido (Cai *et al.*, 2008). En las Figuras 24 y 25 se observan las cinéticas de extracción de azúcares reductores y del rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), respectivamente; de cada enzima (celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa) así como de un tratamiento sin enzima.

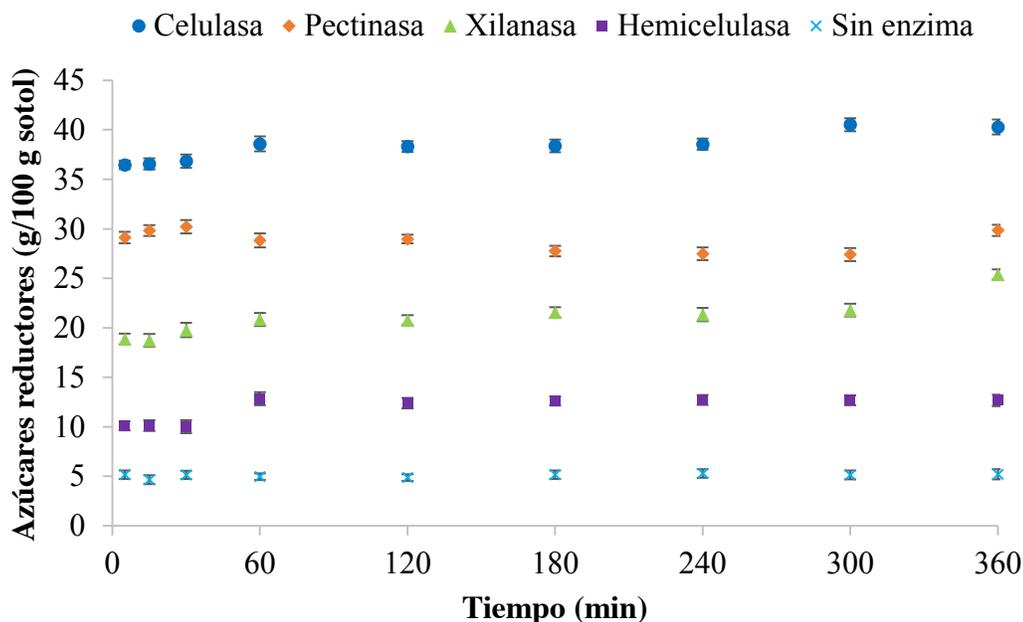


Figura 24. Cinética enzimática de liberación de azúcares reductores.

En la Figura 24 se muestra que el contenido de azúcares reductores para todas las enzimas después de 60 min, no se aumenta, presentando un comportamiento asintótico en el

tiempo. Asimismo, se observa que los tratamientos con enzimas liberaron más azúcares reductores que el tratamiento sin enzima, esto debido a que las enzimas carbohidrasas como celulasas, pectinasas, xiloglucanasas entre otras, rompen los enlaces glucosídicos que unen a dos carbohidratos liberando hacia los extractos, más azúcares reductores (Kashyap *et al.*, 2001). En la Figura 24 también se muestra la diferencia de extracción de azúcares reductores entre cada enzima, siendo la celulasa la que liberó mayor contenido de azúcares reductores, seguida por la pectinasa, xilanasa y por último la hemicelulasa.

Como ya se mencionó la propuesta del uso de enzimas para la mejora de la extracción, es que, a través de estas enzimas, se produzca una hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular como un paso fundamental para liberar los carbohidratos presentes en la planta de sotol. Pectinas, celulosa y hemicelulosa forman parte de los polisacáridos insolubles de la pared celular del sotol (*Dasyilirion spp.*) y otras plantas similares como el agave (Leach y Sobolik 2010). Celulasas, hemicelulasas, pectinasas entre otras enzimas ya han sido empleadas debido a que son capaces de catalizar la hidrólisis de los enlaces de los polisacáridos de la pared celular de las plantas y así descomponer la estructura de la pared celular (Pinelo *et al.*, 2006). Dicha degradación de la pared celular realizada por cada enzima se puede observar con los productos obtenidos, es decir, los azúcares reductores.

De manera general la pared celular de las plantas consiste en un esqueleto rígido de celulosa incrustado en una matriz tipo gel formada de compuestos pécticos, hemicelulosa y glicoproteínas (Chen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014). La mayor o menor liberación de dichos productos dependerá de la acción de cada enzima sobre la pared celular del sotol. Por ejemplo, la celulasa y la hemicelulasa actúan sobre la celulosa y rompen los enlaces β -1,4, que están presentes en la pared primaria debajo de la primera capa de la lámina media de la pared celular de la planta, y catalizan su descomposición en glucosa, celobiosa y en polímeros de glucosa más grandes (Puri *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014). La pectinasa (al ser pectolítica) tiene la capacidad de degradar los compuestos pécticos y la pectina, que se encuentran en la lámina media de las paredes primarias (Puri *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014). Con todo esto, se puede decir que los resultados obtenidos en azúcares reductores son debidos en gran parte a la composición

de la pared celular, del material del sotol y a la acción de cada enzima sobre los componentes de ésta. Asimismo, a las condiciones de temperatura y pH a las que se llevó a cabo la extracción las cuales pudieron afectar en mayor o menor medida a cada una de las enzimas

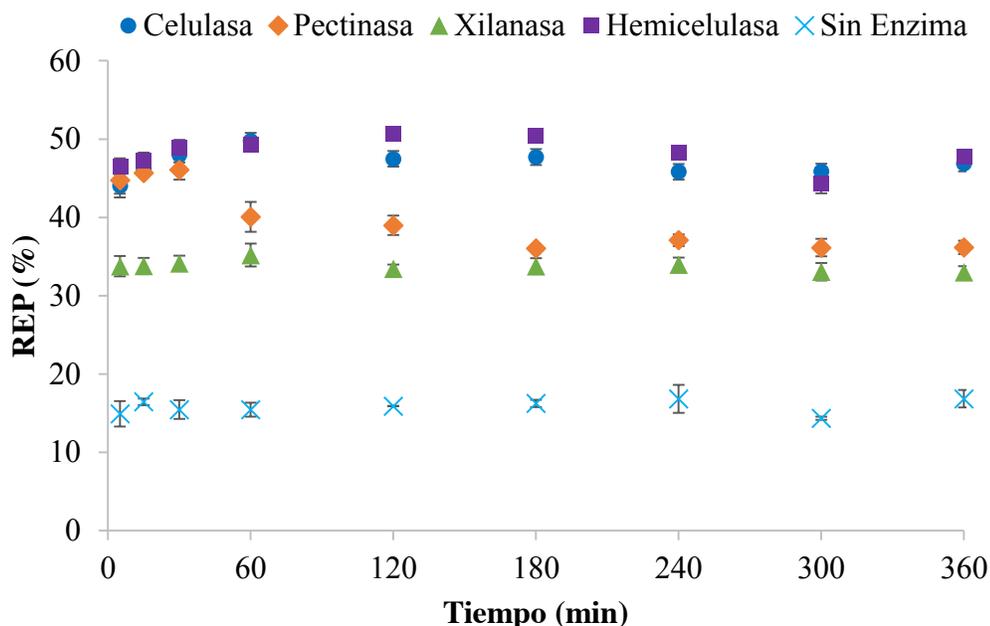


Figura 25. Cinética enzimática de extracción de polisacáridos de sotol, mediante diferentes enzimas.

El rendimiento de extracción de polisacáridos (REP) para todas las enzimas se observa en la Figura 25. En esta se muestra que la extracción de polisacáridos fue bastante rápida, ya que el REP no presentó incrementos significativos después de los 30 minutos para la mayoría de las enzimas, ya que después de este tiempo el REP comenzó a mantener un equilibrio dinámico con el aumento del tiempo de extracción, y ya no aumentó o descendió según la enzima, cuando se alargó el tiempo de extracción a 6 h. Este fenómeno puede ser debido a que una parte de los polisacáridos son hidrolizados bajo ciertas condiciones de temperatura y durante el largo tiempo de extracción (Liu *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011).

La Figura 25 también muestra el efecto de cada una de las enzimas en la extracción de polisacáridos de sotol, en donde la hemicelulasa y la celulasa presentaron mayor rendimiento en la extracción, seguido por la pectinasa y la xilanasas, con un incremento en

el rendimiento del 316%, 310%, 298% y 210%, respectivamente, comparado con el tratamiento sin enzima a los 30 min de extracción, que alcanzó 15.46% de REP. Es importante resaltar que la hemicelulasa fue la que logró extraer mayor rendimiento de polisacáridos, aunque sin diferencia significativa con la celulasa ($P < 0.05$), enzima que presentó la menor liberación de azúcares reductores (Figura 24), resultando interesante dependiendo del fin que se le quiera dar a los fructanos extraídos del sotol con dicha enzima.

Los resultados obtenidos en este estudio para el tiempo de extracción son cortos comparados con otros estudios asistidos con enzimas en los que han extraído polisacáridos de otras plantas, con tiempos que van desde 2.4-3.6 h para polisacáridos de *Tricholoma matsutake* (Yin *et al.*, 2011), 91 min para polisacáridos de *Lysium barbarum* (Zhang *et al.*, 2011), 97 min para polisacáridos provenientes del fruto *Cornus officinalis* (You *et al.*, 2013), 105 min para polisacáridos de *Dyctiophora indusiata* (Wu *et al.*, 2013), 2.73 h para polisacáridos de alfafa (Wang *et al.*, 2013), 3 h para polisacáridos de *Dendrobium chrisotoxum* (Pan *et al.*, 2015). Como se puede observar los tiempos son largos en comparación con lo obtenido para los polisacáridos de sotol en este estudio, lo cual es positivo. Una de las principales causas en la obtención de estos tiempos cortos; aparte de que los fructanos son altamente solubles en agua puede ser que la planta de sotol se deshidrató y se molió llevándola a cierto tamaño de partícula lo cual aumentó la transferencia de masa al medio de extracción. Tiempos cortos de extracción (10 min) también han sido reportados durante la extracción de fructanos asistida con ultrasonido a partir de plantas de agave y sotol deshidratadas y molidas (Narváez-Flores *et al.*, 2015; Sánchez-Madrugal *et al.*, 2017b). Con todo lo anterior queda claro que para mejorar los rendimientos de extracción de los polisacáridos presentes en el sotol (*Dasyilirion wheeleri*); un paso muy importante es la degradación de los polisacáridos de la pared y con la propuesta del uso de enzimas como ya se demostró los REP mejoran considerablemente comparado con el tratamiento de extracción sin enzima.

Las condiciones óptimas de extracción con los resultados obtenidos hasta este punto son una relación líquido-sólido de 60 mL/g y con la cinética del REP para cada una de las

enzimas (aún sin el conocimiento de la concentración óptima de cada enzima) se decidió establecer un tiempo de extracción de 20 min para los siguientes experimentos.

7.4.2.3. Efecto del pH en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol

El valor del pH puede afectar la actividad de las enzimas porque cada una de ellas tiene su propio pH óptimo, esto puede deberse a que un cambio en el pH afecta la estructura espacial de las enzimas. Por lo tanto, la conformación de la enzima y la actividad enzimática pueden alterarse por cambios en el pH (Yin *et al.*, 2011). En este estudio se eligieron diferentes niveles de pH para cada enzima para evaluar su influencia en el REP, manteniendo las demás variables constantes. Esto basado en primer lugar en el pH óptimo registrado por la marca (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) para el sustrato usado por la misma. De esta manera para la celulasa los niveles de pH seleccionados fueron (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0), para la pectinasa (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0), para la xilanasa (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5), y para la hemicelulasa (3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5). El efecto de los diferentes valores de pH para cada enzima sobre el REP es mostrado en la Figura 25. Como es observado, en todas las enzimas el porcentaje de extracción aumentó con el incremento del pH hasta llegar a un punto óptimo para cada una y disminuyendo después de este pH. Para la celulasa a) el pH óptimo fue de 4.5 con un rendimiento de extracción de 63.6%, para la pectinasa b) 4.0 resultó ser el pH óptimo con un 63.8% de extracción, para la xilanasa c) también un pH de 4.0 fue el óptimo con un rendimiento del 62.9% y para la hemicelulasa d) el mayor rendimiento de extracción (62.9%) fue obtenido a un pH de 4.5. La Figura 26, también muestra que para todas las enzimas el REP ya no aumenta cuando el pH es mayor de 4.5. La posible razón de este fenómeno puede ser que el pH apropiado u óptimo para estas enzimas está en el rango de 4 a 4.5, sugiriendo que es necesario un rango de pH adecuado para que las enzimas puedan colapsar las estructuras de la pared celular y liberen los polisacáridos, de esta manera cuando el valor de pH excede de 4 o 4.5, la actividad de la enzima empieza a disminuir por un valor inadecuado de pH (Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2015).

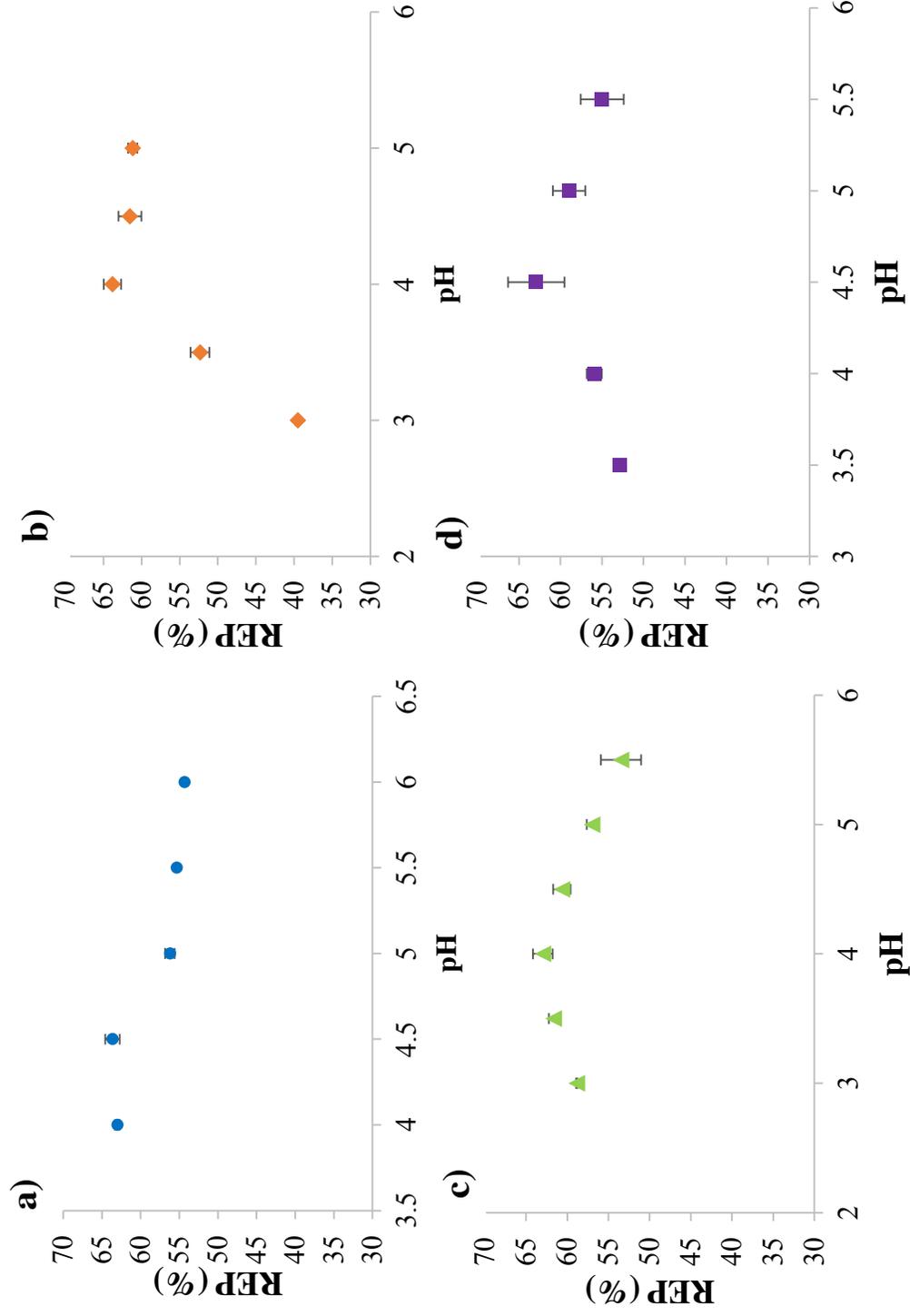


Figura 26. Efecto del pH de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulasa, b) pectinasa, c) xilanasas, d) hemicelulasa.

Por lo tanto, un pH de 4.5 para la celulasa y la hemicelulasa y un pH de 4.0 para la pectinasa y la xilanasa fueron elegidos para realizar los siguientes experimentos de extracción.

7.4.2.4. Efecto de la temperatura en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol

El coeficiente de difusión y de la solubilidad de polisacáridos dentro del solvente de extracción es aumentado conforme se eleva la temperatura, provocando el incremento de la transferencia de masa de los polisacáridos que salen de las partículas de agave y sotol dentro de la solución (Pardo-Rueda *et al.*, 2015; Narváez-Flores *et al.*, 2015). Asimismo, estos autores reportaron que el rendimiento de extracción aumentó con el incremento de la temperatura de extracción debido al aumento de la solubilidad de los polisacáridos a una temperatura más alta. Sin embargo, con el uso de enzimas, cada una tiene su propia temperatura óptima. Para estudiar el efecto de diferentes temperaturas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos, el proceso de extracción se llevó a cabo usando diferentes temperaturas de extracción de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 °C dependiendo de la enzima mientras que los otros factores de extracción se mantuvieron fijos. Dichas temperaturas también se eligieron de acuerdo con la temperatura óptima registrado por la marca (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) y para el sustrato según lo indicado para cada enzima, por esto las temperaturas de exploración fueron diferentes para cada una. El efecto de las diferentes temperaturas para cada enzima sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos es mostrado en la Figura 27.

Como se observa, el REP se incrementó cuando la temperatura se aumentó hasta llegar a un punto óptimo para cada enzima y disminuyó después de ésta. Para la celulasa a) la temperatura óptima fue de 40 °C con un rendimiento de extracción de 67.4%, para la pectinasa b) fue de 45 °C con un 61.38% de extracción, para la xilanasa c) 40 °C fue la temperatura óptima con un rendimiento del 58.2% y para la hemicelulasa d) el mayor rendimiento de extracción (63.5%) fue obtenido a una temperatura de 40 °C.

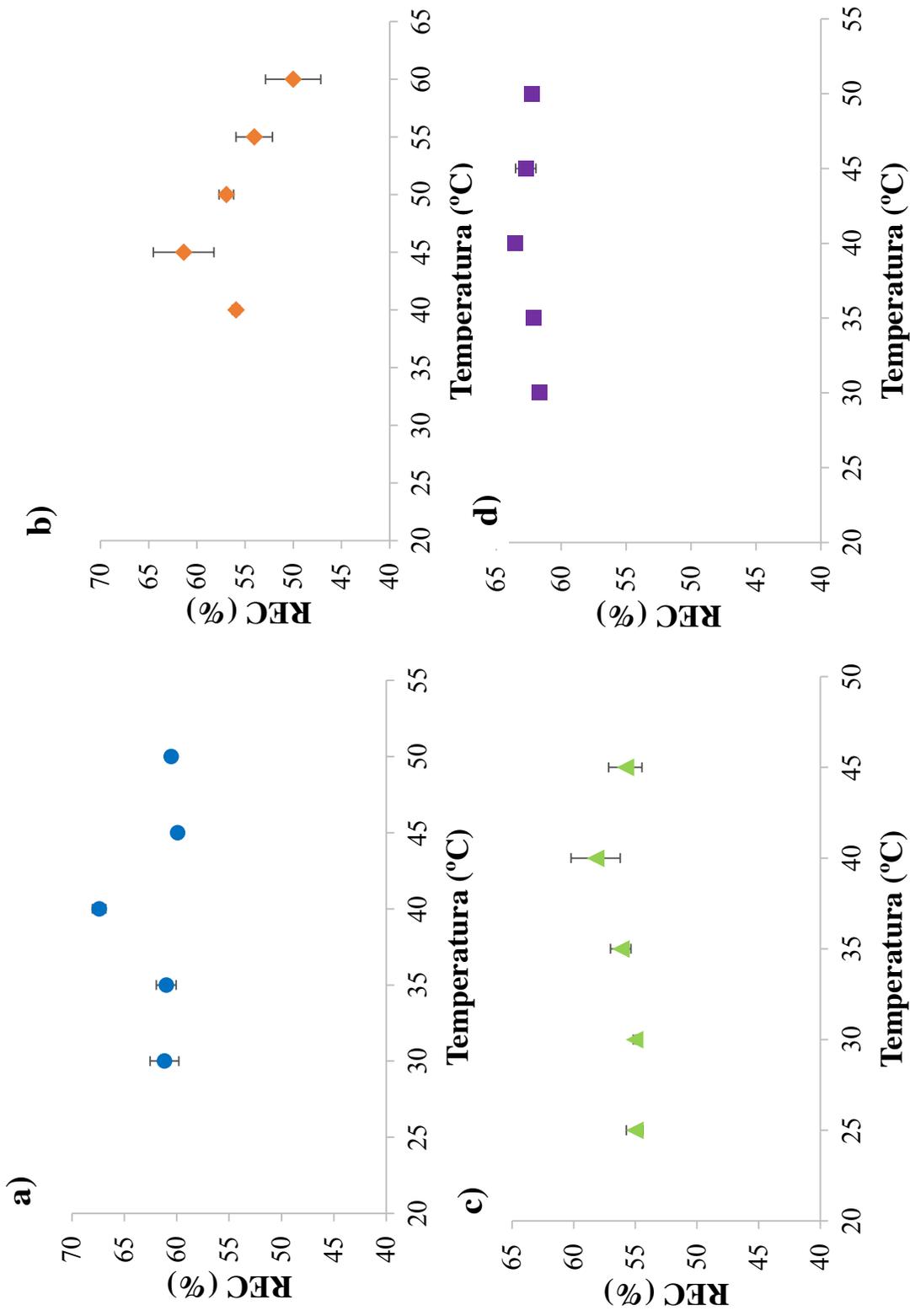


Figura 27. Efecto de la temperatura de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulosa, b) pectinasa, c) xilanasa, d) hemicelulasa.

La posible razón de este resultado puede ser por efecto de dos aspectos: en primer lugar, como ya se mencionó una temperatura más alta puede mejorar la transferencia de masa y acelerar la velocidad de extracción; en segundo lugar, las enzimas tienen temperaturas de efecto adecuadas, cuando la enzima está en condiciones óptimas de temperatura, la actividad de la enzima alcanza su máximo e incrementos de la temperatura, por arriba de la temperatura óptima, la actividad enzimática decrece (Yi *et al.*, 2011).

Las enzimas endógenas tienen buena actividad a temperaturas que oscilan de 30 – 50 °C, según la enzima, pero son inactivadas a altas temperaturas (Puri *et al.*, 2012). Esta tendencia concuerda con lo que han reportado otros autores en la extracción de polisacáridos de diferentes fuentes (Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2015). Las condiciones óptimas para la obtención de los mejores o máximos REP, de acuerdo con los análisis de factores simples hasta este punto, fueron 40 °C para la celulasa, xilanasas y hemicelulasa y 45 °C para la pectinasa y un pH de 4.5 para la celulasa y la hemicelulasa y un pH de 4.0 para la pectinasa y la xilanasas, condiciones que fueron elegidas para realizar los siguientes experimentos de extracción.

7.4.2.5. Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol

La cantidad de enzima también es un factor importante que debe considerarse para la extracción de polisacáridos de materiales vegetales. Si la concentración de la enzima es baja, los polisacáridos presentes en la materia prima no podrán ser completamente extraídos con las enzimas, además de presentarse tiempos largos de extracción. Por otro lado, una alta concentración de enzimas causará un proceso costoso (Narukawa *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014). Diferentes concentraciones de enzima (2.0%, 4.0%, 6.0%, 8.0% y 10% para la pectinasa, xilanasas y hemicelulasa y hasta 11% y 12% para la celulasa) fueron usadas para examinar la influencia de la concentración de enzima sobre el REP, manteniendo las demás variables fijas. Como se observa en la Figura 28 al aumentar la concentración de la enzima celulasa a) de 2% a 12% el REP se incrementó, encontrando que con 11% de celulasa se obtuvo la mayor extracción de 85.65%.

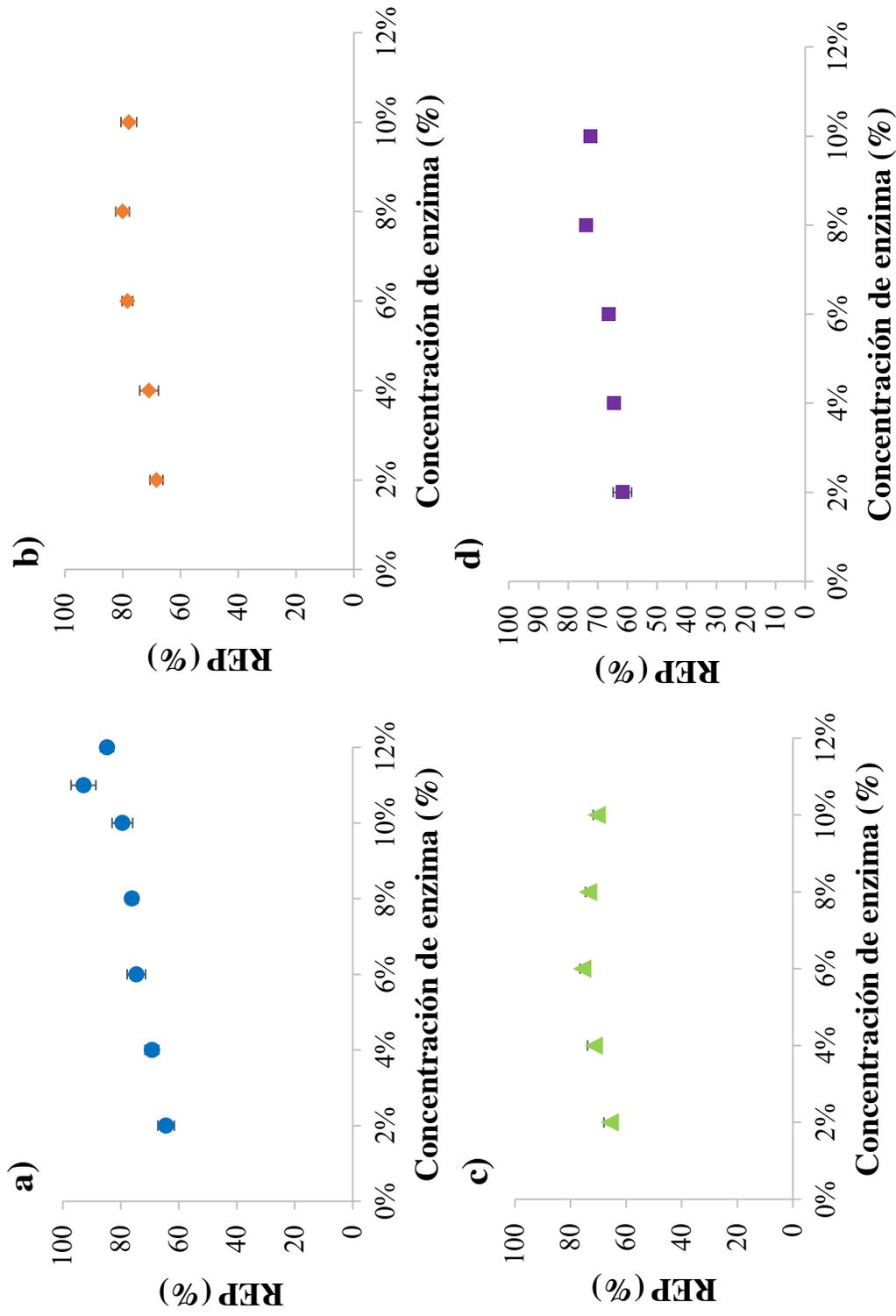


Figura 28. Efecto de la concentración de las 4 diferentes enzimas sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. a) celulasa, b) pectinasa, c) xilanasa, d) hemicelulasa.

Mientras que, para la pectinasa b), con el incremento de la concentración de 2% a 10% se obtuvo el mayor porcentaje del REP (80.03%) con un 8% de enzima. Para la xilanasas c) el aumento del 2% al 10% en su concentración, se incrementó el REP, alcanzando un máximo a una concentración del 6%. Para el caso de la hemicelulasa d) el aumento en su concentración del 2% al 10%, condujo a un máximo del REP del 73.8%, a una concentración de enzima del 8%. Para todas las enzimas, después de la concentración mencionada ya no se observaron incrementos en el REP, lo cual puede atribuirse al hecho de que las enzimas celulolíticas tienden a ser inhibidas por los productos solubles (glucosa, celobiosa) de la celulólisis (Patindol *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2012). Asimismo, cuando la estructura celular se altera, el material liberado de las células, como los azúcares, forman un complejo con las enzimas, lo que resulta en la inhibición del producto (Ladish *et al.*, 1983). Es importante resaltar, como ya se mencionó, que con la celulasa se obtuvieron los mejores rendimientos de extracción con 11% de concentración a 40 °C. Esto debido a que, la celulasa tiene una buena actividad hidrolizando los polisacáridos de la pared celular, como polisacáridos pécticos, xiloglucanos y heteroxilanos (Deker y Walis, 1983; McDougall y Fry, 1990; Wilkins *et al.*, 2007). Por esta razón el tratamiento con celulasa pudo conducir a una mayor pérdida de la integridad y desintegración de la pared celular, mejorando el contacto del solvente a los polisacáridos y fructanos presentes en el sotol. Aunque fue necesaria una mayor concentración de celulasa para extraer el máximo REP; con esta enzima se obtuvo un mayor REP comparada con las demás. Además, el costo de la celulasa a granel es más bajo que el costo del resto de las enzimas, indicando que la celulasa por si sola pudiera ser usada como una opción para la extracción a gran escala de fructanos a partir de piñas de sotol (*D. wheeleri*). En conclusión, al variar en diferentes concentraciones a cada una de las enzimas se encontró que con 11% de celulasa dio un máximo REP de 92.89%, para la pectinasa con 8% se logró el máximo REP de 80.03%, con 6% de xilanasas 75.73% de REP fue encontrado como máximo y para la hemicelulasa con 8% en su concentración se logró una máxima extracción del 73.88%. Es decir, los porcentajes mencionados para cada enzima fueron suficientes para hidrolizar por separado la pared celular de la planta de sotol y liberar sus polisacáridos en mayor concentración.

7.4.3. Efecto de la combinación de las enzimas en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol

Con los resultados del análisis de los factores simples obtenidos se fijaron las mejores condiciones de pH, relación líquido-sólido, tiempo y concentración de enzima. Como uno de los objetivos de este estudio fue obtener una mezcla o coctel de enzimas con el cual se obtuviera un mayor rendimiento para la extracción de fructanos presentes en la planta de sotol (*D. wheeleri*). Se determinó si con el uso de las 4 en realidad se obtenía una mejor extracción. Para conocer esto, con las condiciones óptimas y fijas de las variables antes mencionadas se analizó cada enzima individualmente, después se mezclaron en pares, en tres y por último con las cuatro enzimas como lo indica la Tabla 5 (Sección 6.6.2.2.). En la Figura 29 se muestran los REP obtenidos en cada uno de los tratamientos posibles por combinación de las 4 enzimas. Individualmente, la enzima celulasa fue la que logró mayor REP, seguida de la hemicelulasa, pectinasa y por último la xilanasa, siendo éstas 2 últimas diferentes ($P < 0.05$) con la celulasa. Al observar los resultados de la combinación en pares, la combinación de celulasa con hemicelulasa fue la que presentó mayor REP, seguido de la combinación de celulasa con pectinasa y de pectinasa con hemicelulasa sin presentar diferencia estadística entre estos 3 tratamientos. Asimismo, se puede observar que el REP fue mayor y significativamente diferente ($P < 0.05$) que el de las enzimas individuales. El siguiente tratamiento en pares fue el de pectinasa con xilanasa el cual fue más alto que el de la pectinasa y la xilanasa por si solas, siendo estadísticamente diferente solo con el de la xilanasa. Los siguientes tratamientos en pares fueron el de la celulasa con xilanasa y xilanasa con hemicelulasa que, aunque presentaron una ligera mayor extracción al del tratamiento solo con xilanasa no presentaron diferencia estadística. En cuanto a los tratamientos con 3 enzimas el de celulasa, pectinasa y hemicelulasa fue el que presentó mayor REP, siendo más alto que el de todos los tratamientos con 2 enzimas, pero sin diferencia significativa a los 2 tratamientos en pares que presentaron mayor extracción. El resto de los tratamientos con 3 enzimas no presentaron mejoría en la extracción, comparándolos con los mejores tratamientos con solo 2 enzimas. Por último, se observa claramente que el tratamiento con las 4 enzimas presentó una mejor extracción, siendo

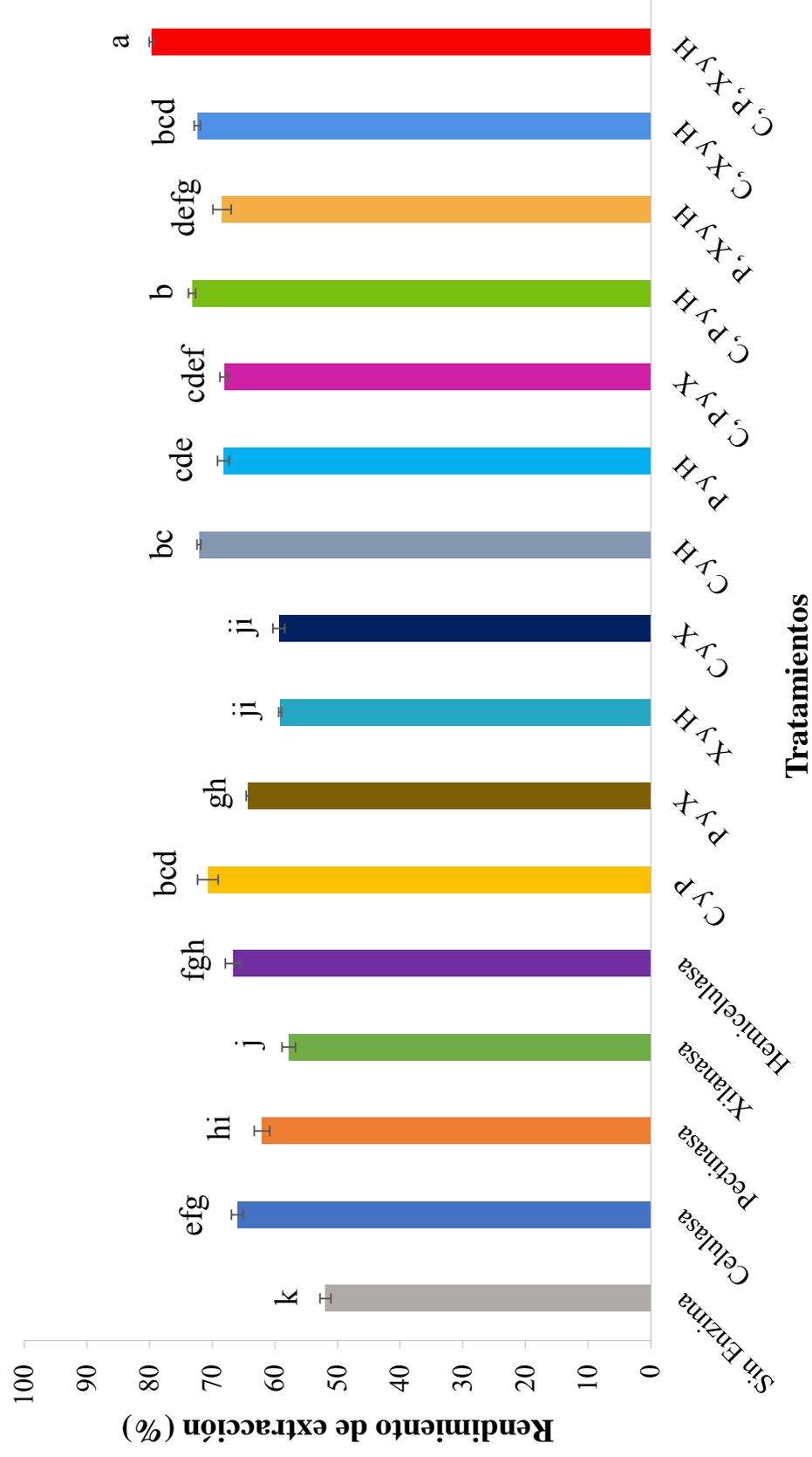


Figura 29. Resultados de la extracción de polisacáridos de sotal a partir de la combinación de enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa). Barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a todos los demás tratamientos individuales y de combinación de enzimas. Con esto se comprueba que, con el uso de las 4 enzimas, efectivamente se obtuvo la mayor extracción de polisacáridos a partir de sotol.

7.4.4. Análisis ortogonal para la optimización de la concentración del complejo de enzimas

En el proceso de extracción asistido con enzimas, varios factores juegan un papel importante en el rendimiento de extracción de polisacáridos de acuerdo con los datos obtenidos anteriormente. Con el propósito de obtener las concentraciones óptimas de cada una de las enzimas en la mezcla enzimática deseada; se empleó un diseño ortogonal L_9 (3^4), el cual puede reducir el número de experimentos y aprender más sobre la influencia de los factores usados. Las concentraciones usadas en este diseño fueron elegidas en base a lo encontrado en el estudio de factores simples (Sección 7.4.2.5.), donde la concentración establecida como el punto medio para cada enzima fue la que logró el máximo REP de sotol, siendo las otras dos un punto de concentración más bajo y otro más alto. Lo anterior se observa en la Tabla 26, asimismo se muestra la aplicación de la diferencia extrema para analizar los datos del diseño ortogonal. Los resultados de dicha optimización mostraron de acuerdo con los valores de R, que la influencia de los factores de extracción asistida con enzimas en el REP fue como sigue: $R_A > R_B > R_C > R_D$, es decir, celulasa > pectinasa > xilanasa > hemicelulasa. La enzima celulasa fue la más importante o la de mayor influencia en la extracción de polisacáridos de sotol ($R = 6.26$). Los valores de K de K_1 a K_3 representan cada nivel de cada factor, del más bajo al más alto. El valor de K más alto, es decir, el mayor rendimiento de extracción y el mejor nivel del factor para la celulasa fue K_1 , el cual representó el nivel de 10%. Para la pectinasa fue K_3 , para la xilanasa K_2 y para la hemicelulasa K_3 . De esta manera, la condición óptima fue la combinación $A_1B_3C_2D_3$ (1-3 son los niveles), es decir, concentración de celulasa (10%), concentración de pectinasa (10%), concentración de xilanasa (8%) y concentración de hemicelulasa (10%). En estas condiciones, el 91.57% del rendimiento de extracción podría ser alcanzado.

Tabla 26. Resultados del experimento ortogonal.

No.	A	B	C	D	REP (%)
1	1 (10%)	1 (6%)	1 (6%)	1 (6%)	81.73
2	1	2 (8%)	2 (8%)	2 (8%)	85.37
3	1	3 (10%)	3 (10%)	3 (10%)	90.68
4	2 (11%)	1	2	3	83.76
5	2	2	3	1	74.44
6	2	3	1	2	80.81
7	3 (12%)	1	3	2	82.81
8	3	2	1	3	75.03
9	3	3	2	1	81.48
K ₁	85.93	82.77	79.20	79.22	
K ₂	79.67	78.29	83.54	83.00	
K ₃	79.78	84.33	82.65	83.16	
R	6.26	6.04	4.35	3.94	

A, concentración de celulasa (% p/p).

B, concentración de pectinasa (% p/p).

C, concentración de xilanasas (% p/p).

D, concentración de hemicelulasa (% p/p).

R, se refiere al resultado de análisis extremo.

K_i, rendimiento de extracción del mismo factor y nivel en los experimentos, *i* = 1, 2 o 3.

7.4.5. Optimización de los parámetros de extracción para la mezcla enzimática

7.4.5.1. Establecimiento de los niveles de los factores experimentales.

Con la combinación óptima del complejo de enzimas encontrado en el diseño ortogonal, se procedió a optimizar las condiciones de extracción más importantes como temperatura, pH, relación L-S y tiempo. Antes de la realización del diseño de optimización se procedió a establecer los niveles de los factores antes mencionados del complejo enzimático obtenido. En la Figura 30 se observan los resultados obtenidos al variar los niveles de los factores simples; temperatura, pH, relación L-S y tiempo.

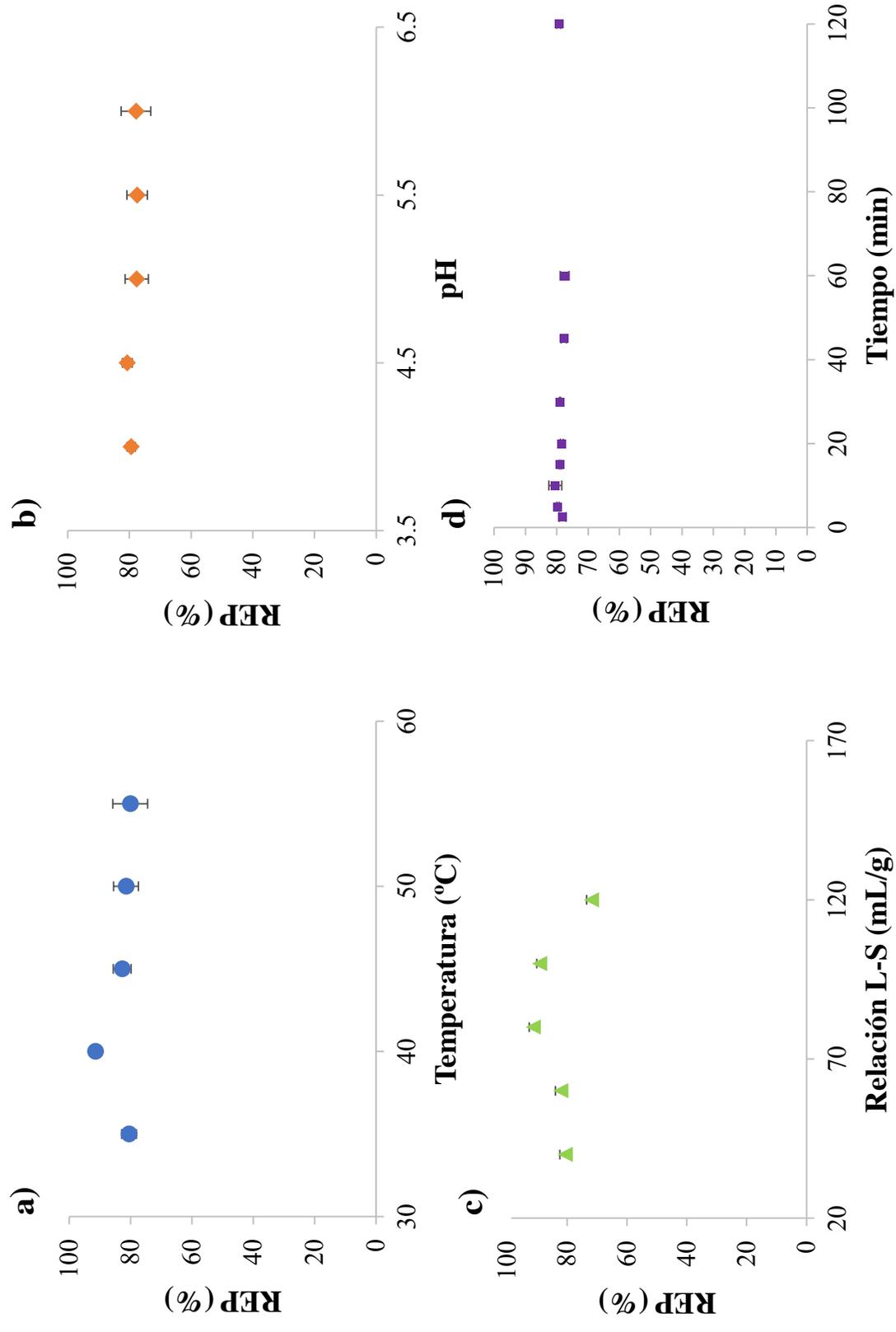


Figura 30. Resultados del análisis de factores simples para el complejo de enzimas encontrado con el diseño ortogonal. a) temperatura, b) pH, c) relación L-S, d) tiempo.

Para la temperatura se encontró que a 40 °C se obtiene el mayor REP, para el pH 4.5 aunque no se presentó una diferencia marcada (Figura 30b), en cuanto a la relación L-S; 80 mL/g fue la que presentó una mayor extracción y para el factor tiempo se observa que la extracción se logra a tiempos muy cortos debido a la alta solubilidad de los carbohidratos presentes en la muestra de sotol. Este factor pudo influenciar la liberación de polisacáridos por la alta solubilidad de los azúcares, esto debido a que las moléculas de los carbohidratos tienen un alto carácter hidrofílico, debido a los fuertes y altamente localizados enlaces de hidrógeno presentados por los sistemas agua-carbohidratos (Cardoso *et al.*, 2012).

De esta manera, los 3 niveles usados para el factor temperatura fueron 35 °C, 40 °C y 45 °C, para el pH 4, 4.5 y 5, para la relación L-S 60, 80 y 100 mL/g, para el tiempo se decidió no incluirlo en el diseño de optimización ya que como se mencionó, la extracción se llevó a cabo a tiempos muy cortos; estableciéndose 20 min como tiempo de extracción para todos los experimentos.

7.4.5.2. Análisis del diseño y ajuste del modelo

En la Tabla 27 se observan los 17 puntos experimentales del diseño Box-Behnken utilizado para optimizar los tres parámetros elegidos; temperatura (X_1), pH (X_2) y relación L-S (X_3). Se realizaron 5 réplicas (experimentos 13-17) como puntos centrales del diseño para estimar el error puro de la suma de cuadrados.

Los resultados obtenidos usando las diferentes combinaciones arrojadas por el diseño Box-Behnken para el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), azúcares reductores (AR), fructanos totales (FRU), glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio (GP_n) son mostrados en la Tabla 27.

El análisis de varianza de los resultados para todas las respuestas es presentado en la Tabla 28 y los coeficientes de regresión obtenidos por el modelo de segundo orden ajustado a los datos experimentales se encuentran en la Tabla 29. Como se observa en la Tabla 28 tanto la temperatura, el pH y la relación L-S no afectaron significativamente ($P > 0.05$) al REP, a los azúcares reductores, al contenido de fructanos y sacarosa. Solamente los 3 factores afectaron significativamente ($P < 0.05$) al contenido de fructosa y al GP_n .

Tabla 27. Diseño Box-Behnken y resultados de rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de los extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Tratamientos	T (°C)	pH	R L-S (mL/g)	REP (%)	AR (g/100 g)	FRU (g/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	GP _n
1	35	4	80	85.23	32.39	46.37	16.84	4.79	0.53	6.31
2	45	4	80	88.88	33.48	45.40	17.78	5.27	0.67	6.82
3	35	5	80	80.04	32.23	48.24	17.03	6.27	0.42	5.69
4	45	5	80	83.27	32.97	46.23	16.95	5.90	0.57	7.70
5	35	4.5	60	91.13	32.77	46.37	16.64	7.53	0.44	4.42
6	45	4.5	60	78.90	32.74	44.75	16.56	7.97	0.55	4.72
7	35	4.5	100	81.18	33.24	45.55	17.53	9.10	0.35	4.70
8	45	4.5	100	87.12	34.39	45.39	17.94	9.70	0.30	4.51
9	40	4	60	82.85	33.40	45.14	17.81	9.81	0.20	2.89
10	40	5	60	84.23	33.73	45.86	18.06	5.25	0.52	4.20
11	40	4	100	79.48	32.71	47.70	16.53	4.74	0.62	7.96
12	40	5	100	74.08	33.35	46.68	17.67	10.11	0.46	3.65
13	40	4.5	80	81.39	33.75	47.30	18.59	10.91	0.29	3.03
14	40	4.5	80	81.02	33.25	48.64	18.70	10.63	0.23	2.87
15	40	4.5	80	85.62	33.07	49.05	18.54	10.85	0.21	2.75
16	40	4.5	80	85.18	32.47	46.06	18.78	10.39	0.19	2.65
17	40	4.5	80	82.88	33.63	46.01	18.56	10.42	0.21	2.58

*Los valores presentes son el promedio tres mediciones. T, temperatura; R L-S, relación líquido-sólido; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 28. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de los extractos de sotol (*Dasyvirion wheeleri*).

Fuente	Cuadros medios							
	GL	REP	AR	FRU	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	GP _n
Model	9	22.27	0.27	1.62	0.85	9.73*	0.037	5.12*
A-Temperatura	1	0.043	1.09	2.82	0.18	0.16	0.016	0.86
B-pH	1	27.45	0.011	0.72	0.070	1.08*	3.87×10 ⁻⁴	0.94
C-R L-S	1	29.09	0.14	1.30	0.045	1.19	3.59×10 ⁻⁵	2.64*
AB	1	0.045	0.029	0.27	0.26	0.18	8.15×10 ⁻⁷	0.57
AC	1	82.58*	0.34	0.54	0.26	6.20×10 ⁻³	5.97×10 ⁻³	0.060
BC	1	11.49	0.025	0.76	0.060	24.63*	0.058	7.89*
A ²	1	32.54	0.24	2.97	0.20*	16.69*	0.081*	14.94*
B ²	1	11.33	0.22	3.84×10 ⁻⁴	3.54	40.16*	0.14*	16.33*
C ²	1	8.42	0.35	4.69	1.35	0.023	8.55×10 ⁻³	0.021
Residual	7	8.96	0.39	1.56	1.27	0.30	0.013	0.67
Falta de ajuste	3	14.95	0.56	0.96	0.36*	0.63	0.028*	1.51*
Error puro	4	4.47	0.26	2.00	0.83	0.056	1.48×10 ⁻³	0.032
R ²		0.7615	0.4722	0.5719	0.7511	0.9765	0.7840	0.9082

*Significancia a $P < 0.05$. R L-S, relación líquido-sólido; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 29. Coeficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (temperatura, pH y relación L-S) para los extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Coefficientes	REP	AR	FRU	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	GP _n
b_0	83.22	33.24	47.42	18.63	10.64	0.23	2.78
b_1	0.073	0.37	-0.59	0.15	0.14	0.045	0.33
b_2	-1.85	0.037	0.30	0.094	0.37*	-6.96×10 ⁻³	-0.34
b_3	-1.91	0.13	0.40	0.075	0.39	2.11×10 ⁻³	0.57*
b_{12}	-0.11	-0.086	-0.26	-0.25	-0.21	4.51×10 ⁻³	0.38
b_{13}	4.54*	0.29	0.37	0.12	0.039	-0.039	-0.12
b_{23}	-1.69	0.079	-0.43	0.22	2.48*	-0.12	-1.40*
b_{11}	2.78	-0.24	-0.84	-0.92*	-1.99*	0.14*	1.88*
b_{22}	-1.64	-0.23	-9.56×10 ⁻³	-0.57	-3.09*	0.18*	1.97*
b_{33}	-1.41	0.29	-1.06	-0.55	-0.074	0.045	-0.71

*Significancia a $P < 0.05$. R L-S, relación líquido-sólido; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Esta falta de ajuste en el modelo fue probablemente debido a que como el complejo enzimático obtenido está compuesto por varias enzimas las cuales tienen una actividad óptima de temperatura y pH. Por lo tanto, cuando se combinan estos diferentes factores una enzima puede actuar más que la otra, es decir, una enzima puede actuar mejor a un pH, y no a la temperatura combinada de un tratamiento dado; pero otra puede actuar mejor a la temperatura de dicho tratamiento sin ser su pH óptimo, por dicha razón los rendimientos de extracción al final del tratamiento llegan a ser iguales. Otra razón por la que el pH no presentó efecto significativo en el modelo se puede observar en la Figura 30b donde claramente se percibe que, aunque el pH óptimo fue de 4.5, con pH de 4 y 5 se obtiene casi el mismo REP. Los gráficos de superficie de respuesta obtenidos del programa estadístico usado no se presentan ya que la mayoría de las respuestas sobre todo el REP y el contenido de fructanos no se ajustaron al modelo.

7.4.6. Diseño central compuesto para la optimización de los parámetros de extracción de la mezcla enzimática

Debido a que con el diseño Box-Behnken propuesto no se obtuvieron los resultados deseados, se decidió explorar a través de otro diseño de optimización las variables que se consideraron más importantes, en este caso la concentración de cada una de las enzimas y la temperatura. Esto se realizó a través de un diseño central compuesto de 5 factores con 5 niveles. Los niveles se eligieron en base al análisis de factores simples descritos anteriormente (Sección 7.4.5.1.).

7.4.6.1. Ajuste del modelo

Los resultados obtenidos usando las diferentes combinaciones de las concentraciones de enzimas y temperatura de acuerdo con el diseño central compuesto usado para las respuestas del REP, AR, FRU, glucosa, fructosa, sacarosa y GP_n son mostrados en la Tabla 30. El análisis de varianza de los resultados para todas las respuestas es presentado en la Tabla 31 y los coeficientes de regresión obtenidos por el modelo de segundo orden ajustado a los datos experimentales se encuentran en la Tabla 32.

Tabla 30. Resultados del diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotal (*Dasyliirion wheeleri*).

Tratamientos	C (%)	P (%)	X (%)	H (%)	T (°C)	REP (%)	AR (g/100 g)	FRU (g/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	GP _n
1	10	8	4	8	30	78.39	30.73	44.53	15.40	7.39	0.601	0.847
2	10	4	8	8	30	79.61	28.68	45.45	13.85	6.77	0.593	0.985
3	6	8	8	4	50	76.96	27.10	45.74	12.73	5.96	0.995	1.136
4	10	8	8	4	30	75.80	28.87	46.01	13.99	6.83	0.530	0.969
5	10	8	4	4	50	73.98	28.94	46.49	14.70	7.00	0.791	0.952
6	10	4	4	8	50	77.24	28.52	45.15	13.81	6.74	0.762	1.042
7	6	4	8	8	50	71.61	26.62	46.49	12.16	5.66	0.917	1.329
8	6	8	4	8	50	69.58	28.27	45.41	13.54	6.57	1.029	1.108
9	10	4	8	4	50	77.10	27.62	47.28	12.96	6.43	0.754	1.127
10	6	8	8	8	30	78.44	27.97	44.48	13.01	6.56	0.658	1.118
11	6	4	4	4	30	67.10	20.51	47.14	7.52	4.25	0.594	1.085
12	4	6	6	6	40	73.94	26.35	45.73	12.87	5.51	0.606	1.311
13	12	6	6	6	40	80.65	31.05	51.44	15.65	7.79	0.515	0.810
14	8	2	6	6	40	73.00	23.95	47.63	8.55	4.55	0.594	1.483
15	8	10	6	6	40	77.30	30.14	45.88	15.21	7.32	0.681	0.885
16	8	6	2	6	40	68.35	25.58	47.28	9.80	5.38	0.617	1.400
17	8	6	10	6	40	75.72	29.19	47.05	14.79	7.22	0.662	0.919
18	8	6	6	2	40	72.13	24.20	47.02	8.74	4.64	0.597	1.469
19	8	6	6	10	40	75.22	29.59	43.72	14.84	7.24	0.668	0.910
20	8	6	6	6	20	62.70	24.75	39.94	9.66	4.75	0.514	1.659
21	8	6	6	6	60	73.21	26.83	41.62	12.01	5.87	1.361	1.591
22	8	6	6	6	40	71.02	26.97	45.17	12.79	5.92	0.628	1.712
23	8	6	6	6	40	69.79	27.18	44.35	12.35	6.18	0.627	1.727
24	8	6	6	6	40	70.44	26.70	45.23	12.19	5.80	0.622	1.766
25	8	6	6	6	40	69.97	27.26	45.62	12.10	6.18	0.649	1.772
26	8	6	6	6	40	69.41	27.47	45.21	11.95	6.33	0.653	1.817

*Los valores presentes son el promedio tres mediciones. C, celulosa; P, pectinasa; X, xilanas; H, hemicelulasa; T, temperatura; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 31. Análisis de varianza del diseño central compuesto asistido con enzimas utilizado para la extracción de polisacáridos de sotel (*Dasyliirion wheeleri*).

Fuente	GL	REP	AR	FRU	Cuadrados medios					GP _n
					Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	
Model	20	23.25*	6.54*	5.37*	5.92*	1.09*	0.044*	0.14*		0.14*
A-Celulasa	1	22.50*	11.01*	16.30*	3.88*	2.61*	4.10×10 ⁻³	0.13*		0.13*
B-Pectinasa	1	9.26*	19.16*	1.54*	22.15*	3.84*	3.74×10 ⁻³	0.18*		0.18*
C-Xilanasa	1	27.12*	6.51*	0.027	12.49*	1.69*	1.00×10 ⁻³	0.12*		0.12*
D-Hemicelulasa	1	4.75*	14.54*	5.42*	18.56*	3.39*	2.54×10 ⁻³	0.16*		0.16*
E-Temperatura	1	55.18*	2.16*	1.41*	2.76*	0.62*	0.36*	2.35×10 ⁻³		2.35×10 ⁻³
AB	1	1.39	0.24	1.34*	2.14*	0.17	6.63×10 ⁻⁴	0.035*		0.035*
AC	1	3.12*	0.015	1.14	0.50	0.087	5.90×10 ⁻⁴	9.50×10 ⁻³		9.50×10 ⁻³
AD	1	24.94*	0.32	1.74*	1.55*	0.12	2.36×10 ⁻³	0.025*		0.025*
AE	1	2.59	0.61*	3.47*	4.99*	0.48*	0.022*	0.072*		0.072*
BC	1	5.18*	1.29*	1.47*	2.46*	0.059	6.95×10 ⁻³	1.59×10 ⁻⁴		1.59×10 ⁻⁴
BD	1	4.17*	0.32	3.19*	1.10	3.07×10 ⁻³	0.014*	4.21×10 ⁻⁴		4.21×10 ⁻⁴
BE	1	16.70*	0.068	0.96*	0.050	0.031	2.72×10 ⁻⁵	0.036*		0.036*
CD	1	4.51*	1.16*	4.04*	2.67*	0.11	6.99×10 ⁻³	8.27×10 ⁻³		8.27×10 ⁻³
CE	1	9.79*	0.19	1.31*	0.20	6.18×10 ⁻³	1.95×10 ⁻³	3.71×10 ⁻³		3.71×10 ⁻³
DE	1	20.18*	0.094	2.02*	0.035	8.29×10 ⁻⁶	1.37×10 ⁻³	5.95×10 ⁻³		5.95×10 ⁻³
A ²	1	94.76*	3.80*	21.02*	8.65*	0.81*	3.90×10 ⁻³	0.91*		0.91*
B ²	1	47.96*	0.049	4.80*	0.028	7.77×10 ⁻⁴	1.47×10 ⁻³	0.63*		0.63*
C ²	1	8.13*	0.051	7.46*	0.14	0.20	1.64×10 ⁻³	0.68*		0.68*
D ²	1	24.98*	0.17	0.15	0.084	6.16×10 ⁻⁴	9.85×10 ⁻⁴	0.62*		0.62*
E ²	1	6.16*	3.46*	31.62*	2.37*	0.72*	0.19*	0.047*		0.047*
Residual	5	0.44	0.085	0.18	0.20	0.063	1.49×10 ⁻³	3.19×10 ⁻³		3.19×10 ⁻³
Falta de ajuste	1	0.64	0.081	0.013	0.61	0.13	6.62×10 ^{-3*}	9.21×10 ⁻³		9.21×10 ⁻³
Error puro	4	0.39	0.086	0.22	0.10	0.046	2.07×10 ⁻⁴	1.69×10 ⁻³		1.69×10 ⁻³
R ²		0.9953	0.9968	0.9919	0.9915	0.9857	0.9916	0.9943		0.9943

*Significancia a $P < 0.05$. REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 32. Coeficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (concentración de enzimas y temperatura) para los extractos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Coefficientes	REP	AR	FRU	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	GP _n
b_0	70.05*	27.15*	45.11*	12.21*	6.05*	0.63*	1.77*
b_1	1.68*	1.17*	1.43*	0.70*	0.57*	0.023	-0.13*
b_2	1.08*	1.55*	-0.44*	1.66*	0.69*	0.022	-0.15*
b_3	1.84*	0.90*	-0.059	1.25*	0.46*	0.011	-0.12*
b_4	0.77*	1.35*	-0.82*	1.52*	0.65*	0.018	-0.14*
b_5	2.63*	0.52*	0.42*	0.59*	0.28*	0.21*	-0.017
b_{12}	0.64	0.26	-0.63*	0.79*	0.22	0.014	-0.10*
b_{13}	0.96*	0.068	-0.58	0.38	0.16	0.013	-0.053
b_{14}	2.71*	0.31	-0.72*	0.68*	0.19	0.026	-0.085*
b_{15}	-0.87	0.43*	-1.01*	1.21*	0.38*	-0.080*	-0.15*
b_{23}	1.24*	-0.62*	0.66*	-0.85*	-0.13	0.045	6.86×10^{-3}
b_{24}	1.11*	-0.31	0.97*	-0.57	-0.030	0.065*	-0.011
b_{25}	-2.22*	-0.14	0.53*	0.12	0.095	2.83×10^{-3}	-0.10*
b_{34}	1.15*	-0.58*	1.09*	-0.89*	-0.18	0.045	0.049
b_{35}	-1.70*	-0.24	0.62*	-0.25	-0.043	-0.024	-0.033
b_{45}	-2.44*	-0.17	0.77*	-0.10	-1.56×10^{-3}	-0.020	-0.042
b_{11}	1.86*	0.37*	0.88*	0.56*	0.17*	-0.012	-0.18*
b_{22}	1.32*	-0.042	0.42*	-0.032	-5.33×10^{-3}	7.33×10^{-3}	-0.15*
b_{33}	0.55*	0.043	0.52*	0.071	0.085	7.74×10^{-3}	-0.16*
b_{44}	0.96*	-0.078	0.073	-0.055	-4.74×10^{-3}	6.00×10^{-3}	-0.15*
b_{55}	-0.47*	-0.36*	-1.08*	-0.29*	-0.16*	0.082*	-0.042*

*Significancia a $P < 0.05$. REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

En general, la concentración de las enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa) y la temperatura de extracción afectaron significativamente ($P < 0.05$) a todas las respuestas. Solamente la concentración de sacarosa presentó falta de ajuste. El modelo ajustado de segundo orden explicó satisfactoriamente la variabilidad de los datos para la mayoría de las respuestas con $R^2 > 0.98$. Esto indica que las respuestas fueron soportadas por las variables; celulasa, pectinasa, xilanasas, hemicelulasa y temperatura explicando la variabilidad de los datos obtenidos arriba del 98%. Entre más cercana a 1 sea la R^2 obtenida, mejor se ajustará el modelo empírico a los datos reales o experimentales (Lee *et al.*, 2006).

7.4.6.2. Rendimiento de extracción de polisacáridos (REP)

Durante la extracción asistida con enzimas, el REP varió de 62.70% a 80.65% (Tabla 30). Las 4 enzimas, así como la temperatura afectaron significativamente ($P < 0.05$) el REP (Tabla 31). El ANOVA demostró que el modelo de regresión cuadrática propuesto para este diseño se ajustó adecuadamente, explicando el 99.53% de la variación de los datos (Tabla 31).

El modelo de regresión de segundo orden relacionando el REP de sotol, con las variables independientes se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 Y = & 70.05 + 1.68X_1 + 1.08X_2 + 1.84X_3 + 0.77X_4 + 2.63X_5 + 1.86 X_1^2 \\
 & + 1.32X_2^2 + 0.55X_3^2 + 0.96X_4^2 - 0.47X_5^2 + 0.64X_1X_2 \quad \text{Ec. 20} \\
 & + 0.96X_1X_3 + 2.71X_1X_4 - 0.87X_1X_5 + 1.24X_2X_3 \\
 & + 1.11X_2X_4 - 2.22X_2X_5 + 1.15X_3X_4 - 1.70X_3X_5 \\
 & - 2.44X_4X_5
 \end{aligned}$$

Para el caso de la ecuación 20 el REP obtenido fue considerado como la variable dependiente o respuesta Y .

Como se observa en la Tabla 31 los términos de P del modelo menores de 0.05 indican que son significativos. Para esta respuesta (REP) casi todos los términos del modelo fueron significativos, excepto AB y AE. De esta manera, las variables con bajos niveles de probabilidad contribuyen al modelo, mientras que los demás pueden ser ignorados o eliminados del modelo. De acuerdo con Karthikeyan *et al.* (1996), altas magnitudes de los

valores t y pequeños valores de P indican una alta significancia de los correspondientes coeficientes del modelo (Tabla 31). Dichos valores de t no se presentan, pero los valores de $P < 0.05$ están indicados con un * en las Tablas 31 y 32. Las superficies de respuesta constituyen la representación gráfica de la ecuación de regresión para determinar los valores óptimos de las variables dentro de los rangos considerados (Tanyildizi *et al.*, 2005). Dichos gráficos se presentan en la Figura 31 en los cuales se muestran las interacciones entre las 4 enzimas. Cada gráfico de superficie de respuesta representa un número infinito de combinaciones de las dos variables de prueba que se muestran en cada una, manteniendo las otras tres variables en su respectivo nivel cero. El principal objetivo de las superficies de respuesta es buscar eficientemente los valores óptimos de las variables, de tal manera que la respuesta se maximice (Tanyildizi *et al.*, 2005). Sin embargo, para el caso de la respuesta del REP el modelo ajustado dio una tendencia de punto silla prediciendo los valores fuera del rango de los niveles experimentales, de acuerdo con la Figura 31. Se observa que tendencias a un mayor rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol se presentan a concentraciones altas de ambas enzimas, esto es coincidente en todas las interacciones con cada una de las enzimas (Figura 31a,b,c,d,e,f). Asimismo, en algunos gráficos se observan tendencias de concentraciones altas en el REP con concentraciones altas de una enzima en combinación con concentraciones bajas de la otra enzima, pudiéndose decir con esto que las enzimas tienen un efecto complementario. Es decir, lo que no se extrae con una enzima; otra enzima con concentración más alta logra extraer el resto. Como ya se ha mencionado la temperatura es una de las variables clave que afectan la liberación de polisacáridos y otros compuestos de diferentes fuentes vegetales, que puede modificar el equilibrio y las condiciones de transferencia de masa en la extracción sólido-líquido y afectar la actividad de la enzima. Incrementos en la temperatura puede acelerar la velocidad de reacción de las enzimas (Yi *et al.*, 2011). Esto se observa en la Figura 32 para todas las enzimas; donde con un incremento de la temperatura el rendimiento de extracción de polisacáridos presentes en la planta de sotol también se incrementó.

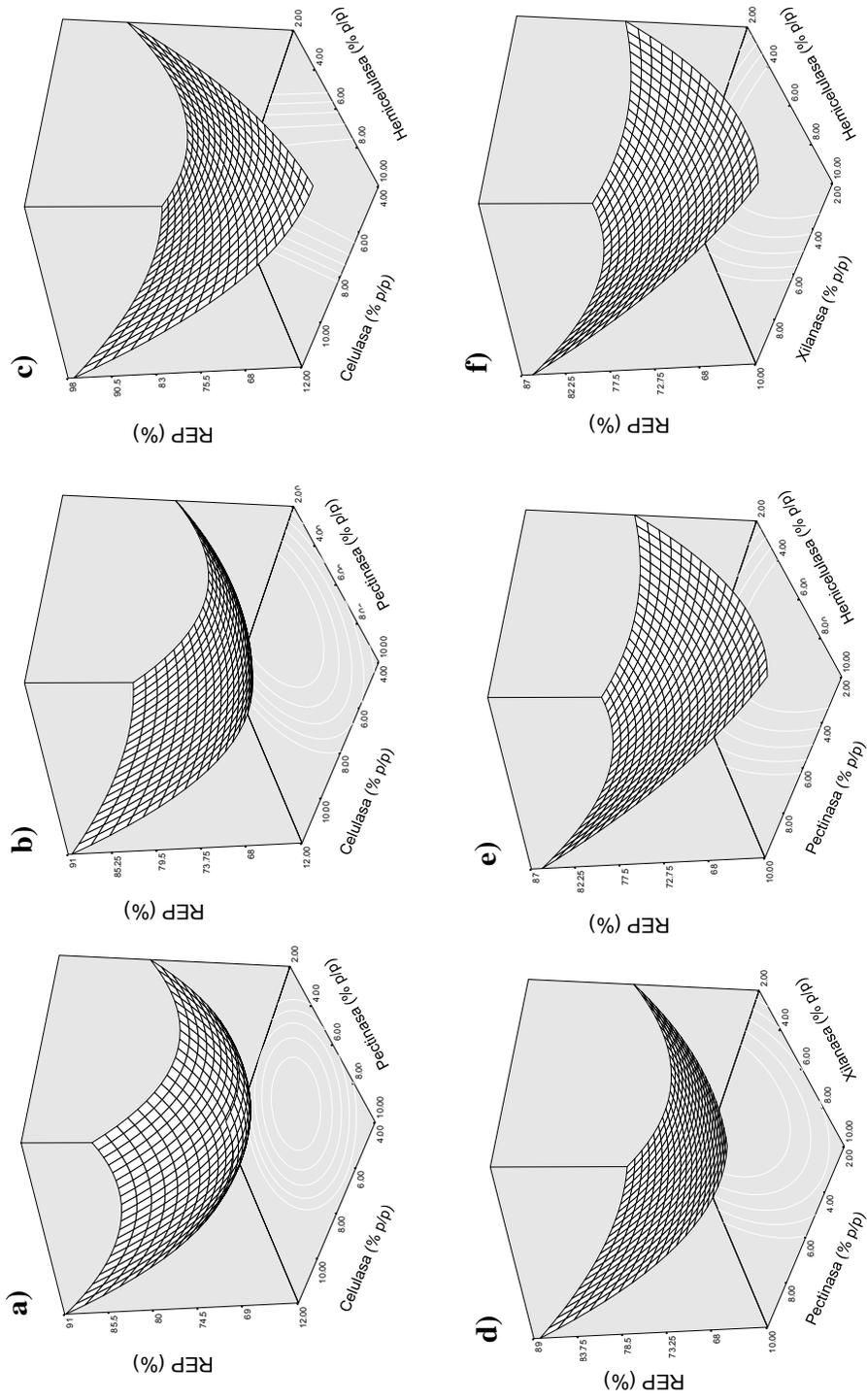


Figura 31. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanasa (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanasa (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanasa-hemicelulasa (f) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.

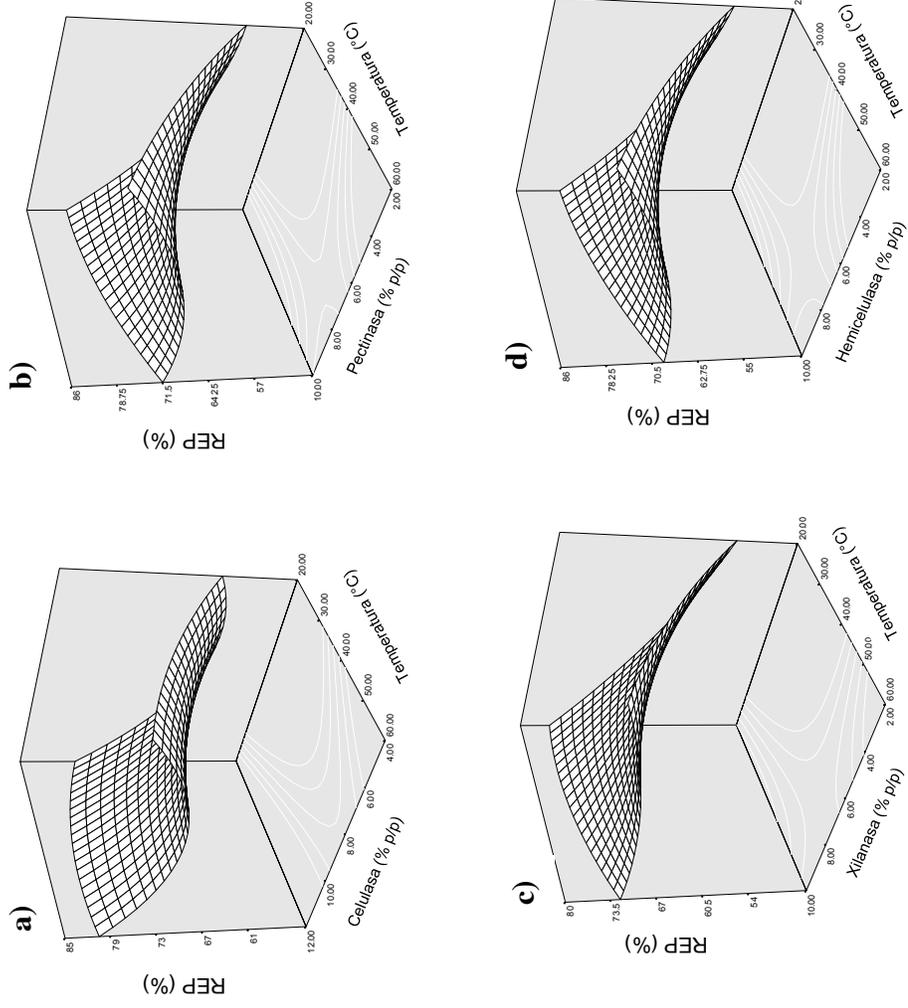


Figura 32. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanasa-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.

Aunque altas temperaturas tienen efectos positivos sobre los rendimientos de extracción, dichas temperaturas no pueden ser incrementadas indefinidamente, debido en parte a la inestabilidad de los compuestos a extraer, es decir, puede haber hidrólisis parcial de polisacáridos y a ciertas temperaturas pueden tomar lugar la desnaturalización de membranas (Cacace y Mazza, 2003). Además, el aumento de la temperatura puede afectar en la desnaturalización de la enzima, disminuyendo el rendimiento del producto deseado (Renouard *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2015).

Dicho efecto es observado en las superficies de respuesta de las interacciones de las interacciones de las enzimas con la temperatura, sobre todo es muy claro a altas concentraciones de todas las enzimas (Figura 32a, b, c y d).

7.4.6.3. Azúcares Reductores (AR)

El contenido de azúcares reductores varió de 23.95 g/100 g a 31.05 g/100 g (Tabla 30). Las concentraciones de las 4 enzimas, así como la temperatura afectaron significativamente ($P < 0.05$) el contenido de azúcares reductores en los extractos (Tabla 31). El modelo de regresión cuadrática propuesto para este diseño se ajustó adecuadamente, explicando la variabilidad de los datos en un 99.68% (Tabla 31).

Con el modelo ajustado para esta respuesta se encontró una topografía de punto silla (Fig. 33) con una solución a un punto crítico de concentración de celulasa de 4.38%, de pectinasa 6.41%, xilanasas de 8.22%, hemicelulasa de 9.51% y temperatura de 28.27 °C para obtener un valor de AR de 27.62 g/100 g.

El modelo de regresión de segundo orden relacionando el contenido de AR de sotol, con las variables independientes se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 Y = & 27.15 + 1.17X_1 + 1.55X_2 + 0.90X_3 + 1.35X_4 + 0.52X_5 + 0.37X_1^2 \\
 & - 0.042X_2^2 + 0.043X_3^2 - 0.078X_4^2 - 0.36X_5^2 + 0.26X_1X_2 \\
 & + 0.068X_1X_3 + 0.31X_1X_4 + 0.43X_1X_5 - 0.62X_2X_3 \\
 & - 0.31X_2X_4 - 0.14X_2X_5 - 0.58X_3X_4 - 0.24X_3X_5 \\
 & - 0.17X_4X_5
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 21}$$

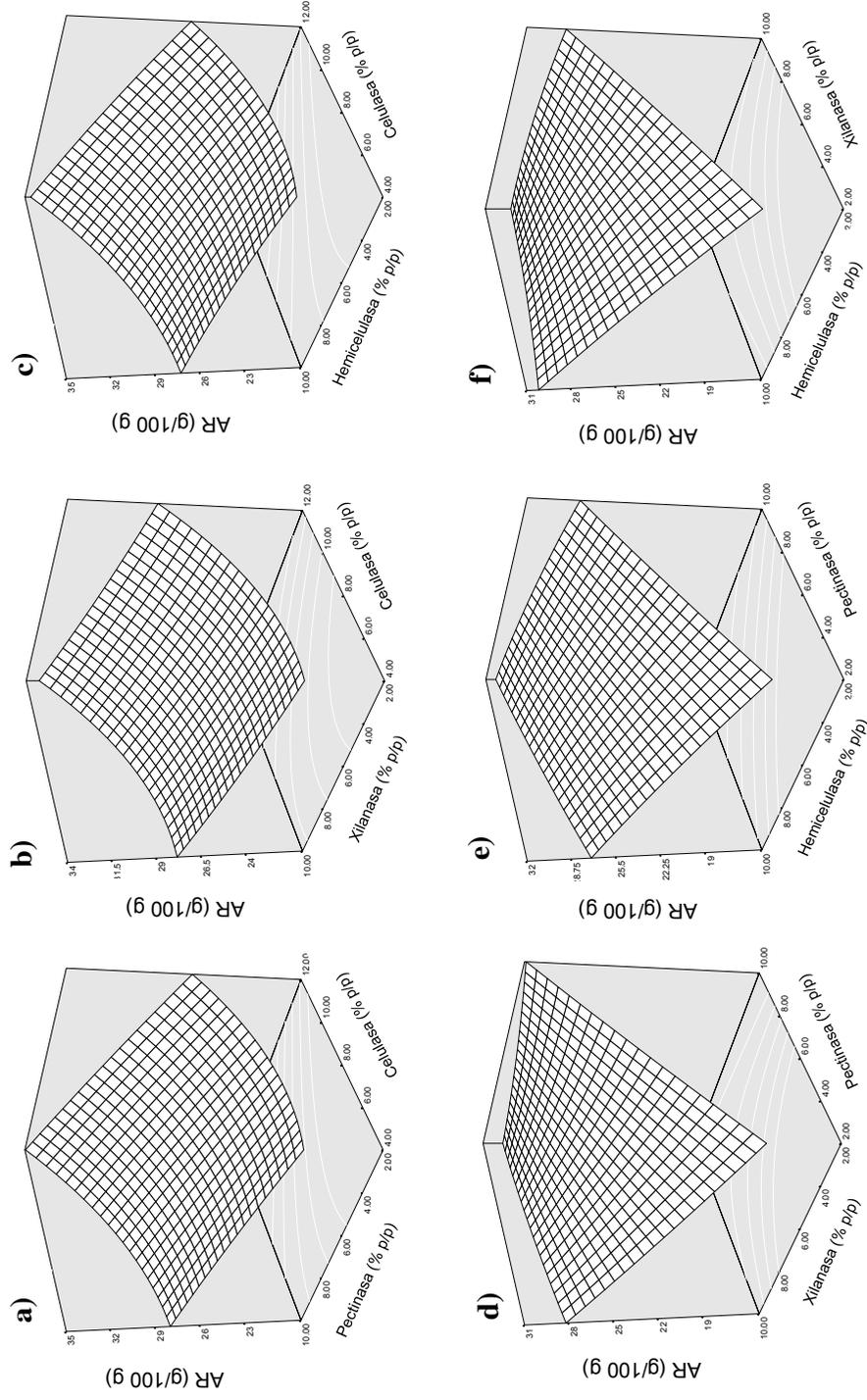


Figura 33. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanasa (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanasa (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanasa-hemicelulasa (f) sobre el contenido de azúcares reductores.

Para el caso de la ecuación 21 los AR obtenidos fueron considerados como la variable dependiente o respuesta Y . Como ya es sabido, los valores de P menores de 0.05 son significativos para el modelo, los cuales se observan en la Tabla 31 y 32. En esta se puede observar que las 5 variables en su efecto lineal fueron significativas ($P < 0.05$). Asimismo, las interacciones AE, BC, y CD y la concentración de la enzima celulasa (A) y la temperatura (E) en su efecto cuadrático. La Figura 33 muestra las superficies de respuesta obtenidas para el contenido de azúcares reductores con las interacciones entre las 4 enzimas. En dichos gráficos se observa que la mayor liberación de azúcares reductores es obtenida a concentraciones altas de enzimas. Y como efecto contrario, la menor liberación de azúcares reductores es obtenida con las menores concentraciones de enzimas (Figura 33a, b, c, d, e, f). Como era de esperarse, entre mayor en la concentración de enzima es mayor la liberación de azúcares reductores durante la extracción asistida con enzimas, esto debido al rompimiento de los enlaces glucosídicos entre dos unidades de carbohidratos por efecto de las enzimas del tipo carbohidrasas, como celulasas, pectinasas y xiloglucanasas, entre otras (Kashyap *et al.*, 2001). Mayores contenidos de azúcares reductores debido a la hidrólisis por efecto de enzimas ya han sido reportados. Por ejemplo, Kim *et al.* (2005) extrajeron polifenoles a partir de cáscara de manzana con celulasa donde el contenido de azúcares reductores aumentó de 20 mg para un tratamiento no enzimático a 40 mg con un tratamiento con celulasa. Hanana *et al.* (2015) investigaron la extracción de fibras de alfa (*Stipa tenacissima*) usadas en aplicaciones de pulpa y papel; con varios procesos de extracción entre ellos con lacasas, pectinasas y celulasas, obteniendo con dicho tratamiento enzimático mejores rendimientos y calidad de las fibras, así como mejores propiedades mecánicas y cambios en la superficies de la fibra y en la composición química. Sánchez-Madrigal *et al.* (2018) también reportaron mayor liberación de azúcares reductores a altas concentraciones de enzima (Pectinex Ultra SP-L) durante la extracción de fructanos a partir de sotol fresco (*Dasyilirion wheeleri*). En los gráficos de superficie de respuesta de las interacciones de cada una de las enzimas con la temperatura (Figura 34) también se observa el que a altas concentraciones de enzima la liberación de azúcares reductores es mayor.

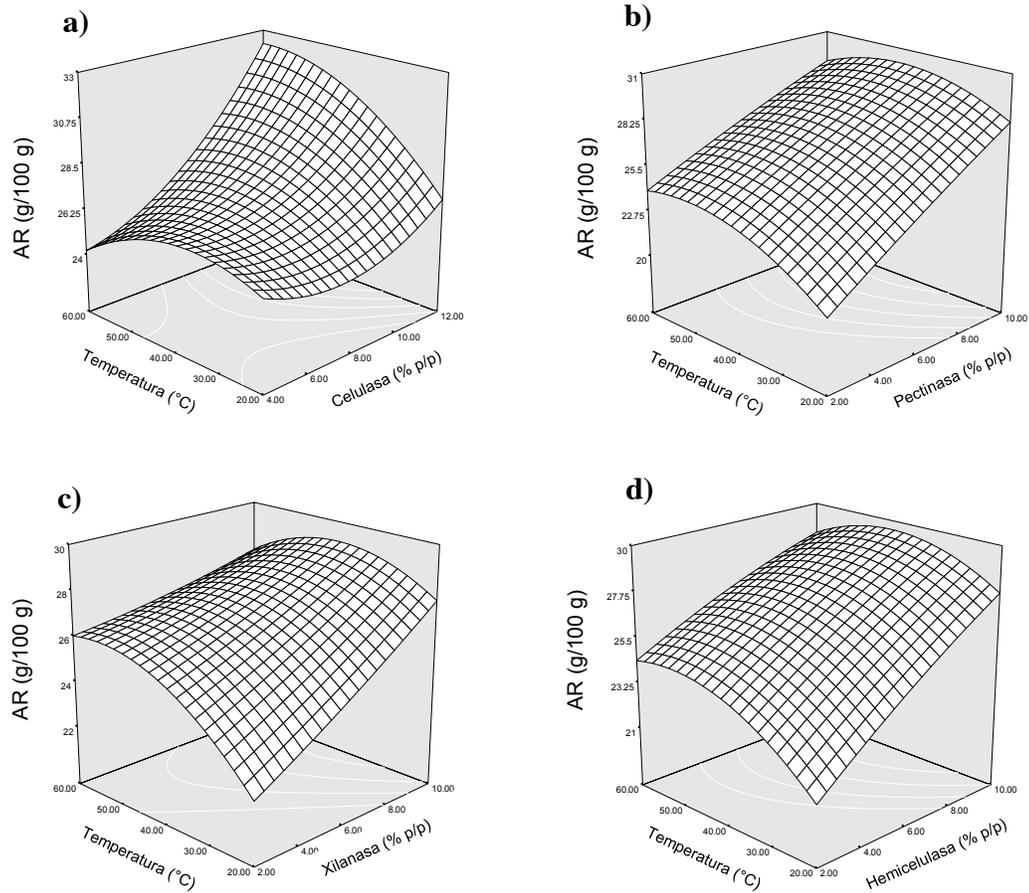


Figura 34. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanasa-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el contenido de azúcares reductores.

En esta Figura se muestra claramente el efecto de la temperatura en la producción de azúcares reductores; los cuales como ya es sabido son la base para conocer la actividad de una enzima (Bailey *et al.*, 1992; Romero-Cascales *et al.*, 2012). De esta manera, la menor concentración o liberación de azúcares reductores es obtenida a temperaturas más bajas, los cuales aumentan con el incremento de la temperatura para después disminuir el contenido de AR cuando la temperatura sigue aumentando. Esto es debido a que cuando la temperatura está dentro de las temperaturas de efecto adecuadas, la actividad catalizadora de la enzima aumenta con el incremento de la temperatura enzima y por lo tanto también la liberación de AR. Después, cuando la temperatura es más alta que la temperatura de efecto adecuada, la actividad de la enzima disminuye con el incremento de la temperatura disminuyendo también el contenido de AR. Esta tendencia ya ha sido reportada en otros estudios durante la extracción de polisacáridos de otras fuentes vegetales (Liu *et al.*, 2009; Zou y Guo 2010; Yin *et al.*, 2011; Puri *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2015). Como se observa en la Figura 34 las interacciones de la temperatura con las enzimas pectinasa, xilanasa y hemicelulasa fueron similares, sin embargo, la interacción con la celulasa (Figura 34a) es un poco diferente, mostrando menor contenido de AR a mayor temperatura. Esto quizás se debe a que la enzima celulasa es más susceptible a las temperaturas altas y por lo tanto se desnaturalizó a dichas temperaturas disminuyendo su actividad (Pan *et al.*, 2015). Las tendencias en lo obtenido para los AR son consistentes o similares a lo encontrado para los azúcares individuales glucosa y fructosa, debido a que el efecto reductor lo brindan principalmente a éstos 2 azúcares. Por lo tanto, las superficies de respuesta de todas las interacciones no se presentan.

7.4.6.4. Contenido de fructanos totales (FRU)

La Tabla 30 muestra como el contenido de FRU varió de 39.94 g/100 g a 47.63 g/100 g. El análisis de varianza (Tabla 31) mostró que las 4 enzimas, así como la temperatura afectaron significativamente ($P < 0.05$) la extracción de fructanos. El modelo de segundo orden para este diseño predijo adecuadamente la variabilidad de los datos en un 99.19, observándose una topografía de punto silla (Fig. 35) con una solución a un punto crítico

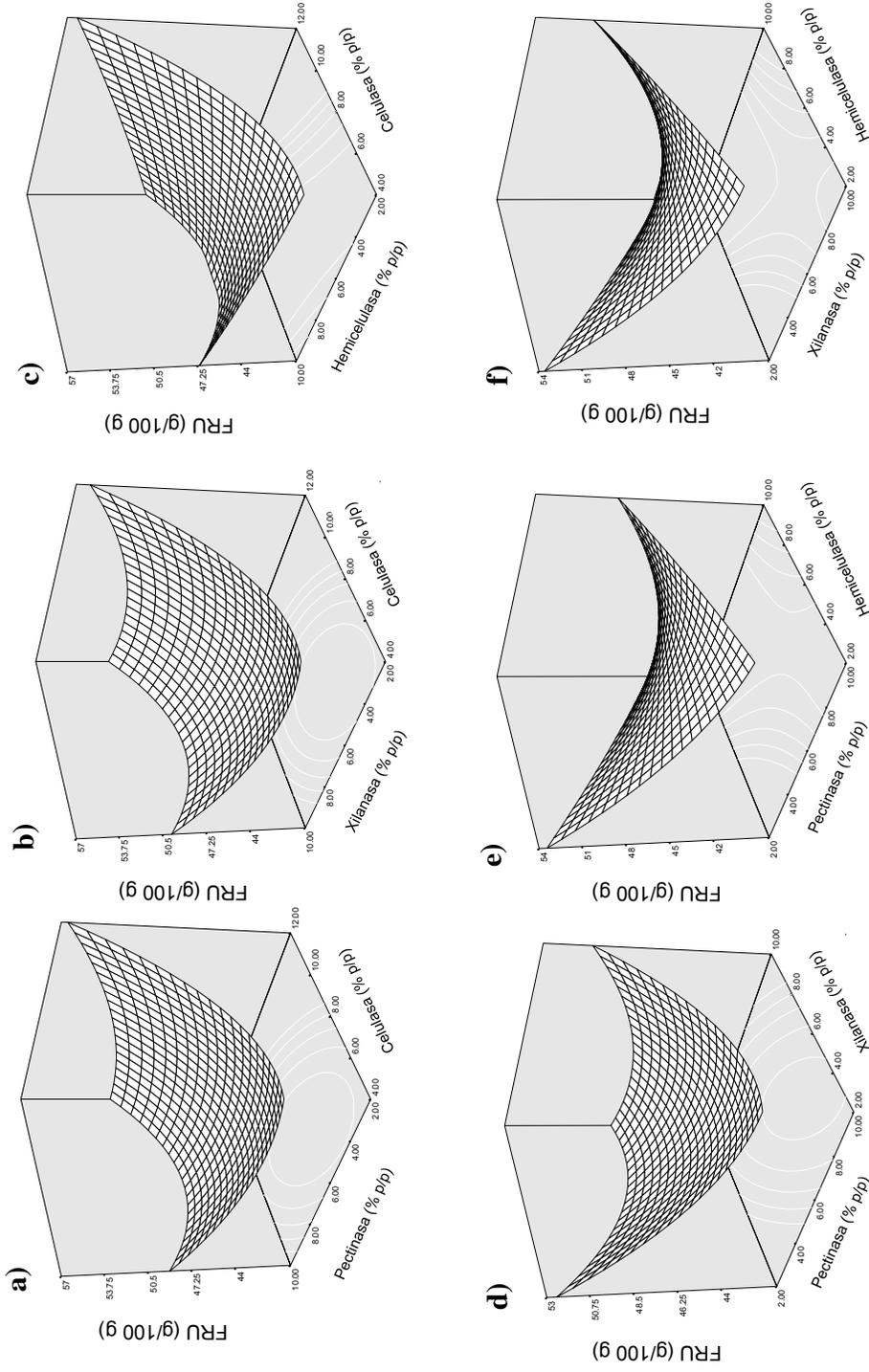


Figura 35. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanasa (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanasa (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanasa-hemicelulasa (f) sobre el contenido de fructanos totales.

con concentraciones de las enzimas celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa de 6.58%, 7.365, 4.94%, 5.10%, respectivamente, y una temperatura de 43.83 °C para la obtención de 44.73 g/100 g de FRU de sotol.

El modelo de regresión de segundo orden relacionando el contenido de FRU de sotol, con las variables independientes se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 Y = & 45.11 + 1.43X_1 - 0.44X_2 - 0.059X_3 - 0.82X_4 + 0.42X_5 + 0.88X_1^2 \\
 & + 0.42X_2^2 + 0.52X_3^2 + 0.073X_4^2 - 1.08X_5^2 - 0.63X_1X_2 \quad \text{Ec. 22} \\
 & - 0.58X_1X_3 - 0.72X_1X_4 - 1.01X_1X_5 + 0.66X_2X_3 + 0.97X_2X_4 \\
 & + 0.53X_2X_5 + 1.09X_3X_4 + 0.62X_3X_5 + 0.77X_4X_5
 \end{aligned}$$

Para el caso de la ecuación 22 el contenido de FRU fueron considerados como la variable dependiente o respuesta Y .

En la Tabla 31 también se muestra que las enzimas excepto la xilanasa y la temperatura fueron significativas ($P < 0.05$) en su efecto lineal. Asimismo, las interacciones entre variables menos la de celulasa-xilanasa (AC) y las enzimas en su efecto cuadrático excepto la hemicelulasa (D) fueron significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 35 se observa que las tendencias de extracción de mayor contenido de FRU se encontraron con la interacción de la celulasa-pectinasa, celulasasa-xilanasa y celulasa-hemicelulasa (Figura 35a, b, c), dichas interacciones con la concentración más alta de celulasa y con la concentración más baja de las otras 3 enzimas, indicando el fuerte efecto de la celulasa sobre la extracción de FRU de sotol. En caso contrario con las interacciones de las demás enzimas pectinasa-xilasa, pectinasa-hemicelulasa y xilanasa-hemicelulasa (Figura 35d, e, f) se logra alcanzar la máxima concentración de FRU con las concentraciones más bajas de dichas enzimas. Para la interacción de las enzimas con la temperatura (Figura 36) se encontró la misma tendencia que para el REP y los AR, mostrando la gran importancia que tiene la temperatura durante la extracción asistida con enzimas. Es decir, bajas concentraciones de fructanos a bajas temperaturas y conforme se va incrementando el contenido de FRU aumenta hasta disminuir a cierta temperatura y causar una baja extracción a temperaturas altas.

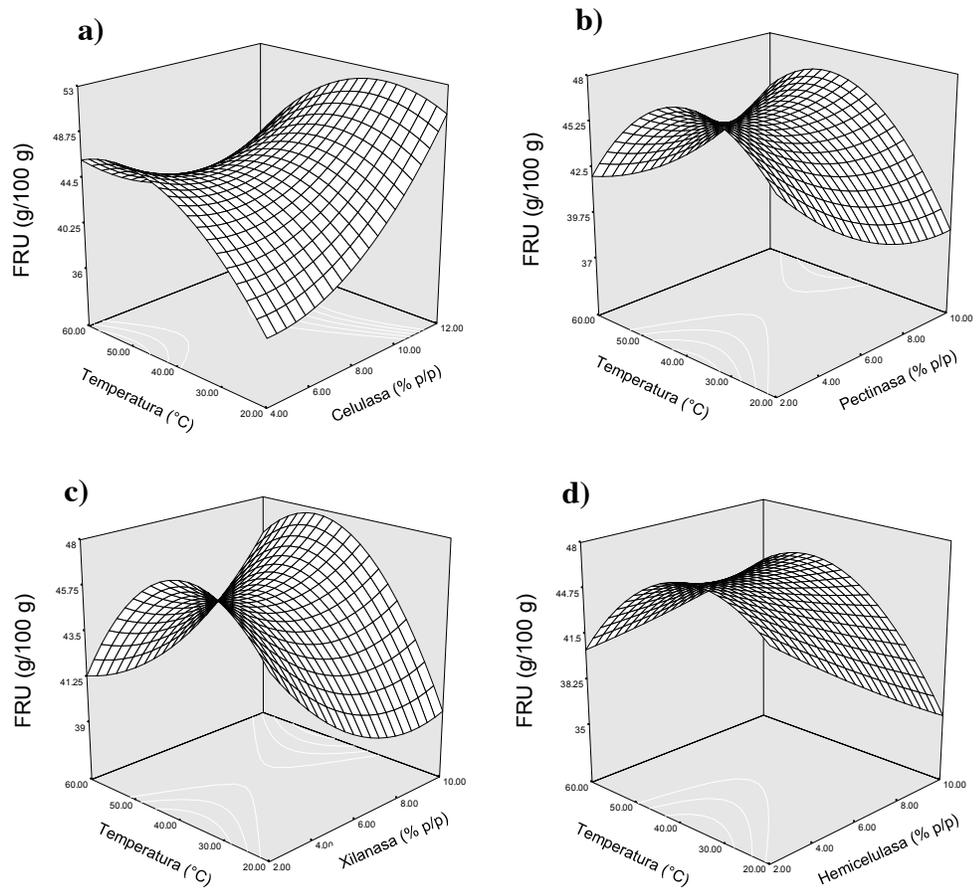


Figura 36. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanasa-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el contenido fructanos totales

Una tendencia similar fue observada para las 4 enzimas (Figura 36a, b, c, d). Esto debido a lo ya explicado en las secciones anteriores de REP y AR.

Es importante resaltar que el contenido de fructanos encontrado en este estudio fue mayor a otros estudios en los cuales también extrajeron fructanos de sotol fresco en sistemas enzimáticos similares. Pardo-Rueda *et al.* (2015) reportó bajos contenidos de fructanos (29.55 g/100 g b.s.) a partir de plantas de sotol (*Dasyilirion leiophyllum*) con un pre-tratamiento enzimático usando Pectinex Ultra SP-L a 40 °C. Sánchez-Madrugal *et al.* (2018) reportó contenidos de fructanos un poco mayores encontrando la máxima concentración de 39.20 g/100 g b.s. a partir de sotol fresco (*Dasyilirion wheeleri*) a cierta concentración de Pectinex Ultra SP-L a 30 °C. En este estudio la máxima concentración de fructanos fue de 47.63 g/100 g.

7.4.6.5. Grado de polimerización promedio (GP_n)

El GP_n de los extractos se muestra en la Tabla 30, los cuales oscilaron de 1.81 a 0.84. Las 4 enzimas, así como la temperatura afectaron significativamente ($P < 0.05$) el GP_n (Tabla 31). El análisis de varianza demostró que el modelo de segundo orden propuesto se ajustó adecuadamente, explicando el 99.43% de la variación de los datos (Tabla 31).

El modelo ajustado para el GP_n presentó una topografía de punto máximo, a un punto crítico con concentraciones de celulasa de 3.02%, de pectinasa de 1.36%, de xilanasas de 4.02, de hemicelulasa de 4.13% y a una temperatura fuera del rango experimental para la obtención de un GP_n de 2.15.

El modelo de regresión de segundo orden relacionando el GP_n de los extractos de sotol, con las variables independientes se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 Y = & 1.77 - 0.13X_1 - 0.15X_2 - 0.12X_3 - 0.14X_4 - 0.017X_5 - 0.18X_1^2 \\
 & - 0.15X_2^2 - 0.16X_3^2 - 0.15X_4^2 - 0.042X_5^2 - 0.10X_1X_2 \\
 & - 0.053X_1X_3 - 0.085X_1X_4 - 0.15X_1X_5 + 0.00686X_2X_3 \\
 & - 0.011X_2X_4 - 0.10X_5 + 0.049X_3X_4 - 0.033X_3X_5 \\
 & - 0.042X_4X_5
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 23}$$

Para el caso de la ecuación 23 el GP_n fue considerado como la variable dependiente o respuesta Y .

Para esta respuesta todas las enzimas excepto la temperatura fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en su efecto lineal (Tabla 31). De igual manera fueron significativas las interacciones AB, AD, AE y BE, es decir, celulasa-pectinasa, celulasa-hemicelulasa, celulasa-temperatura y pectinasa-temperatura. En su efecto cuadrático tanto las 4 enzimas como la temperatura presentaron significancia para el modelo ($P < 0.05$). La Figura 37 muestra las superficies de respuesta de las interacciones de las enzimas en las cuales se observa la tendencia al máximo mencionado anteriormente, lo que indica que a concentraciones intermedias de las enzimas se obtiene el máximo grado de polimerización.

Como ya se mencionó la temperatura también afectó el GP_n siendo más claro en las superficies de respuesta de las interacciones de las enzimas con esta variable. En primer lugar, se observa que a bajas temperaturas de extracción el GP_n es mayor que a temperaturas más altas, esto puede ser debido a que a temperaturas altas ocurre hidrólisis en la molécula de los fructanos, como ha sido reportado en otros estudios (Madrigal y Sangronis, 2007; Zhu *et al.*, 2016) disminuyendo así su grado de polimerización. Esto se observa en la Figura 38 donde conforme aumenta la temperatura el GP_n aumenta ligeramente, disminuyendo a temperaturas más altas. Resultados similares fueron reportados por Sánchez-Madrigal *et al.* (2017a; 2017b; 2018) durante la extracción de fructanos de agave y sotol, respectivamente a 90 °C.

Los grados de polimerización encontrados en este estudio son muy bajos en comparación con otros estudios en los cuales han extraídos fructanos de plantas de *Agave tequilana* (Waleck *et al.*, 2008; Montañez-Soto *et al.*, 2011; Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017a) y de plantas de *Dasyilirion wheeleri* (Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017b; 2018).

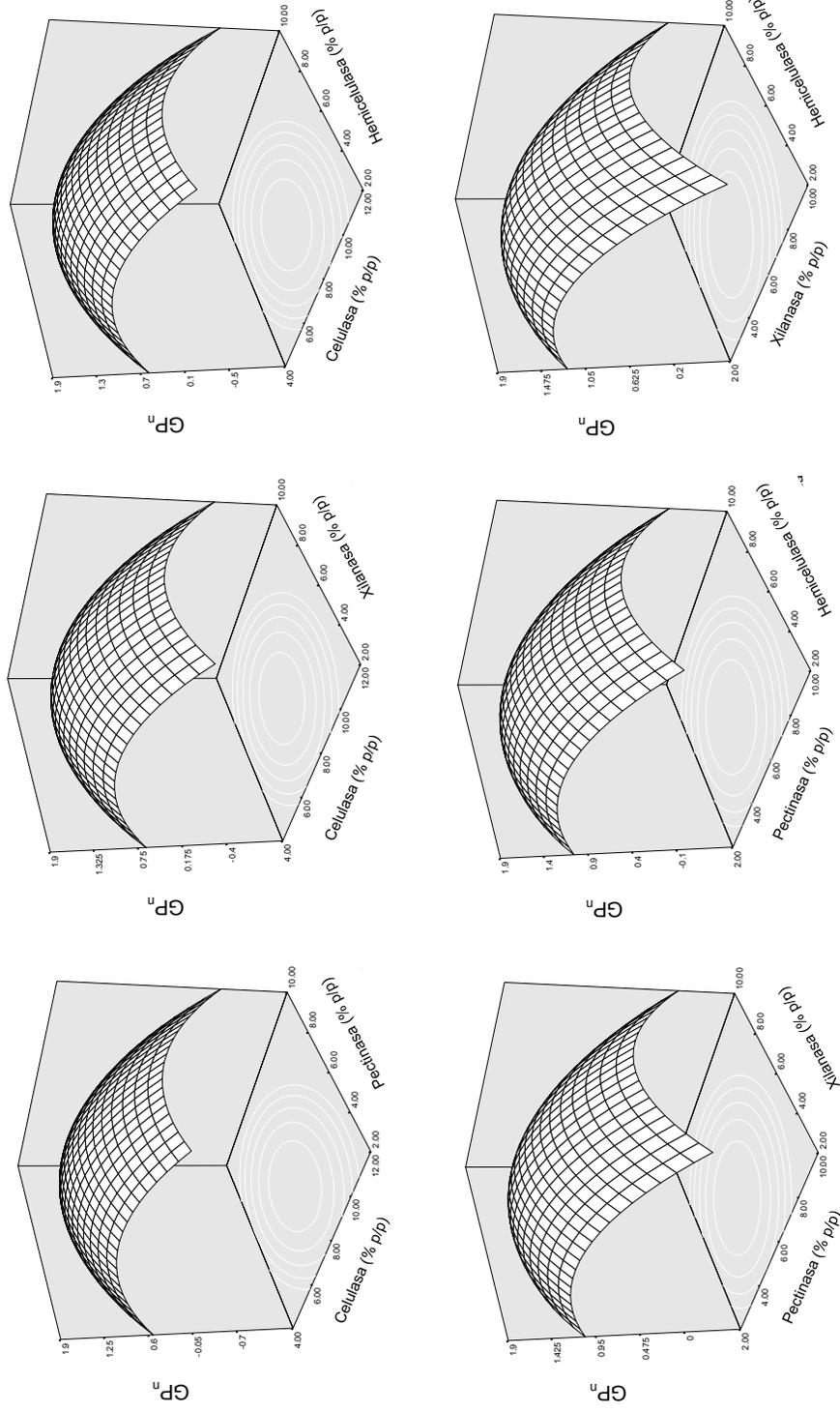


Figura 37. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas en sus diferentes interacciones; celulasa-pectinasa (a), celulasa-xilanasa (b), celulasa-hemicelulasa (c), pectinasa-xilanasa (d), pectinasa-hemicelulasa (e) y xilanasa-hemicelulasa (f) sobre el GP_n.

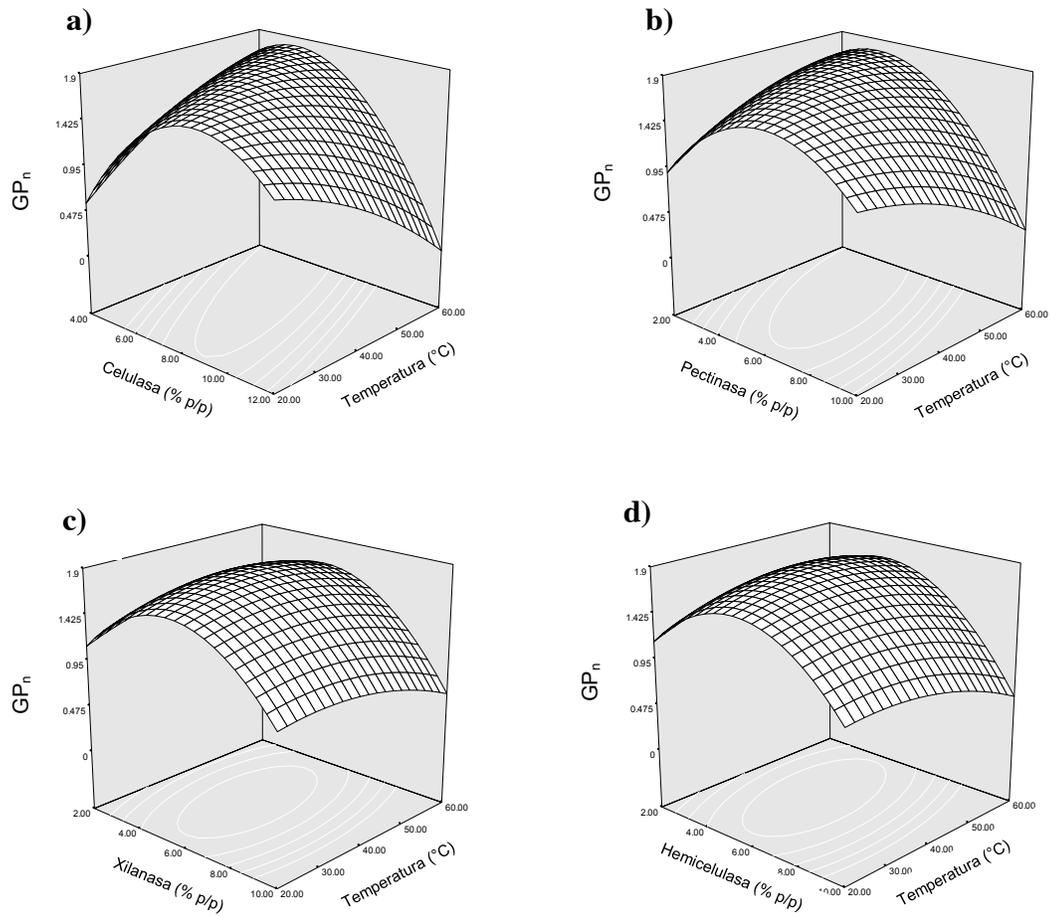


Figura 38. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la concentración de las enzimas y la temperatura en sus diferentes interacciones; celulasa-temperatura (a), pectinasa-temperatura (b), xilanasas-temperatura (c) y hemicelulasa-temperatura (d) sobre el GP_n .

En estos 2 últimos reportaron GP_n de hasta 10.56 durante la extracción asistida con ultrasonido y desde 5.70 hasta 16.67 durante la extracción asistida con el coctel enzimático Pectinex Ultra SP-L, respectivamente. Aunque los grados de polimerización en este tipo de plantas tiene que ver mucho la edad de las plantas (Mellado-Mojica y López, 2012; Sánchez-Madrugal *et al.*, 2017a), las cuales no eran las mismas entre estudios, se puede decir que al tratarse de un tratamiento enzimático con 4 diferentes enzimas, posiblemente éstas tuvieron un gran efecto en el rompimiento de la molécula de los fructanos.

7.4.7. Optimización del proceso de extracción de fructanos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) asistido con enzimas

A través de la aplicación de análisis canónico (Myers, 1971) se localizaron los puntos estacionarios para las respuestas FRU, REP y AR. A través de la técnica de optimización gráfica de multirespuestas (Quintero-Ramos *et al.*, 2002; Gómez-Moriel *et al.*, 2011), se agruparon los valores para seleccionar una optimización general de este proceso. El criterio aplicado para esta optimización gráfica fue encontrar las condiciones que dieran lo valores más altos de FRU y REP con los valores más bajos de AR. La condición óptima para este proceso fue basada en encontrar la región la cual satisface el criterio explicado anteriormente. La sobreposición de las gráficas de contorno de las gráficas individuales de FRU, REP y AR, se usó para determinar la región óptima, indicada por el área de diferente color (Figura 39). Para realizar dicha optimización gráfica se eligió la respuesta de contenido de FRU, en la que de acuerdo con el análisis de varianza las variables independientes que tuvieron mayor efecto sobre el modelo fueron la concentración de celulasa y la temperatura (Tabla 31). Por lo tanto las concentraciones de las demás enzimas se fijaron en 4%, con esto al elegir un punto dentro del área marcada en la Figura 39, se encontró que a una concentración de celulasa de 8.03% y una temperatura de 39.03 °C permite obtener un contenido de FRU de 50.36 g/100 g, un REP de 71.76%, un contenido de AR de 21.66 g/100 g, de glucosa de 5.34 g/100 g, de fructosa de 3.95 g/100 g, sacarosa de 0.72 g/100 g y un GP_n de 1.74.

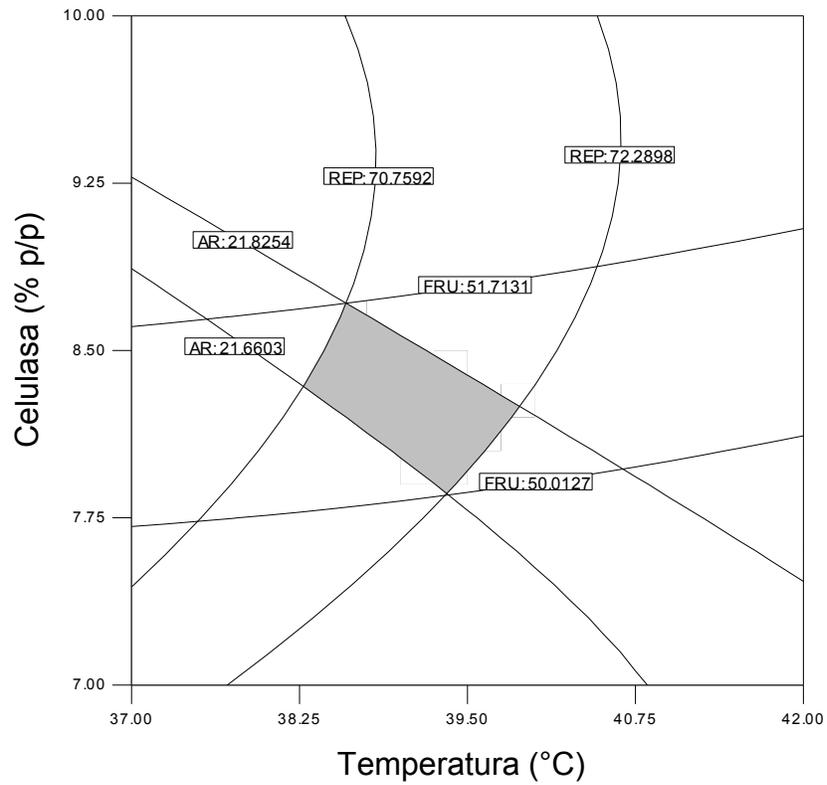


Figura 39. Región optimizada de la superposición de las gráficas de contorno de los extractos de sotol obtenidos por extracción asistida con enzimas, manteniendo fijas las concentraciones de las enzimas pectinasa, xilanasa y hemicelulasa en 4%. FRU, REP, AR.

7.5. Estudio No. 5

Optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de plantas de sotol silvestre (*Dasyilirion wheeleri*)

7.5.1. Caracterización fisicoquímica de las plantas de sotol

Para este estudio se utilizó el mismo polvo de sotol obtenido en el estudio anterior.

7.5.2. Efecto de diferentes tratamientos de extracción en el rendimiento de la extracción de polisacáridos de sotol (selección de tratamientos sinérgicos)

Se combinaron tratamientos independientes de extracción enzimática y ultrasonido para investigar si la extracción asistida con ultrasonido y la extracción asistida con ultrasonido podrían funcionar de forma sinérgica para aumentar los rendimientos de extracción de polisacáridos de sotol. La Figura 40 muestra el rendimiento de extracción (REP) de sotol bajo diferentes tratamientos de extracción. Como ya se demostró anteriormente, los tratamientos asistidos con ultrasonido o con enzimas pueden incrementar significativamente el REP de sotol ($P < 0.05$) debido a que en la extracción enzimática se utilizan como en este estudio; celulasas, pectinasas, xilanasas y hemicelulasas para hidrolizar y degradar los componentes de la pared celular de las plantas para mejorar la liberación de los diferentes compuestos bioactivos intracelulares (Pinelo *et al.*, 2006; Karki *et al.*, 2011; Puri *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014) y la extracción con ultrasonido utiliza la cavitación ultrasónica, el cual es el principal factor que mejora esta extracción (Mason *et al.*, 2003; Grönroos, 2010; Chen *et al.*, 2012). Al comparar los tratamientos se encontró que el tratamiento solo con ultrasonido alcanzó un rendimiento significativamente menor ($P < 0.05$) que el tratamiento asistido con enzimas, lo cual indica que las enzimas logran una mayor contribución para mejorar el REP de sotol comparado con el ultrasonido. Este resultado concuerda con otros estudios realizados previamente. You *et al.* (2013) demostraron que la extracción asistida con enzimas extrajo mayor rendimiento de polisacáridos de *Cornus officinalis* que los tratamientos de extracción con agua caliente y la extracción asistida con ultrasonido. Wu *et al.* (2014) también encontraron que la extracción asistida con enzimas da mayores rendimientos que el

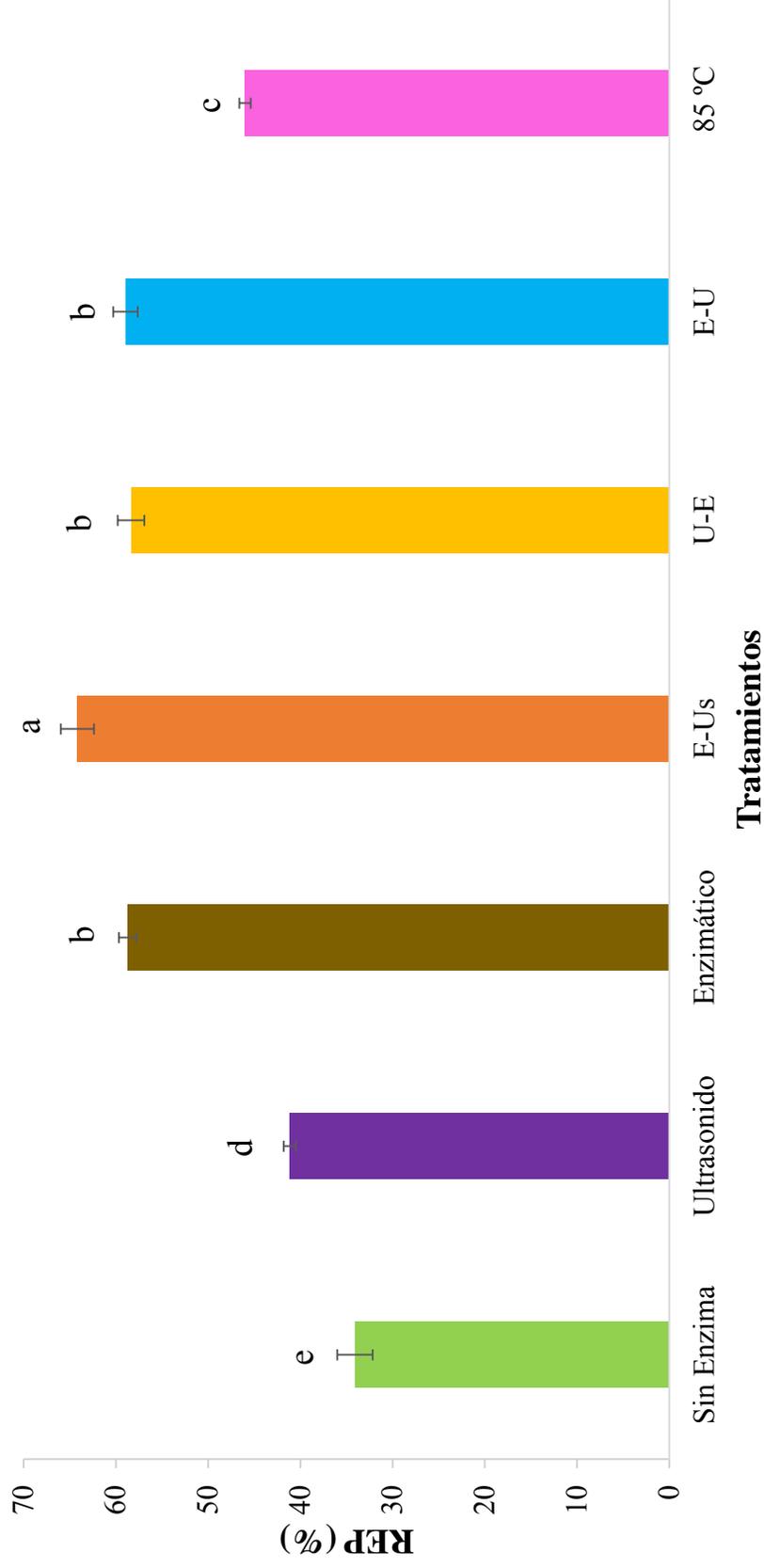


Figura 40. Efecto de diferentes tratamientos de extracción sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol (*Dasytiron wheeleri*). E-Us: tratamiento enzimático asistido con ultrasonido (simultáneo); U-E: tratamiento asistido con ultrasonido seguido de enzimático; E-U: tratamiento enzimático seguido de ultrasonido; tratamiento control a 85 °C. Barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

tratamiento convencional y que el tratamiento asistida solo con ultrasonido durante la extracción de polisacáridos de calabaza (*Cucurbita moschata*). Liao *et al.* (2015) durante la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de *Corbicula fluminea* encontraron mejores resultados que con tratamiento sin ultrasonido.

El efecto de los tratamientos de extracción simples (sin enzima, solo con ultrasonido, enzimático y convencional a 85 °C) así como los tratamientos sinérgicos sobre el REP de sotol se observan en la Figura 40. Esta comparación muestra que las extracciones alternativas por si solas (ultrasonido y enzimático), así como las extracciones por separado primeramente una extracción con ultrasonido seguida de una extracción enzimático (U-E), y otra extracción asistida con enzimas seguida de ultrasonido (E-U); no son la mejor opción para mejorar la eficiencia en el rendimiento de extracción de los polisacáridos presentes en la planta de sotol (*D. wheeleri*), ya que como se puede observar en la Figura 40 la extracción de polisacáridos de sotol es mejorada usando ambos tratamientos simultáneamente (E-U_s) ($P < 0.05$), atribuido a un incremento en el área superficial de contacto entre las fases por efecto de la sonicación, que incrementan la transferencia de masa. Esto ha sido reportado por Capelo *et al.* (2005), donde describe que un aumento en el área de contacto entre las fases causadas por la cavitación reduce las limitaciones de transferencia de masa en el sistema enzima-sustrato. Asimismo, a que una alta intensidad de ultrasonido enfocada causa una reducción simple en el tamaño de las burbujas, lo que permite que más área del sustrato esté en contacto con la enzima. Además, las mejores velocidades de reacción causadas por el ultrasonido se han atribuido a un aumento en las colisiones entre la enzima y el sustrato (Wu *et al.*, 2014). El incremento de la velocidad de transferencia de masa y mejora en las cinéticas enzimáticas en este tipo de sistemas de extracción se atribuye al incremento en el número de burbujas de cavitación causado por el ultrasonido (Tsochatzidis *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2008). De esta manera, el tratamiento enzimático (mezcla de celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa a 10%, 10%, 8% y 10%, respectivamente) asistido con ultrasonido (39 W) realizado simultáneamente (E-U_s), fue elegido para realizar este estudio, por lo tanto, se procedió a optimizar las condiciones de este sistema de extracción.

7.5.3. Efecto de las variables independientes sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol

7.5.3.1. Efecto del tiempo de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos

El efecto del tiempo de ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP) se muestra en la Figura 41. La cinética se realizó obteniendo muestra a 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min para examinar la influencia del REP manteniendo los demás parámetros de extracción fijos: potencia de ultrasonido 39 W, temperatura 40 °C, pH 4.5, concentración de enzima (10% de celulasa, 10% de pectinasa, 8% de xilanasa y 10% de hemicelulasa) y una relación L:S de 50 mL/g.

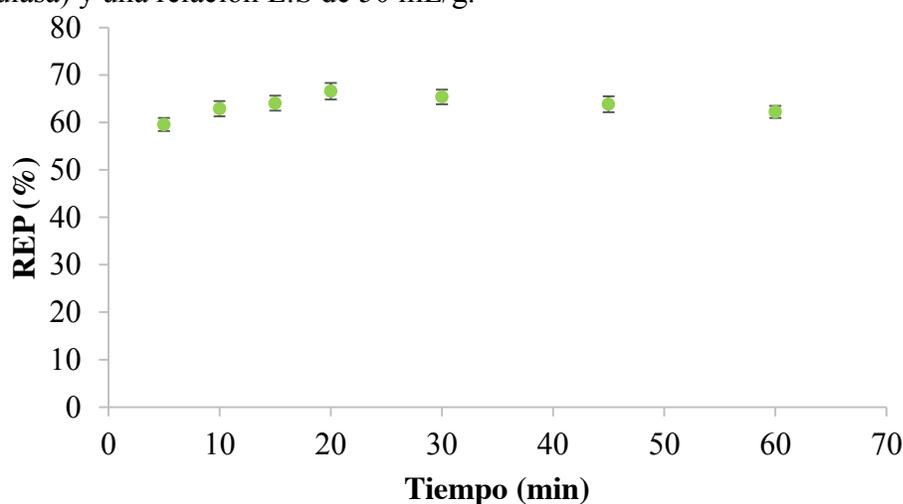


Figura 41. Cinética de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol.

El REP se incrementó con el tiempo de extracción asistida con ultrasonido y alcanzó un valor máximo de 66.56% a los 20 min de extracción, luego la curva comenzó a disminuir ligeramente debido a la pérdida del ultrasonido posproceso (Chen *et al.*, 2007). Este fenómeno también puede ser explicado al daño que sufre la estructura celular, en periodos de tiempo muy cortos (al inicio de la extracción) liberando los polisacáridos; mientras que a tiempos prolongados de extracción el ultrasonido puede inducir a la degradación de los polisacáridos (Liu *et al.*, 2014) disminuyendo el REP. Por lo tanto 20 min se establecieron como el tiempo de máxima extracción para los siguientes experimentos. Tiempos similares de extracción han sido reportados en otros estudios para procesos de extracción

enzimáticos asistidos con ultrasonido de polisacáridos de otras fuentes vegetales; Liu *et al.* (2014) reportaron 20 min como el tiempo en el que encontraron un valor crítico de extracción de polisacáridos de *Lycium barbarum*. Xu *et al.* (2015) reportaron 25 min el cual alcanzaron el máximo rendimiento de extracción de polisacáridos de grosella negra.

7.5.3.2. Efecto de la relación líquido-sólido sobre el rendimiento de polisacáridos

La extracción enzimática asistida con ultrasonido se realizó a diferentes relaciones líquido-sólido (polvo de sotol) manteniendo fijos los demás parámetros de extracción: temperatura 40 °C, pH 4.5, tiempo 20 min, concentración de enzima (10% de celulasa, 10% de pectinasa, 8% de xilanasas y 10% de hemicelulasa) y una potencia de 39 W. Como se muestra en la Figura 42 el REP fue afectado por las diferentes relaciones líquido-sólido. Con un incremento de la relación de 25 mL/g a 50 mL/g el REP aumentó alcanzando una máxima extracción de $66.15\% \pm 0.25$; luego el REP disminuyó con un incremento en la relación líquido-sólido. Esto se debe a que a relaciones líquido-sólido demasiado bajas o demasiado altas no se favorece el movimiento de las células de la planta al sitio activo de la enzima y por lo tanto la transferencia de polisacáridos al medio bajo tratamiento ultrasónico es menor (Wang *et al.*, 2014).

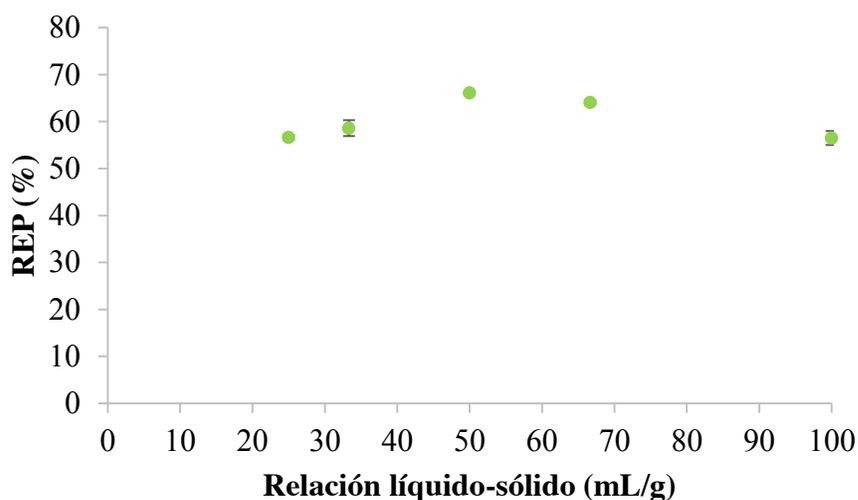


Figura 42. Efecto de la relación líquido-sólido sobre el rendimiento de polisacáridos de sotol.

Estas tendencias en sistemas de extracción similares ya se han reportado durante la extracción de polisacáridos de otras fuentes vegetales (Wu *et al.*, 2104; Xu *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2015). Para este estudio se decidió no explorar dentro del diseño definitivo esta variable, por lo tanto, para el resto de los tratamientos de extracción se fijó la relación líquido-sólido

7.5.3.3. Efecto de la potencia de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos

El rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol a diferentes potencias de ultrasonido de 18-60 W se muestran en la Figura 43, manteniendo los demás parámetros de extracción fijos: temperatura 40 °C, pH 4.5, tiempo 20 min, concentración de enzima (10% de celulasa, 10% de pectinasa, 8% de xilanasas y 10% de hemicelulasa) y una relación L:S de 50 mL/g. Los resultados indicaron rendimientos similares a través de todas las potencias de ultrasonido, solo se observa una insignificante disminución del REP a potencias altas.

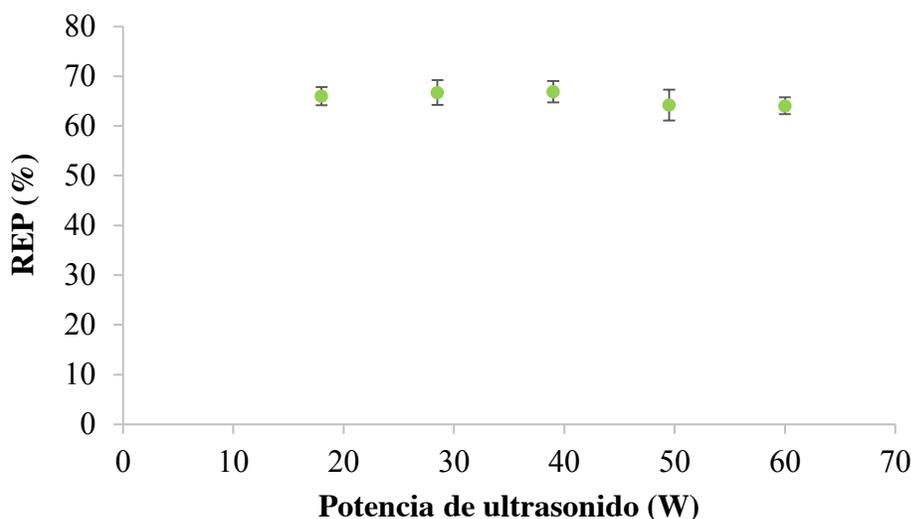


Figura 43. Efecto de la potencia de ultrasonido sobre el rendimiento de polisacáridos de sotol.

Esto puede deberse a que altas potencias de ultrasonido pueden causar la despolimerización de polisacáridos, así como la disminución de la agregación y viscosidad, lo cual resulta en la disminución del rendimiento de extracción (Chen *et al.*,

2012). Liu *et al.* (2014) y Wu *et al.* (2014) reportaron resultados similares durante la extracción de polisacáridos de *Lycium barbarum* y calabaza (*Cucurbita moschata*), respectivamente. Debido a estos resultados y al Liu comparar con otros reportes, se decidió extender los niveles de potencia de ultrasonido ya que el equipo de ultrasonido utilizado en este estudio lo permitía, de esta manera para el diseño definitivo se utilizó, además una potencia más baja y más alta que lo observado en la Figura 43 (11 y 67 W).

7.5.4. Estudio de optimización de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de plantas de sotol

7.5.4.1. Establecimiento de las variables de extracción

Las variables de extracción como el pH, temperatura y concentración de enzima son muy importantes en este tipo de sistemas de extracción. Sin embargo, como se decidió trabajar con la mezcla enzimática encontrada como óptima con el diseño ortogonal del estudio anterior y el pH encontrado como óptimo de dicha mezcla fue de 4.5, se decidió establecerlo como fijo ya que se consideró sin efecto importante para esta extracción. Para el caso de la temperatura no se realizaron estudios de factores simples, solo se decidió estudiar diferentes temperaturas en un rango de acción para la mezcla enzimática de 20, 30, 40, 50 y 60 °C. Además, se decidió incluirlo en el diseño ya que se ha reportado que la extracción asistida con ultrasonido también es afectada por la temperatura (Santos *et al.*, 2009; Grönroos, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Chemat *et al.*, 2017). Para el caso de la concentración de enzima, aunque ya se mencionó que se usó la mezcla y concentraciones óptimas de las 4 enzimas celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa en 10%, 10%, 8% y 10%, respectivamente. Esta se consideró como una mezcla enzimática la cual tiene una actividad no conocida de cada una de las enzimas, ya que solo se encontró que a dicha relación en % p/p con respecto a la cantidad de sotol la extracción de polisacáridos de sotol fue mayor. Por lo tanto, para este estudio ya obtenida dicha mezcla, se decidió investigar diferentes relaciones enzimáticas, es decir, se diluyó en diferentes volúmenes para conocer si en realidad con esa cantidad se obtenían mejores rendimientos o si se podría usar menor cantidad de enzima. Al final de acuerdo con los cálculos

correspondientes se usaron diferentes concentraciones de mezcla enzimática, la cual tenía una concentración inicial de las 4 enzimas de 20 g/L. Al diluir esta solución los diferentes niveles usados en el diseño fueron 0, 1, 2, 3 y 4 g/L.

7.5.4.2. Análisis del diseño y ajuste del modelo al proceso de extracción

En la Tabla 33 se muestran los 20 tratamientos del diseño central compuesto al combinar de las diferentes variables independientes usadas para este estudio: potencia de ultrasonido (X_1), temperatura de extracción (X_2) y concentración de enzima (X_3). Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos para el rendimiento de extracción de polisacáridos (REP), azúcares reductores (AR), fructanos totales (FRU), glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio (GP_n) son mostrados en la Tabla 33.

El análisis de varianza de los resultados para todas las respuestas es presentado en la Tabla 34 y los coeficientes de regresión obtenidos por el modelo de segundo orden ajustado a los datos experimentales se encuentran en la Tabla 34.

En general, la potencia de ultrasonido, la temperatura y la concentración de la mezcla enzimática afectaron significativamente ($P < 0.05$) a todas las respuestas.

El modelo ajustado de segundo orden explicó satisfactoriamente la variabilidad de los datos para la mayoría de las respuestas con $R^2 > 0.85$. Valores mayores de 0.85 indican que el modelo es apto, sugiriendo para este estudio que el diseño experimental propuesto fue adecuado para la predicción de las diferentes respuestas evaluadas en la extracción enzimática de fructanos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) asistida con ultrasonido.

7.5.4.3. Rendimiento de extracción de polisacáridos (REP)

Durante la extracción enzimática asistida con ultrasonido, el REP varió de 48.60 a 72.08% (Tabla 33). Las 3 variables: potencia de ultrasonido, temperatura y la concentración de enzimas afectaron significativamente ($P < 0.05$) el REP (Tabla 34). El análisis de varianza demostró que el modelo de regresión de segundo orden propuesto se ajustó adecuadamente, explicando el 87.19% de la variación de los datos (Tabla 34).

Tabla 33. Diseño central compuesto y resultados de rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (*Dasyliroa wheeleri*).

Tratamientos	PU (W)	T (°C)	[] Enzimas (g/L)	REP (%)	AR (g/100 g)	FRU (g/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	GP _n
1	25	30	1	50.00	9.48	42.95	3.187	1.363	0.676	1.198
2	53	30	1	52.09	10.02	43.69	3.380	1.451	0.654	1.259
3	25	50	1	54.48	10.37	44.90	3.467	1.500	0.916	1.313
4	53	50	1	58.84	10.46	46.76	3.475	1.544	0.879	1.368
5	25	30	3	57.79	16.95	45.09	7.609	2.573	0.395	1.509
6	53	30	3	60.63	17.87	47.17	8.881	2.614	0.385	1.479
7	25	50	3	61.35	18.52	48.03	9.131	2.641	0.620	1.384
8	53	50	3	64.64	19.09	50.48	9.150	2.752	0.516	1.304
9	11	40	2	57.60	13.58	47.12	6.033	2.062	0.446	1.433
10	67	40	2	62.60	15.01	48.16	6.298	2.186	0.418	1.433
11	39	20	2	53.15	13.16	44.34	5.230	2.047	0.342	1.292
12	39	60	2	63.79	13.60	49.86	5.245	2.069	1.141	1.237
13	39	40	0	48.60	4.64	41.89	0.630	0.514	1.176	1.215
14	39	40	4	72.08	21.54	51.52	10.806	3.169	0.554	1.369
15	39	40	2	65.69	14.45	49.20	6.491	2.266	0.331	1.152
16	39	40	2	67.25	14.23	50.19	6.561	2.226	0.321	1.209
17	39	40	2	64.96	15.16	51.09	6.462	2.195	0.327	1.073
18	39	40	2	69.38	14.24	48.35	6.314	2.339	0.413	1.106
19	39	40	2	67.09	14.20	50.04	6.119	2.299	0.432	1.162
20	39	40	2	70.13	15.14	49.60	6.108	2.394	0.435	1.232
Control	---	85	---	46.01	13.79	48.95	3.758	1.835	0.359	1.220

*Los valores presentes son el promedio tres mediciones. PU, Potencia de ultrasonido; T, temperatura; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 34. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polisacáridos, azúcares reductores, fructanos, glucosa, fructosa, sacarosa y grado de polimerización promedio de la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Fuente	Cuadrados medios									
	GL	REP	AR	FRU	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	GP _n		
Model	9	87.07*	31.01*	15.00*	12.38*	0.74*	0.14*	0.028*		
A-PU	1	8.07×10 ⁻⁴	0.12	0.54	0.16	1.06×10 ⁻⁴	4.50×10 ⁻⁴	6.39×10 ⁻³		
B-Temperatura	1	1.08	0.30	0.33	0.26	2.93×10 ⁻⁵	5.40×10 ⁻⁴	0.035*		
C-[] Enzima	1	106.39*	1.87*	19.30*	0.22	0.26*	0.37*	0.042*		
AB	1	0.92	0.082	0.28	0.26	9.54×10 ⁻⁵	1.48×10 ⁻³	4.00×10 ⁻⁴		
AC	1	0.013	0.096	0.46	0.15	4.82×10 ⁻⁵	3.91×10 ⁻⁴	6.40×10 ⁻³		
BC	1	1.67	0.27	0.19	0.25	7.12×10 ⁻⁵	1.48×10 ⁻³	0.034*		
A ²	1	121.93*	0.048	11.56*	0.021	0.046*	6.60×10 ⁻³	0.14*		
B ²	1	171.28*	1.87*	16.57*	1.71*	0.088*	0.22*	0.028*		
C ²	1	115.40*	3.01*	20.91*	0.50*	0.32*	0.39*	0.040*		
Residual	10	11.51	0.22	2.10	0.085	6.19×10 ⁻³	5.75×10 ⁻³	4.05×10 ⁻³		
Falta de ajuste	5	18.96	0.24	3.32	0.13	7.01×10 ⁻³	8.45×10 ⁻³	4.48×10 ⁻³		
Error puro	5	4.07	0.21	0.88	0.038	5.37×10 ⁻³	3.06×10 ⁻³	3.62×10 ⁻³		
R ²		0.8719	0.9921	0.8653	0.9924	0.9908	0.9566	0.8607		

*Significancia a $P < 0.05$. PU, Potencia de ultrasonido; REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

Tabla 35. Coeficientes del modelo de segundo orden para la relación entre las variables (potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzima) para la extracción enzimática asistida con ultrasonido de polisacáridos de sotol (*Dasyliirion wheeleri*).

Coefficient	REP	AR	FRU	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	GP _n
b_0	-1479.99*	-141.53*	-609.92*	-31.15*	-69.07*	93.76*	34.06*
b_1	0.28	3.37	7.31	3.94	0.10	-0.21	-0.79
b_2	-10.29	5.46	5.73	5.10	-0.054	-0.23	-1.85
b_3	-1728.38*	-229.09*	-736.22*	-79.22	-85.86*	102.35*	34.45*
b_{12}	0.34	-0.10	0.19	-0.18	-3.45×10^{-3}	-0.014	-7.07×10^{-3} *
b_{13}	-0.61	1.64	3.61	2.04	0.037	-0.10	-0.42
b_{23}	-6.86	2.76	2.32	2.66	-0.045	-0.20	-0.98*
b_{11}	-2.20*	-0.044	-0.68*	-0.029	-0.043*	0.016	0.075*
b_{22}	-2.61*	-0.27*	-0.81*	-0.26*	-0.059*	0.094*	0.033*
b_{33}	-482.04*	-77.91*	-205.17*	-31.67*	-25.52*	28.03*	9.02*

*Significancia a $P < 0.05$. REP, rendimiento de extracción de polisacáridos; AR, azúcares reductores; FRU, fructanos totales; GP_n, grado de polimerización promedio.

La concentración de enzimas en su efecto lineal y las 3 variables en su efecto cuadrático afectaron significativamente ($P < 0.05$) al REP. Para observar los efectos combinados de dos parámetros de extracción sobre el REP, se generó la respuesta en función de dos variables independientes a valor constante. Una variable fue mantenida constante en su respectivo valor de rango central y las otras dos variables variaron dentro de sus rangos experimentales para comprender sus efectos principales e interactivos sobre las variables dependientes. En la Figura 44 se muestran los resultados de la influencia interactiva de la potencia de ultrasonido, temperatura de extracción y concentración de enzimas sobre el REP. Esto también fue usado para determinar las condiciones óptimas. De acuerdo con la Figura 44, las diferentes gráficas muestran una topografía con un valor máximo de 69.95% de REP de sotol, a una potencia de ultrasonido de 43.79 W, temperatura de extracción de 44.09 °C y concentración de enzima de 3.06 g/L. La Figura 44a-b muestra el REP en función la potencia de ultrasonido (X_1) y la temperatura (X_2) y concentración de enzimas (X_3), respectivamente; mientras que la Figura 44c en función de la temperatura (X_2) y la concentración de enzimas (X_3).

En las 3 superficies de respuesta se observa una tendencia al máximo, en donde el REP presentó un incremento al aumentar la temperatura y la potencia de ultrasonido (Figura 44a), hasta alcanzar un máximo y decreciendo posteriormente con incrementos posteriores de ambas variables. Un comportamiento similar, se presentó en la Figura 44 (b, y c) para las interacciones de potencia ultrasónica-enzima y temperatura-enzima, respectivamente. Donde se alcanzaron valores máximos de REP para luego disminuir con incrementos de dichas variables. Respecto a la temperatura, el incremento de los rendimientos de extracción al aumentar la temperatura puede ser debido a varias causas; una de ellas es que se disminuye la viscosidad del solvente, lo que favorece una mejora en la permeabilidad del solvente en la matriz de las partículas, ocurriendo una mayor desorción de los polisacáridos estrechamente unidos en la matriz de la planta, traduciendo esto en un mayor coeficiente de difusión de polisacáridos y una mayor solubilidad de polisacáridos en el solvente de extracción (Li *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012). Además, se mejoran las actividades catalizadoras de las enzimas para romper la pared celular de la

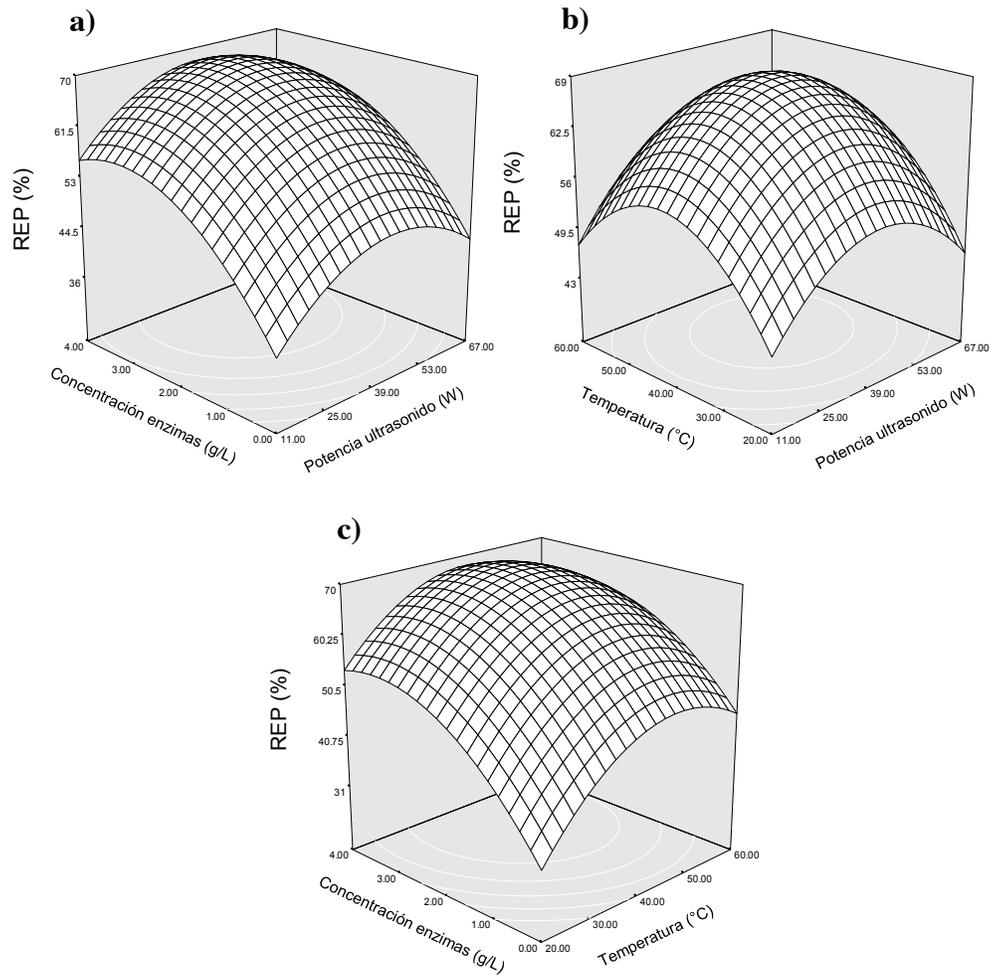


Figura 44. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el rendimiento de extracción de polisacáridos.

planta e hidrolizar los polisacáridos estructurales y favorecer la liberación de polisacáridos (Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). Sin embargo, al seguir incrementando la temperatura, el REP disminuye, esto pudiéndose atribuir a que a altas temperaturas se disminuye el número de burbujas de cavitación generadas por el ultrasonido debilitando el impacto del colapso en la cavidad en muestras homogéneas (Palma y Barroso 2002; Wu *et al.*, 2014), asimismo se disminuye la bioactividad enzimática (Yin *et al.*, 2011) y a la degradación térmica de los polisacáridos (Chen *et al.*, 2012). En cuanto a la potencia de ultrasonido el aumento del REP de sotol al incrementar ésta, se debe a la vibración que se produce en las interfaces entre el solvente y la matriz sólida causada por las ondas ultrasónicas. Dicho aumento en el REP, como ya se ha mencionado se debió al aumento en el número de las burbujas de cavitación formadas y con esto al aumento de la velocidades de transferencia de masa (Li *et al.*, 2007). De acuerdo con Talukder *et al.* (2006) cuando se combinan enzimas con ultrasonido, la extracción durante cortos tiempos puede mejorar la actividad de las enzimas. Además, otros estudios (Vargas *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Tran y Le, 2011) han reportado que la sonicación a bajas frecuencias puede incrementar la actividad de algunas enzimas como las pectinasas pudiendo desintegrar la pared celular y membranas de diferentes fuentes vegetales liberando sus compuestos bioactivos. Por lo tanto, un aumento de la potencia de ultrasonido hasta cierto grado provoca un aumento en los rendimientos de extracción (Figura 44a-b), disminuyendo a potencias altas pudiéndose deber también a la inactivación de las enzimas. Asimismo, altas potencias causan un aumento en el número de burbujas en el solvente de extracción durante la cavitación, reduciéndose la eficiencia de la energía ultrasónica transmitida al medio. Al mismo tiempo, la aplicación de ultrasonido a altas potencias también causa, despolimerización, agregación y disminución de la viscosidad de los polisacáridos, lo que da lugar a la disminución del REP (Chen *et al.*, 2012). Para el caso de la concentración de enzimas, conforme es aumentada el REP de sotol también se incrementa (Figura 44b-c) esto debido como ya se ha mencionado a su efecto en la degradación de la pared celular de las plantas e hidrólisis de sus polisacáridos estructurales (Puri *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014). Después de cierta concentración el REP empieza a disminuir, esto debido a

que altas concentraciones de enzimas hay mayor hidrólisis causando una mayor obtención de productos solubles (azúcares), los cuales forman complejos con las enzimas, resultando en una inhibición por producto, en este caso el REP (Ladish *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 2015).

7.5.4.4. Azúcares reductores (AR)

El contenido de AR durante la extracción enzimática asistida con ultrasonido varió de 4.64 a 19.09 g/100 g (Tabla 33) En el efecto lineal solo la concentración de enzimas afectó significativamente ($P < 0.05$) la liberación de AR, siendo significativa ($P < 0.05$) en su efecto cuadrático la temperatura de extracción y la concentración de enzimas. De acuerdo con el ANOVA se demostró que el modelo cuadrático propuesto se ajustó adecuadamente explicando la variabilidad de los datos experimentales en un 99.21% (Tabla 34). Para esta respuesta el modelo dio una tendencia al máximo, de acuerdo con el análisis de cordillera, prediciendo los valores óptimos fuera de rango de los niveles experimentales, esto debido probablemente a lo encontrado por efecto de la concentración de enzimas, es decir, mayor liberación de AR entre mayor enzima añadida. En la Figura 45 se muestran las superficies de respuesta de las interacciones de las diferentes variables potencia-temperatura (a), potencia-enzima (b), temperatura-enzima (c). En la primera (Fig. 45a) se observa claramente que a altas potencias la liberación de AR aumentó, esto debido a que el efecto sonomecánico del ultrasonido induce a la ruptura celular promoviendo el desprendimiento de azúcares reductores de la pared celular (Toma *et al.*, 2001; Lingyun *et al.*, 2007; Ebringerová y Hromádková, 2010). Para el efecto de la temperatura se observa que con el aumento de ésta a potencias bajas la liberación de AR se incrementa para después disminuir a mayor temperatura, esto puede ser atribuido a que a altas temperaturas la actividad de las enzimas disminuye, decreciendo el contenido de AR, sin embargo, este efecto también es observado a potencias de ultrasonido altas, con una tendencia de incremento en el contenido de AR. En estas condiciones los menores contenidos de AR son debidos a que a altas temperaturas se reduce la cavitación durante la aplicación del ultrasonido, contrarrestando así su efecto (Zhang *et al.*, 2013; Pardo-Rueda *et al.*, 2015).

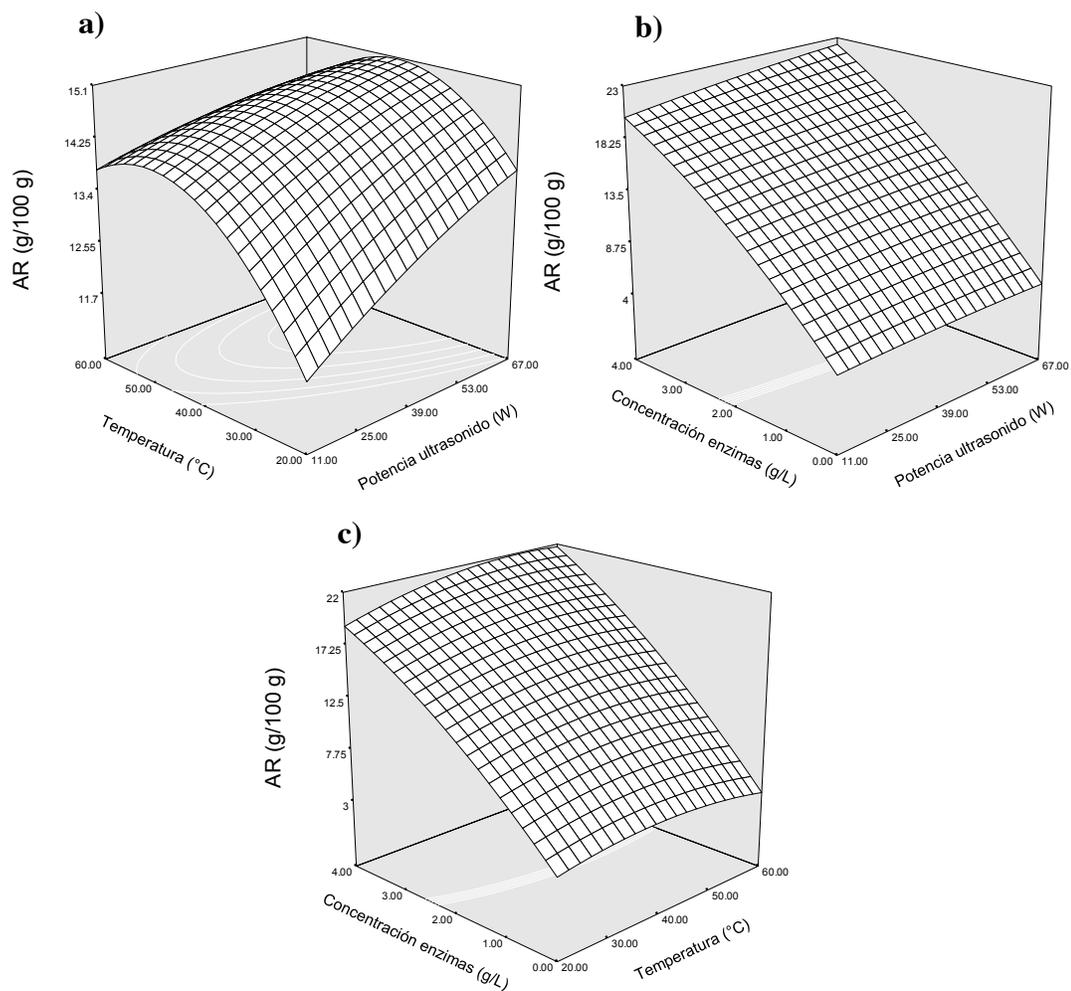


Figura 45. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el contenido de azúcares reductores.

Esto es debido a que a elevadas temperaturas se induce a un aumento de la presión de vapor, provocando que más vapores del solvente entren en la cavidad de la burbuja y numerosas burbujas de cavitación colapsen menos violentamente y reduzcan así el efecto de sonicación (Santos *et al.*, 2009; Chemat *et al.*, 2017). Para las otras 2 superficies de respuesta (Figura 45b-c) la tendencia fue la misma, observándose claramente que la liberación de AR es por efecto principalmente del incremento de la concentración de enzimas. Esto como ya se ha mencionado es debido a que las enzimas como las celulasas, hemicelulasas, pectinasas entre otras, hidrolizan los enlaces de los polisacáridos de la pared celular de las plantas descomponiendo la estructura de la pared celular (Pinelo *et al.*, 2006). Dicha degradación de la pared celular realizada por cada enzima se puede observar con los productos obtenidos, es decir, los azúcares reductores. Por dicha razón entre mayor concentración enzima se agregue mayor hidrólisis habrá y mayor generación de productos o AR se liberarán.

7.5.4.5. Azúcares individuales (glucosa, fructosa y sacarosa)

En la Tabla 33 se muestra el contenido de glucosa y fructosa, el cual varió de 0.63 a 10.80 g/100 g y de 0.51 a 3.16 g/100 g, respectivamente. El ANOVA demostró que para estas 2 respuestas el modelo fue significativo ($P < 0.05$), ajustándose a la variabilidad de los datos experimentales en un 99.24% y 99.08%. Para el contenido de fructosa, la potencia de ultrasonido, la temperatura y la concentración de enzimas presentaron efecto significativo ($P < 0.05$), mientras que la glucosa fue afectada ($P < 0.05$) por la temperatura de extracción y la concentración de enzimas (Tabla 34). Para la glucosa y la fructosa las superficies de respuesta presentaron la misma tendencia en todas sus interacciones, como se observa en la Figura 46. Debiéndose a que estos 2 azúcares tienen efecto reductor, además de que son los productos de la hidrólisis por efecto de las enzimas. Para estas 2 respuestas el modelo también dio una tendencia al máximo prediciendo los valores óptimos fuera de rango de los niveles experimentales. Para el contenido de sacarosa, éste varió de 0.32 a 1.17 g/100 g (Tabla 33). El análisis de varianza (Tabla 34) indicó que para esta respuesta el modelo cuadrático fue significativo estadísticamente ($P < 0.05$), obteniéndose una R^2 de 0.9566.

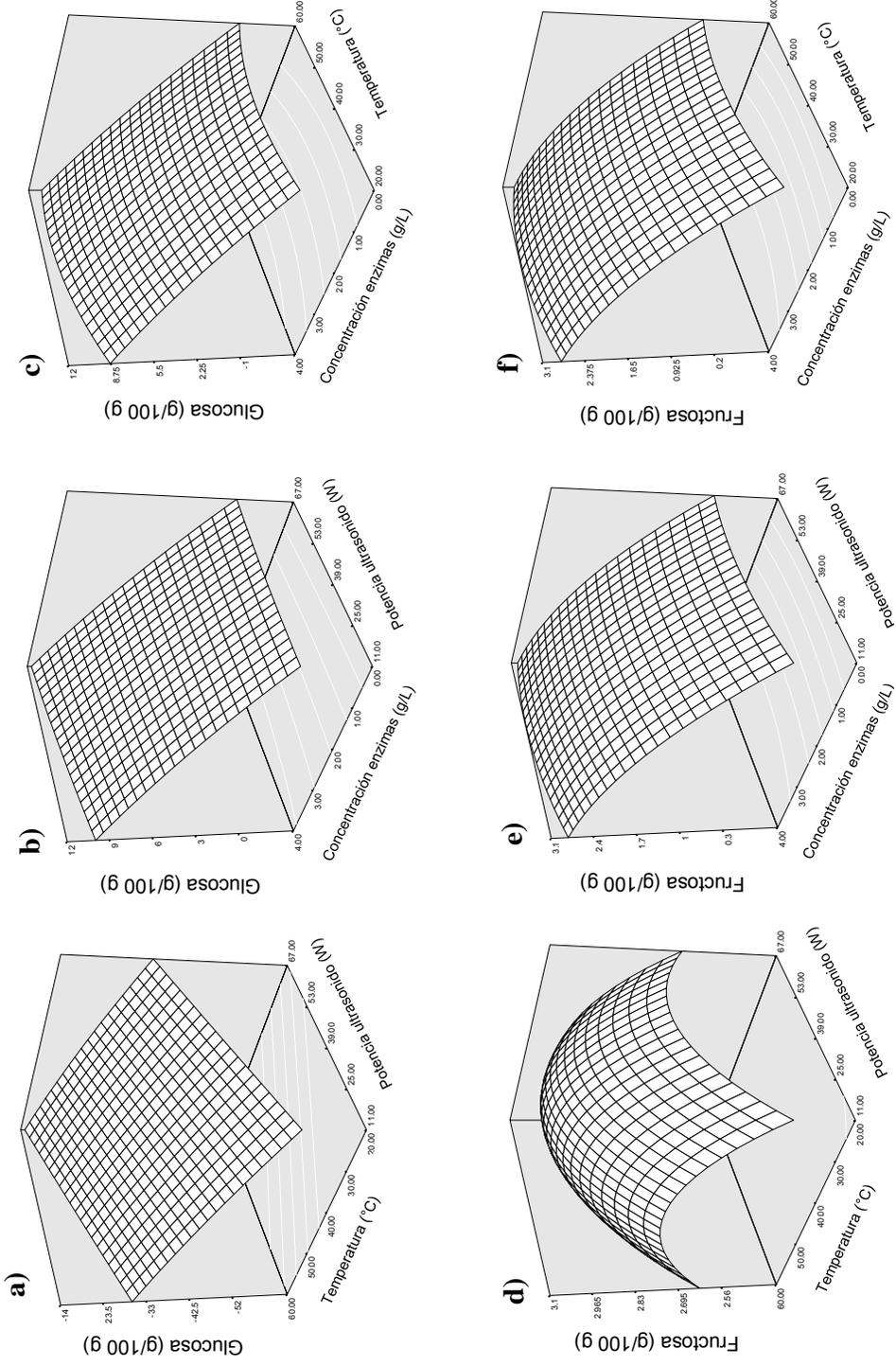


Figura 46. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a, d) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b, e) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c, f) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W), sobre en contenido de glucosa y fructosa, respectivamente.

Solo la concentración de enzimas presentó efecto significativo en su efecto lineal y en su efecto cuadrático tanto la temperatura como la concentración de enzimas presentaron significancia ($P < 0.05$). En la Figura 47 se muestran las superficies de respuesta de las diferentes interacciones entre variables para el contenido de sacarosa. El modelo ajustado para esta respuesta presentó una topografía de punto mínimo (0.2789 g/100 g) a una potencia de ultrasonido de 42.53 W, temperatura de extracción de 32.53 °C y la concentración de enzimas de 2.58 g/L. En la interacción entre potencia y temperatura (a) se observa que solo con la temperatura se observa un efecto aumentando la concentración de sacarosa a altas temperaturas, pudiéndose deber a que a dichas temperaturas la actividad de las enzimas disminuye provocando menos hidrólisis de la sacarosa lográndose una mayor cuantificación. En la siguiente interacción entre potencia y enzima (b) se muestra que a menor concentración de enzimas el contenido de sacarosa es mayor, esto también debido al efecto de las enzimas (mayor contenido por menos hidrólisis). Para la interacción entre temperatura y enzima (c) se observa que tanto en las combinaciones de baja y alta temperatura con baja concentración de enzimas y tanto con alta concentración de enzimas a temperaturas altas y bajas la sacarosa presentó una tendencia a incrementar. Esto también debido a que en dichos extremos la actividad de las enzimas es menor causando menor degradación de la molécula de sacarosa.

7.5.4.6. Contenido de fructanos totales (FRU)

El contenido de FRU de acuerdo con la Tabla 33 varió de 41.89 a 51.48 g/100 g. Tanto la potencia de ultrasonido, la temperatura y la concentración de enzimas afectaron significativamente ($P < 0.05$) el contenido de FRU. El modelo de segundo orden propuesto para este diseño presentó un ajuste adecuado, con una variabilidad de los datos experimentales de 86.53% (Tabla 34). Para la extracción de FRU solo la concentración de enzimas fue estadísticamente significativa en su efecto lineal ($P < 0.05$) y las 3 variables en su efecto cuadrático presentaron significancia para el modelo ($P < 0.05$). La Figura 48 muestra las superficies de respuesta de las interacciones entre las variables independientes usadas para este diseño.

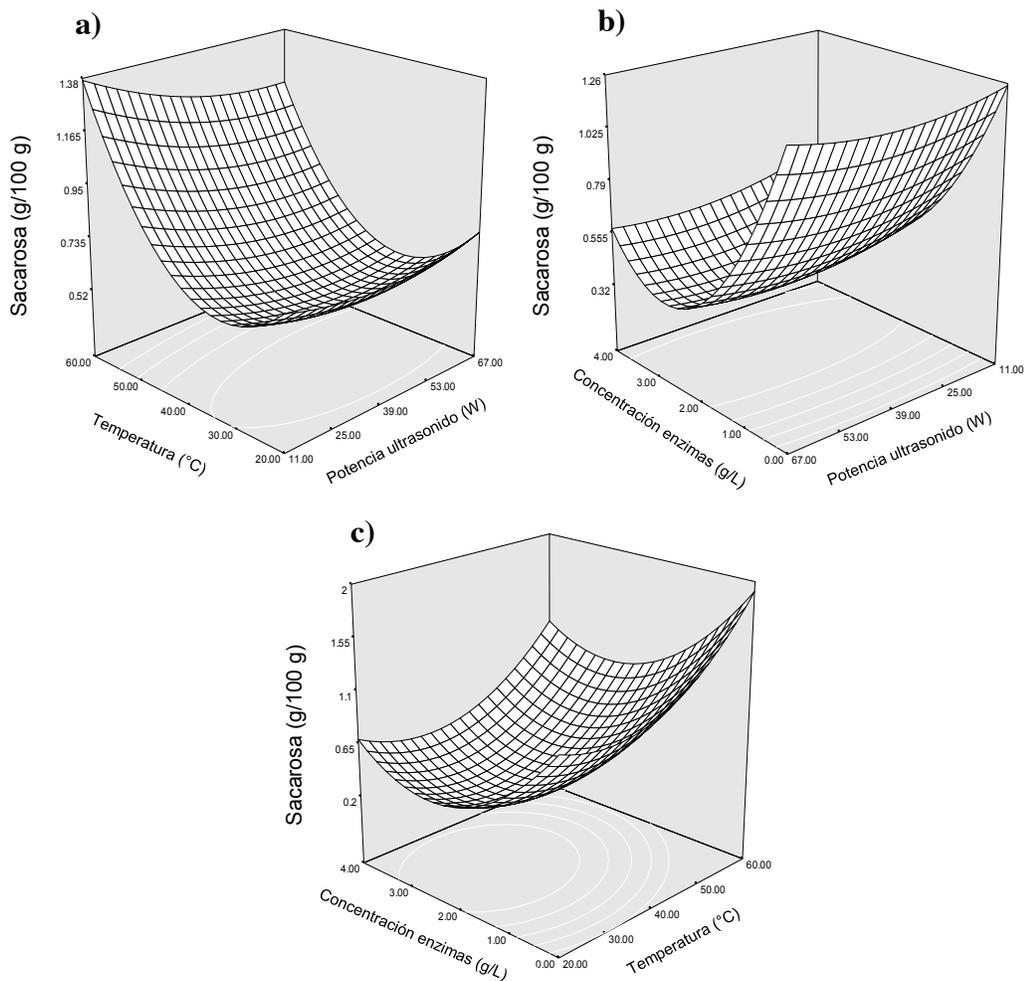


Figura 47. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre en contenido de sacarosa.

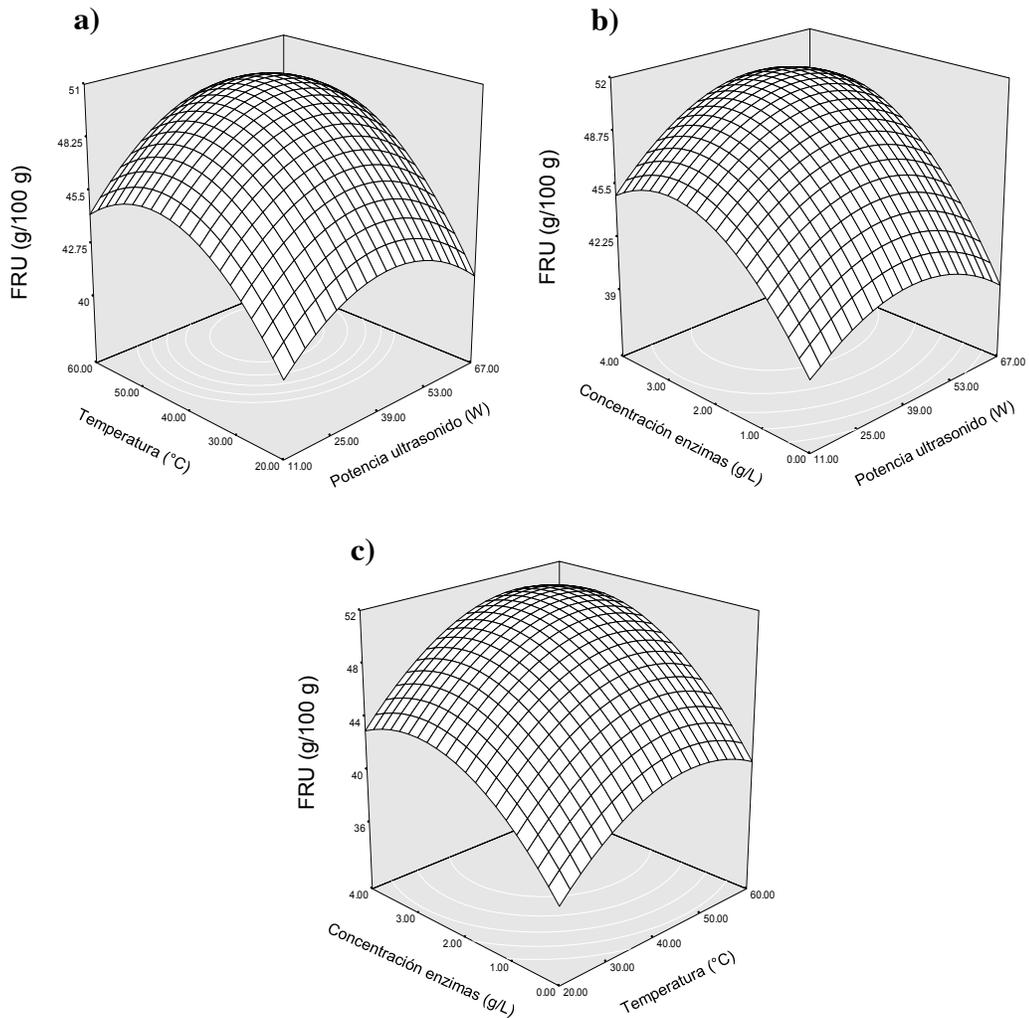


Figura 48. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 °C), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el contenido de fructanos totales.

Como se puede observar la tendencia encontrada para esta variable dependiente (FRU) fue similar en todas sus interacciones a los obtenidos para el REP (Figura 44a-c). Debiéndose dicho comportamiento a lo explicado en la sección de REP. Con el modelo ajustado para el contenido de FRU se encontró una topografía de punto máximo a un rendimiento de 51.69%, con las condiciones de potencia de ultrasonido de 50.19 W, temperatura de 50.73 °C y concentración de enzimas de 3.28 g/L. Es importante resaltar que el contenido de fructanos encontrado en este estudio fue mayor a otros estudios en los cuales también extrajeron fructanos de sotol fresco en sistemas enzimáticos similares. Pardo-Rueda *et al.* (2015) reportaron bajos contenidos de fructanos (29.55 g/100 g b.s.) a partir de plantas de sotol (*Dasyllirion leiophyllum*) con un pre-tratamiento enzimático usando Pectinex Ultra SP-L a 40 °C. Sánchez-Madrugal *et al.* (2018) reportaron contenidos de fructanos un poco mayores encontrando la máxima concentración de 39.20 g/100 g b.s. a partir de sotol fresco (*Dasyllirion wheeleri*) a cierta concentración de Pectinex Ultra SP-L a 30 °C. En este estudio de extracción enzimática asistida con ultrasonido la máxima concentración de fructanos determinada experimentalmente fue de 51.52 g/100 g. Este mayor contenido de FRU obtenidos después de la extracción enzimática asistida con ultrasonido, es debido a la alteración de la estructura celular por los efectos sinérgicos del ultrasonido y las enzimas presentes en la superficie celular, lo que produce un aumento de la permeabilidad celular y la liberación de polisacáridos extracelulares e intracelulares. Esta liberación de polisacáridos al medio extracelular produce un mayor rendimiento de extracción (Liao *et al.*, 2015).

7.5.4.7. Grado de polimerización promedio (GP_n)

Los valores encontrados del grado de polimerización promedio variaron de 1.073 a 1.509 (Tabla 33). Las variables independientes potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas presentaron efecto significativo para el modelo ($P < 0.05$). El modelo cuadrático propuesto se ajustó significativamente ($P < 0.05$) para esta respuesta con una R^2 de 0.8607, es decir, la variabilidad de los datos experimentales fue explicada en un 86.07% (Tabla 34). La temperatura y la concentración de enzimas fueron

significativas en su efecto lineal ($P < 0.05$), así como la interacción temperatura-concentración de enzimas (BC) y las 3 variables en su efecto cuadrático. Las superficies de respuesta de las interacciones entre variables se muestran en la Figura 49. En estas se observa un efecto contrario a lo obtenido tanto para el REP como para el contenido de FRU, es decir, en donde se encontró mayor rendimiento de extracción, el GP_n fue menor. Esto puede ser debido por efecto de las condiciones con las que tanto la potencia de ultrasonido, la temperatura y la concentración de enzimas lograron tener mayor efectividad para la liberación de polisacáridos de la planta de sotol, también se encontró una mayor degradación en la molécula de los fructanos, disminuyendo el GP. Para esta respuesta el modelo dio una tendencia al mínimo prediciendo los valores óptimos fuera de rango de los niveles experimentales. Los GP encontrados en este estudio son muy bajos en comparación con otros estudios en los cuales han extraído fructanos a partir de plantas de *Agave tequilana* (Waleckx *et al.*, 2008; Montañez-Soto *et al.*, 2011; Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017a) y de plantas de *D. wheeleri* (Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017b; 2018). En estos 2 últimos reportaron GP_n de hasta 10.56 durante la extracción asistida con ultrasonido y desde 5.70 hasta 16.67 durante la extracción asistida con el coctel enzimático Pectinex Ultra SP-L, respectivamente. Aunque los GP en este tipo de plantas es afectado por la edad de las plantas (Mellado-Mojica y López, 2012; Sánchez-Madrigal *et al.*, 2017a), las cuales no eran las mismas entre estudios, se puede decir que, al tratarse de un tratamiento de extracción enzimático y además asistido con enzimas, posiblemente estos 2 tratamiento tuvieron un gran efecto en el rompimiento de la molécula de los fructanos. En otros estudios se ha reportado (Liao *et al.*, 2015) que el peso molecular de polisacáridos de *Corbicula fluminea* extraídos con un proceso sinérgico entre enzimas con ultrasonido disminuye aún más comparado con un proceso solo con enzimas, comprobándose con esto que el ultrasonido no solo afecta la integridad de la superficie celular logrando que sus componentes sean más accesibles a la extracción, sino que también causó una mayor despolimerización de compuestos en fragmentos de bajo peso molecular. En este mismo estudio reportaron que, aunque los polisacáridos extraídos sinérgicamente con enzimas y ultrasonido tuvieron bajo peso molecular, también presentaron una mayor actividad

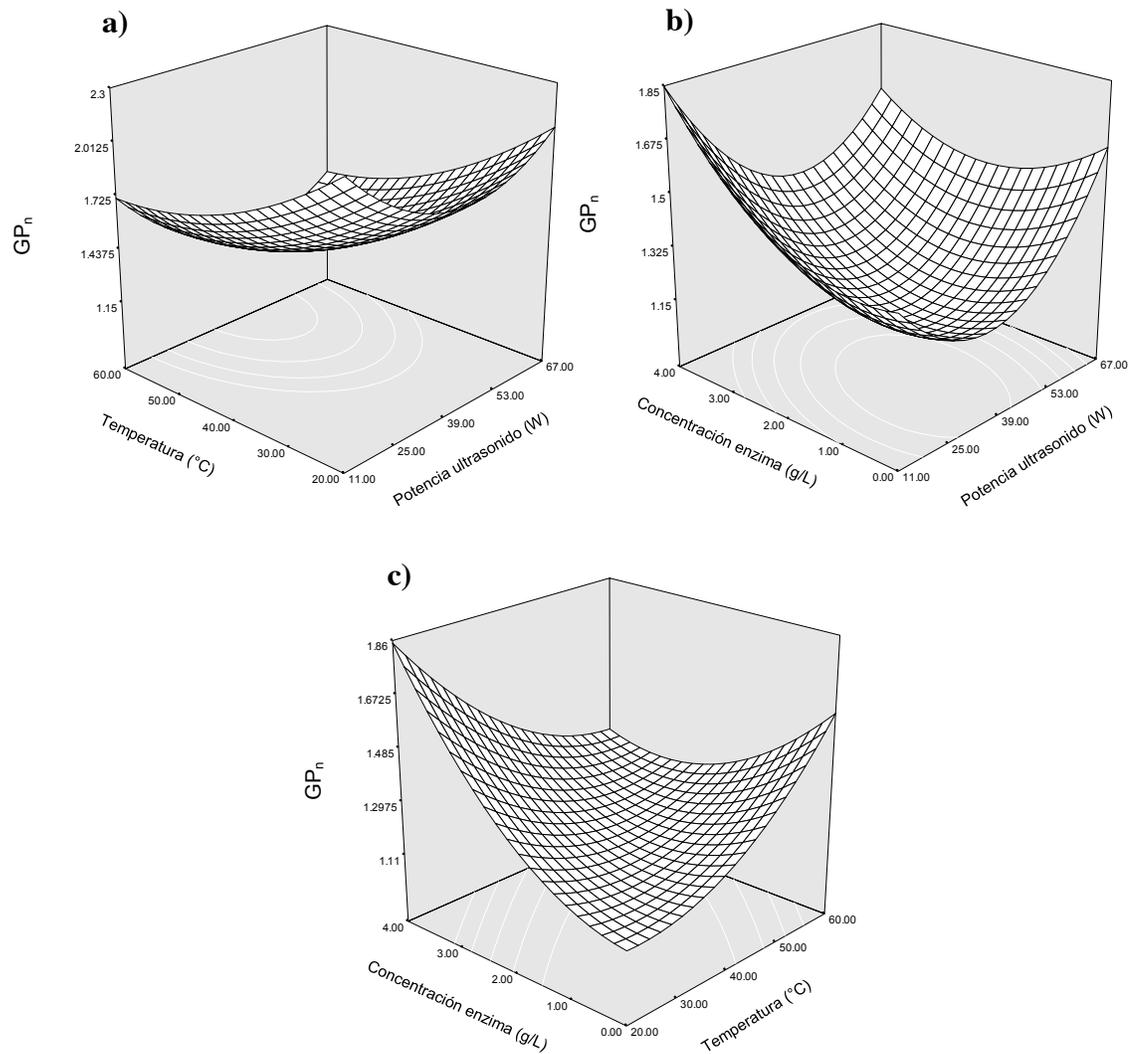


Figura 49. Superficies de respuesta mostrando los efectos de la potencia de ultrasonido, temperatura y concentración de enzimas en sus diferentes interacciones; (a) potencia-temperatura (con enzima fija en 2 g/L), (b) potencia-enzima (con temperatura fija en 40 $^{\circ}C$), (c) temperatura-enzima (con potencia fija en 39 W) sobre el GP_n .

antioxidante que los polisacáridos extraídos solo con enzimas, atribuyéndoselo a la posible degradación de polisacáridos y a cambios adicionales en la estructura química como resultado del efecto del ultrasonido. Con esto se pretende resaltar que, aunque se disminuye significativamente el grado de polimerización de los fructanos, otros cambios en su estructura química pueden ocurrir proporcionándoles diferentes características. Por ejemplo el efecto de acortamiento de la cadena en los fructanos se puede considerar como desventaja o no, esto dependiendo del uso al que vayan a ser destinados o agregados a los alimentos como un ingrediente funcional; ya que las propiedades de los fructanos incluyendo actividad prebiótica, digestibilidad, promotores potenciales de la salud, valor calórico, poder edulcorante y capacidad de retención de agua, son dependientes de su grado de polimerización (Apolinário *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016).

7.5.5. Optimización del proceso de extracción enzimática asistido con ultrasonido de fructanos de sotol (*Dasyllirion wheeleri*)

A través de la aplicación de análisis canónico (Myers, 1971) se localizaron los puntos estacionarios para las respuestas FRU, REP y AR. A través de la técnica de optimización gráfica de multirespuestas (Quintero-Ramos *et al.*, 2002; Gómez-Moriél *et al.*, 2011), se agruparon los valores para seleccionar una optimización general de este proceso. El criterio aplicado para esta optimización gráfica fue encontrar las condiciones que dieran los valores más altos de FRU y REP con los valores más bajos de AR. La condición óptima para este proceso fue basada en encontrar la región la cual satisface el criterio explicado anteriormente. La sobreposición de las gráficas de contorno de las gráficas individuales de FRU, REP y AR, se usó para determinar la región óptima, indicada por el área de diferente color (Figura 50). Las condiciones óptimas encontradas fueron: una potencia de ultrasonido de 45 W (la cual se fijó de acuerdo a lo encontrado como potencia óptima para extraer el máximo REP y contenido de FRU), temperatura de extracción de 47.08 °C y concentración de enzimas de 3.00 g/L, que permitió obtener un contenido de FRU de 51.49 g/100 g, un REP de 69.71%, un contenido de AR de 18.75 g/100 g, de glucosa de 8.98 g/100 g, de fructosa de 2.79 g/100 g, sacarosa de 0.48 g/100 g y un GP_n de 1.22.

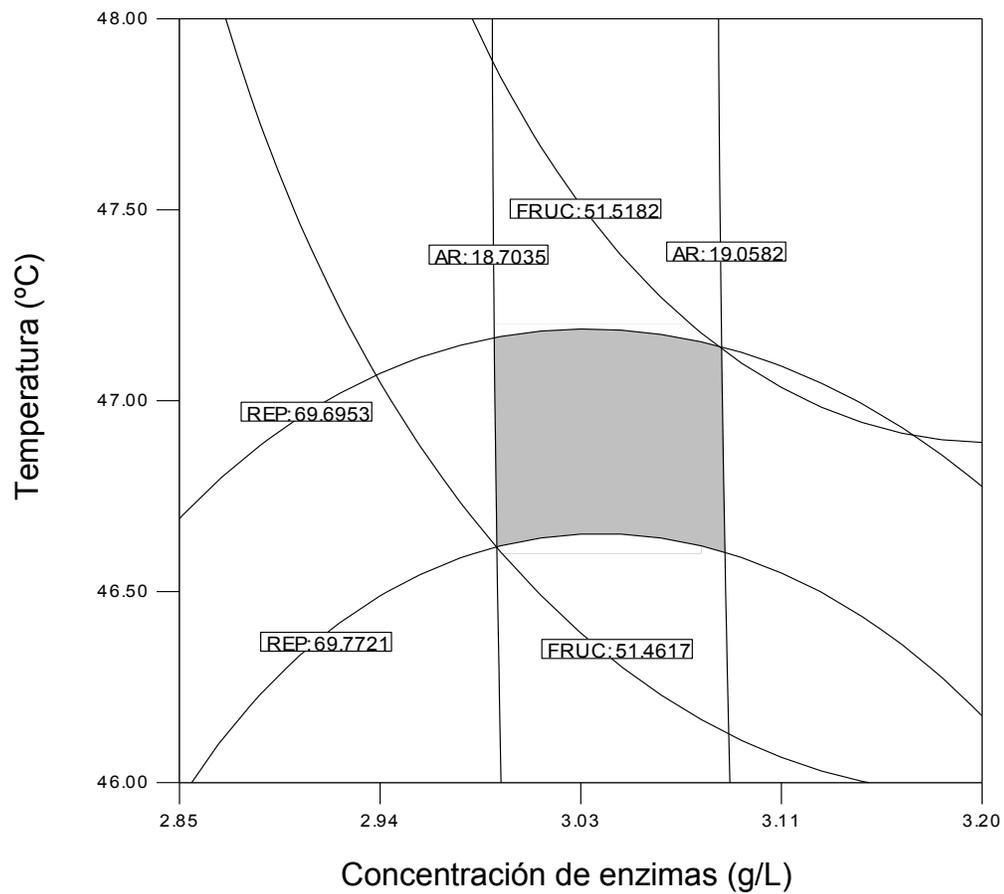


Figura 50. Región optimizada de la superposición de las gráficas de contorno de los extractos de sotol obtenidos por tratamientos enzimáticos asistidos con ultrasonido, manteniendo fija la potencia de ultrasonido en 45 W. FRU, REP, AR.

7.6. Estudio No. 6

Aplicación de fructanos de agave (*Agave tequilana* var. azul) en la encapsulación de antocianinas de maíz azul (*Zea mays* L.) por secado por aspersión

7.6.1. Caracterización del extracto de maíz azul (*Zea mays* L.)

Para este estudio el maíz azul fue usado como materia prima para la preparación del extracto de antocianinas, el cual fue caracterizado fisicoquímicamente y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 36. De acuerdo con los resultados, el extracto presentó un valor de °Brix de 5.73 ± 0.11 , con un contenido de materia seca o gramos de sólidos secos de 4.02 ± 0.02 g s.s./100 g. El extracto presentó un pH de 1.79 ± 0.02 , este valor es muy bajo, es decir, su pH es muy ácido ya que para su extracción el solvente se acidificó porque las antocianinas son más estables a pH's bajos y así al momento del secado por aspersión y almacenamiento tuvieron mayor estabilidad.

Tabla 36. Características fisicoquímicas del extracto de maíz azul (*Zea mays* L.)

Determinación	Contenido*
°Brix	5.73 ± 0.11
Humedad (%)	95.97 ± 0.02
Actividad de agua (a_w)	0.99 ± 0.03
pH	1.79 ± 0.02
Antocianinas totales (mg/100 g b.s.)	412.97 ± 24.13
Polifenoles totales (mg EAG/g b.s.)	2042.42 ± 51.28
Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g b.s.}$)	93.57 ± 3.10
L^*	34.30 ± 0.03
a^*	37.44 ± 0.07
b^*	9.75 ± 0.04
Croma*	38.69 ± 0.08
Hue°	0.254 ± 0.001

Medias \pm desviación estándar. EAG, equivalentes de ácido gálico; ET, equivalentes de trolox; b.s., base seca; L^ , a^* , b^* , Croma*, Hue°, parámetros de color.

El contenido de antocianinas totales presentes en el extracto fue de 412.97 mg/100 g base seca (b.s.). En comparación con lo reportado por Ersus y Yurdagel, (2007) para un extracto de antocianinas de zanahoria negra (*Daucus carota* L.) con 6 °Brix (2721.61 mg/100 g)

es bajo; así como por lo reportado por Tonon *et al.* (2010) para un jugo de açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) con 3946.14 mg/100 g y por Stoll *et al.* (2016) en un extracto de orujo de uva con 5491.90 mg/100 g, y por Selim *et al.* (2008) quienes cuantificaron un contenido máximo de antocianinas de 1457 mg/100 g con etanol acidificado con HCl extracto de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Sin embargo, para ser de un extracto de maíz azul en el cual las antocianinas solo se encuentran en el pericarpio y en la capa de aleurona o en ambas (Salinas-Moreno *et al.*, 1999) este tipo de granos pigmentados representan una fuente importante de antocianinas, por lo que el interés en el uso potencial de antocianinas de maíz azul o morado como colorante natural se ha incrementado (García-Tejeda *et al.*, 2015). Aunando a lo anterior, al potencial que representa este cultivo en su rendimiento lo que hace posible obtener grandes volúmenes en tiempos relativamente cortos.

En cuanto a la determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante se obtuvo como resultado 2042.42 mg EAG/100 g b.s. y 93.57 $\mu\text{mol ET/g}$ b.s., respectivamente. Dichos valores también son bajos al compararlos con extractos de otras fuentes ricas en antocianinas; Tonon *et al.* (2010) para un jugo de açai reportaron 1230.43 $\mu\text{mol ET/g}$ b.s., Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, (2011) para diferentes variedades de grosella negra (*Ribes nigrum* L.) encontraron valores de polifenoles totales de 4615.97 mg EAG/100 g b.s. a 3823.19 mg EAG/100 g b.s. Sin embargo, es más alto al compararlo con el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de un jugo de tuna (*Opuntia ficus indica*) reportado por Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) con 1467 mg EAG/100 g b.s. y 6.36 $\mu\text{mol ET/100 g}$ b.s., respectivamente.

Como se mencionó, el extracto de grano de maíz azul para este estudio fue concentrado y con los resultados obtenidos se puede comprobar la eficiencia en dicha concentración, ya que al comparar con lo reportado por Sánchez-Madrigal *et al.* (2015) para un grano de maíz azul de la misma zona cultivo pero de otra temporada de cosecha el contenido de antocianinas totales fue de 61.22 mg/100 g, para polifenoles totales 298.47 mg EAG/100 g y para actividad antioxidante 2.58 $\mu\text{mol ET/g}$.

7.6.2. Caracterización de los polvos

7.6.2.1. Propiedades físicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul

Los resultados de densidad aparente, humedad, actividad de agua, higroscopicidad, pH, IAA, ISA y temperatura de transición vítrea (T_g) de los encapsulados producidos con fructanos de agave como agente acarreador en diferentes concentraciones son presentados en las Tablas 37 y 38.

7.6.2.2. Densidad aparente

La densidad aparente de los encapsulados osciló de 0.6254 a 0.6477 g/cm³, la cual solo mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el 6% y 12% de adición de fructanos. Sin embargo, se observa una ligera tendencia de mayor densidad aparente entre mayor adición de fructanos. De acuerdo con Tonon *et al.* (2010) la densidad aparente de los encapsulados es relacionada con el peso molecular de los materiales acarreadores. Entre más pesado es el material, más fácilmente se acomoda en los espacios entre las partículas ocupando menos espacio y resultando en valores de densidad aparente más altos. Chegini y Ghobadian (2005) reportaron que polvos obtenidos por secado por aspersión los cuales presentaron mayor contenido de humedad tendieron a tener un mayor peso por volumen, esto debido a la presencia de agua, la cual es considerablemente más densa que el sólido seco. Este comportamiento puede ser asociado con los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 37), porque los encapsulados producidos con mayor cantidad de fructanos (12%) mostraron mayor contenido de humedad. Los valores de densidad aparente encontrados, son similares a lo reportado por otros autores al encapsular diferentes pigmentos con distintos acarreadores. Cai y Corke (2000) durante la encapsulación de betalaínas provenientes de plantas y hojas frescas de amaranto con maltodextrina y almidones de maíz (0.52 - 0.67 g/cm³). Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) al encapsular betalaínas de jugo de tuna con β -glucanos (0.52 – 0.62 g/cm³). Asimismo, son altos en comparación con lo reportado por Mahdavi *et al.* (2016) al encapsular antocianinas de frutos de *Berberis vulgaris* con maltodextrina, goma arábica y gelatina (0.395 – 0.431 g/cm³) y a los reportados por Tonon *et al.* (2010) en encapsulados de antocianinas de açai con diferentes

Tabla 37. Propiedades físicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.

Adición de acarreador (% p/v)	Densidad aparente (g/cm ³)	Humedad (%)	Actividad de agua (a _w)	Higroscopicidad (%)
6%	0.6254 ± 0.008 ^b	9.47 ± 0.39 ^b	0.123 ± 0.005 ^c	49.68 ± 0.92 ^a
8%	0.6407 ± 0.012 ^a	10.03 ± 0.07 ^b	0.141 ± 0.021 ^{bc}	46.34 ± 1.02 ^b
10%	0.6425 ± 0.004 ^a	10.49 ± 0.27 ^{ab}	0.143 ± 0.016 ^c	41.07 ± 1.07 ^c
12%	0.6477 ± 0.012 ^a	11.07 ± 0.86 ^a	0.156 ± 0.005 ^b	38.17 ± 0.27 ^{cd}
Polvo de fructanos	0.5809 ± 0.007 ^c	4.44 ± 0.39 ^c	0.189 ± 0.010 ^a	36.45 ± 0.53 ^d

Medias ± desviación estándar de la repetición de dos tratamientos. Valores con letra diferente por columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey.

Tabla 38. Propiedades físicas y térmicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.

Adición de acarreador (% p/v)	pH	IAA	ISA	T _g (°C)
6%	2.15 ± 0.005 ^{cd}	0.9442 ± 0.022 ^a	1.3464 ± 0.017 ^d	50.71 ± 0.48 ^a
8%	2.16 ± 0.005 ^d	0.7655 ± 0.040 ^b	1.3884 ± 0.016 ^c	53.55 ± 2.62 ^a
10%	2.20 ± 0.032 ^{bc}	0.6191 ± 0.010 ^c	1.4549 ± 0.015 ^b	50.01 ± 1.08 ^a
12%	2.23 ± 0.032 ^b	0.5548 ± 0.017 ^d	1.4819 ± 0.006 ^b	52.15 ± 2.39 ^a
Polvo de fructanos	5.12 ± 0.017 ^a	0.1489 ± 0.014 ^e	1.5774 ± 0.009 ^a	50.13 ± 0.51 ^a

Medias ± desviación estándar de la repetición de dos tratamientos. Valores con letra diferente por columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey. IAA, índice de absorción de agua, ISA, índice de solubilidad en agua.

acarreadores (0.37 a 0.48 g/cm³), así como a los resultados divulgados por Saikia *et al.* (2105) en encapsulados de polifenoles provenientes de orujo de *Averrhoa carambola* (0.21 – 0.34 g/cm³). Sin embargo, en otros reportes como los presentados por Khazaei *et al.* (2014) y Jafari *et al.* (2016) quienes encapsularon antocianinas de pétalos de azafrán (*Crocus sativus*) con maltodextrinas y goma arábica, los valores de densidad son altos de 1.2 a 2.22 g/cm³ y de 1.87 a 2.85 g/cm³, respectivamente en comparación con los encontrados en este estudio. Dichas diferencias pueden ser atribuidas como ya se mencionó a varios parámetros como el contenido de humedad, distribución del tamaño de partícula y morfología entre los diferentes acarreadores (Walton, 2000). Rajam y Anandharamkrishnan (2015) reportaron valores más altos de densidad aparente en encapsulados que contenían solo fructooligosacáridos (FOS) que, con los otros acarreadores usados, esto atribuyéndoselo a la agregación de las partículas y a menor espacio entre ellas (Goula y Adamoupolus, 2012).

A pesar de lo encontrado, los valores de densidad de este estudio se encuentran dentro de los rangos reportados para diferentes polvos, cumpliendo con una característica importante para su manejo, almacenamiento y procesamiento.

7.6.2.3. Contenido de humedad

Para el contenido de humedad se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los encapsulados obtenidos con 6% y 12% de fructanos añadidos con valores de 9.47 y 11.07%, respectivamente (Tabla 37). Como se observa, humedad aumentó conforme se incrementó la cantidad de fructanos como acarreador. Esto se debe probablemente a que los fructanos al ser altamente higroscópicos entre mayor cantidad de estos en los encápsulados hay una mayor afinidad de los fructanos por el agua en función de la presencia de mayores grupos hidrofílicos que se unen fuertemente al agua (de Barros Fernandes *et al.*, 2014b) lo que contribuye a la obtención de mayor contenido de humedad. de Barros Fernandes *et al.* (2014a; 2014b) reportaron que al microencapsular aceite esencial de romero con diferentes acarreadores, la humedad de los polvos se incrementó con la adición de inulina. Saénz *et al.* (2009) también reportaron mayor contenido de

humedad en las microcápsulas de compuestos bioactivos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) adicionadas con inulina. Los contenidos de humedad encontrados en este estudio son un poco altos en comparación con lo reportado por otros estudios. Cai y Corke (2000) reportaron humedades de 1.95 – 6.80% en encapsulados de betalaínas de plantas de amaranto con maltodextrina y almidones, Ersus y Yurdagel (2007) encontraron humedades de 1.09 a 3.76% en cápsulas de antocianinas de zanahoria negra, Saénz *et al.* (2009) en cápsulas de betalaínas de jugo tuna adicionadas con inulina reportaron contenidos de humedad de 2.21 a 5.12%, Pitalua *et al.* (2010) obtuvieron humedades de 3.59 a 5.33% en microencapsulados de jugo de betabel con goma arábica, Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, (2011) determinaron contenidos de humedad de 1.70 a 3.90% al final de la microencapsulación de polifenoles de grosella negra (*Ribes nigrum* L.), García-Tejeda *et al.* (2015) encapsularon antocianinas de maíz morado con almidones de maíz como acarreadores y encontraron humedades de 2.44 a 3.10%, de Barros Fernandes *et al.* (2014a; 2014b) al encapsular aceite esencial de romero con diferente materiales de pared reportaron humedades de 0.59 – 1.28% y de 1.55 – 3.48%, respectivamente, Khazaei *et al.* (2014) obtuvieron cápsulas de antocianinas a partir de pétalos de azafrán con maltodextrinas y goma arábica con porcentajes de humedad de 1.66 a 4.38%, Robert *et al.* (2015) al encapsular jugo de tuna roja utilizando maltodextrina reportaron de 5.6 – 7.7% de humedad, Mahdavi *et al.* (2016) determinaron humedades de 3.07 a 4.26% en cápsulas de antocianinas provenientes de frutos de *Berberis vulgaris* con maltodextrina, goma arábica y gelatina. De acuerdo con Pitalua *et al.* (2010) el contenido de humedad depende del acarreador y de las condiciones de secado. Éstos 2 factores pudieron ser los responsables para que los contenidos de humedad encontrados en este estudio fueran más altos ya que solo se cambiaron los fructanos de agave en diferentes porcentajes, pero al final de cuentas la base del acarreador eran solo fructanos los cuales son altamente higroscópicos, lo cual favorece a la absorción de humedad en los encapsulados, como ya fue explicado anteriormente. Por otro lado, el secado por aspersión que se llevó a cabo a 150 °C, evitó una mayor eliminación de la humedad en los encapsulados de los diferentes tratamientos contribuyendo a contenidos altos de humedad.

7.6.2.4. Actividad de agua (a_w)

La actividad del agua se considera como uno de los factores que más influyen en la seguridad y estabilidad de los alimentos y, junto con la temperatura, controla las propiedades físicas y químicas de los polvos (Pitalua *et al.*, 2010). La actividad de agua también presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los polvos encapsulados, pero solamente entre los polvos con 6% y 12% de adición de fructanos (Tabla 37). Los valores de a_w para estos 2 tratamientos fueron de 0.123 y 0.156, respectivamente. La tendencia encontrada para la actividad de agua fue similar a la encontrada para el contenido de humedad, comprobándose que a mayor cantidad de fructanos; se les atribuyen mayores propiedades higroscópicas por su mayor afinidad por el agua. Sin embargo, todos los encapsulados obtenidos se encuentran dentro del rango reportado por otros autores durante la encapsulación de diferentes pigmentos y compuestos bioactivos con diferentes acarreadores. Jafari *et al.* (2016) en cápsulas de antocianinas de pétalos de azafrán (*Crocus sativus*) con maltodextrinas y goma arábiga reportaron a_w de 0.069 – 0.289. García-Tejeda *et al.* (2015) en encapsulados de antocianinas de maíz morado obtuvieron a_w 0.17 a 0.25. Bustos-Garza *et al.* (2013) encontraron a_w entre 0.27 a 0.36 en encapsulados de oleorresina de astaxantina. Con las a_w encontradas para este estudio se puede decir que la estabilidad de los pigmentos en los polvos encapsulados está asegurada, debido a la minimización del deterioro bioquímico y crecimiento microbiano (Kha *et al.*, 2010). Esto debido a lo encontrado por algunos autores; Pitalua *et al.* (2010) realizaron un estudio en el cual colocaron a diferentes a_w las microcápsulas obtenidas, reportando que en atmósferas secas el agua es fuertemente atraída a los sitios polares en la superficie de las microcápsulas, y, por lo tanto, no está disponible para ningún tipo de reacción, esto debido a que a $a_w < 0.521$ encontraron valores bajos e intermedios de degradación de betalaínas. Por el contrario, Serris y Biliaderis (2001), reportaron que cuando los valores de actividad de agua son altos ($a_w > 0.748$) el fenómeno de adsorción produce hinchamiento conformacional y cambios en la estructura de los polvos secos.

7.6.2.5. Higroscopicidad

Para la higroscopicidad de los encapsulados se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los porcentajes de adición de fructanos de 6%, 8% y 10%, sin presentar diferencias los de 12% de adición con los de 10% (Tabla 37). Dichos valores de higroscopicidad oscilaron en un rango de 38.17% a 49.68%, obteniéndose el valor más alto en los polvos encapsulados adicionados con el menor porcentaje de fructanos (6%) y disminuyendo la higroscopicidad conforme se aumentó el porcentaje de fructanos en los encapsulados. La disminución de la higroscopicidad al aumentar la concentración de acarreador (maltodextrinas) ya ha sido reportado por Saikia *et al.* (2015). de Barros Fernandes *et al.* (2014b) encontraron que la presencia de inulina como acarreador disminuyó la higroscopicidad durante el almacenamiento a humedades relativas altas. Asimismo, en otro estudio, estos mismos autores reportaron que al mezclar en diferentes concentraciones aislado de proteína de suero de leche con inulina como acarreadores no hubo diferencias sobre la higroscopicidad (de Barros Fernandes *et al.*, 2014a).

Como se puede observar, en este estudio los valores de higroscopicidad disminuyeron inversamente con el aumento del contenido de humedad (Tabla 37), es decir, a menor contenido de humedad de los polvos la higroscopicidad fue mayor. Este mismo comportamiento fue reportado por Tonon *et al.* (2009), por Mahdavi *et al.* (2016) y por Otálora *et al.* (2015). De acuerdo con estos autores los polvos con menor contenido de humedad tienen mayor capacidad de absorber agua del ambiente, esto debido a un mayor gradiente de concentración de agua entre el producto (encapsulados) y el aire circundante, en consecuencia: una mayor higroscopicidad en los polvos secados por aspersion se debió a un menor contenido de humedad.

Los valores de higroscopicidad encontrados para este estudio son altos en comparación con otros estudios; de Barros Fernandes *et al.* (2014a) reportaron valores de 15.7 a 17.1%, Mahdavi *et al.* (2016) encontraron porcentajes de higroscopicidad de 19.53 a 20.44% y Saikia *et al.* (2015) reportaron valores de higroscopicidad de 8.32 a 9.45. Sin embargo, son similares o más bajos a lo reportado por Khazaei *et al.* (2014) en encapsulados de antocianinas con maltodextrinas y goma arábiga (46.6% - 63.47%), Ersus y Yurdagel

(2007) en microcápsulas de antocianinas de zanahoria negra con diferentes acarreadores encontraron porcentajes de higroscopicidad de 72.83 a 83.33%, Cai y Corke (2000) reportaron valores de higroscopicidad de 44.6 a 49.5% en encapsulados de betalainas de plantas de amaranto con maltodextrina y almidones y Jafari *et al.* (2016) al encapsular antocianinas de pétalos de azafrán con maltodextrinas y goma arábica encontraron de 46.6 a 61.74% de higroscopicidad.

7.6.2.6. pH

En la Tabla 38 se muestran los resultados de pH de los encapsulados, los cuales presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los porcentajes de adición de fructanos de 6% y 8% con los de 10% y 12%. Como se observa, los pH's de los polvos encapsulados son bajos esto debido a que el extracto del cual se partió presentó un pH de 1.79. Sin embargo, el pH aumentó ligeramente con el aumento del porcentaje de fructanos, siendo los encapsulados con 12% de adición los que presentaron el pH más alto (2.23), esto debido a que el pH que presentó el acarreador utilizado fue de 5.12. Como ya se mencionó, aunque los encapsulados presentaron valores de pH bajos, estos son adecuados para la estabilidad de las antocianinas (Brouillard, 1982; He y Giusti, 2010).

7.6.2.7. Índice de absorción de agua (IAA) e índice de solubilidad en agua (ISA)

Tanto el IAA como el ISA fueron significativamente afectados ($P < 0.05$) por el porcentaje de adición de fructanos en los encapsulados de antocianinas de maíz azul. Presentando diferencias estadísticas entre todos los porcentajes de adición para el IAA y para el ISA los porcentajes de 10% y 12% fueron diferentes ($P < 0.05$) con los encapsulados de 6% y 8% de adición, siendo estos 2 últimos diferentes entre ellos.

En la Tabla 38 se muestra que el IAA disminuyó conforme se aumentó el porcentaje de adición de fructanos, siendo este comportamiento similar y por las mismas causas a lo encontrado para los valores de higroscopicidad. Ahmed *et al.* (2010b) reportaron tendencias en la disminución del IAA a mayor concentración del acarreador maltodextrina. Estos mismos autores, indican que las variaciones en el IAA pueden ser

debidas al grado de compromiso de los grupos hidroxilo para formar puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entre las cadenas del acarreador.

Para el ISA se encontró una tendencia contraria, aumentando con el incremento de la concentración de fructanos en los encapsulados. Asimismo, se observa que los encapsulados presentaron menor ISA que los polvos no encapsulados (acarreador). Estas diferencias pueden ser atribuidas a que la estructura de los fructanos cambia por efecto de la acidez del extracto disminuyendo su solubilidad. Ahmed *et al.* (2010b) también reportaron incrementos en el ISA al aumentar la concentración del acarreador (maltodextrina).

El incremento en el ISA puede ser debido a que a altas concentraciones de fructanos la interacción entre las partículas que los conforman son más cercanas y pueden formar aglomerados, contribuyendo a la obtención de IAA más pequeños y subsecuentemente en incrementos de los ISA de los encapsulados (Ahmed *et al.*, 2010b; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 2014). Los ISA son mayores que los reportados por Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) en encapsulados de betacianinas usando β -glucanos como acarreador (0.640 – 0.766) y menores a los reportados por Ahmed *et al.* (2010b) en encapsulados de compuestos bioactivos de camote morado con maltodextrinas y ácido cítrico como acarreadores (1.92 – 2.56). A pesar de las tendencias obtenidas, se puede decir que los ISA encontrados en todos los encapsulados son aceptables ya que ninguno presentó dificultad para solubilizarse, esto se debe a que los componentes de los polvos obtenidos como pigmentos, azúcares y acarreador presentan una alta solubilidad en agua. De acuerdo con Syamaladevi *et al.* (2012) la solubilidad es considerada como una propiedad instantánea importante (humectabilidad, dispersabilidad, solubilidad) para polvos encapsulados ya que pueden ser sometidos a rehidratación cuando son usados como ingrediente en alimentos.

7.6.2.8. Temperatura de transición vítrea (T_g)

Para las propiedades térmicas no se encontró efecto significativo ($P > 0.05$) entre los porcentajes de adición de fructanos como acarreador, sin diferencias estadísticas entre los

encapsulados obtenidos (Tabla 38). Las T_g encontradas para este estudio son favorables ya que de acuerdo con Oikonomopoulou *et al.* (2016) las temperaturas de almacenamiento superiores a la T_g proporcionan mayor movilidad molecular acelerando las velocidades de reacción. Por el contrario, condiciones de temperatura por debajo de la T_g proporcionan una mayor estabilidad de los productos contra el deterioro durante el almacenamiento. El rango de temperatura obtenido entre los encapsulados osciló desde 50.01 °C a 53.55 °C, representado como ya se mencionó condiciones de almacenamiento favorables. Aunque en este estudio no se encontraron diferencias entre los encapsulados, se ha reportado que cambios en la T_g pueden ser debidos a varias causas; por ejemplo, Goula y Adamopoulos (2008) reportaron una reducción en la T_g debido al incremento de la humedad debido al efecto plastificante del agua. Cai y Corke (2000) reportaron que el T_g está relacionada con el peso molecular de los materiales acarreadores, disminuyendo el T_g conforme el peso molecular es más pequeño. León-Martínez *et al.* (2010) indican que también está relacionada con la rigidez de la cadena y con estructura de la cadena del polímero acarreador, aumentando la T_g a medida que se incrementa la densidad de los enlaces cruzados.

Las temperaturas de transición vítrea encontradas para este estudio son mayores a las obtenidas por otros autores; Ahmed *et al.* (2010b) reportaron T_g de 10.15 a 29.37 °C, Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) encontraron T_g de 32.27 °C a 37.69 °C, Otálora *et al.* (2015) en encapsulados de jugo de tuna con mucílago de nopal y maltodextrina como acarreadores encontraron una T_g de aproximadamente 40 °C, Cai y Corke (2000) reportaron T_g similares entre 45.4 °C – 54.7 °C.

Aunque como ya se mencionó las T_g no presentaron diferencias ($P > 0.05$), este parámetro es uno de los más importantes a considerarse para encapsulados de diferentes compuestos bioactivos, ya que de éste dependen las condiciones de conservación a las que deben someterse para asegurar su estabilidad. Saavedra-Leos *et al.* (2018) reportaron que, si los encapsulados se almacenan a temperaturas superiores a su T_g o se someten a condiciones de humedad relativamente altas, el sistema puede experimentar un cambio repentino en la microestructura, desde un estado rígido amorfo a un estado gomoso.

7.6.2.9. Color de los encapsulados de antocianinas de maíz azul

Otra de las características importantes de los encapsulados de pigmentos es el color, ya que una de sus funciones es impartir color o pigmentar alimentos. En la Figura 51 se observa el color obtenido en los encapsulados en sus diferentes concentraciones de fructanos como acarreador. En cuanto a los parámetros de color obtenidos para los encapsulados de antocianinas de extracto de maíz azul se muestran en la Tabla 39.

El parámetro de luminosidad (L^*) el cual representa la tendencia del negro (0) al blanco (100), fue afectado significativamente ($P < 0.05$) por el porcentaje de adición de fructanos. En la Tabla 39 se muestra que el valor de este parámetro aumentó a mayor concentración de fructanos, es decir, los encapsulados se volvieron más luminosos (blancos), se obtuvieron al 6% y 8%, los cuales fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con los encapsulados de 10% y 12% de adición de fructanos.

Para el parámetro a^* de los encapsulados de maíz azul no se encontró efecto significativo ($P > 0.05$) entre concentraciones de fructanos. El parámetro a^* mide las tonalidades del verde al rojo ($-a^*$ = verde; $+a^*$ = rojo), por lo tanto, se encontró que al aumentar el porcentaje de fructanos no se afectó la tonalidad roja de los encapsulados, manteniendo valores positivos de 36.25 a 36.33, característicos de las antocianinas. Dicha tendencia en el color rojo es visualmente detectable en la Figura 50.

Respecto al parámetro b^* la adición de fructanos no causó efecto significativo ($P > 0.05$) sobre esta tonalidad en el color. En la Tabla 39 se muestra como los valores fueron similares entre tratamientos; este parámetro mide las tonalidades del amarillo al azul ($+b^*$ = amarillo; $-b^*$ = azul) encontrándose valores positivos de 13.46 a 13.79, es decir, los encapsulados obtenidos tendieron más hacia el color amarillo.

Para el cromatipo a^* y el ángulo hue se observa el mismo comportamiento, es decir, no se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los diferentes encapsulados, indicando una intensidad en el color (o saturación) similar entre muestras, así como una pureza en el color, respectivamente. El cromatipo a^* mostró valores de 38.73 a 38.90, mientras que para el ángulo hue valores entre 0.355 a 0.363 confirmando con estos valores cercanos a 0° , la tendencia de los encapsulados a un color rojo puro.

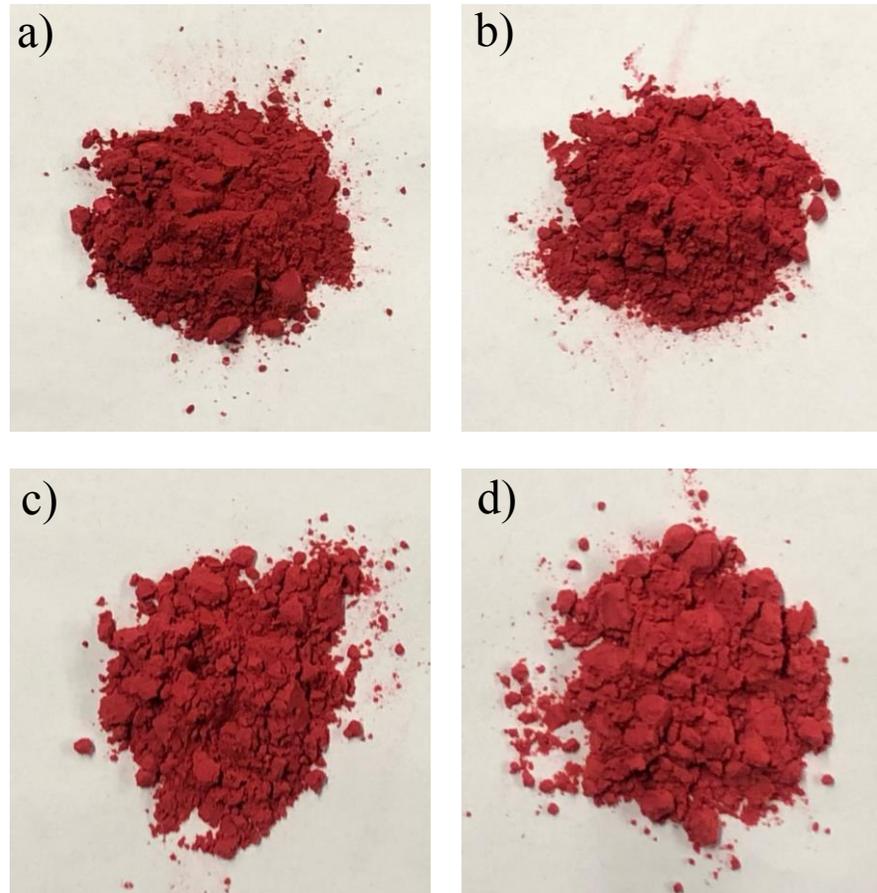


Figura 51. Polvos encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con fructanos de agave. a) 6%, b) 8%, c) 10%, d) 12%.

Tabla 39. Parámetros de color de encapsulados de antocianinas de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.

Adición de acarreador (% p/v)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	Croma*	Hue (°)	ΔE
6%	36.79 ± 0.32 ^d	36.25 ± 1.34 ^a	13.62 ± 0.26 ^a	38.73 ± 1.179 ^a	0.359 ± 0.018 ^a	5.04 ± 0.35 ^c
8%	37.77 ± 0.94 ^c	36.29 ± 0.64 ^a	13.46 ± 0.25 ^a	38.90 ± 0.481 ^a	0.355 ± 0.006 ^a	5.29 ± 0.64 ^c
10%	40.09 ± 0.50 ^b	36.26 ± 0.21 ^a	13.79 ± 0.39 ^a	38.80 ± 0.332 ^a	0.363 ± 0.007 ^a	7.11 ± 0.61 ^b
12%	42.32 ± 0.46 ^a	36.33 ± 0.30 ^a	13.65 ± 0.24 ^a	38.81 ± 0.213 ^a	0.359 ± 0.008 ^a	8.57 ± 0.47 ^a

Medias ± desviación estándar de la repetición de dos tratamientos. Valores con letra diferente por columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey.

Valores similares en algunos parámetros en encapsulados de antocianinas de diferentes fuentes ya han sido reportados. Souza *et al.* (2015) usando maltodextrina y Kuck y Noreña (2016) con goma arábica, povidexrosa y goma guar como agentes acarreadores encontraron en microencapsulados de extractos de piel de uva (*Vitis labrusca* var. Bordo), parámetros de color similares excepto en los valores del parámetro b^* . Ersus y Yurdagel (2007) en encapsulados de extracto de antocianinas de zanahoria negra con diferentes acarreadores, así como Ahmed *et al.* (2010b) en encapsulados de extractos de camote morado con maltodextrina y ácido ascórbico también encontraron parámetros similares, con valores de b^* un poco más parecidos que los anteriores estudios. Jafari *et al.* (2016) así como Khazaei *et al.* (2014) al encapsular antocianinas de pétalos de azafrán con maltodextrinas y goma arábica reportaron valores de L^* más altos, es decir, más luminosos y con valores más bajos de b^* (negativos) lo que indica mayores tendencias al azul que los encontrados para los encapsulados de antocianinas de maíz azul de este estudio.

Además, se obtuvo la diferencia total de color (ΔE) para los encapsulados para la cual se encontró efecto significativo ($P < 0.05$) entre concentraciones de fructanos. En la Tabla 39 se observa claramente que la adición de diferentes porcentajes de fructanos afectan el color (ΔE), principalmente al parámetro L^* , por sus contribuciones en la luminosidad, ya que se relacionan con el color blanco, como se muestra en los resultados obtenidos (Tabla 39).

7.6.2.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los resultados del análisis de microscopía electrónica de barrido de los encapsulados de antocianinas de maíz azul con diferentes concentraciones de fructanos de agave se muestran en la Figura 52. En las micrografías (Fig. 52a, b, c, d) se observan los encapsulados como una matriz de esferas, algunas de ellas comprimidas y con poca aglomeración entre las cápsulas (pequeños racimos), en cambio en el control de fructanos sin encapsular (Fig. 52e) se observan las esferas más completas, es decir, con menos esferas colapsadas o comprimidas solo con pequeñas marcas debido al acomodo entre las

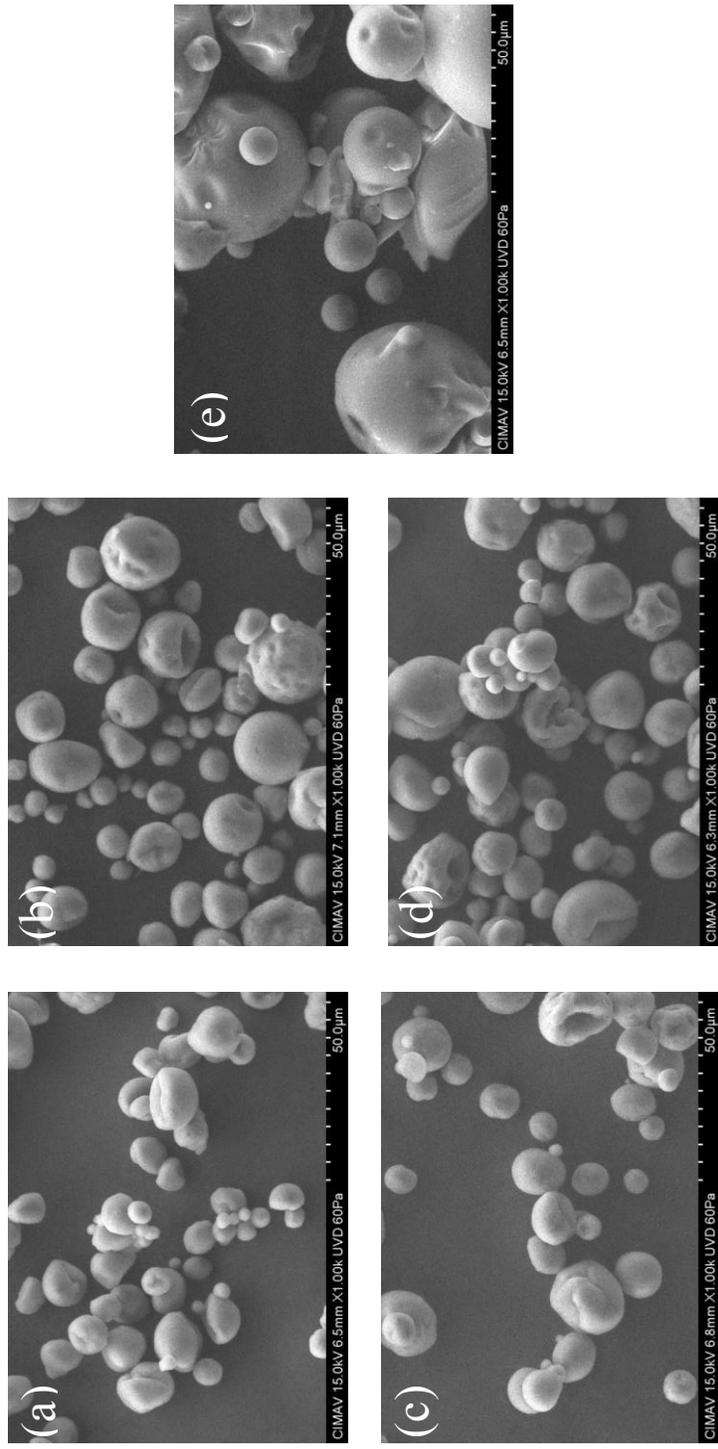


Figura 52. Microscopía electrónica de barrido de los encapsulados de antocianinas de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave. (a) 6%, (b) 8%, (c) 10%, (d) 12% y (e) fructanos de agave.

partículas de los fructanos. Cai y Corke (2000) reportaron que con la disminución de los sólidos en la alimentación (maltodextrina) antes del secado por aspersión el tamaño de partícula de los encapsulados de betacianinas de plantas de amaranto disminuyó. Sin embargo, en este estudio no se observan diferencias claras entre los encapsulados con diferente concentración de fructanos.

Las esferas de los diferentes tratamientos presentan superficies lisas, aunque también muestran pequeñas corrugaciones, así como variación en el tamaño de las partículas (5 – 30 μm). Estas diferentes morfologías e irregularidades en la superficie de las cápsulas pueden ser debidas a la composición de la alimentación, el tamaño de las gotas y de la temperatura durante el proceso de secado (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005; Handscomb y Kraft 2010).

Las cápsulas no esféricas o con forma irregular con aparición de cavidades en la superficie son atribuidas al colapso de la pared de la cápsula debido a la rápida evaporación del agua y a la consecuente contracción de las partículas durante el proceso de secado (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005; Saénz *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010; Saikia *et al.*, 2015). Resultados similares han sido reportados por Beirão-da-Costa *et al.* (2013) en cápsulas de aceite esencial de orégano con inulina como acarreador, quienes indicaron que el hallazgo de diferentes tamaños y formas en estas cápsulas fueron influenciadas por el material acarreador, la temperatura de secado y el contenido de inulina en la solución de alimentación.

Morfologías similares fueron observadas en microcápsulas de compuestos bioactivos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) con maltodextrina e inulina como agentes acarreadores (Saénz *et al.*, 2009). Así como en encapsulados de oleorresina de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* con maltodextrina, goma arábica, proteína de suero y entre ellos inulina de *Agave tequilana* Weber como acarreadores en diferentes proporciones (Bustos-Garza *et al.*, 2013). En encapsulados de aceite esencia de romero con diferentes acarreadores entre ellos inulina también se observaron morfologías con algunas similitudes (de Barros Fernandes *et al.*, 2014a).

7.6.3. Propiedades químicas de los encapsulados de antocianinas de maíz azul

7.6.3.1. Antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales de los encapsulados de extracto de maíz azul se presenta en la Tabla 40, donde se observa que su contenido disminuye ($P < 0.05$) conforme se aumenta el porcentaje de fructanos (Fig. 53). Este comportamiento puede estar relacionado a que con el aumento en el contenido de sólidos totales originados por la adición de fructanos, el contenido de antocianinas totales disminuye. Resultados similares han sido reportados por Ahmed *et al.* (2010a) en harinas de camote morado obtenidas por secado por aspersion tratadas con α -amilasa y maltodextrina. Asimismo, por Ahmed *et al.* (2010b) en encapsulados de camote morado obtenidos por secado por aspersion con ácido ascórbico y maltodextrina como acarreadores. En ambos estudios el contenido de antocianinas totales disminuyó al aumentar la cantidad de maltodextrina de 0.3% a 0.5% y de 0.3% a 1.0% con el otro acarreador fijo.

Otra de las razones por las cuales disminuyó el contenido de antocianinas con la adición de fructanos pudo ser debida a que los encapsulados en esas condiciones presentaron mayor humedad y a_w , por lo tanto, las antocianinas encapsuladas pudieron presentar mayor susceptibilidad debido a que su estructura principal (catión flavilio) pudo hidratarse y degradarse a su estructura incolora (chalcona) (Brouillard y Delaporte, 1977). Osorio *et al.* (2010) reportaron que en antocianinas de Corozo (*Bactris guineensis*) encapsuladas con maltodextrinas fueron altamente afectadas por la humedad del ambiente ($>76\%$).

Al comparar los encapsulados con el extracto de maíz azul se observa una pérdida significativa ($P < 0.05$) en el contenido de antocianinas totales. Los porcentajes de retención variaron de 26.49% a 17.14% para los encapsulados con menor y mayor concentración de fructanos, respectivamente (Tabla 40). Como se puede observar en la Figura 53 las antocianinas fueron muy susceptibles a las temperaturas del secado por aspersion ya que las pérdidas fueron considerables.

Laleh *et al.* (2006) pueden ser debidas a que la destrucción rápida de las antocianinas podría ser por la hidrólisis de la estructura 3-glucósido a altas temperaturas, la cual tiene un efecto protector en la antocianina inestable.

Tabla 40. Antocianinas totales, polifenoles totales y actividad antioxidante de los encapsulados de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.

Adición de acarreador (% p/v)	AT (mg/100 g)	PR (%)	PT (mg EAG/100 g)	PR (%)	AA ($\mu\text{mol ET/g}$)	PR (%)
6%	109.42 \pm 2.36 ^b	26.49	1350.38 \pm 20.15 ^b	66.11	36.06 \pm 1.22 ^b	38.54
8%	92.15 \pm 1.89 ^c	22.31	1257.51 \pm 23.19 ^c	61.56	32.30 \pm 1.11 ^c	34.52
10%	79.10 \pm 3.94 ^d	19.15	1171.79 \pm 18.23 ^d	57.37	29.42 \pm 1.17 ^d	31.44
12%	70.79 \pm 2.96 ^e	17.14	1118.56 \pm 6.69 ^e	54.76	27.18 \pm 0.81 ^e	29.05
Extracto de maíz azul	412.97 \pm 24.13 ^a	100.00	2402.47 \pm 52.28 ^a	100.00	93.57 \pm 3.10 ^a	100.00

Medias \pm desviación estándar del triplicado de la repetición de dos tratamientos. Valores con letra diferente por columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey. AT, antocianinas totales (mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/100 g); PT, polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/100 g); AA, actividad antioxidante (μmol equivalente de trolox/g); PR, porcentaje de retención.

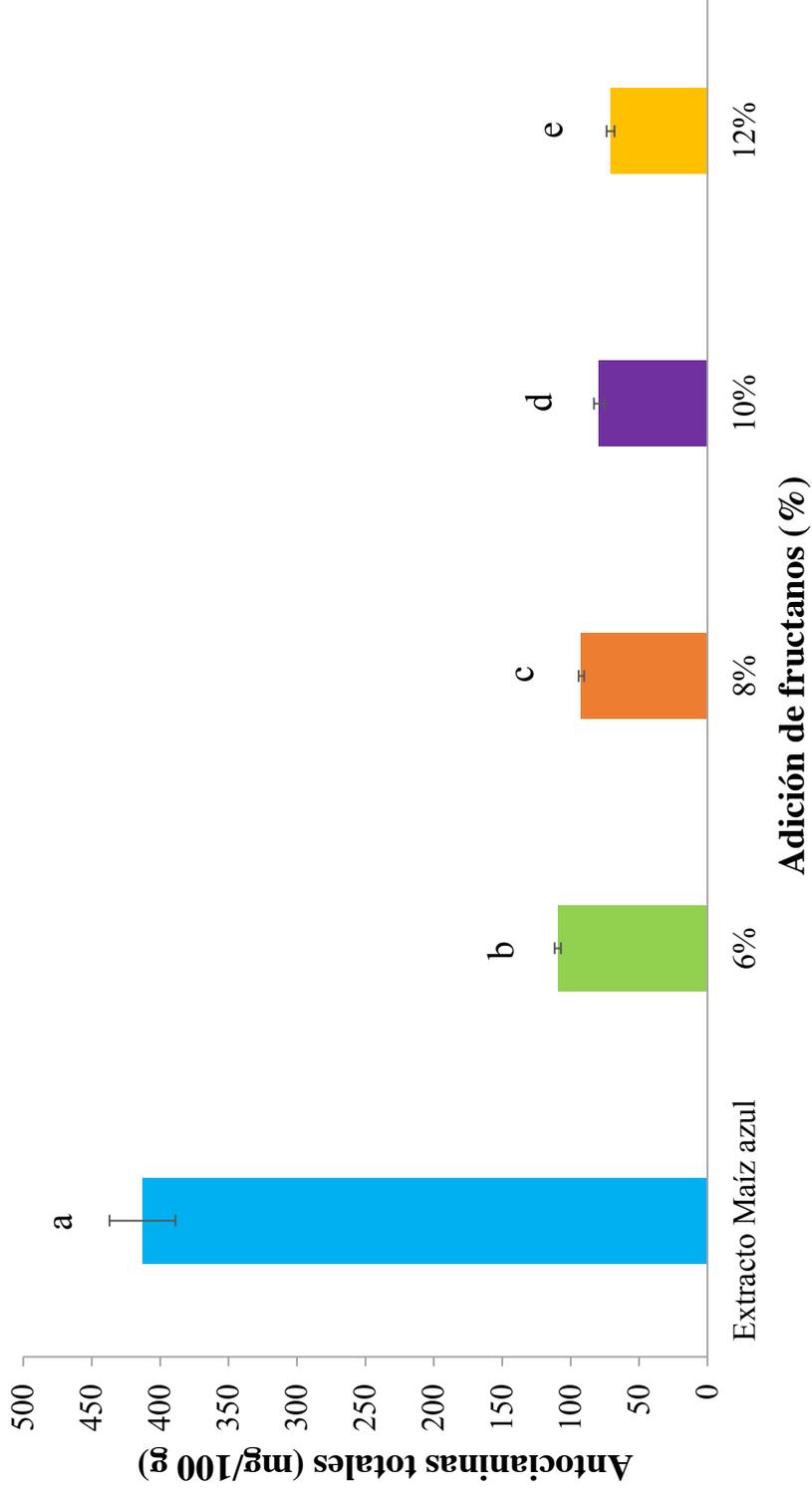


Figura 53. Contenido de antocianinas totales de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave. Letras diferentes en las barras representan diferencia significativa ($P < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

Otra posibilidad es que a temperaturas altas la hidrólisis del anillo pirilio resulta en la producción de chalconas, las cuales son responsables de la coloración café desarrollada en los alimentos que contienen antocianinas (Brouillard, 1982). Ersus y Yurdagel (2007) reportaron que altas temperaturas causaron mayores pérdidas de antocianinas durante el secado por aspersion, encontrando 160 °C como la temperatura con la que encontraron menores pérdidas que 180 °C y 200 °C. De igual manera reportaron que para los encapsulados de extracto zanahoria negra obtenidos con maltodextrinas con ED < 29 (equivalentes de dextrosa) se puede usar una temperatura de entrada de hasta 180 °C. Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011) no encontraron efecto significativo en los ED de las maltodextrinas en el contenido de antocianinas, pero si encontraron que con los acarreadores usados el contenido de antocianinas disminuyó conforme aumentó la temperatura de secado; las temperaturas probadas fueron 150 °C, 160 °C, 180 °C y 205 °C. Sin embargo, en este mismo estudio también reportaron que con temperaturas de entrada debajo de 180 °C no se afectó significativamente el contenido de antocianinas de los polvos encapsulados. Estos mismos autores también probaron inulina como acarreador; reportando que con el uso de éste el contenido de antocianinas totales fue menor y significativamente diferente ($P < 0.05$) a los obtenidos con maltodextrinas, pudiéndose deber a una mayor higroscopicidad de la inulina, siendo los encapsulados con este acarreador más susceptibles a la degradación de estos compuestos. Esto también pudo ser una causa por la que en este estudio la pérdida de antocianinas durante el secado por aspersion fue alta, ya que solo se usaron fructanos de agave en diferentes porcentajes de adición.

El contenido de antocianinas totales de los encapsulados de maíz azul es menor a lo reportado por Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011) con contenidos de antocianinas totales en encapsulados de grosella negra con maltodextrinas de 361 a 454 mg/100 g y con inulina de 296 a 399 mg/100 g. Asimismo, es menor a lo encontrado por Kuck y Noreña (2016) en cápsulas de extractos de piel de uva variedad Bordo con goma arábica, polidextrosa y goma guar con contenidos de antocianinas desde 1718 a 2105 mg/100 g. Nayak y Rastogi (2010) también reportaron contenidos más altos de antocianinas desde

485.2 a 325.3 mg/100 g en encapsulados de extractos de frutos de *Garcinia indica* con maltodextrinas de diferentes ED y mezcla de maltodextrina, fosfato tricálcico y goma arábica. Ersus y Yurdagel (2007) en microcápsulas de antocianinas de zanahoria negra con diferentes acarreadores cuantificaron desde 482.96 hasta 630.92 mg/100 g. En otro estudio, reportaron contenidos de antocianinas más cercanos de 118 a 131 mg/100 g en encapsulados del fruto de la palma de corozo (*Bactris guineensis*) con maltodextrinas como acarreador (Osorio *et al.*, 2010). De igual manera, García-Tejeda *et al.* (2015) reportaron en encapsulados de extracto de granos de maíz morado usando como agentes acarreadores almidón de maíz normal y ceroso tanto hidrolizados como acetilados, contenidos de antocianinas totales similares a algunos tratamientos de este estudio, así como menores (46 – 85 mg/100 g). Robert *et al.* (2010) también encontraron contenidos similares en encapsulados de extracto de granada (*Punica granatum*) de 47 a 84 mg/100 g. Asimismo, Ahmed *et al.* 2010b encontraron en cápsulas de camote morado con maltodextrinas y ácido cítrico como acarreadores contenidos más bajos de 52 a 57 mg/100 mg.

Las diferencias en el contenido de antocianinas totales al comparar con otros estudios se deben en primer lugar a que las fuentes o frutos de los que son obtenidos son ricos principalmente en este tipo de compuestos, además de que su composición en cuanto al tipo de antocianinas como monoglucósidos, diglucósidos, entre muchas otras, así como las proporciones de éstas es bastante diferente. Otra causa, puede ser como ya se mencionó el tipo de acarreador usado en los diferentes estudios, así como las condiciones de secado, cuando se emplea este método para “encapsular”.

7.6.3.2. Polifenoles totales

El análisis de los polvos encapsulados mostró que el contenido de polifenoles fue afectado significativamente ($P < 0.05$) por la cantidad de fructanos de agave añadidos al extracto de maíz azul. Conforme se incrementó el porcentaje de fructanos, el contenido de polifenoles totales disminuyó (Tabla 40), lo cual también está relacionado con el aumento en el contenido de sólidos originados por los fructanos. Este resultado concuerda con lo

reportado por Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) quienes encontraron menor contenido de polifenoles totales en encapsulados de jugo de tuna roja (*Opuntia ficus indica*) al agregar mayor contenido (15%, 22.5% y 30%) de fibra soluble (β -glucanos). Al comparar los encapsulados obtenidos con el extracto de maíz azul se observa que existe una disminución significativa ($P < 0.05$) del contenido de polifenoles totales (Figura 54), para todos los encapsulados. Estos resultados indican que los polifenoles son perdidos durante el proceso de secado por aspersion. Dicha pérdida está relacionada con la susceptibilidad de algunos ácidos fenólicos a la degradación y polimerización durante la exposición a altas temperaturas y al oxígeno (Changchub y Maitsuthisakul 2011; Kuck y Noreña, 2016). Respecto al efecto ejercido por la adición de fructanos, los porcentajes de retención oscilaron de 66.11% a 54.76% para los encapsulados con menor y mayor concentración de fructanos, respectivamente (Tabla 40), observándose una mayor retención a bajos % de adición de fructanos (6-8%). El contenido fenólico de los encapsulados de extracto de maíz azul es menor que lo reportado por Ahmed *et al.* (2010b) en encapsulados de compuestos bioactivos de camote morado con maltodextrinas y ácido cítrico como acarreadores con contenidos de 3692 a 5723 mg EAG/100 g. Asimismo, son bajos comparando con lo reportado por Kuck y Noreña (2016) en encapsulados de extractos de piel de uva variedad Bordo con goma arábica, polidextrosa y goma guar como agentes acarreadores (2143 a 2503 mg EAG/100 g). Sin embargo, son similares a lo encontrado por Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011) en microcápsulas de grosella negra con dextrosa como acarreador (1163.5 a 1251.4 mg EAG/100 g) y con inulina 967.2 mg EAG/100 g a 150 °C, siendo mayores comparadas con las microcápsulas obtenidas a 160 °C, 180 °C y 205 °C. De igual manera, Saikia *et al.* (2015) cuantificaron valores más bajos de polifenoles totales de 535 a 825 mg EAG/100 g en encapsulados de orujo de *Averrhoa carambola* con maltodextrina. Igualmente, Robert *et al.* (2010) reportaron contenidos de polifenoles menores en encapsulados de granada (*Punica granatum*) de 284 a 151 mg EAG/100 g.

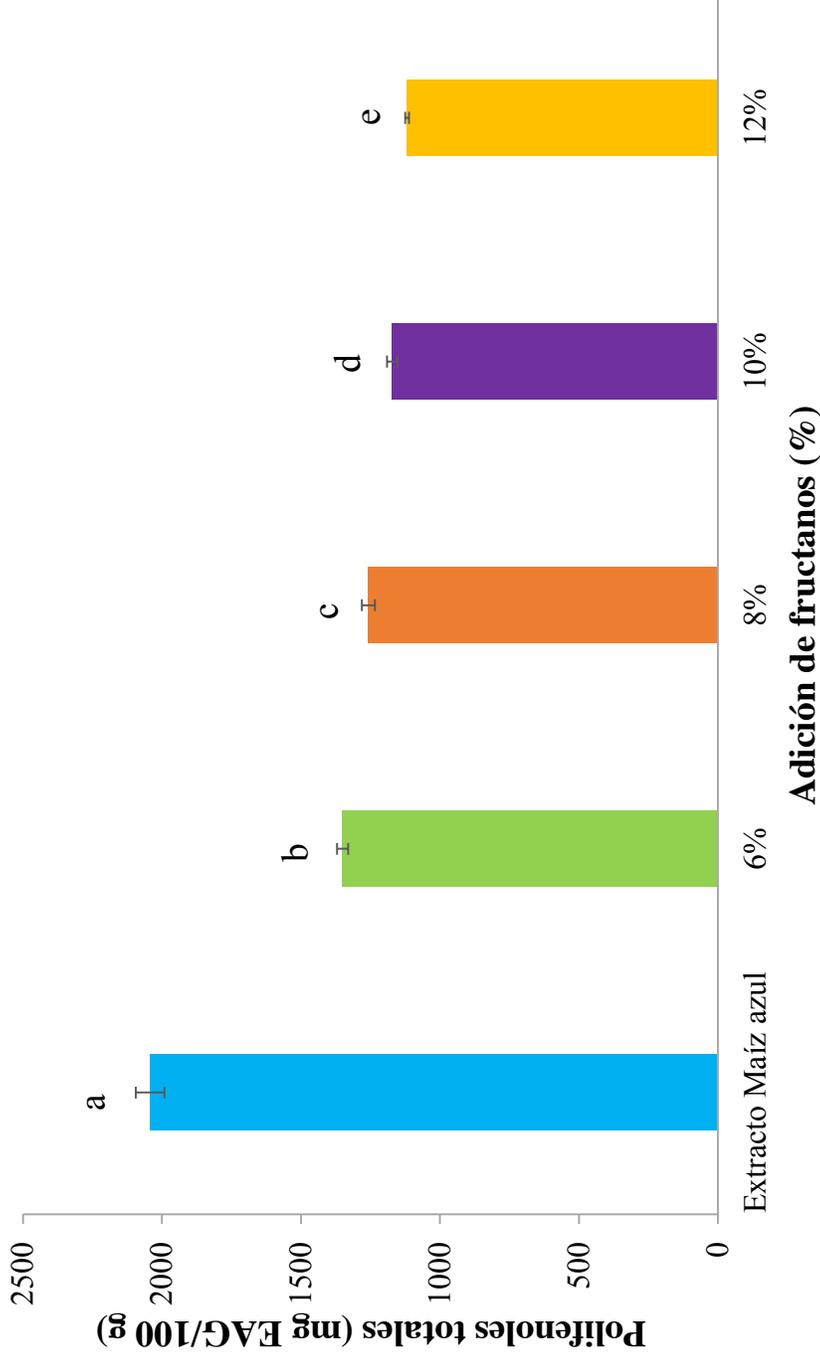


Figura 54. Contenido de polifenoles totales de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave. Letras diferentes en las barras representan diferencia significativa ($P < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

Las diferencias tan marcadas con otros estudios se deben en primer lugar a que la fuente de la que parten algunos estudios contiene mayores cantidades de compuestos fenólicos, además de que los encapsulados son obtenidos con otros agentes acarreadores, siendo según Robert *et al.* (2010) el tipo de agente encapsulante y la relación núcleo (compuesto a encapsular): recubrimiento las variables más importantes para la encapsulación de polifenoles.

7.6.3.3. Actividad antioxidante

La adición de fructanos de agave afectó significativamente ($P < 0.05$) la actividad antioxidante de los encapsulados de extracto de maíz azul. A mayor contenido de fructanos, los encapsulados presentaron menor actividad antioxidante (Tabla 40). Ahmed *et al.* (2010b) reportaron resultados similares, encontrando menor actividad antioxidante en encapsulados con mayores concentraciones de ácido ascórbico y maltodextrina que en los encapsulados con menores concentraciones de los mismos acarreadores. Esta diferencia la relacionaron con el menor contenido de antocianinas encontrado también en los encapsulados con mayor concentración de acarreadores. Comparando los encapsulados con el extracto de maíz azul se encontró una disminución significativa ($P < 0.05$) de la actividad antioxidante (Figura 55). Los porcentajes de retención variaron de 38.54% a 29.05% para los encapsulados con menor y mayor concentración de fructanos, respectivamente (Tabla 40). En la Figura 55 también se puede observar que el método de secado afectó significativamente la actividad antioxidante en los encapsulados, ya que estos presentaron una disminución notoria, respecto al contenido del extracto inicial.

Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2014) reportaron durante la encapsulación de compuestos de tuna roja que la actividad antioxidante no se ve afectada significativamente por las condiciones del secado por aspersion. Sin embargo, Kuck y Noreña (2016) durante la encapsulación por secado por aspersion de compuestos presentes en la piel de la uva variedad Bordo; reportaron que la actividad antioxidante disminuyó de 42.7% a 53.07%. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser debidos a que los componentes presentes en el maíz

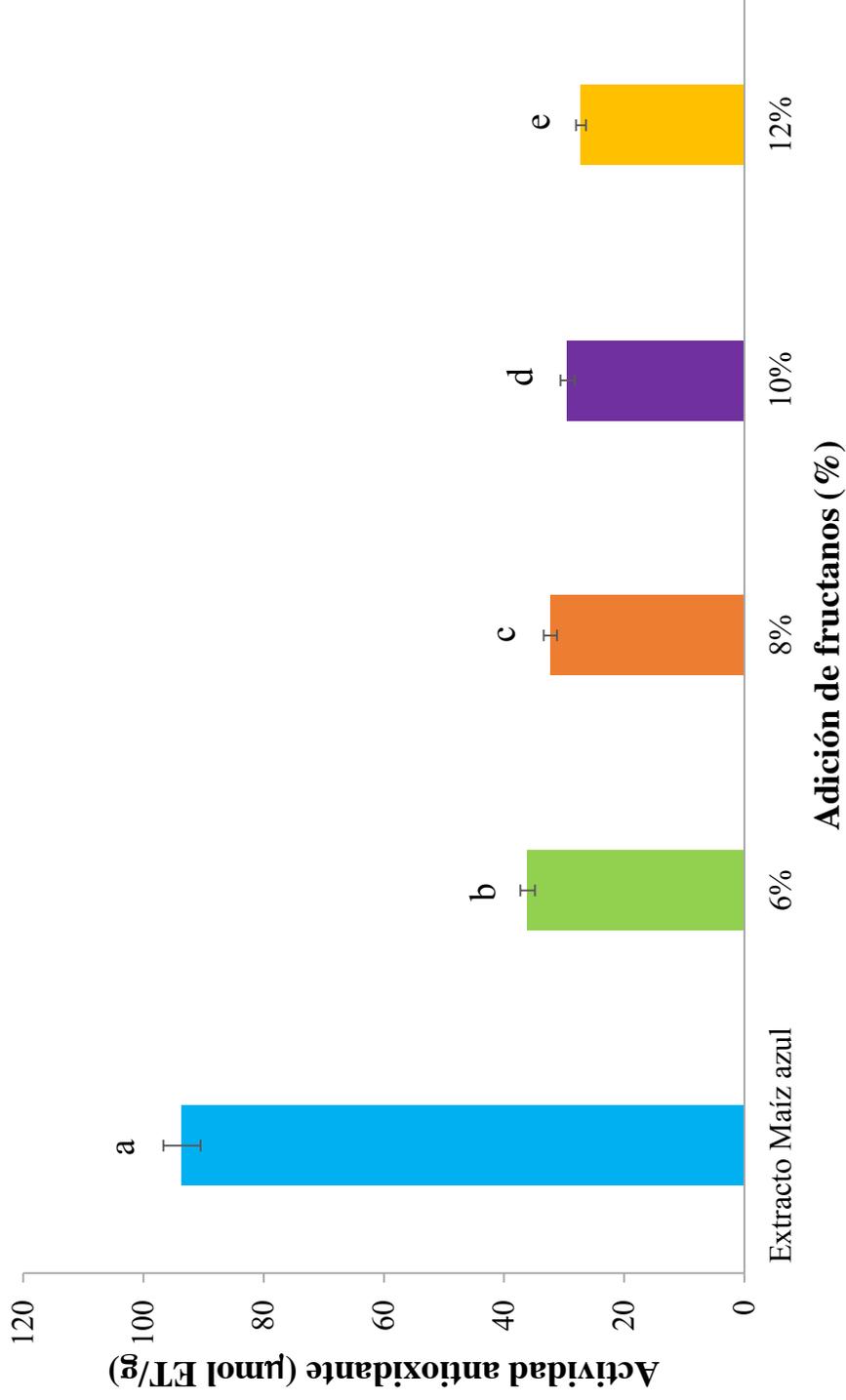


Figura 55. Actividad antioxidante de los encapsulados de extracto de maíz azul obtenidos por secado por aspersión con diferentes adiciones de fructanos de agave. Letras diferentes en las barras representan diferencia significativa ($P < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

azul como las antocianinas son más susceptibles a las temperaturas altas de secado (Ersus y Yurdagel 2007; Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011). Esto confirmándose con lo obtenido en polifenoles totales (Fig. 54) como en antocianinas totales (Fig. 53), ya que estos dos análisis y la actividad antioxidante presentaron el mismo comportamiento. Estudios previos han reportado una alta correlación de la actividad antioxidante con el contenido de antocianinas y la composición de polifenoles totales en alimentos (Camire *et al.*, 2002; Moyer *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006). Como ya se mencionó Ahmed *et al.* (2010b) reportaron que el contenido de antocianinas en encapsulados de compuestos de camote morado tiene relación con lo obtenido en la actividad antioxidante. De igual manera, Oki *et al.* (2002) reportaron que la actividad antioxidante de harina de camote morado es atribuida al contenido de antocianinas. Suda *et al.* (2002) indican que al menos un grupo cafeoil acilado de las antocianinas contribuye a una alta actividad de captación de radicales.

7.6.3.4. Antocianinas individuales

En la Figura 56 (a) se muestra el cromatograma de los estándares de antocianinas utilizados en este estudio: cianidina 3,5-diglucósido (pico 1, 3.4 min), pelargonidina 3,5-diglucósido (pico 2, 4.4 min), cianidina 3-glucósido (pico 3, 5.8 min) y pelargonidina 3-glucósido (pico 4, 7.5 min).

El perfil cromatográfico de las antocianinas encontradas en el extracto de maíz azul se observa en la Figura 56 (b), en la cual se observan 13 picos, de los cuales solo 2 pudieron ser identificados de acuerdo con su tiempo de retención. De esta manera, el pico 1 corresponde a la cianidina 3-glucósido y el pico 3 a la pelargonidina 3-glucósido con una concentración de 215.50 mg/100 g b.s. g y 31.70 mg/100 g b.s., respectivamente. Los otros 2 estándares se utilizaron debido a que otros estándares de antocianinas que existen en el mercado como la cianidina 3-galactósido y la malvidina 3-glucósido no se encontraron en un maíz azul de la misma zona, pero de otra cosecha (Sánchez-Madrigal *et al.*, 2015).

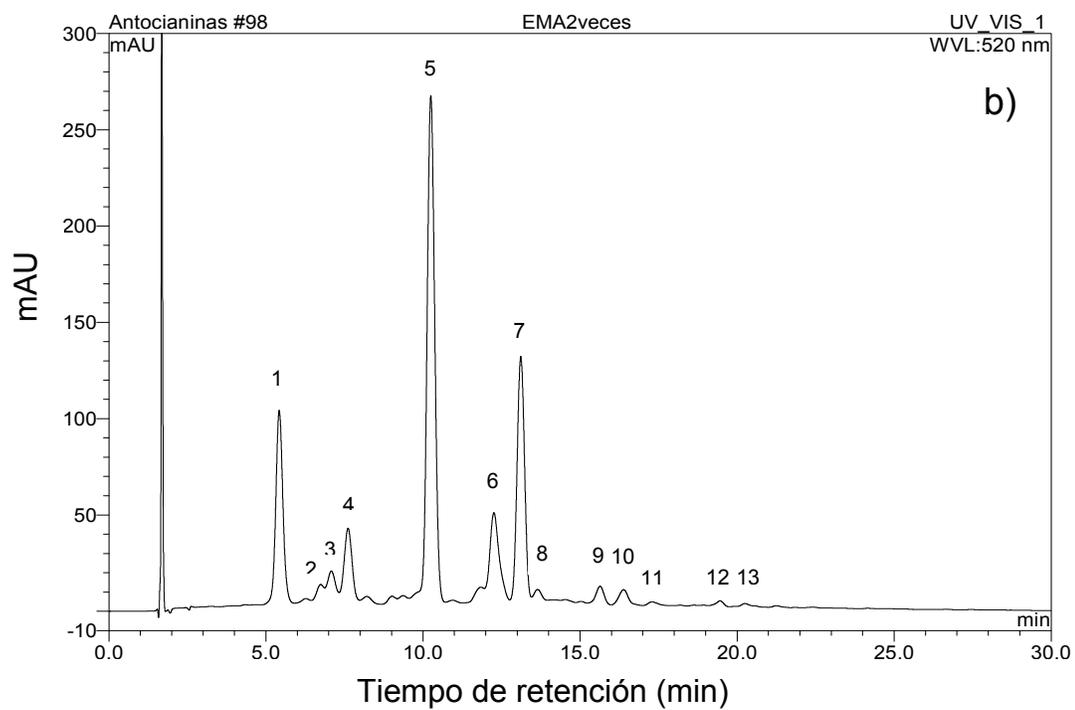
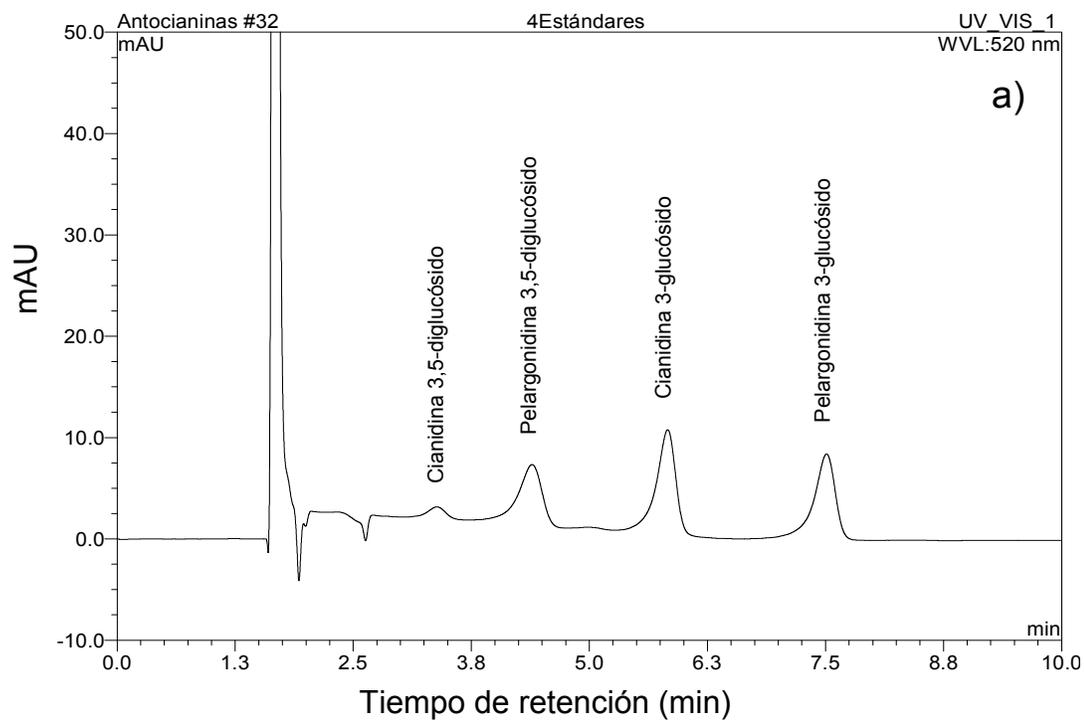


Figura 56. Cromatogramas de los estándares (a) y del extracto de maíz azul (b). Pico 1: cianidina 3-glucósido, pico 3: pelargonidina 3-glucósido, picos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 (no identificados).

Por lo tanto, se adquirieron otras antocianinas (cianidina 3,5-diglucósido y pelargonidina 3,5-diglucósido) para probar su presencia; sin embargo, éstas 2 antocianinas tampoco fueron identificadas en el cromatograma del extracto de maíz azul (Fig. 56b) de este estudio, ya que no se observaron picos en los tiempos de retención de estos 2 estándares, obteniéndose el primer pico (cianidina 3-glucósido) hasta después de los 5 minutos.

La proporción de las antocianinas identificadas cianidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido fue del 15.74% y 4.97%, respectivamente. Sin embargo, se encontraron 2 picos con proporciones más altas que la cianidina 3-glucósido; el pico 5 con 39.25% y el pico 7 con 17.88%, las cuales de acuerdo con otros estudios podrían ser antocianinas aciladas.

Fossen *et al.* (2001) identificaron la cianidina 3-glucósido, la pelargonidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y antocianinas del tipo acilado en flores y hojas de la planta del maíz. Las antocianinas reportadas fueron cianidina 3-(6"-malonilglucósido), cianidina 3-(3",6"-dimalonilglucósido), peonidina 3-(6"-malonilglucósido) y peonidina 3-dimalonilglucósido, constituyendo estas antocianinas aciladas más del 40% del total de las antocianinas.

En maíz morado también se ha reportado la contribución significativa de antocianinas aciladas teniendo como grupo acilo el ácido malónico, estas antocianinas incluyen a la cianidina 3-(6"-malonilglucósido), pelargonidina 3-(6"-malonilglucósido), peonidina 3-(6"-malonilglucósido) así como la dimalonil cianidina 3-glucósido, también constituyendo con más del 40% del total de las antocianinas (de Pascual-Teresa *et al.*, 2002; Pedreschi y Cisneros-Zeballos 2007). Salinas-Moreno *et al.* (2003) y Cortés-Gómez *et al.* (2006) reportaron resultados similares en maíz azul, identificando a la cianidina 3-glucósido, la pelargonidina 3-glucósido y la malvidina 3-glucósido, así como dos antocianinas en mayor proporción del tipo acilado que probablemente sean dos de las ya mencionadas; la 3-(6"-malonilglucósido) y la cianidina 3-(3",6"-dimalonilglucósido) (Salinas-Moreno *et al.*, 2005).

Asimismo, se observaron 2 picos más altos que la pelargonidina 3-glucósido (pico 4 y 6) con proporciones del 7.66% y 9.35%, respectivamente.

Los resultados de la cuantificación de las antocianinas individuales a partir de los estándares usados se muestran en la Tabla 41. En donde como ya se mencionó para el extracto de maíz sin procesar y por lo tanto para los encapsulados obtenidos, no se encontró la cianidina 3,5-diglucósido y la pelargonidina 3,5-diglucósido. La concentración de cianidina 3-glucósido disminuyó conforme se incrementó la proporción de acarreador (fructanos de agave), siendo estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) los encapsulados de 6% con los de 10% y 12%, sin presentar diferencias ($P > 0.05$) éstos dos últimos. Al comparar con la concentración del extracto de maíz sin procesar, los porcentajes de retención variaron de 21.04% a 8.04% para los encapsulados con menor y mayor concentración de fructanos, respectivamente (Tabla 41). Para la concentración de la pelargonidina 3-glucósido, ésta también disminuyó al incrementar la concentración de fructanos, siendo significativamente diferentes ($P < 0.05$) los encapsulados con 6% y 8% de acarreador con los de 10% y 12%.

Los porcentajes de retención para esta antocianina individual oscilaron de 18.05% (para los encapsulados con 6% de fructanos) a 10.54% (para los encapsulados con 12% de fructanos). Los resultados obtenidos para entocianinas individuales, es decir, el comportamiento de disminuir conforme se aumenta la cantidad de acarreador es similar a lo encontrado para el contenido de antocianinas totales; relacionándose como ya se mencionó con el aumento en el contenido de sólidos totales y además a una mayor humedad y a_w generada por una mayor adición de fructanos, lo cual pudo afectar el anillo del catión flavilio favoreciendo su degradación en la formación de su respectiva chalcona incolora.

De igual manera, es claramente observada la susceptibilidad de éstas 2 antocianinas individuales a la temperatura provocada por el secado por aspersión, ya que sus pérdidas fueron considerables; de un 78.95% para la cianidina 3-glucósido y de un 81.94% para la pelargonidina 3-glucósido; para los encapsulados con los mejores resultados en cuanto a contenido de pigmentos y antioxidantes se refiere (6% de acarreador).

Los cromatogramas de los encapsulados de extracto de maíz azul se muestran en la Figura 57.

Tabla 41. Contenido de antocianinas individuales de los encapsulados de maíz azul producidos con diferentes concentraciones de fructanos de agave.

Adición de acarreador (% p/v)	Cy-3,5-di-glu (mg/100 g)	Pe-3,5-di-glu (mg/100 g)	Cy-3-glu (mg/100 g)	PR (%)	Pe-3-glu (mg/100 g)	PR (%)
6%	ND	ND	45.34 ± 4.17 ^b	21.04	5.72 ± 0.42 ^b	18.05
8%	ND	ND	34.82 ± 0.13 ^{bc}	16.15	4.77 ± 0.04 ^b	15.04
10%	ND	ND	27.46 ± 0.24 ^{cd}	12.74	3.53 ± 0.03 ^c	11.16
12%	ND	ND	18.84 ± 0.20 ^d	8.74	3.34 ± 0.10 ^c	10.54
Extracto de maíz azul	ND	ND	215.50 ± 3.57 ^a	100.0	31.70 ± 0.35 ^a	100.0

Medias ± desviación estándar del triplicado de la repetición de dos tratamientos. Valores con letra diferente por columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey. Cy-3-glu, cianidina-3-glucósido; Pe-3-glu, pelargonidina-3-glucósido; Cy-3,5-di-glu, cianidina-3,5-di-glucósido; Pe-3,5-di-glu, pelargonidina-3,5-di-glucósido; ND, no detectado; PR, porcentaje de retención.

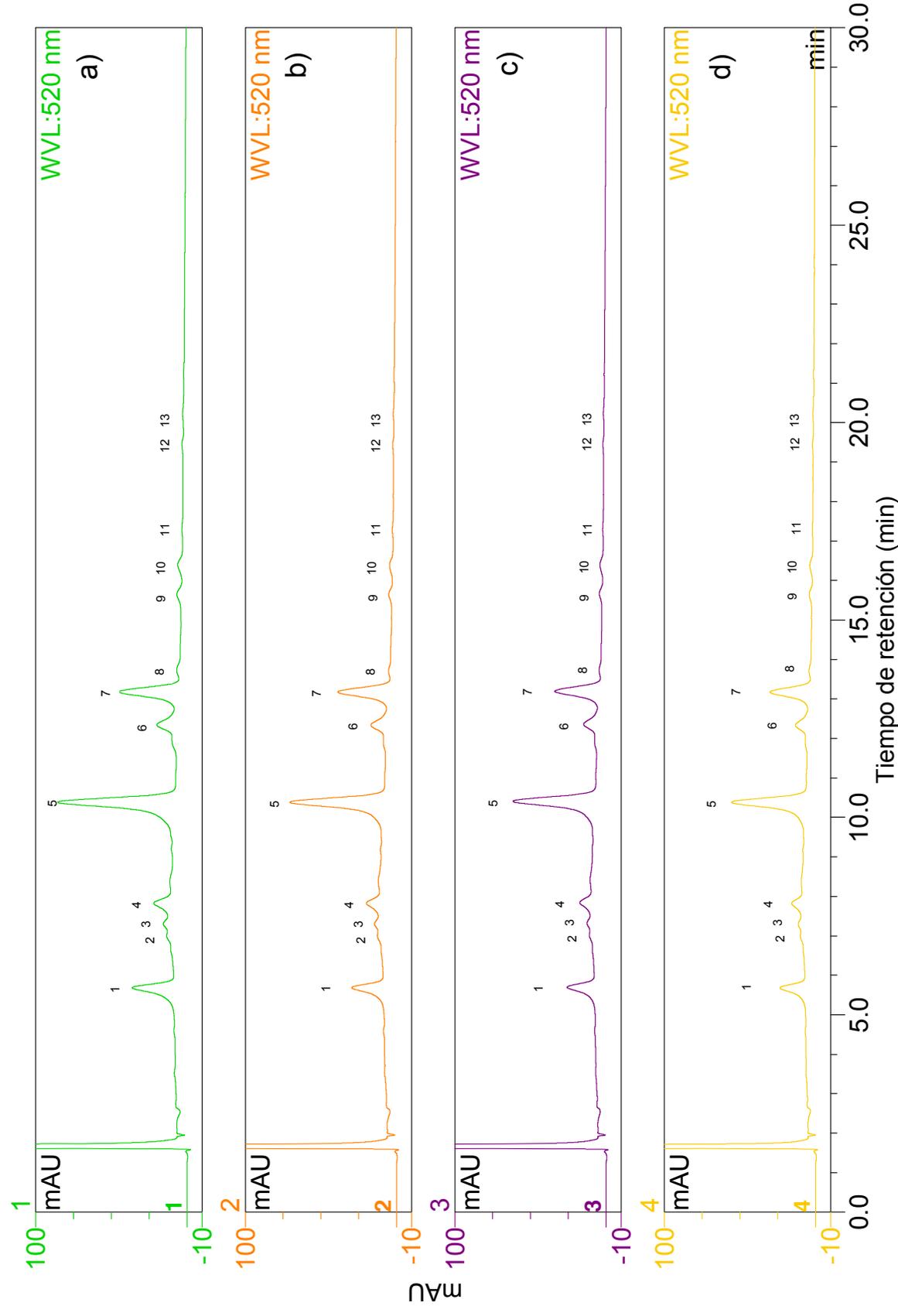


Figura 57. Cromatogramas de los encapsulados de extracto de maíz azul con diferentes concentraciones de fructanos de agave. (a) 6%, (b) 8%, (c) 10%, (d) 12%.

En todos los encapsulados también se observan los 13 picos encontrados en la muestra de extracto de maíz azul (Fig. 56b), confirmándose con esto que, aunque el secado por aspersión disminuyó considerablemente el contenido de antocianinas individuales, ningún pico, es decir, ninguna antocianina individual desapareció totalmente.

Aunque solo se identificaron y se cuantificaron 2 antocianinas, al comparar el pico más alto de cada cromatograma (pico 5) se confirma lo obtenido para éstas 2, ya que en la Figura 57 se observa de una manera más clara lo obtenido en la cuantificación tanto de la cianidina 3-glucósido como de la pelargonidina 3-glucósido. El pico 5 (no identificado) disminuyó al aumentar la concentración de acarreador, encontrándose para los encapsulados con 6% de fructanos un área promedio de 23.95 (Fig. 57a), para los encapsulados con 8% un área de 18.33 (Fig. 57b), para los que contenían 10% el área promedio fue de 16.25 (Fig. 57c) y para los de 12% el área fue de 14.72 (Fig. 57d). Lo anterior también se observa con para los picos no identificados 4, 6 y 7, los cuales como ya se mencionó pertenecen a los picos con mayor proporción dentro de los cromatogramas; con esto se puede decir que los resultados obtenidos en antocianinas totales en todos los tratamientos fueron mayormente influenciados por estos picos no identificados (4, 5, 6 y 7), además de la cianidina 3-glucósido.

VIII. CONCLUSIONES

8.1. Estudio No. 1

La extracción de carbohidratos de *A. tequilana* Weber var. azul se mejoró con el uso de ultrasonido. Tanto la DPU como la relación S:L afectaron significativamente la extracción de carbohidratos: con la DPU más alta y la relación S:L más baja se obtuvieron los niveles más altos de REC, glucosa, fructosa, sacarosa y FRU. La planta de agave de 7 años presentó los niveles más altos de REC y FRU pero los niveles más bajos de glucosa, fructosa y sacarosa. El GP_n fue mayor en la planta de mayor edad (7 años), lo que indica la presencia de polímeros de fructanos más largos. También la DPU más alta provocó cierta degradación de los fructanos, disminuyendo el GP_n en ambas piñas de agave. A pesar de este efecto, la extracción de altos niveles de carbohidratos usando ultrasonido puede ser una ventaja sobre los métodos tradicionales de extracción térmica, que producen una mayor degradación de los fructanos con GP_{ns} más bajos. Adicionalmente, considerando la temperatura de extracción de ambos métodos, la EAU podría representar un menor consumo de energía en comparación con el tratamiento térmico tradicional a altas temperaturas. Estos resultados sugieren que la tecnología de EAU es prometedora para la extracción de fructanos y otros polisacáridos encontrados en diferentes plantas. Sin embargo, para considerar esta tecnología como un método superior, para su aplicación a escala industrial, se requieren más estudios para evaluar este proceso, como el consumo de energía que se puede evaluar junto con las mejores condiciones para la extracción de fructanos de estos tipos de plantas (*Agavaceas*).

8.2. Estudio No. 2

El modelo propuesto de segundo orden, que implica la metodología de superficie de respuesta, predijo adecuadamente la extracción de fructanos asistida por ultrasonido a partir de sotol silvestre (*D. wheeleri*), a diferentes PU y temperaturas. Un aumento de la PU de hasta 59.05 W y 36.01 °C condujo a un aumento en el contenido de fructanos, con una liberación mínima de azúcares simples (glucosa y fructosa), indicando una hidrólisis mínima de fructanos. Esto resultó en extractos con valores de GP_n de 4.7. Aunque el contenido de fructanos no fue diferente de los obtenidos por extracción térmica tradicional, la EAU minimizó el daño de la molécula de azúcar, resultando en fructanos con mayor GP_n en tiempos de extracción cortos. Estos resultados sugieren que la EAU es una alternativa amigable con un menor consumo de energía para la extracción de fructanos de tejidos de plantas como el sotol (*D. wheeleri*).

8.3. Estudio No. 3

El modelo de segundo orden explicó adecuadamente las tendencias en AR, FRU, glucosa y GP_n durante la extracción de carbohidratos solubles de piñas de sotol a varias concentraciones de enzima y sustrato. Concentraciones bajas de sustrato con concentraciones de enzima de más de 87.87 U/mL resultaron en altas concentraciones de AR. A condiciones cercanas de extracción (83.04 U/mL de enzima; 6.70 g/100 mL de sustrato), se observó el máximo contenido de fructanos. Ambas respuestas fueron coincidentes con el GP_n obtenido, que varió de 5.48 a 16.18. Las mejores condiciones de extracción estimadas se obtuvieron a una concentración de enzima de 11.6-45.6 U/mL y cantidad de sotol en el medio de 9.15 a 12.56 g/100 mL, resultando en extractos con AR de 7.8 a 10.6 g/100 g b.s., fructanos de 37.58 a 38.58 g/100 g b.s., y GP_n de 8-10, con bajo contenido de glucosa, fructosa y sacarosa. Los resultados mostraron que la extracción de carbohidratos complejos, como los fructanos, es una alternativa tecnológica prometedora a otros métodos de extracción, ya que favorece la extracción de estos componentes, dando como resultado extractos con GPs que pueden aplicarse para formulaciones de productos funcionales con bajo e intermedia viscosidad con efectos prebióticos. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la extracción enzimática con enzimas individuales y optimizar aún más la extracción de fructanos.

8.4. Estudio No. 4

En este estudio, se investigaron las condiciones óptimas para la extracción asistida con enzimas de polisacáridos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*) a través de pruebas de factores simples, de un experimento ortogonal y usando la metodología de la superficie de respuesta. Entre todos los parámetros investigados, el pH, la temperatura, las enzimas utilizadas, su concentración presentaron efecto significativo en la extracción de polisacáridos de *D. wheeleri*. Asimismo, los resultados de este estudio demostraron que la extracción asistida por enzimas ofrece mejores rendimientos que un tratamiento sin enzimas. Los mejores rendimientos de polisacáridos de sotol con enzimas individuales fueron logrados en 20 min a 40 °C por la celulasa y hemicelulasa. Sin embargo, se demostró que con el uso de las 4 enzimas (celulasa, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa) se obtuvo el más el mayor rendimiento de extracción de polisacáridos de sotol. De acuerdo con el diseño ortogonal las concentraciones óptimas de cada enzima en % p/p fueron 10%, 10%, 8% y 10%, respectivamente. El modelo de segundo explicó adecuadamente las tendencias en el REP, FRU, AR, glucosa, fructosa, sacarosa y GP_n a diferentes concentraciones de enzimas y temperatura. De acuerdo con la optimización gráfica se obtuvieron mejores resultados, prediciendo los REP y contenido de FRU más altos de 71.76% y 50.36 g/100 g, respectivamente; esto a una concentración de la enzima celulasa del 8%, pectinasa, xilanasas y hemicelulasa del 4% a una temperatura de extracción de 39 °C. A estas condiciones el modelo ajustado también predice un contenido de AR de 21.66 g/100 g, de glucosa de 5.34 g/100 g, de fructosa de 3.95 g/100 g, sacarosa de 0.72 g/100 g y un GP_n de 1.74. Con estos resultados se demuestra que la extracción asistida con enzimas podría ser una alternativa para la extracción de fructanos y de otros polisacáridos presentes en plantas de sotol, aunque con extractos de bajo grado de polimerización pero que podrían ser aplicados para la formulación de productos con efecto prebiótico. Sin embargo, para considerar esta extracción con posibilidad de aplicación a mayor escala, se tendrían que realizar mayores estudios de viabilidad como costos por las enzimas o considerar utilizar solo la enzima celulasa que es la de menor costo pudiendo aún así encontrar buenos rendimientos de extracción de polisacáridos de *D. wheeleri*.

8.5. Estudio No. 5

La extracción enzimática asistida con ultrasonido fue la más efectiva comparada con varios tratamientos sinérgicos de extracción, resultando con valores de REP de hasta 72.08% en comparación con el control a 85 °C con solo 46.01%. Además, se obtuvieron cortos tiempo de extracción, por lo que esta extracción podría ser usada para mejorar los rendimientos de extracción de polisacáridos de sotol (*Dasyilirion wheeleri*). Se optimizaron los rangos de tres de los principales factores que afectaron el REP de sotol de acuerdo con experimentos de factores simples. Posteriormente, para optimizar aún más las condiciones de extracción de polisacáridos de sotol, potencia de ultrasonido, temperatura de extracción y concentración de enzimas se usó la metodología de superficie de respuesta. El modelo de segundo orden dio una descripción satisfactoria de los datos experimentales obtenidos del REP, FRU, AR, glucosa, fructosa, sacarosa y GP_n. Así como las condiciones óptimas de extracción de potencia de ultrasonido 43.79 W, temperatura de extracción 44.09 °C y concentración de enzimas 3.06 g/L, para encontrar el máximo REP de 69.95%. Asimismo, se encontraron las condiciones óptimas para la máxima extracción de FRU (51.69%), la cuales fueron de 50.19 W, 50.73 °C y 3.28 g/L. Ambos resultados presentaron valores predichos muy cercanos a los encontrados gráficamente 69.71% y 51.49 g/100 g, respectivamente. Los resultados mostraron que la extracción enzimática asistida con ultrasonido de fructanos de sotol puede ser una alternativa tecnológica prometedora a otros métodos que favorece la extracción de dichos compuestos; aunque los extractos obtenidos presentaron bajos GPs pueden ser aplicados para formular productos alimenticios funcionales con baja viscosidad y efectos prebióticos.

8.6. Estudio No. 6

Este estudio describe el uso de fructanos de agave en diferentes concentraciones como material de pared o acarreador para la encapsulación de extracto de maíz azul usando la técnica de secado por aspersión. Los resultados de este estudio indicaron que la concentración de fructanos de agave afectó las propiedades fisicoquímicas de los encapsulados de maíz azul. El incremento de la cantidad de fructanos como acarreador aumentó la densidad aparente, la humedad, la a_w , el pH y el ISA; por el contrario, disminuyó la higroscopicidad, el IAA, así como el contenido de pigmentos y antioxidantes de los encapsulados (antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante y antocianinas individuales). El color también fue afectado estadísticamente con el aumento de la concentración de fructanos; incrementándose la luminosidad y afectando principalmente este parámetro L^* a la diferencia total de color (ΔE) de los encapsulados. Las propiedades térmicas (T_g) y morfológicas (SEM) no se vieron afectadas por las diferentes concentraciones de fructanos usadas. Los resultados sugieren que mezclas con fructanos de agave a concentraciones del 6% (p/v) con extractos ricos en antocianinas provenientes de maíz azul, para su encapsulación por secado por aspersión a 150 °C, favorecieron altos valores de retención de antocianinas (26.49%), polifenoles (66.11%) y actividad antioxidante (38.54%) con propiedades físicas adecuadas para su máxima estabilidad. Los polvos encapsulados de extracto de maíz azul usando fructanos de agave como acarreador representan un aditivo alimenticio prometedor para su posible incorporación en alimentos y así pigmentarlos de forma natural, además de impartirles propiedades antioxidantes y presencia de componentes bioactivos (fibra soluble) que puede beneficiar la salud del consumidor.

IX. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos a lo largo de este estudio se obtuvieron condiciones de extracción de carbohidratos de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) y sotol (*Dasyilirion wheeleri*) con diferentes métodos alternativos de extracción para mejorar rendimientos de extracción y calidad en los carbohidratos obtenidos a partir de estas 2 plantas. A partir de lo obtenido a través del método de extracción asistido con ultrasonido se encontraron resultados favorables que sugieren que esta tecnología es prometedora para la extracción de fructanos y otros carbohidratos de plantas de agave y sotol. Sin embargo, para considerarla como un método superior para su aplicación a escala industrial se requieren más estudios para evaluarlo, como consumo de energía, lo cual puede ser evaluado en conjunto con las mejores condiciones para la extracción de fructanos de estos tipos de plantas. En cuanto a la extracción asistida con enzimas, se obtuvieron mejores rendimientos de extracción, sin embargo, los GP de los fructanos se vieron afectados, disminuyendo considerablemente. Asimismo, se obtuvo una mezcla óptima de 4 enzimas para la obtención de un mayor rendimiento de carbohidratos de sotol, sin embargo, para considerar esta extracción con posibilidad de aplicación a mayor escala, se tendrían que realizar mayores estudios de viabilidad como costos por las enzimas o considerar utilizar solo la enzima celulasa que es la de menor costo pudiendo aún así encontrar buenos rendimientos de extracción de polisacáridos de sotol. Aunque en este estudio solo se evaluaron extractos, los posibles polvos de fructanos que podrían ser obtenidos a través de la extracción enzimática podrían ser aplicados en diferentes alimentos y brindar efecto prebiótico por su bajo GP. Asimismo, estos polvos podrían ser usados en diferentes procesos, por ejemplo, como excipiente en la elaboración de pastillas y causar al mismo tiempo efecto prebiótico. Otro de los posibles usos es el investigado en este estudio, es decir, como acarreadores para la encapsulación de pigmentos u otros compuestos bioactivos, tal como se demostró en este estudio que pueden ser usados sin el uso de otro acarreador, sin embargo, podrían evaluarse en conjunto con otros acarreadores como maltodextrinas, goma guar, entre otros, para mejorar algunas características de los polvos encapsulados.

X. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000. Approved Methods of AACC. Method 14–40, 10th ed. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Abdel-Aal ESM, Hucl P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry* 76:350–354.
- Abou-Arab AA, Talaat HA, Abu-Salem FM. 2011. Physico-chemical properties of inulin produced from Jerusalem artichoke tubers on bench and pilot plant scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5:1297–1309.
- Abozed SS, Abdelrashid A, El-Kalyoubi M, Hamad KI. 2009. Production of inulin and high-fructose syrup from Jerusalem artichoke tuber (*Helianthus tuberosus* L.). *Annals of Agricultural Science (Cairo)* 54:417–423.
- Aguerre RJ, Suarez C, Viollaz PE. 1989. Swelling and pore structure in starch materials. *Journal of Food Engineering* 9:71–80.
- Ahmed M, Akter MS, Eun JB. 2010a. Impact of α -amylase and maltodextrin on physicochemical, functional and antioxidant capacity of spray-dried purple sweet potato flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(3):494–502.
- Ahmed M, Akter MS, Lee JC, Eun JB. 2010b. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT-Food Science and Technology* 43(9):1307–1312.
- Alamilla-Beltrán L, Chanona-Pérez JJ, Jiménez-Aparicio AR, Gutiérrez-López GF. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67(1-2):179–184.
- Alvarado C, Camacho RM, Cejas R, Rodríguez JA. 2014. Profiling of commercial agave fructooligosaccharides using ultrafiltration and high-performance thin layer chromatography. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13(2):417–427.
- Anderson RA, Conway HF, Pfeifer VF, Griffin EL Jr. 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion-cooking. *Cereal Science Today* 14:4–12.
- AOAC. 1996. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. (16th ed.). Washington: AOAC International.

- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. (15th ed.). Washington: AOAC International.
- Apolinário, AC, de Lima Damasceno, BPG, de Macêdo Beltrão, NE, Pessoa, A, Converti, A, da Silva, JA. 2014. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers* 101:368–378.
- Arrizon J, Morel S, Gschaedler A, Monsan P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry* 122(1):123–130.
- Asadi M. 2007. *Beet-Sugar Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23:257–270.
- Bailey MJ, Pessa E. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme and Microbial Technology* 12:266–271.
- Bakowska-Barczak AM, Kolodziejczyk PP. 2011. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2):1301–1309.
- Barclay T, Gini-Markovic M, Cooper P, Petrovsky N. 2010. Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemistry* 1:27–50.
- Beirão-da-Costa S, Duarte C, Bourbon AI, Pinheiro AC, Januário MIN, Vicente AA, Beirão-da-Costa ML, Delgadillo I. 2013. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. *Food Hydrocolloids* 33:199–206.
- Bendjeddou D, Lalaoui K, Satta D. 2003. Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of ethnopharmacology* 88(2):155–160.
- Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:2123–2129.
- Bogler DJ. 1998. Three new species of *Dasyilirion* (Nolinaceae) from Mexico and

- clarification of the *D. longissimum* complex. *Brittonia* 50(1):71–86.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology* 28:25–30.
- Brouillard R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In: Markakis P (ed.) *Anthocyanins as food colors*. Academic Press Inc, New York, pp 1–40.
- Brouillard R, Delaporte B. 1977. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society* 99:8461–8468.
- Bustos-Garza C, Yáñez-Fernández J, Barragán-Huerta BE. 2013. Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International* 54(1):641–649.
- Cacace JE, Mazza G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolics from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59:379–389.
- Cai W, Gu X, Tang J. 2008. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydrate polymers* 71(3):403–410.
- Cai YZ, Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of food science* 65(7):1248–1252.
- Camire ME, Chaovanalikit A, Dougherty MP, Briggs JL. 2002. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. *Journal of Food Science* 67(1):438–441.
- Capelo JL, Maduro C, Vilhena C. 2005. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid–liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrasonics Sonochemistry* 12(3):225–232.
- Cara C, Ruiz E, Oliva JM, Sáenz F, Castro E. 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 99(6):1869–1876.
- Cardoso MVC, Carvalho LVC, Sabadini E. 2012. Solubility of carbohydrates in heavy water. *Carbohydrate Research* 353:57–61.

- Castellanos-Pérez N, Rodríguez-Mendiola MA, López de Alba PL, López-Martínez L, Gutiérrez-Miceli FA, Arias-Castro C. 2012. Optimización de los procesos de extracción y fraccionamiento por grado de polimerización de fructanos, obtenidos a partir de *Agave tequilana* Weber var. azul, para la obtención de prebióticos. *Gayana Botánica* 69:31–39.
- Chacón-Villalobos A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17:265–286.
- Changchub L, Maisuthisakul P. 2011. Thermal stability of phenolic extract and encapsulation from mango seed kernel. *Agricultural Science Journal* 42(2):397–400.
- Chávez-Rodríguez A, Farias-Cervantes VS, Luna-Solano G, Chávez-Rodríguez AM, Ortiz-Basurto RI, Andrade-González I. 2016. Quality attributes and particles deposition of spray dried fructans of blue agave juice. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15(2):493–502.
- Chegini GR, Ghobadian B. 2005. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. *Drying Technology* 23:657–668.
- Chemat F, Huma Z, Han M. 2001. Application of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry* 18:813–835.
- Chemat F, Huma Z, Khan M. 2011. Application of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18(4):813–835.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AN, Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review *Ultrasonics Sonochemistry* 34:540–560.
- Chemat F, Tomao V, Virost M. 2008. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. En *Handbook of food analysis instruments*, Ötles S (ed.). CRC Press: Boca Raton, pp. 85–103.
- Chen H, Zhou X, Zhang J. 2014. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydrate polymers* 111:567–

575.

- Chen R, Li S, Liu C, Yang S, Li X. 2012. Ultrasound complex enzymes assisted extraction and biochemical activities of polysaccharides from *Epimedium* leaves. *Process Biochemistry* 47(12):2040–2050.
- Chen XQ, Zhang Y. 2007. Ultrasonic-associated extraction of water-soluble polysaccharides from defatted Korean pine kernel. *Journal of Forestry Research*, 18:133–135.
- Choudhari SM, Ananthanarayan L. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry* 102(1):77–81.
- Çinar I. 2005. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochemistry* 40(2):945–949.
- Cruz-Requena M, de la Garza-Toledo H, Aguilar-González CN, Aguilera-Carbó A, Reyes-Valdés H, Rutiaga M, Rodríguez-Herrera R. 2013. Chemical and molecular properties of stool plants (*Dasyilirion cedrosanum*) of different sex and its fermentation products. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences* 3(1):41–49.
- Dacome AS, Da Silva CC, da Costa CE, Fontana JD, Adelman J, da Costa SC. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 40(11):3587–3594.
- de Barros Fernandes RV, Borges SV, Botrel DA, Rodrigues de Oliveira, C. 2014a. Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. *International Journal of Food Science & Technology* 49(6):1522–1529.
- de Barros Fernandes RV, Borges SV, Botrel DA. 2014b. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate polymers* 101:524–532.

- Dekker RFH, Wallis AFA. 1983. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis–steam explosion. *Biotechnology and bioengineering* 25(12):3027–3048.
- Deng Q, Zhou X, Chen H. 2014. Optimization of enzyme assisted extraction of *Fructus mori* polysaccharides and its activities on antioxidant and alcohol dehydrogenase. *Carbohydrate polymers* 111:775–782.
- de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2002 LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1003–1006.
- Design Expert. 2005. Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA.
- de León-Rodríguez A, González-Hernández L, De la Rosa APB, Escalante-Minakata P, López MG. 2006. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 54:1337-1341.
- Duan J, Kasper DL, 2011. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology* 12:401-409.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3):350–356.
- Ebringerová A, Hromádková Z. 2010. An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central European Journal of Chemistry* 8:243–257.
- Ersus S, Yurdagel U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80(3):805–812.
- Fan T, Hu J, Fu L, Zhang L. 2015. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charantia* L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 115:701–706.
- Flores-Girón E, Salazar-Montoya JA, Ramos-Ramírez EG. 2016. Application of a Box–Behnken design for optimizing the extraction process of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Journal of the Science of Food and Agriculture*

96(11):3860–3866.

- Fossen T, Slimestad R, Andersen OM. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2318–2321.
- Franck A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87:287–291.
- Franck A. 2006. Inulin. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, Stephen A (eds) Marcel Dekker, Inc: New York, pp 439–449.
- Fritzen-Freire CB, Prudêncio ES, Amboni RD, Pinto SS, Negrão-Murakami AN, Murakami FS. 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International* 45(1):306-312.
- Gan Q, Allen SJ, Taylor G. 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry* 387:1003–1018.
- García-Tejeda YV, Salinas-Moreno Y, Martínez-Bustos F. 2015. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioproducts Processing* 94:717–726.
- Geankoplis C.J. 1998. Procesos de separación líquido-líquido y sólido-fluido. In: *Procesos de transporte y operaciones unitarias*, (C.J. Geankoplis, ed.), pp. 773–822. CECSA, México.
- Ghazi I, de Segura AG, Fernández-Arrojo L, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, Ballesteros A. 2005. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 35(1):19–27.
- Ghazi I, Fernández-Arrojo L, García-Arellano H, Ferrer M, Ballesteros A, Plou FJ. 2007. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology* 128(1):204–211.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *International Union of Pure Applied Chemistry*. 59(2):257–268.

- Giannuzzo AN, Boggetti HJ, Nazareno MA, Mishima HT. 2003. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of Citrus paradise. *Phytochemical Analysis* 14:221–223.
- Gómez E, Tuohy KM, Gibson GR, Klinder A, Costabile A. 2010. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology* 108(6):2114–2121.
- Gómez-Moriél CB, Quintero-Ramos A, Camacho-Dávila A, Ruiz-Gutiérrez MG, Talamás-Abbud R, Olivas-Vargas R, Barnard J. 2012. Optimization of chipotle pepper smoking process using response surface methodology. *Journal of Food Quality* 35(1):21–33.
- Goula AM, y Adamopoulos KG. 2012. A new technique for spray-dried encapsulation of Lycopene. *Drying Technology* 30(6):641–652.
- Grohmann K, Baldwin EA. 1992. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. *Biotechnology Letters* 14(12):1169–1174.
- Grohmann K, Baldwin EA, Buslig BS. 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45(1):315–327.
- Grönroos A. 2010. Ultrasonically Enhanced Disintegration. Polymers, Sludge, and Contaminated Soil. (Ph.D. thesis) (1. ed.). Finland: VTT Publications 734:1-100.
- Guevara-Amatón K, Miranda-Guardiola R, Sosa-Blanco CA, Rodríguez-Cantú ME. 2010. Obtencion de Bio-combustibles mediante pirolisis de cascara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*). *Revista Salud Pública y Nutrición Edición especial No. 1*.
- Hammed AM, Jaswir I, Amid A, Alam Z, Asiyandi-H TT, Ramli N. 2013. Enzymatic hydrolysis of plants and algae for extraction of bioactive compounds. *Food Reviews International* 29(4):352–370.
- Hanana S, Elloumi A, Placet V, Tounsi H, Belghith H, Bradai C. 2015. An efficient enzymatic-based process for the extraction of high-mechanical properties alfa fibres. *Industrial Crops and Products* 70:190–200.
- Handscorn CS, Kraft M. 2010. Simulating the structural evolution of droplets following

- shell formation. *Chemical Engineering Science* 65:713–725.
- He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 1:163–187.
- Heldman DR, Singh RP. 1981. *Food Process Engineering*, AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Hendry GAF, Wallace RK. 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki M, Chatterton NJ (ed.). *Science and technology of fructans*. CRC Press: Boca Raton, pp119–139.
- Heredia-León JC, Talamás-Abbud R, Mendoza-Guzmán V, Solís-Martínez F, Jiménez-Castro J, Barnard J, Quintero-Ramos A. 2004. Structural and physical properties of dried Anaheim chilli peppers modified by low-temperature blanching. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:59–65.
- Hoover DG. 2000. Ultrasound. *Journal of Food Science Supplement: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies* 65:93–95.
- Hu Z, Srinivasan MP. 1999. Preparation of high-surface-area activated carbons from coconut Shell. *Microporous and Mesoporous Materials* 27:11–18.
- Huang YC, Chang YH, Shao YY. 2006. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry* 98(3):529–538.
- Iñiguez-Covarrubias G, Díaz-Teres R, Sanjuan-Dueñas R, Anzaldo-Hernández J, Rowell RM. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: Potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource Technology* 77(2):101–108.
- Jacotet-Navarro M, Rombaut N, Deslis S, Fabiano-Tixier AN, Pierre FX, Bily A, Chemat F. 2016. Towards a "dry" bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry* 18(10):3106–3115.
- Jafari SM, Mahdavi-Khazaei K, Hemmati-Kakhki A. 2016. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate polymers* 140:20–25.

- Kapchie VN, Wei D, Hauck C, Murphy PA. 2008. Enzyme- Assisted Aqueous Extraction of Oleosomes from Soybeans (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:1766–1771.
- Karki B, Maurer D, Kim TH, Jung S. 2011. Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions. *Bioresource Technology* 102(2):1228–1233.
- Karthikeyan RS, Rakshit SK, Baradajaran A. 1996. Optimization of batch fermentation condition for dextran production. *Bioprocess Engineering* 15:247–251.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology* 77(3):215–227.
- Kelly G. 2008. Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic* 13:315–329.
- Kha TC, Nguyen MH, Roach PD. 2010. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering* 98:385–392.
- Khazaei KM, Jafari SM, Ghorbani M, Kakhki AH. 2014. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate polymers* 105:57–62.
- Khazaei KM, Jafari SM, Ghorbani M, Kakhki AH. 2016. Optimization of anthocyanins extraction from saffron petals with response surface methodology *Food Analytical Methods*. 9(7):1999–2001.
- Kim JW, Lee BC, Lee JH, Nam KC, Lee SC. 2008. Effect of electron-beam irradiation on the antioxidant activity of extracts from *Citrus unshiu* pomaces. *Radiation Physics and Chemistry* 77:87–91.
- Kim Y, Faqih MN, Wang SS. 2001. Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers* 46:135–145.
- Kim YJ, Kim DO, Chun OK, Shin DH, Jung H, Lee CY, Wilson DB. 2005. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(24):9560-9565.

- König J, Grasser R, Pikor H, Vogel K. 2002. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374(1):80–87.
- Korakli M, Vogel RF. 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:790–803.
- Kuck LS, Noreña CPZ. 2016. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry* 194:569–576.
- Ladisch MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 5(2):82–102.
- Landbo AK, Meyer AS. 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3169–3177.
- Lao F, Giusti MM. 2017. The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanin powders. *Food chemistry* 227:376-382.
- Leach JD, Sobolik KD. 2010. High dietary intake of prebiotic inulin-type fructans in the prehistoric Chihuahuan Desert. *British Journal of Nutrition* 103(11):1558–1561.
- Lee SH, Nguyen HM, Koo Y-M, Ha SH. 2008. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. *Process Biochemistry* 43:1009–1012.
- Leite TJTC, Mürr XFE, Martinelli P, Dal Fabbro IM, Park KJ. 2007. Optimization of physical concentration process for inulin, *Journal of Food Engineering*, 80:832-838.
- León-Martínez FM, Méndez-Lagunas LL, Rodríguez-Ramírez J. 2010. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydrate Polymers* 81:864–870.
- Levigne S, Ralet MC, Thibault JF. 2002. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers* 49(2):145–153.

- Li H, Song C, Zhou H, Wang N, Cao D. 2011. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of wheat germ oil using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88:819–817.
- Li JW, Ding SD, Ding XL. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Journal of Food Engineering* 80:176–83.
- Li SQ, Zhang B, Xin G, Yu Y, Liu CJ. 2010. Double-enzyme method for polysaccharides extraction from *Gomphidius rutilus* fruitbodies. *Food Science* 31:143–146.
- Li X, Wang Z, Wang L, Walid E, Zhang H. 2012. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hohenbuehelia serotina* by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* 51(4):523–530.
- Li Y, Fabiano-Tixier AN, Tomao V, Cravotto G, Chemat F. 2013. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry* 20(1):12–18.
- Liao N, Zhong J, Ye X, Lu S, Wang W, Zhang R, Xu J, Chen S, Liu D. 2015. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbicula fluminea*: Characterization and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 60(2):1113–1121.
- Lingyun W, Jianhua W, Xiaodong Z, Da T, Yalin Y, Chenggang C, Tianhua F, Fan Z. 2006. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering* 79:1087–1093.
- Liu MQ, Liu GF, Dai XJ, Hu AY. 2010. Optimization of solid-state fermentation conditions for pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology and its enzymatic properties. *Journal of China University of Metrology* 2:147–151.
- Liu J, Miao S, Wen X, Sun Y. 2009. Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill using response surface methodology (RSM). *Carbohydrate Polymers* 78(4):704–709.
- Liu Y, Gong G, Zhang J, Jia S, Li F, Wang Y, Wu S. 2014. Response surface optimization

- of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. Carbohydrate Polymers 110:278–284.
- Loginova KV, Shynkaryk MV, Lebovka NI, Vorobiev E. 2009. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulse electric fields, Journal of Food Engineering 96:374–379.
- López MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Diaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* weber var. azul. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:7835–7840.
- López MG, Urías-Silvas JE. 2007. Agave fructans as prebiotics. En: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (Ed.), Recent Advances in Fructooligosaccharides Research (pp. 297–310). Kerala, India: Research Signpoint.
- López-Molina D, Navarro-Martínez MD, Rojas-Melgarejo F, Hiner ANP, Chazarra S, Rodríguez-López JN. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). Phytochemistry 66:1476–1484.
- Madrigal L, Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57:387–396.
- Mahdavi SA, Jafari SM, Assadpoor E, Dehnad D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. International journal of biological macromolecules 85:379–385.
- Mancilla-Margalli NA, López M. 2006. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:7832–7839.
- Maran JP, Mekala V, Manikandan S. 2013. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. Carbohydrate Polymers 92(2):2018–2026.
- Marcilla A, García-García S, Asensio M, Conesa JA. 2000. Influence of thermal treatment regime on the density and reactivity of activated carbons from almond shells. Carbon 38:429–440.
- Mason T, Paniwnyk L, Chemat F. 2003. Ultrasound as a Preservation Technology. In:

- Food Preservation Techniques, Zeuthen P and Bøgh-Sørensen L (ed.). Woodhead Publishers: pp. 303–337.
- Mason TJ, Tiehm A. 2001. Ultrasound in Environmental Protection, Advances in Sonochemistry. Elsevier: Amsterdam.
- McCleary BV, Murphy A, Mugford DC. 2000. Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *Journal of AOAC International* 83:356–364.
- McDougall GJ, Fry SC. 1990. Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiology* 93(3):1042–1048.
- Mellado-Mojica E, López MG. 2012. Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its development cycle in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(47):11704–11713.
- Mellado-Mojica E., López-Medina TL, López MG. 2009. Developmental variation in *Agave tequilana* Weber var. azul stem carbohydrates. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 3:34–39.
- Mensink MA, Frijlink HW, Maarschalk KV, Hinrichs WLJ. 2015. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers* 130:405–419.
- Meyers RH. 1971. Response surface methodology. Allyn and Bacon, Inc., Boston.
- Milani E, Koocheki A, Golimovahhed QA. 2011. Extraction of inulin from Burdock root (*Arctium lappa*) using high intensity ultrasound. *International Journal of Food Science and Technology* 46(8):1699–1704.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):420–428.
- Minitab. 2010. Statistical Software 16. State College, PA, USA, Minitab, Inc.
- Montañez-Soto J, Venegas-González J, Vivar-Vera M, Ramos-Ramírez E. 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro* 23(3):199–206.

- Montgomery DC. 1991. Design and analysis of experiments. New York: Wiley.
- Montilla A, Olano A, Martínez-Villaluenga C, Corzo N. 2011. Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(19):10705–10711.
- Moreno-Castro LE, Quintero-Ramos A, Ruiz-Gutiérrez MG, Sánchez-Madrigal MÁ, Meléndez-Pizarro CO, Pérez-Reyes I, Lardizábal-Gutiérrez D. 2015. Nixtamalization assisted with ultrasound: effect on mass transfer and physicochemical properties of nixtamal, masa and tortilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14(2):265–279.
- Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. 2002. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:519–525.
- Narukawa T, Hioki A, Chiba K. 2012. Aqueous extraction of water-soluble inorganic arsenic in marine algae for speciation analysis. *Analytical Sciences* 28(8):773–779.
- Narváez-Flores M, Sánchez-Madrigal MÁ, Quintero-Ramos A, Paredes-Lizárraga MA, González-Laredo RF, Ruiz-Gutiérrez MG, Piñón-Castillo HA, Meléndez-Pizarro CO. 2015. Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) at different temperatures and ultrasound powers. *Food and Bioproducts Processing* 96:232–239.
- Nayak CA, Rastogi NK. 2010. Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology* 28(12):1396–1404.
- Nidetzky B, Steiner W. 1993. A new approach for modeling cellulase–cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 42(4):469–479.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005. 2006. Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Economía.
- Nyam KL, Tan CP, Lai OM, Long K, Man YBC. 2009. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Kalahari Melon Seed Oil: Optimization Using Response Surface

- Methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86:1235–1240.
- O'Donnell CP, Tiwari BK, Bourke P, Cullen PJ. 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology* 21:358–367.
- Okai AAE, Gierschner K. 1991. Size and charge properties of the pectic and cellulolytic enzymes in a commercial enzyme preparation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 192(3):244–248.
- Oki T, Masuda M, Furuta S, Nishiba Y, Terahara N, Suda I. 2002. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *Journal of Food Science* 67:1752–1756.
- Osorio C, Acevedo B, Hillebrand S, Carriazo J, Winterhalter P, Morales AL. 2010. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(11):6977–6985.
- Otálora MC, Carriazo JG, Iturriaga L, Nazareno MA, Osorio C. 2015. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food chemistry* 187:174–181.
- Palma M, Barroso CG. 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta* 458(1):119–130.
- Pan LH, Wang J, Ye XQ, Zha XQ, Luo JP. 2015. Enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobium chrysotoxum* and its functional properties and immunomodulatory activity. *LWT-Food Science and Technology* 60(2):1149–1154.
- Pardo-Rueda AJ, Quintero-Ramos A, Genovese DB, Camacho-Dávila A, Zepeda-Rodríguez A, Contreras-Esquivel JC, Bizarro AP. 2015. Efficient extraction of fructans from sotol plant (*Dasyilirion leiophyllum*) enhanced by a combination of enzymatic and sonothermal treatments. *Food and Bioproducts Processing* 94:398–404.

- Paseephol T, Small D, Sherkat F. 2007. Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Food Chemistry* 104:73–80.
- Patindol J, Wang L, Wang YJ. 2007. Cellulase-assisted extraction of oligosaccharides from defatted rice bran. *Food Chemistry and Toxicology* 72:C516–C521.
- Pedreschi R, Cisneros-Zeballos L. 2007. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry* 100:956–963.
- Peña-Alvarez A, Díaz L, Medina A, Labastida C, Capella S, Vera LE. 2004. Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1027:131–136.
- Pinal L, Cornejo F, Arellano M, Herrera E, Nuñez L, Arrizon J, Gschaedler A. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(5):655–661.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. 2006. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* 17:1–12.
- Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control* 31(2):593–606.
- Pitalua E, Jimenez M, Vernon-Carter EJ, Beristain CI. 2010. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing* 88(2-3):253–258.
- Ptichkina NM, Markina OA, Rummyantseva GN. 2008. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids* 22(1):192–195.
- Puri M, Sharma D, Barrow CJ. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* 30:37–44.
- Quintero-Ramos A, Bourne MC, Barnard J, González-Laredo R, Anzaldúa-Morales A, Pensaben-Esquivel M, Márquez-Meléndez R. 2002. Low temperature blanching of

- frozen carrots with calcium chloride solutions at different holding times on texture of frozen carrots. *Journal of Food Processing and Preservation* 26:361–374.
- Rajam R, Anandharamakrishnan C. 2015. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology* 60(2):773-780.
- Raven JA. 1987. The role of vacuoles. *New Phytologist* 106:357–422.
- Rawson A, Tiwari BK, Tuohy MG, O'Donnell CP, Brunton N. 2011. Effect of ultrasound and blanching pretreatments on polyacetylene and carotenoid content of hot air and freeze dried carrot discs. *Ultrasound Sonochemistry* 18:1172–1179.
- Renouard S, Hano C, Corbin C, Fliniaux O, Lopez T, Montguillon J, Barakzoy E, Mesnard F, Lamblin F, Lainé E. 2010. Cellulase assisted release of secoisolariciresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds. *Food Chemistry* 122:679–687.
- Ritsema T, Smeekens, S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):223-230.
- Roberfroid MB, 2004. Inulin-Type Fructans. *Functional Food Ingredients*. CRS Press: Boca Raton.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Meheust A. 2010. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2):S1–S63.
- Robert P, Gorena T, Romero N, Sepulveda E, Chavez J, Saenz C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science & technology* 45(7):1386–1394.
- Robert P, Torres V, García P, Vergara C, Sáenz C. 2015. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *LWT-Food Science and Technology* 60(2):1039–1045.
- Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food engineering* 109:98–103.

- Romero-Cascales I, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. 2012. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry* 130(3):626–631.
- Ronkart SN, Blecker CS, Fourmanoir H, Fournies C, Deroanne C, Van Herck J-C, Paquot M. 2007. Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta* 604(1):81–87.
- Rosa GS, Moraes MA, Pinto LAA. 2010. Moisture sorption properties of chitosan. *LWT-Food Science and Technology* 43:415–420.
- Ruiz-Gutiérrez MG, Amaya-Guerra CA, Quintero-Ramos A, Ruiz-Anchondo, TJ, Gutiérrez-Uribe JA, Baez-González JG, Lardizábal-Gutiérrez D, Campos-Venegas K. 2014. Effect of soluble fiber on the physicochemical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) encapsulated using spray drying. *Food Science and Biotechnology* 23(3):755–763.
- Saavedra-Leos MZ, Leyva-Porras C, Alvarez-Salas C, Longoria-Rodríguez F, López-Pablos AL, González-García R, Pérez-Urizar JT. 2018. Obtaining orange juice–maltodextrin powders without structure collapse based on the glass transition temperature and degree of polymerization. *CyTA-Journal of Food* 16(1):61–69.
- Saéñz C, Tapia S, Chávez J, Robert P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114(2):616–622.
- Saikia S, Mahnot NK, Mahanta CL. 2015. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food chemistry* 171:144–152.
- Salinas-Moreno Y, Martínez-Bustos F, Soto-Hernández M, Ortega-Paczka R, Arellano-Vázquez JL. 2003. Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37:617–628.
- Salinas-Moreno Y, Salas-Sánchez G, Rubio-Hernández D, Ramos-Lobato N. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43:483–487.

- Sánchez-Madrigal MÁ, Amaya-Guerra CA, Quintero-Ramos A, Báez-González JG, Nuñez-González MA, Ruiz-Gutiérrez MG, Garzón-Tiznado JA. 2017a. Ultrasound-assisted extraction of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) at different ultrasound powers and solid-liquid ratios. *Food Science and Technology* 37(2):261–268.
- Sánchez-Madrigal MÁ, Beltrán-Verdugo VR, Quintero-Ramos A, Amaya-Guerra CA, Meléndez-Pizarro CO, Ruiz-Gutiérrez MG, Lardizábal-Gutiérrez D, Neder-Suárez D, Ortíz-Basurto RI. 2017b. Effect of ultrasound on the carbohydrate extraction from sotol plants (*Dasyilirion wheeleri*) at different powers and temperatures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16(3):845–859.
- Sánchez-Madrigal MÁ, Quintero-Ramos A, Martínez-Bustos F, Meléndez-Pizarro CO, Ruiz-Gutiérrez MG, Camacho-Dávila A, Torres-Chávez PI, Ramírez-Wong, B. 2015. Effect of different calcium sources on the bioactive compounds stability of extruded and nixtamalized blue maize flours. *Journal of food science and technology* 52(5):2701–2710.
- Sánchez-Madrigal MÁ, Viesca-Nevárez SL, Quintero-Ramos A, Amaya-Guerra CA, Meléndez-Pizarro CO, Contreras-Esquivel JC, Talamás-Abbud R. 2018. Optimization of the enzyme-assisted extraction of fructans from the wild sotol plant (*Dasyilirion wheeleri*). *Food Bioscience* 22:59–68.
- Santos HM, Lodeiro C, Capelo-Martínez JL. 2009. In: Capelo-Martínez, JL. (Ed.), *The Power of Ultrasound*, in: *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications* (pp. 1–16). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Selim KA, Khalil KE, Abdel-Bary MS, Abdel-Azeim NA. 2008. Extraction, encapsulation and utilization of red pigments from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as natural food colourants. *En Alex Journal of Food Science and Technology. Conf* (Vol. 2008, pp. 7–20).
- Serris GS, Biliaderis CG. 2001. Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 691–700.
- Sin HN, Yusof S, Hamid NSA, Rahman RA. 2006. Optimization of enzymatic

- clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 73(4):313–319.
- Sing K. 2001. The use of nitrogen adsorption for the characterization of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 187–188:3–9.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152–178
- Sørensen HR, Pedersen S, Anders VN, Meyer AS. 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme Microbiology Technology* 36:773–784.
- Souza VB, Thomazini M, Balieiro JCC, Fávoro-Trindade CS. 2015. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing* 93:39–50.
- Sterling C. 1963. Texture and cell wall polysaccharides in foods. In: *Recent Advances in Food Science*. (J.M. Leitch and D.N. Rhodes, eds.), pp. 259–281. Butterworths, London.
- Stoll L, Costa TMH, Jablonski A, Flôres SH, de Oliveira Rios A. 2016. Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology* 9(1):172–181.
- Stoll T, Schweiggert U, Schieber A, Carle R. 2003. Process for the recovery of a carotene-rich functional food ingredient from carrot pomace by enzymatic liquefaction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4(4):415–423.
- Suda I, Oki T, Masuda M, Furuta S, Nishiba Y, Furuta S, Matsugano K, Sugita K, Terahara N. 2002. Direct absorption of acylated anthocyanin on purple-fleshed sweet potato into rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6):1672–1676.
- Syamaladevi RM, Insan SK, Dhawan S, Andrews P, Sablani SS. 2012. Physicochemical

- properties of encapsulated red raspberry (*Rubus idaeus*) powder: Influence of high-pressure homogenization. *Drying technology* 30(5):484–493.
- Talukder MMR, Zaman MM, Hayashi Y, Wu JC, Kawanishi T. 2006. Ultrasonication enhanced hydrolytic activity of lipase in water/isooctane two-phase systems. *Biocatalysis and Biotransformation* 24:189–94.
- Tanriseven A, Aslan Y. 2005. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 36(4):550–554.
- Tanyildizi MS, Ozer D, Elibiol E. 2005. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry* 40:2291–2296.
- Tárrega A, Rocafull A, Costell E. 2010. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. *LWT - Food Science and Technology* 43:556–562.
- Toma M, Vinatoru M., Paniwnyk L, Mason, TJ. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasound Sonochemistry* 8:137–142.
- Tonon RV, Baroni AF, Brabet C, Gibert O, Pallet D, Hubinger MD. 2009. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering* 94(3-4):215–221.
- Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* 43(3): 907–914.
- Tran P, Le V. 2011. Effects of ultrasound on catalytic efficiency of pectinase preparation during the treatment of pineapple mash in juice processing. *International Food Research Journal* 18:347–354.
- Tsochatzidis NA, Guiraud P, Wilhelm AM, Delmas H. 2001. Determination of velocity, size and concentration of ultrasonic cavitation bubbles by the phase-Doppler technique. *Chemical Engineering Science* 56(5):1831–1840.
- Vale G, Rial-Otero R, Mota A, Fonseca L, Capelo JL. 2008. Ultrasonic- assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental

- speciation: a tutorial. *Talanta* 75:872–884.
- Vara-Rangel R. 2008. Caracterización estructural de paredes celulares de piña de maguey pulquero (*Agave salmiana*) por espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (Tesis). Coahuila, México.
- Vargas L, Pião A, Domingos R, Carmona E. 2004. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:137–142.
- Vijn I, Smeekens S. 1999. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology* 120:351–360.
- Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8:303–313.
- Vizcaíno-Rodríguez LA, Rodríguez-Mendiola MA, Arias-Castro C. 2012. Estimulación de la biosíntesis de fructanos en cultivos de células en suspensión de *Agave inaequidens* subsp. *inaequidens* mediante la adición de glucosa y fructosa. *Gayana Botánica* 69:75–81.
- Voragen AGJ, Pilnik W. 1989. Pectin degrading enzymes in fruit and vegetable processing. In *Aspects of enzymes chemistry for agriculture*. ACS symposium series 389 (pp. 93–115). New York: American Chemical Society, ACS.
- Waleckx E, Gschaedler A, Colonna-Ceccaldi B, Monsan P. 2008. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry* 108(1):40–48.
- Walton DE. (2000). The morphology of Spray-Dried particles a qualitative view. *Drying Technology* 18(9):1943–1986.
- Wang L, Weller CL. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology* 17:300–312.
- Wang S, Dong X, Tong J. 2013. Optimization of enzyme-assisted extraction of polysaccharides from alfalfa and its antioxidant activity. *International journal of biological macromolecules* 62:387–396.
- Wang Y, Liu Y, Hu Y. 2014. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 111:324–332.

- Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS. 2003. Handbook of food enzymology. Marcel Dekker Inc: New York.
- Wilkins MR, Widmer WW, Grohmann K, Cameron RG. 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource technology* 98(8):1596–1601.
- Wu H, Zhu J, Diao W, Wang C. 2014. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Carbohydrate polymers* 113: 314–324.
- Wu S, Gong G, Wang Y, Li F, Jia S, Qin F, Ren, H, Liu Y. 2013. Response surface optimization of enzyme-assisted extraction polysaccharides from *Dictyophora indusiata*. *International journal of biological macromolecules* 61:63–68.
- Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 330–335.
- Xu GH, Chen JC, Liu DH, Zhang YH, Jiang P, Ye XQ. 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science* 73:C11–C18.
- Xu Y, Zhang L, Bailina Y, Ge Z, Ding T, Ye X, Liu D. 2014. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering* 126:72–81.
- Xu Y, Zhang L, Yang Y, Song X, Yu Z. 2015. Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant. *Carbohydrate Polymers* 117:895–902.
- Yin X, You Q, Jiang Z. 2011. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 86(3):1358–1364.
- You Q, Yin X, Zhao Y. 2013. Enzyme assisted extraction of polysaccharides from the fruit of *Cornus officinalis*. *Carbohydrate polymers* 98(1):607–610.
- Zha XQ, Wang JH, Yang XF, Liang H, Zhao LL, Bao SH, Luo JP, Xu YY, Zhou BB.

2009. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydrate Polymers* 78(3):570–575.
- Zhang DY, Wan Y, Xu JY, Wu GH, Li L, Yao XH. 2016. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* 137:473–479.
- Zhang J, Jia S, Liu Y, Wu S, Ran J. 2011. Optimization of enzyme-assisted extraction of the *Lycium barbarum* polysaccharides using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 86(2):1089–1092.
- Zhang L, Guo S, Wang M, He L. 2015. PEG-based ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves. *International Journal of Biological Macromolecules* 80:644–650.
- Zhang L, Ye X, Ding T, Sun X, Xu Y, Liu D. 2013. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry* 20(1):222–231.
- Zhang LF, Zhang MW, Wen H, Yan Z, Zhang RF, Wei ZC. 2010. Optimization on cellulase and ultrasonic-wave assisted extraction technology of *Momordica charantia* polysaccharides. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machine* 41(11):142–147.
- Zhang Y, Wang ZY, Chen XQ. 2005. Ultrasound-associated extraction of seed oil of Korean pine. *Journal of Forestry Research* 16:140–142.
- Zhao ZY, Zhang Q, Li YF, Dong LL, Liu SL. 2015. Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 119:101–109.
- Zheng G, Bhatti R. 1998. Enzyme-Assisted wet separation of starch from other seed components of hull-less barley. *Cereal Chemistry* 75:247–250.
- Zhu Y, Li Q, Mao G, Zou Y, Feng W, Zheng D, Wang W, Zhou L, Zhang T, Yang J, Yang L, Wu X. 2014. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate*

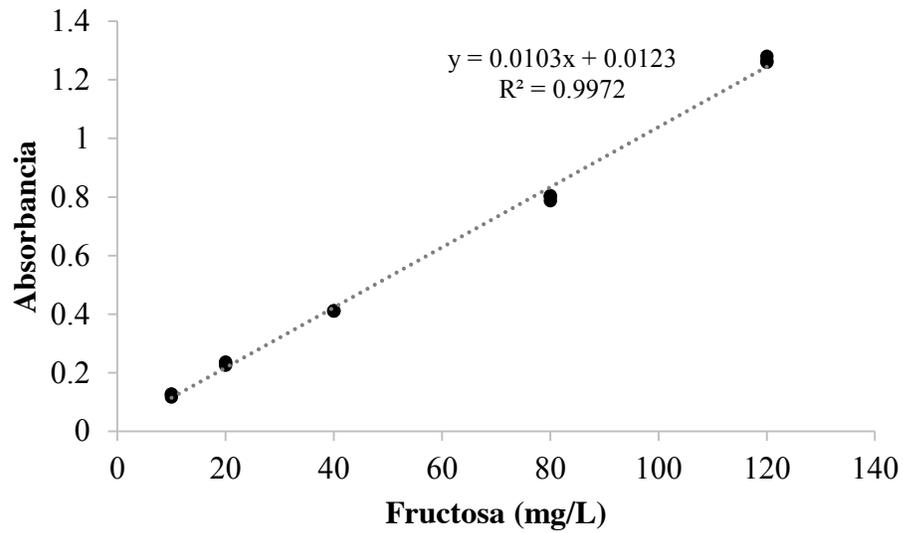
Polymers 101:606–613.

- Zhu Z, He J, Liu G, Barba FJ, Koubaa M, Ding L, Bals O, Grimi N, Vorobiev E. 2016. Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 33:1–9.
- Zou SY, Guo SY. 2010. Study on the enzymatic properties of cellulases from *Trichoderma koningii* QF-02. *Biotechnology Bulletin* 5:203–206.
- Zou Y, Xie C, Fan G, Gu Z, Han Y. 2010. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11(4):611–615.

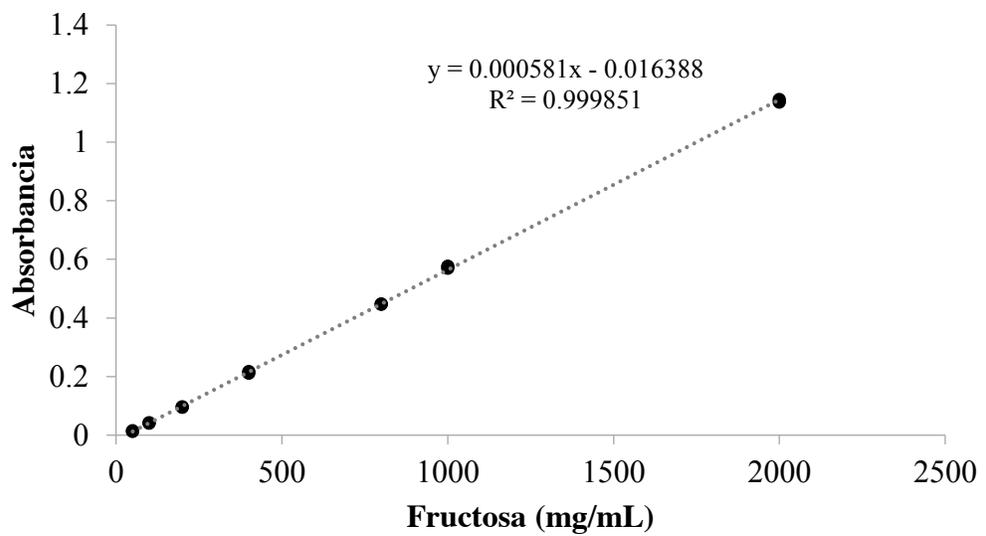
ANEXOS

ANEXO 1

Curva de calibración para la cuantificación de azúcares totales



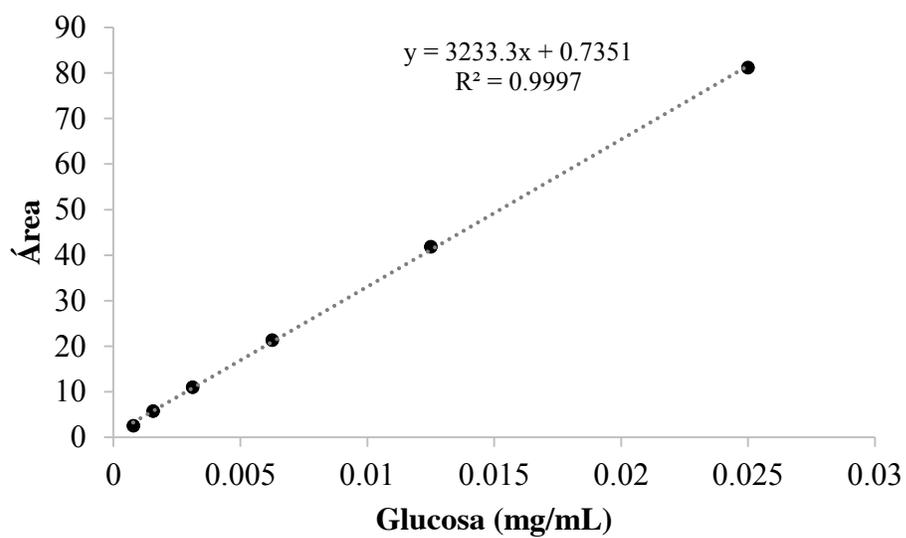
Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores



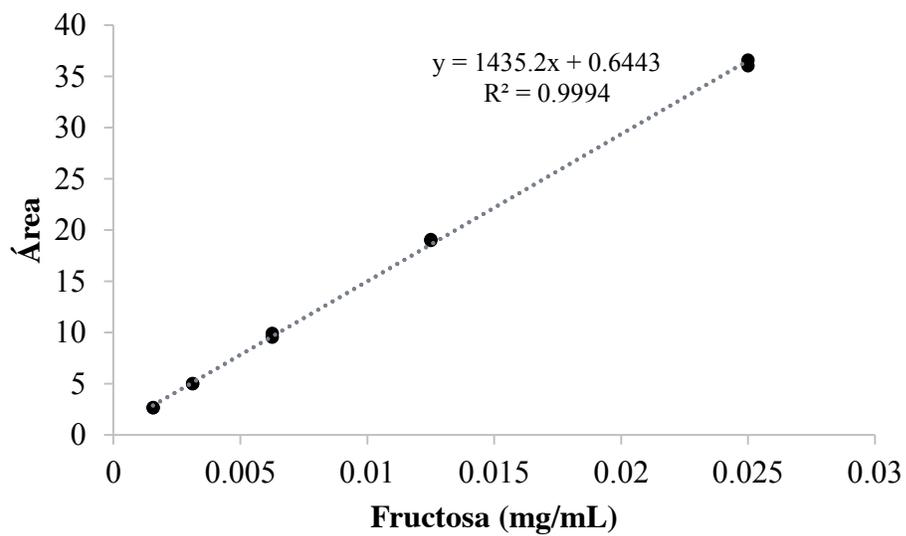
ANEXO 2

Curvas de calibración para azúcares individuales (HPAEC-PAD)

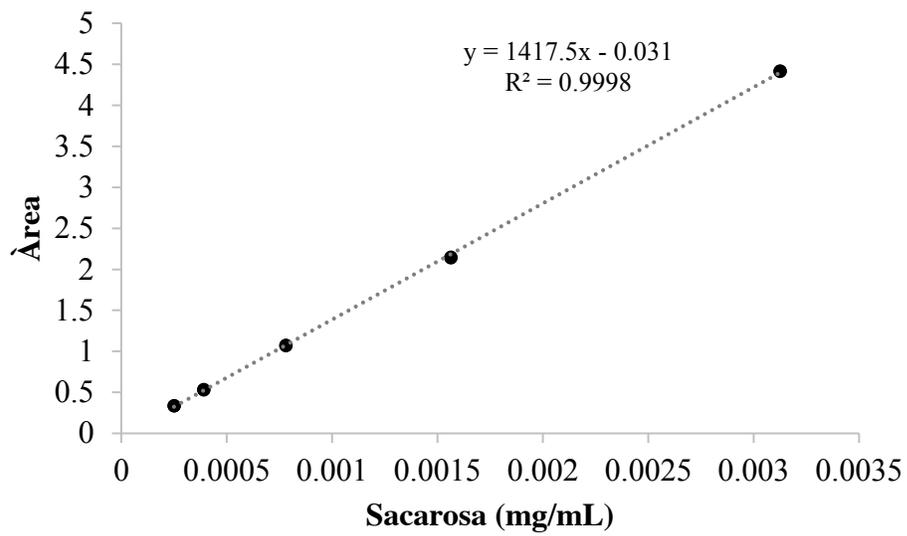
Curva de calibración para la cuantificación de glucosa



Curva de calibración para la cuantificación de fructosa

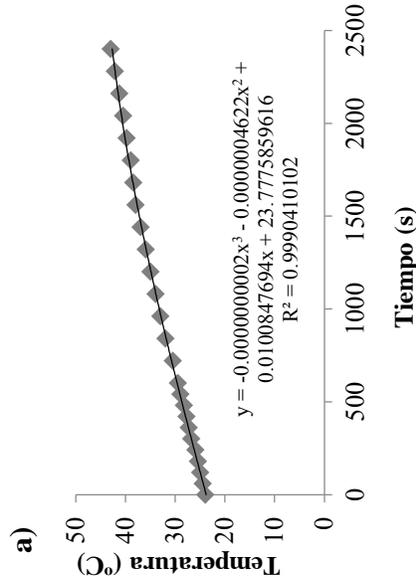


Curva de calibración para la cuantificación de sacarosa



ANEXO 3

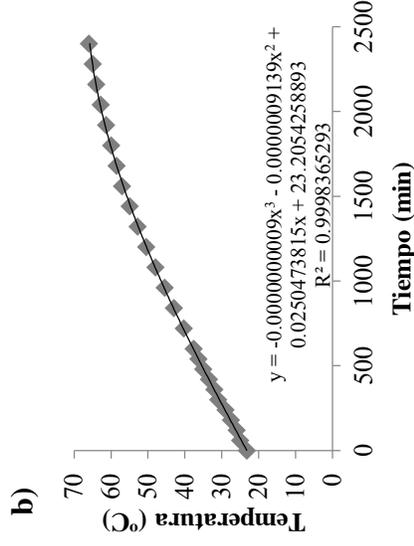
Cálculo de la densidad de potencia de ultrasonido (Estudio No. 1)



Ecuación:
 $T = -0.000000002t^3 - 0.0000004622t^2 + 0.0100847694t + 23.7775859616$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -6X10^{-10}t^2 - 9.244X10^{-8}t + 0.0100847694$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 0.00971483$

$$P = m Cp (\partial T/\partial t)$$

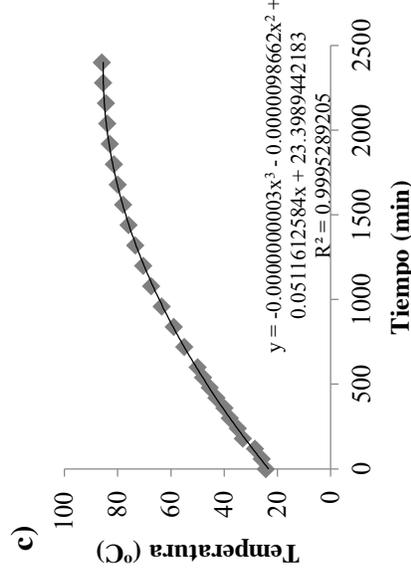
$m = 600 \text{ g}$
 $Cp = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 0.00971483 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$
 $P = 24.3647889 \text{ W}$
 $\text{DPU} = 24.3647889 \text{ W}/0.6 \text{ L}$
 $\text{DPU} = 40.6079814 \text{ W/L o mW/mL}$



Ecuación:
 $T = -0.0000000009t^3 - 0.0000009139t^2 + 0.0250473815t + 23.2054258893$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -2.7X10^{-9}t^2 - 2.78X10^{-7}t + 0.0250473815$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 0.02040846$

$$P = m Cp (\partial T/\partial t)$$

$m = 600 \text{ g}$
 $Cp = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 0.02040846 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$
 $P = 51.1844239 \text{ W}$
 $\text{DPU} = 51.1844239 \text{ W}/0.6 \text{ L}$
 $\text{DPU} = 85.3073562 \text{ W/L o mW/mL}$



Ecuación:
 $T = -0.0000000003t^3 - 0.0000098662t^2 + 0.0511612584t + 23.3989442183$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -9.0X10^{-10}t^2 - 1.9732X10^{-5}t + 0.0511612584$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 0.029444646$

$$P = m Cp (\partial T/\partial t)$$

$m = 600 \text{ g}$
 $Cp = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 0.029444646 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$
 $P = 73.85171 \text{ W}$
 $\text{DPU} = 73.85171 \text{ W}/0.6 \text{ L}$
 $\text{DPU} = 123.086183 \text{ W/L o mW/mL}$

ANEXO 4

Actividad enzimática experimental

Los resultados de la actividad enzimática para cada enzima se muestran en la Tabla 41. La actividad específica de las enzimas comerciales en U/g, resultó ser mayor para la pectinasa, seguido de la xilanasa y por último la hemicelulasa. Para la hemicelulasa se probaron 3 azúcares reductores, sin embargo, la actividad específica fue similar; siendo mayor para la xilosa, seguido de la galactosa y manosa.

Asimismo, se observa la actividad específica de la mezcla de las 4 enzimas (usada en el estudio 4 y 5). La actividad de la celulasa fue similar, sin embargo, la de las enzimas pectinasa y xilanasa disminuyeron y la de la hemicelulasa aumentó en el mismo orden de azúcares reductores probadas para esta enzima (xilosa > galactosa > manosa).

Tabla 42. Actividad enzimática de la celulasa, pectinasa, xilanasa y hemicelulasa.

Enzimas	Sustrato	Producto (azúcar reductor)	Actividad específica (U/g)
Celulasa	CMC	Glucosa	16.20 ± 0.85
Pectinasa	Ácido poligalacturónico	Ácido galacturónico	624.86 ± 38.19
Xilanasa	Xilano	Xilosa	216.66 ± 3.72
Hemicelulasa	Goma de algarrobo	Manosa	1.39 ± 0.08
		Xilosa	1.98 ± 0.12
		Galactosa	1.55 ± 0.09
Mezcla de enzimas			
Celulasa	CMC	Glucosa	16.27 ± 0.57
Pectinasa	Ácido poligalacturónico	Ácido galacturónico	190.97 ± 16.39
Xilanasa	Xilano	Xilosa	123.9 ± 2.66
Hemicelulasa	Goma de algarrobo	Manosa	3.19 ± 0.09
		Xilosa	4.64 ± 0.14
		Galactosa	3.52 ± 0.10

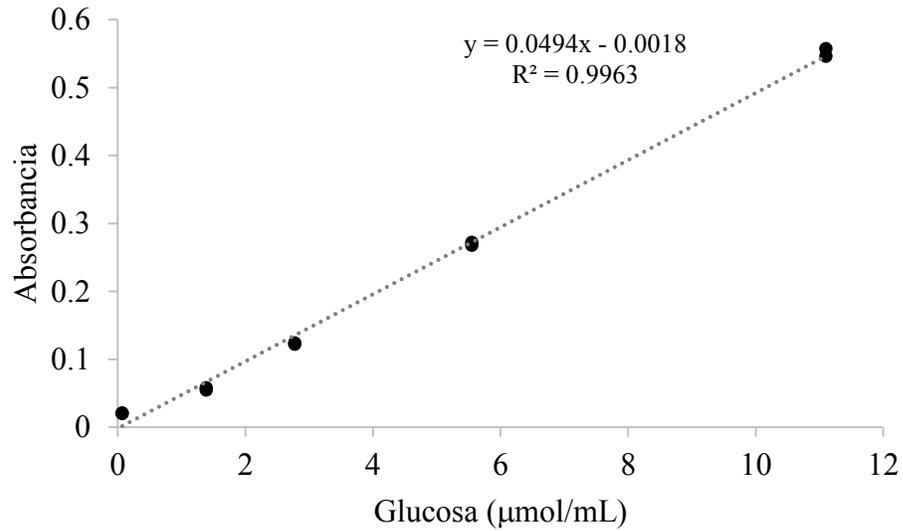
Medias ± desviación estándar. CMC, carboximetilcelulosa.

La actividad celulasa (*endo*-1,4-β-D-glucanasa) y xilanasa (*endo*-1,4-β-xilanasa) obtenidas fueron similares a lo reportado por Wikiera *et al.* (2016) con 10 U/g y 229 U/g, respectivamente para enzimas de la misma marca (Sigma-Aldrich) a pH de 5.0 y 40 °C.

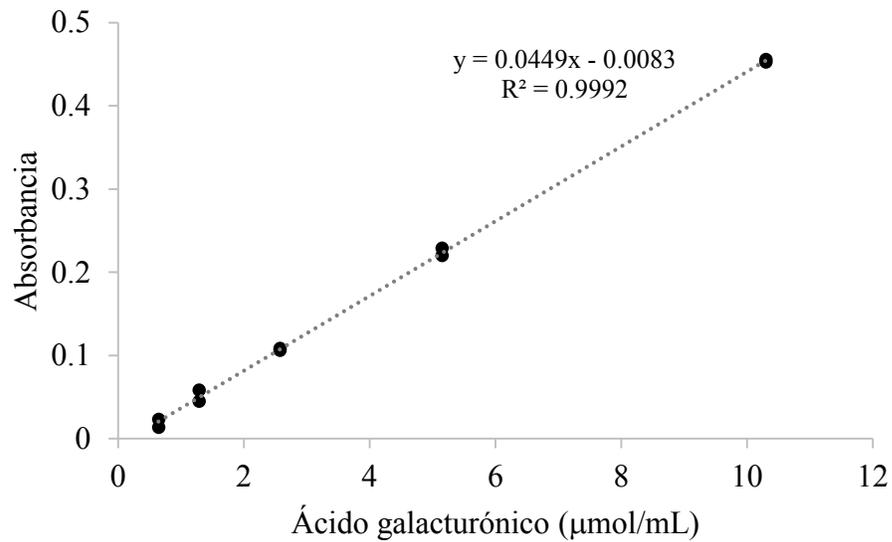
ANEXO 5

Curvas de calibración para la determinación de la actividad enzimática

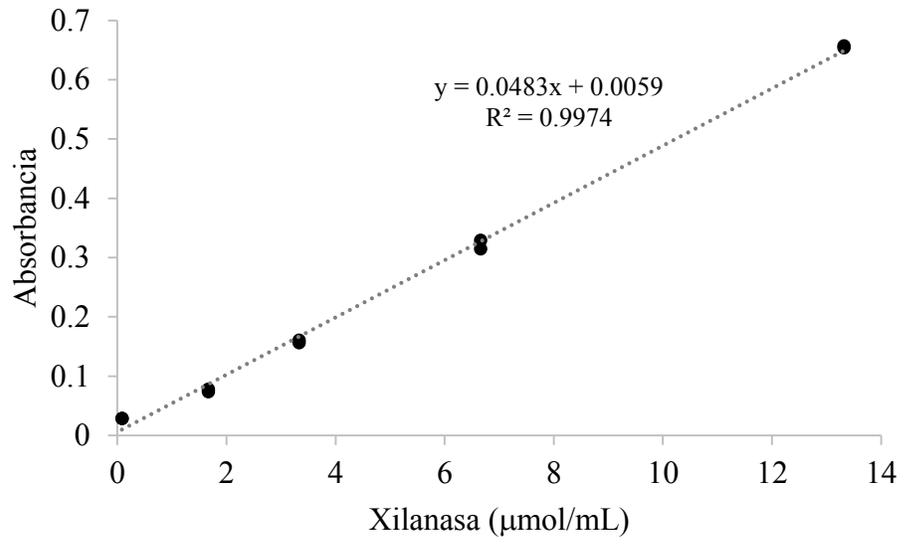
Curva de calibración para la cuantificación de glucosa (celulasa)



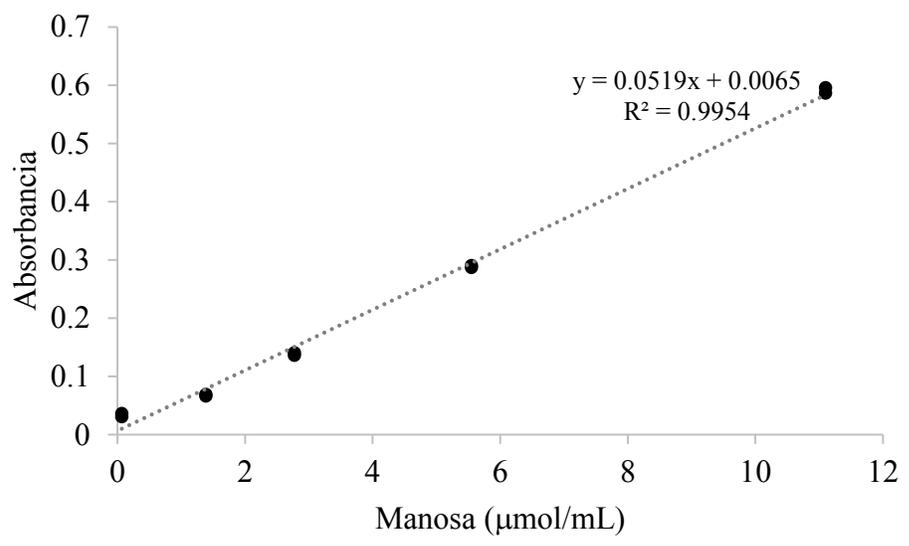
Curva de calibración para la cuantificación de ácido galacturónico (pectinasa)



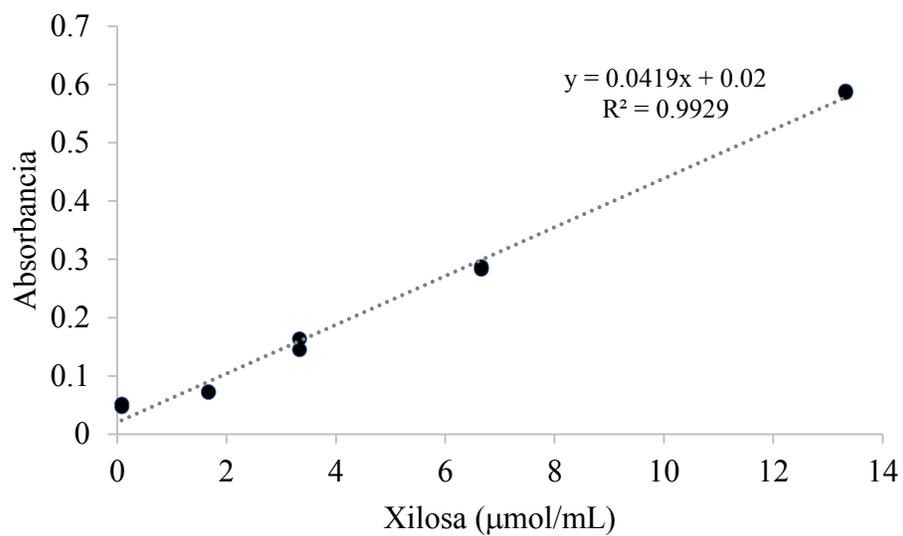
Curva de calibración para la cuantificación de xilosa (xilanas)



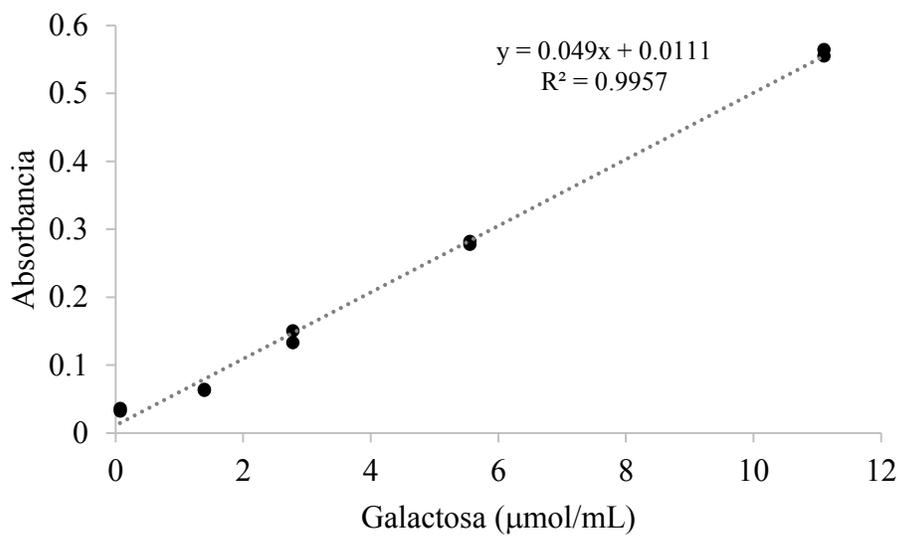
Curva de calibración para la cuantificación de manosa (hemicelulasas)



Curva de calibración para la cuantificación de xilosa (hemicelulasa)

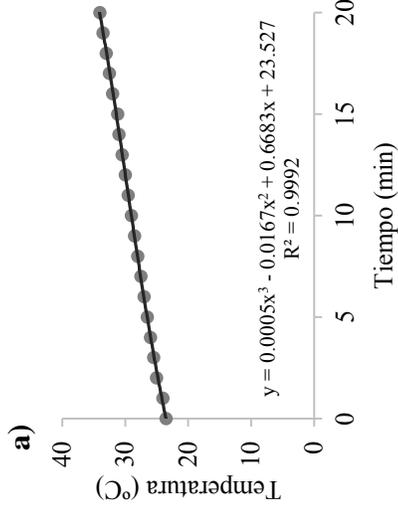


Curva de calibración para la cuantificación de galactosa (hemicelulasa)



ANEXO 6

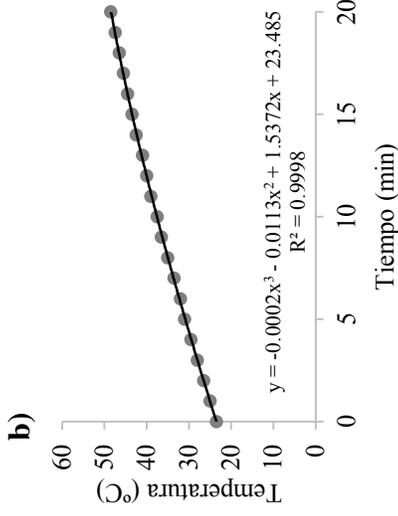
Cálculo de la potencia de ultrasonido (Estudio No. 5)



Ecuación:
 $T = 0.0005t^3 - 0.0167t^2 + 0.6683t + 23.527$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = 0.0015t^2 - 0.0334t + 0.6683$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 0.5393$

$$P = m C_p (\partial T/\partial t)$$

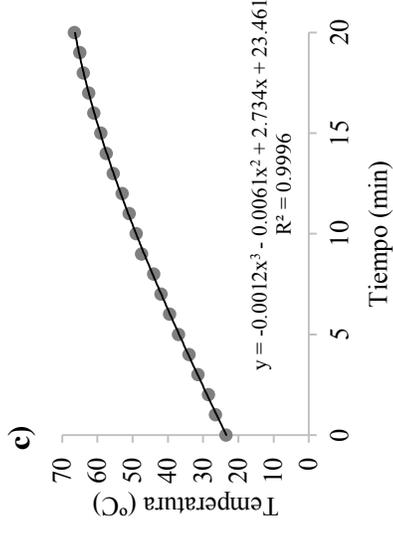
$m = 300 \text{ g}$
 $C_p = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 0.5393 \text{ }^\circ\text{C/min})$
 $* (1\text{min}/60 \text{ s})$
 $P = 11.27137 \text{ W}$



Ecuación:
 $T = -0.0002t^3 - 0.0113t^2 + 1.5372t + 23.485$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -0.0006t^2 - 0.0226t + 1.5372$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 1.2292$

$$P = m C_p (\partial T/\partial t)$$

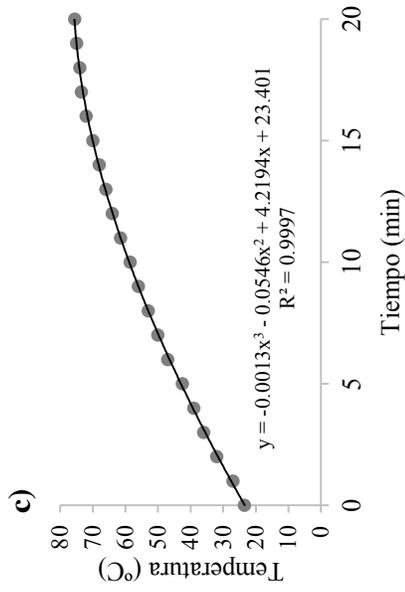
$m = 300 \text{ g}$
 $C_p = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 1.2292 \text{ }^\circ\text{C/min})$
 $* (1\text{min}/60 \text{ s})$
 $P = 25.69028 \text{ W}$



Ecuación:
 $T = -0.0012t^3 - 0.0061t^2 + 2.734t + 23.461$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -0.0036t^2 - 0.0122t + 2.734$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 2.12$

$$P = m C_p (\partial T/\partial t)$$

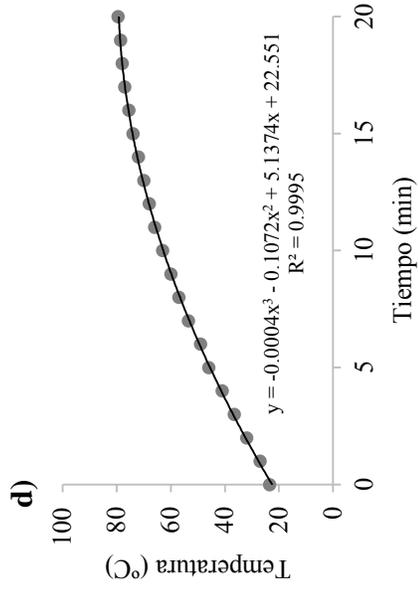
$m = 300 \text{ g}$
 $C_p = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 2.12 \text{ }^\circ\text{C/min})$
 $* (1\text{min}/60 \text{ s})$
 $P = 44.308 \text{ W}$



Ecuación:
 $T = -0.0013t^3 - 0.0546t^2 + 4.2194t + 23.401$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -0.0039t^2 - 0.1092t + 4.2194$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 2.5944$

$P = m C_p (\partial T/\partial t)$

$m = 300 \text{ g}$
 $C_p = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 2.5944 \text{ }^\circ\text{C/min}$
 $* (1 \text{ min}/60 \text{ s}))$
 $P = 54.22296 \text{ W}$



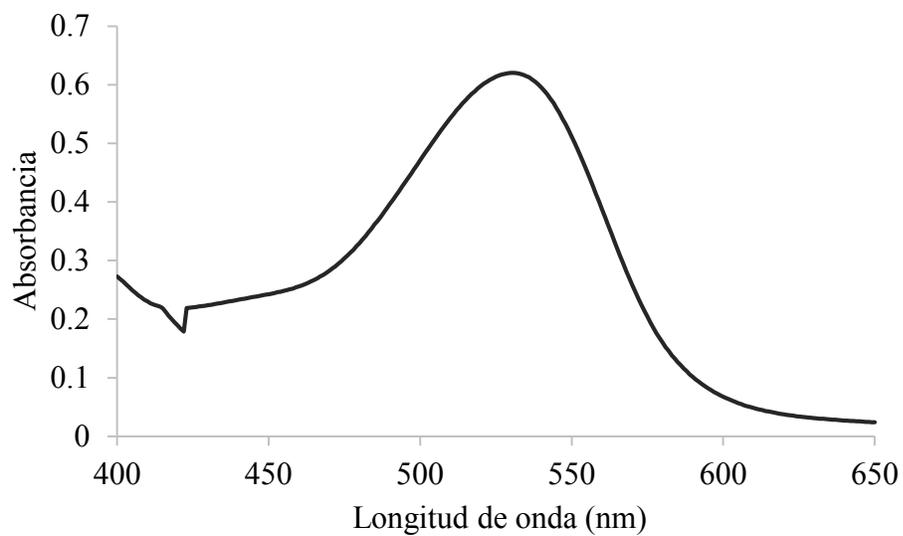
Ecuación:
 $T = -0.0004t^3 - 0.1072t^2 + 5.1374t + 22.551$
 Derivando:
 $\partial T/\partial t = -0.0012t^2 - 0.2144t + 5.1374$
 Sustituyendo $t=0$
 Por lo tanto: $\partial T/\partial t = 3.1574$

$P = m C_p (\partial T/\partial t)$

$m = 300 \text{ g}$
 $C_p = 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$
 $P = (600 \text{ g} * 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C} * 3.1574 \text{ }^\circ\text{C/min}$
 $* (1 \text{ min}/60 \text{ s}))$
 $P = 65.98966 \text{ W}$

ANEXO 7

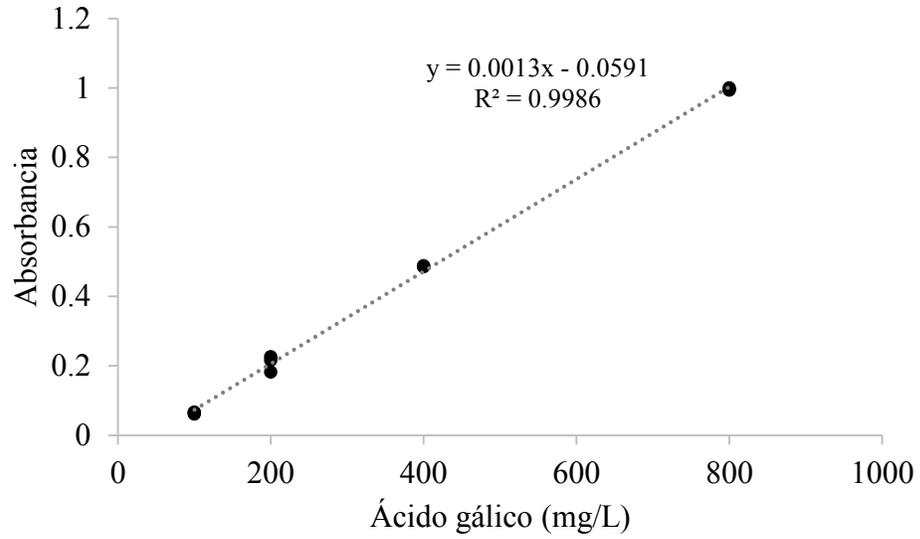
Barrido de longitud de onda y determinación del pico más alto para la cuantificación de antocianinas totales



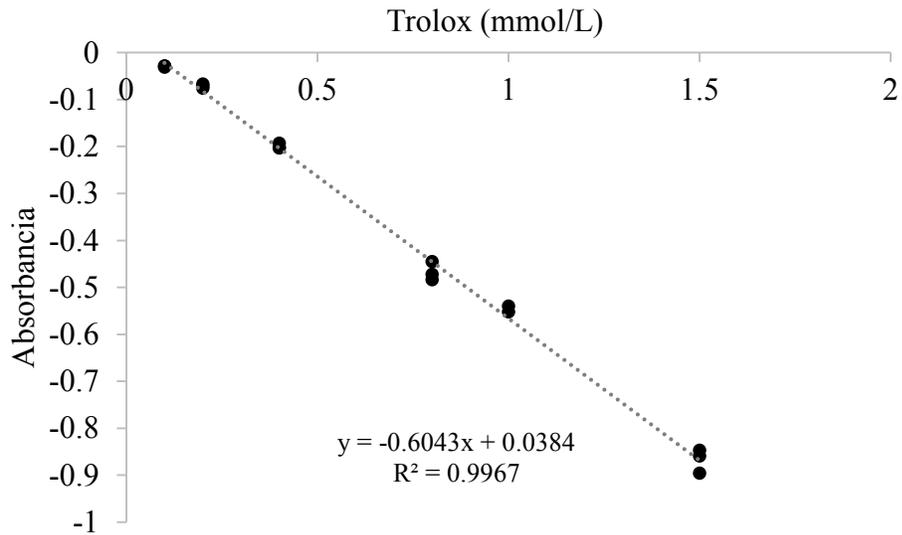
No.	nm	Absorbancia	Tipo
1	530.50	0.6204	Pico

ANEXO 8

Curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales

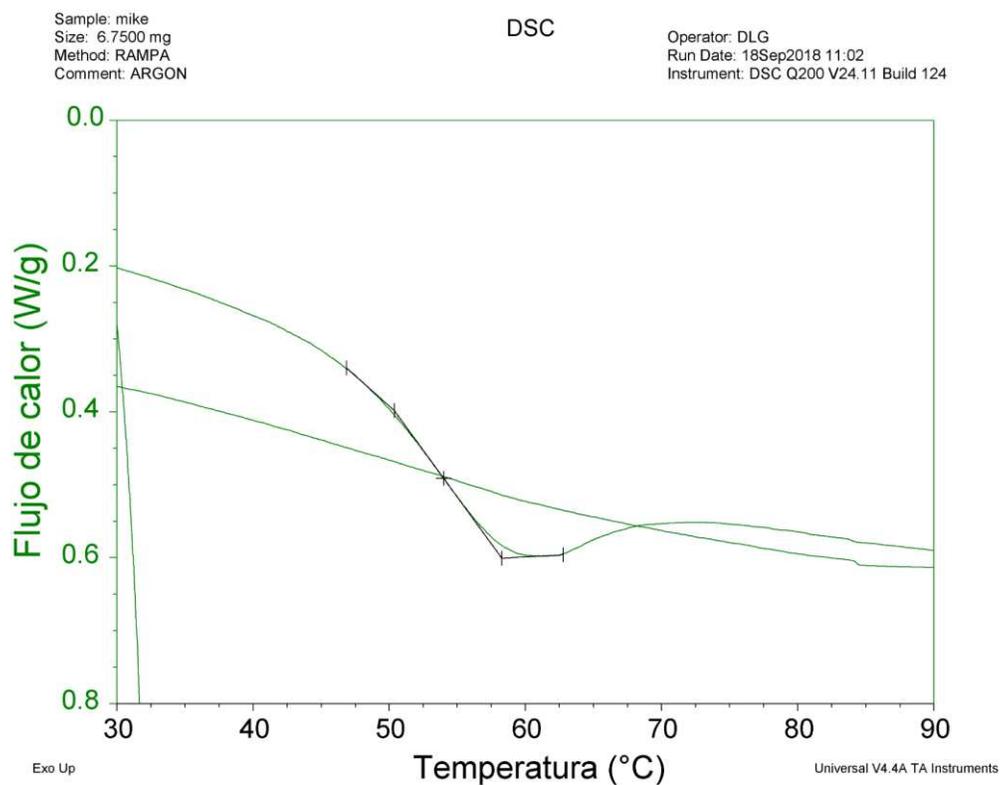


Curva de calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante



ANEXO 9

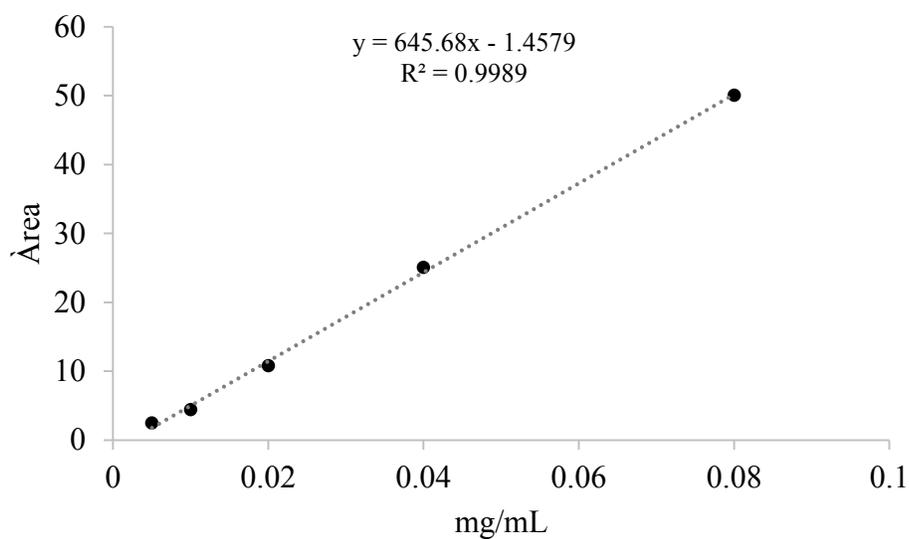
Termograma obtenido del análisis de calorimetría diferencial de barrido de los encapsulados de extracto de maíz azul para la determinación de la temperatura de transición vítrea.



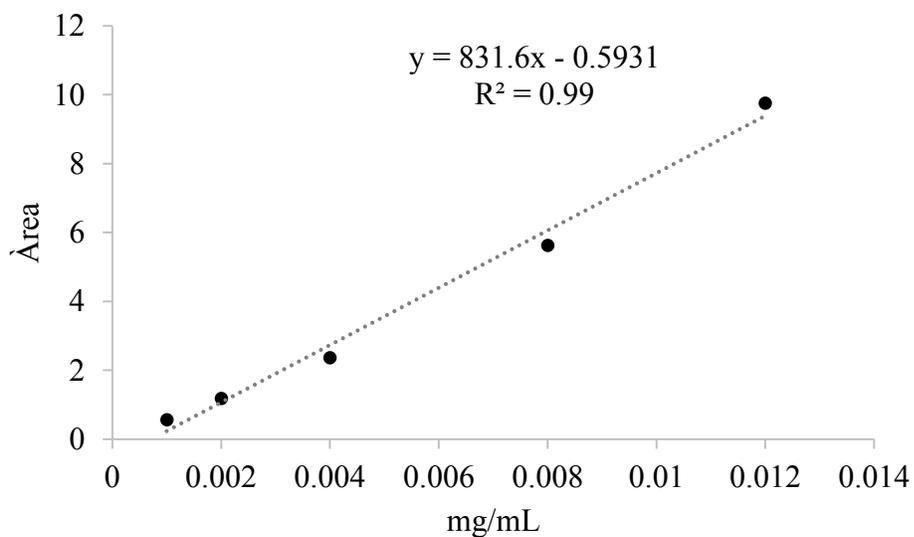
ANEXO 10

Curvas de calibración para antocianinas individuales (HPLC)

Curva de calibración para la cuantificación de cianidina 3-glucósido



Curva de calibración para la cuantificación de pelargonidina 3-glucósido



RESUMEN BIOGRÁFICO

Miguel Ángel Sánchez Madrigal

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Alimentos

Tesis: EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS A PARTIR DE PLANTAS DE SOTOL (*Dasyliirion* spp.) Y AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. azul) MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS ASISTIDOS CON TECNOLOGÍAS DE ULTRASONIDO Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS

Campo de Estudio: Ciencias de los Alimentos.

Datos personales: Nacido en El Fuerte, Sinaloa, el 6 de julio de 1985.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido Ingeniero Químico en el año 2009 con mención honorífica, grado obtenido por la misma Universidad de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos en el año 2012 también con mención honorífica.

Experiencia profesional: Asistente de investigación y laboratorio en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Prestador de servicios técnicos y profesionales para diferentes proyectos con algunas empresas en conjunto con la UACH.