



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE  
INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

**Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de  
Recursos Naturales**

**Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia*  
*Haw.* y *A. potatorum* Zucc. en la modulación de péptidos  
involucrados en la regulación del apetito (GLP-1 y grelina)**

Tesis que presenta

***Patricia Araceli Santiago García***

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Directora de tesis

**Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez**

Oaxaca, México, diciembre 2015



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 10 del mes de diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc. en la modulación de péptidos involucrados en la regulación del apetito (GLP-1 y grelina)"  
Presentada por la alumna

Santiago  
Apellido paterno

García  
materno

Patricia Araceli  
nombre(s)

Con registro: B 0 5 1 3 3 2

aspirante al grado de: **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA  
Director de tesis

*Mercedes G. López*

Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez

*Rafael Felipe del Castillo Sánchez*

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez

*Celerino Robles Pérez*

Dr. Celerino Robles Pérez

*Salvador Isidro Belmonte Jiménez*

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

*Margarito Martínez Cruz*

Dr. Margarito Martínez Cruz

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO

*José Rodolfo Martínez y Cárdenas*  
Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 10 del mes diciembre del año 2015, el (la) que suscribe **Santiago García Patricia Araceli** alumno (a) del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro B051332, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez y cede los derechos del trabajo titulado: "Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc. en la modulación de péptidos involucrados en la regulación del apetito (GLP-1 y grelina)". Al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [psanti\\_02@yahoo.com.mx](mailto:psanti_02@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Santiago García Patricia Araceli**



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## COMITÉ TUTORIAL

**Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez.** Profesor Investigador del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca.

**Dr. Celerino Robles Pérez.** Profesor Investigador del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca.

**Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez.** Profesor Investigador del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca.

**Dr. Margarito Martínez Cruz.** Profesor Investigador del Instituto Tecnológico de Oaxaca.

**Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez.** Profesora Investigadora del Departamento de Biotecnología y Bioquímica. CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Directora de Tesis.

El presente trabajo titulado "**Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc. en la modulación de péptidos involucrados en la regulación del apetito (GLP-1 y grelina)**" se realizó en el laboratorio de Bioquímica de Alimentos del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional Unidad Oaxaca y en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Bioquímica en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato, bajo la dirección de la **Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez**.

Los estudios de doctorado fueron posibles gracias a las facilidades otorgadas por el **INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL/CIIDIR – Unidad Oaxaca**

*A mis hijos Tania Patricia y Martí Horacio*

*A mi esposo Horacio Mendoza*

*Gracias por su inmenso amor y apoyo incondicional*

*Esto no sería posible sin Ustedes*

*A mis padres Noemí García Cruz y Ageo Melchor Merlín<sup>†</sup>*

*Mi ejemplo a seguir de trabajo, amor y tenacidad.*

*Con mi eterno agradecimiento y amor*

# ÍNDICE

CONTENIDO	Página
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
Índice de figuras	V
Índice de tablas	IX
<b>ABREVIACIONES</b>	<b>XI</b>
Unidades de medida utilizadas en el texto	XI
Abreviaciones empleadas en el texto	XIII
<b>Resumen</b>	<b>XVIII</b>
Abstract	XX
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
II.1. FRUCTANOS	3
II.1.1. Estructura química y su clasificación	3
II.1.2. Función de los fructanos en plantas	6
II.1.3 Aplicación de los fructanos en alimentos	7
II. 2. AGAVE	7
II. 2.1. Clasificación taxonómica y botánica	8
II. 2.2. <i>Agave angustifolia</i> Haworth	10
II. 2.3. <i>Agave potatorum</i> Zuccarini	11
II. 2.4 Metabolismo de las plantas de agave	12
II.2.5 Fructanos en agave	14
II.3 PREBIOTICOS	16
II.3.1 Efecto prebiótico	18
II.4 EFECTOS DE LOS FRUCTANOS EN LA SALUD	19
II.4.1. Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)	19
II.4.2. Hormonas gastrointestinales	22
II.4.2.1. Péptido-1 tipo glucagón (GLP-1)	22
II.4.2.1.1.GLP-1 y su efecto relacionado con la saciedad	24
II.4.2.2. Grelina	25
II.4.3. Influencia de los fructanos sobre la glicemia/ insulinemia	27
II.4.4. Efectos de los fructanos sobre el metabolismo de lípidos	29
II.5. AGAVINAS Y SU POTENCIAL PREBIÓTICO	30
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>33</b>

<b>IV. HIPÓTESIS</b>	34
<b>V. OBJETIVOS</b>	35
V. 1. Objetivo general	35
V. 2. Objetivos específicos	35
<b>VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	36
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
VII.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS	37
VII.1.1. Material biológico	37
VII.1.2. Extracción y purificación de fructanos	37
VII.1.3. Secado por aspersión	38
VII.1.3.1. Característica fisicoquímicas	38
VII.1.3.1.1. Color	38
VII.1.3.1.2. Determinación de carbohidratos totales	39
VII.1.3.1.3. Azúcares reductores directos	39
VII.1.3.1.4. Determinación de fructosa	40
VII.2. CUANTIFICACION DE FRUCTANOS	40
VII.3. CARACTERIZACION DE AGAVINAS POR TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS	42
VII.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC).	42
VII.3.2. Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).	43
VII.3.3. Derivatización de fructanos a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA)	43
VII.3.3.1. Metilación	44
VII.3.3.2. Extracción de productos metilados	44
VII.3.3.3. Hidrólisis	46
VII.3.3.4. Reducción	46
VII.3.3.5. Acetilación	46
VII.3.3.6. Extracción de alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA <sub>S</sub> )	46
VII.3.3.7. Identificación de derivados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	47
VII.4. EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FRUCTANOS DE <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave potatorum</i> : ESTUDIOS <i>in vitro</i>	48
VII.4.1. Diseño experimental	48
VII.4.2. Bacterias	48
VII.4.2.1. Regeneración de la cepa	49
VII.4.2.2. Crecimiento bacteriano	49
VII.4.3. Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)	50



VII.4.4. Análisis estadístico	50
VII.5. EFECTO PREBIÓTICO DE LAS AGAVINAS DE <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> EN LA INGESTA DE ALIMENTO, GANANCIA DE PESO DEL CUERPO Y HORMONAS RELACIONADAS A LA SACIEDAD (GLP-1 y grelina).	51
VII.5.1. Animales de laboratorio	51
VII.5.2. Dietas	51
VII.5.3. Evaluación de la ingesta de alimento, ganancia de peso y producción de heces de los ratones	51
VII.5.4 Determinación de glucosa y perfil de lípidos en sangre de los ratones.	52
VII.5.4.1 Evaluación del perfil lipídico colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja y muy baja densidad (COL, TG, HDL, LDL y VLDL).	52
VII.5.5 Sacrificio	53
VII. 5.5.1 Análisis del peso de ciego, colon y su contenido	54
VII. 5.6.1.1 1	54
VII. 5.6.1.2 Cuantificación de grelina	56
VII. 5.5.2 Extracción y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en ciego y colon	57
VII. 5.5.3 Cambios de pH en el intestino grueso de ratones	58
VII. 5.6 Análisis estadístico	58
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
VIII.I. EXTRACCIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN DE FRUCTANOS DE ALTO Y BAJO GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE <i>Agave angustifolia</i> Haw y <i>Agave potatorum</i> Zucc.	59
VIII.1.1 Rendimiento de la extracción de fructanos	59
VIII.1.2 Secado por aspersion	59
VIII.1.2.1 Características fisicoquímicas de los fructanos en polvo	60
VIII.1.3 Contenido de fructanos	61
VIII. 2 CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i>	62
VIII.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	62
VIII.2.2 HPAEC-PAD de fructanos de plantas de <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave potatorum</i> .	64
VIII.2.3 Análisis de enlaces por derivatización a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) de fructanos en plantas de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i>	68
VIII.3 EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FRUCTANOS DE <i>Agave angustifolia</i>	74

Haw. y <i>Agave potatorum</i> Zucc	
VIII.3.1. Efecto de fructanos de alto grado de polimerización sobre el crecimiento de Bifidobacteria	74
VIII.3.2. Fructanos de bajo grado de polimerización	75
VIII.3.3 Mezclas	76
VIII.3.4 Efecto de fructanos de diferentes grado de polimerización sobre el crecimiento de Lactobacilli	77
VIII.3.5. Efecto de la fermentación de fructanos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i>	81
VIII.3.5.1 Descenso del pH por efecto de las Bifidobacterias	81
VIII.3.5.2 Descenso de pH por efecto de Lactobacilli	82
VIII.3.5.3 Producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)	83
VIII.4. EFECTO DEL CONSUMO DE AGAVINAS DE CADENA CORTA DE <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave potatorum</i> Y HORMONAS RELACIONADAS CON LA SACIEDAD (GLP-1 Y GRELINA) EN RATONES.	85
VIII.4.1 Ingesta de alimento y ganancia de peso	85
VIII.4.2 Concentración de GLP-1 intestinal y en el plasma de la vena porta	88
VIII.4.3. Concentración de grelina en plasma de la vena porta y en estómago	90
VIII.4.4. Concentración y proporción cecal de SCFAs	91
VIII.4.5. Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol y lípidos de alta densidad en el plasma	92
<b>IX.CONCLUSIONES</b>	100
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	102
<b>XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	103
<b>APENDICES</b>	
<b>Santiago-García P. A. and López M G. 2009.</b> Prebiotic effect of agave fructans and mixtures of different degrees of polymerization from <i>Agave angustifolia</i> Haw., <i>Dyn. Biochem. Process Biotech. Mol. Biol.</i> 1:52-58.	
<b>Santiago-García P. A. and López M G. 2014.</b> Agavins from <i>Agave angustifolia</i> and <i>Agave potatorum</i> affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. <i>Food Funct.</i> 5:3311–3319.	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1.	Clasificación de fructanos almacenados en plantas de acuerdo con los enlaces glicosídicos presentes. Lewis (1993).	5
2.	Clasificación de fructanos almacenados en plantas de acuerdo a la presencia o ausencia de una molécula glucosa en la estructura (GF <sub>n</sub> o Fn). Lewis (1993).	6
3.	Principales regiones de agave y mezcal en Oaxaca	8
4.	Morfología de la planta de agave	9
5.	<i>Agave angustifolia</i> Haw.	10
6.	<i>Agave potatorum</i> Zucc.	11
7.	Metabolismo ácido de las Crasuláceas (metabolismo CAM). Durante el periodo de oscuridad, las estomas abiertas permiten la asimilación de CO <sub>2</sub> mediante la producción de malato que es almacenado en la vacuola. Durante el día, el cierre de los estomas reduce la pérdida de agua, mientras que el malato es descarboxilado y fosforilado en el citoplasma para la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin. (Hopkins, 1999).	13
8.	Estructuras moleculares propuesta para las agavinas o fructanos del género agave (graminanos y agavinas) del Grupo I. Mancilla-Margalli & López (2006).	15
9.	Esquema representativo del colon en donde se lleva acabo la fermentación anaeróbica de los prebióticos (fructanos) por Bifidobacteria y Lactobacilli con producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como productos de su fermentación para mejorar la salud del hospedero (Modificado de Huazano-García & López, 2013).	17
10.	Efectos de la fermentación de fructanos sobre péptidos gastrointestinales. (Modificado de Drucker, 2006).	23
11.	Sitio de acción de las señales que influyen en la ingesta de alimentos en el hipotálamo. (Wynne et al. 2004)	26
12.	Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (a), <i>L. casei</i> (b), <i>L. paracasei</i> , (c) y <i>L. rhamnosus</i> (d). CIS, <i>Cichorium intybus</i> Sigma; DVS, <i>Dahlia variabilis</i> Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, <i>Agave tequilana</i> var. Azul de Jal; ATG, <i>A. tequilana</i> var. Azul de Gto; AAO, <i>A. angustifolia</i> Oax; AAS, <i>A. angustifolia</i> Son; APO, <i>A. potatorum</i> Oax; ACO, <i>A. cantala</i> Oax; AFY, <i>A. fourcroydes</i> Yuc; DSC, <i>Dasyilirion</i> sp. Chih. (Urías-Silvas & López, 2007)	30

13.	Concentración intestinal de GLP-1 (7-36) amida. STD, Estándar; RAF,rafitilosa; ATG, <i>A. tequilana</i> var. Azul Gto.; DSC, <i>Dasyilirion</i> sp. Chih. Valores promedio con EEM. (Urías-Silva et al., 2007)	31
14.	Metodología de la derivatización de fructanos a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs)	45
15.	Esquema general del trabajo <i>in vivo</i>	54
16.	Protocolo del inmunoensayo enzimático (Phoenix Pharmaceuticals)	56
17.	Contenido de fructanos de alto y bajo grado de polimerización en <i>Agave angustifolia</i> y en <i>A. potatorum</i> .	62
18.	Cromatografía de capa fina de los fructanos de alto DP de <i>A. angustifolia</i> , (AALDP); fructanos de bajo DP de <i>A. angustifolia</i> (AASDP); fructanos de alto DP de <i>A. potatorum</i> (APLDP); fructanos de bajo DP de <i>A. potatorum</i> , (APSDP); (STD) estándar. G, glucosa; F, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-kestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.	63
19.	Perfil HPAEC-PAD de fructanos de alto grado de polimerización de <i>Agave angustifolia</i> , AALDP; <i>A. potatorum</i> , APLDP y raftiline (RNE).	65
20.	Perfil HPAEC-PAD de fructanos de bajo grado de polimerización de <i>Agave angustifolia</i> , AALDP; <i>A. potatorum</i> , APLDP y raftilosa (RSE).	67
21.	Perfil de elución de fructanos derivados a alditol, acetatos parcialmente metilados de raftiline (RNE)	69
22.	Perfil de elución de fructanos derivados a alditol, acetatos parcialmente metilados de los fructanos secados por aspersión El nombre específico y tiempo de retención (min) de cada PMAA se enlistan en la Tabla 6.	70
23.	Cromatografía de capa fina de los fructanos de alto DP de <i>A. angustifolia</i> , (LAA); A =75% LAA + 25% SAA; B =50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de <i>A. angustifolia</i> ; raftilosa (RSE); raftiline (RNE); fructanos de alto DP de <i>A. potatorum</i> (LAP); D =75% LAP + 25% SAP; E =50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de <i>A. potatorum</i> ,(SAP); (STD) estándar. Xil, xilosa; Glu, glucosa; Fru, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-cestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.	74
24.	Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de Bifidobacterias incubados anaeróticamente por 20 h en MSR	76

conteniendo 10 g/L de fructanos. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Densidad óptica, DO. Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raftiline, (RAF1); raftilosa, (RAF2).

- |     |  |    |
|-----|--|----|
| 25. | Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de Lactobacilli incubados anaeróbicamente por 20 h en MSR conteniendo 10 g/L de fructanos. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$ . Densidad óptica, DO. Fructanos de alto DP de <i>A. angustifolia</i> , (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de <i>A. angustifolia</i> (SAA); fructanos de alto DP de <i>A. potatorum</i> (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de <i>A. potatorum</i> ,(SAP); raftiline (RAF1); raftilosa (RAF2). | 78 |
| 26. | Ganancia de peso de ratones alimentados con las diferentes dietas, dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>Agave potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE).Valores son medias con su error estándar y son mostradas por barras verticales (seis ratones por grupo). Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )   | 86 |
| 27. | Ingesta de alimento de ratones alimentados con las diferentes dietas, dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>A. potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE).Valores son medias con su error estándar y son mostradas por barras verticales (seis ratones por grupo). Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )   | 88 |
| 28. | Concentración intestinal de GLP-1 de ratones alimentados con una dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>Agave potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE). Los resultados son la media con su error estándar de las medias. Valores medios con diferentes letras fueron diferentes significativamente cuando ( $P \leq 0.05$ ).  | 89 |
| 29. | Concentración de GLP-1 en el plasma de la vena porta de ratones alimentados con la dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>A. potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE). Los  | 90 |

resultados son la media con su error estándar de las medias. Valores medios con diferentes letras fueron diferentes significativamente cuando ( $P \leq 0.05$ ).

30. Concentración de grelina gástrica (**A**) y en vena porta (**B**) de ratones alimentados con la dieta estándar (STD) o dietas suplementadas con agavinas de DP chico de *Agave angustifolia* (AASDP) o *A. potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE). Valores medios con su error estándar son mostrados por barras verticales. Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). 91

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Características estructurales de At-J. <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul (Jalisco); Aa-S: <i>A. angustifolia</i> (Sonora); Aa-O: <i>A. angustifolia</i> (Oaxaca); Ap-O: <i>A. potatorum</i> (Oaxaca).	16
2	Fructanos y mezclas de diferente grado de polimerización de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> utilizadas sadocomo fuente de carbono para el crecimiento de probióticos	48
3	Especies de Bifidobacteria y Lactobacilli obtenidas de la American Type Cultura Collection (ATCC), Rockvill, Md., utilizadas en el estudio <i>in vitro</i> utilizando agavinas como fuente de carbono.	49
4	Características fisicoquímicas de las agavinas secadas por aspersión.	60
5	Carbohidratos identificados en los fructanos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> mediante HPAEC-PAD.	66
6	Alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) identificados en los fructanos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i>	71
7	Contribución cuantitativa (porcentaje por mol) de los PMAAs derivatizados en fructanos en <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> . de alto y bajo DP	73
8	Correlación entre los diferentes enlaces glicosídicos identificados en fructanos de alto y bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i>	73
9	Descenso de pH del medio de cultivo por efecto de la fermentación de fructanos por <i>B. adolescentis</i> , (BA); <i>B. animalis</i> (BAN), <i>B. bifidum</i> , (BBF) <i>B. breve</i> , (BBR); <i>B. infantis</i> (BI) y <i>B. longum</i> (BL).	82
10	Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> y <i>L. rhamnosus</i> .	83
11	Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) generados durante la fermentación de fructanos por <i>B. adolescentis</i> , BA; <i>B. animalis</i> , BAN; <i>B. bifidum</i> , BBF; <i>B. breve</i> , BBR; <i>B. infantis</i> BI y <i>B. longum</i> BL.	84
12	Concentración de los ácidos grasos de cadena corta (mM) generados a través de la fermentación de fructanos por <i>L.</i>	85

*acidophilus*, *L. casei* *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 13 | Ingesta de alimento, heces, peso del hígado y ciego, pH cecal y colónica de ratones alimentados con dieta standard (STD) o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>A. potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE).   | 87 |
| 14 | Concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mmol g <sup>-1</sup> contenido colónico en base húmeda) en el colon de ratones alimentados con dieta estándar (STD) o dietas suplementadas con agavinas con DP chico de <i>Agave angustifolia</i> (AASDP) o <i>Agave potatorum</i> (APSDP) y raftilose (RSE).   | 92 |
| 15 | Concentración en plasma de glucosa y perfil de lípidos ((colesterol total (COL), triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL), baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL)) de ratones alimentados con dieta estándar (STD) agavinas de bajo DP de <i>Agave angustifolia</i> Haw. (AASDP) y <i>A. potatorum</i> Zucc. (APSDP) y Raftilose (RSE). | 93 |



## UNIDADES DE MEDIDA UTILIZADAS EN EL TEXTO

°C	Grados Centígrados (Celsius)
g	Gramos
Kg	Kilogramos
%	Porcentaje
mmol	Milimoles
Kcal	Kilocaloría
m	Metro
cm	Centímetros
msnm	Metro sobre el nivel del mar
pmol	Picomol
mL	Mililitros
w/v	Peso Volumen ( por sus siglas en ingles )
r.p.m.	Revoluciones por minuto
min	Minutos
µg	Microgramos
v	Volumen
M	Molar
µL	Microlitros
nM	Nanomolar
λ	Longitud de onda
seg	Segundos
w	Peso
Ω	Ohm
µm	Micromolar
h	Hora

mm	Milímetros
eV	Electrovolts
kJ	Kilo jouls
mol	Mol

## ABREVIACIONES

### ABREVIACIONES EMPLEADAS EN EL TEXTO

<i>A. angustifolia</i>	<i>Agave angustifolia</i> Haw.
AALDP	<i>Agavinas de largo grado de polimerización de A. angustifolia</i>
AASDP	<i>Agavinas de corto grado de polimerización de A. angustifolia</i>
<i>A. potatorum</i>	<i>Agave potatorum</i> Zucc.
APLDP	<i>Agavinas de largo grado de polimerización de A. potatorum</i>
APSDP	<i>Agavinas de corto grado de polimerización de A. potatorum</i>
ATCC	American Type Cultura Collection
ATP	Trifosfato de adenosina ( <i>adenosine triphosphate</i> , por sus siglas en inglés)
ATS	Antrona-triptofano-ácido
Aw	Actividad acuosa
BA	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
BAN	<i>Bifidobacterium animalis</i>
BBF	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
BBR	<i>Bifidobacterium breve</i>
BI	<i>Bifidobacterium infantis</i>
BL	<i>Bifidobacterium longum</i>
Ca	Calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas ( <i>Crassulacean acid metabolism</i> , por sus siglas en inglés)
CaOH <sub>2</sub>	Hidróxido de calcio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dicloro metano
CH <sub>3</sub> COONa	Acetato de sodio

CH <sub>3</sub> I	Yoduro de metilo
CCK	Colecistoquinina
CH <sub>4</sub>	Metano
CIIDIR	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CICUAL	Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CoA	Acetil coenzima A
COL	Colesterol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DP	Grado de polimerización
1K	Kestosa
DP4 o 1N	Nistosa
DP5	1,1-kestopentaosa
DPP-IV	Dipeptidil-peptidasa IV
DSC	<i>Dasyilirion</i>
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
FAS	Sintasa ácido grasa
FDA	Alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés)
FOS	Fructooligosacáridos
Fr	Factor de retención
Fn	Fructanos que carecen de una unidad de glucosa terminal
FRU	Fructosa

GC-FID	Cromatografía de gases de ionización de flama
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masa (Gas chromatography coupled to mass spectrometry, por sus siglas en inglés)
GLP-1	Péptido-1 tipo glucagón
GLU	Glucosa
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato ácido de sodio
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HP-FFAP	Columna cromatografica de polietilen glicol modificada con ácido nitrotereftálico (Nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol)
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a un detector pulso amperométrico
IPN	Instituto Politécnico Nacional
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LAA	Fructanos de alto DP de <i>Agave angustifolia</i>
LAP	Fructanos de alto DP de <i>Agave potatorum</i>
LC	<i>Lactobacillus casei</i>
Lpc	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDP	Largo grado de polimerización (Long Degree of polymerization, por sus siglas en inglés)
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
MA	Ácido málico
MRS	Mann Rogosa Sharp

Efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* en la modulación de péptidos involucrados en la regulación del apetito (GLP-1 y grelina.

Mg	Magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tiosulfato de sodio
NaHBD <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio deuterado
NaHB <sub>4</sub>	Borohidruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OH	Hidroxilo
OAA	Oxalacetato
OXM	Oxintomodulina
PAHBAH	Hidracida de ácido p-hidroxibenzoico
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPc	Fosfenolpiruvato carboxilasa
pH	Potencial de hidrógeno
PMAAs	Alditol acetatos parcialmente metilados
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RNE	Raftiline
RSE	Raftilose
SA-HRP	Peroxidasa de rábano con estreptavidina

SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SDP	Corto DP (Short Degree of polimerization, por sus siglas en inglés)
SE	Error estándar
STD	Estándar
TFA	Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> , por sus siglas en inglés)
TG	Triglicéridos
TLC	Cromatografía en capa fina
tr	Tiempo de retención
USA	Estados Unidos de Norteamérica
UFC	Unidades fumadoras de colonias
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
X/A	Células de la glándula oxíntica
YY	Péptido YY

## RESUMEN

En México el incremento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en la población constituyen uno de los mayores problemas de salud pública, debido a que estas condiciones predisponen a trastornos metabólicos. Los fructanos tipo inulina debido a su capacidad prebiótica pueden regular el metabolismo de lípidos y glucosa a través de la modulación de la microbiota colónica y de las hormonas relacionadas con la saciedad. Estos efectos se ha reportado que están relacionados a un incremento de péptidos del colon que han mostrado tener influencia sobre la ingesta de energía, como el péptido-1 tipo glucagón (GLP-1), y su precursor mRNA proglucagón. Los fructanos son polímeros de fructosa y son almacenados en plantas como achicoria, trigo, cebolla, ajo o agave. Los fructanos de agaves no son inulinas, son mezclas complejas de fructanos con enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6) con una unidad de glucosa externa (graminanos) y una glucosa interna (fructanos neoserie), éstos últimos llamados agavinas con propiedades nutraceuticas interesantes para reducir el riesgo de algunas enfermedades. A la fecha solo el efecto de las agavinas de *A. tequilana* ha sido reportado y ha mostrado importantes efectos sobre la homeostasis de glucosa y lípidos en ratones. Dentro de las plantas de agave que contienen fructanos en el estado de Oaxaca *Agave angustifolia* Haw. y *A. potatorum* Zucc. son importantes ejemplares, sin embargo existen pocos reportes sobre su efecto prebiótico y fisiológicos cuando son incorporados en la dieta. Por lo tanto en este trabajo, se decidió evaluar la velocidad de crecimiento de seis especies de Bifidobacteria y cuatro de Lactobacilli utilizando a los fructanos y mezclas con diferente grado de polimerización de *A. angustifolia* y *A. potatorum* como fuente de carbono. Por otro lado, ratones machos C57BL/6N fueron alimentados con una dieta estándar (STD) o suplementada con 10% de agavinas de bajo grado de polimerización (SDP) de *A. angustifolia* (AASDP), *A. potatorum* (APSDP) y los fructanos de achicoria (RSE) como referencia. La ingesta de energía fue evaluada todos los días y la ganancia de peso una vez por semana. Después de 5 semanas, se colectaron muestras de sangre de la vena porta así como segmentos intestinales y estómago para medir GLP-1 y grelina usando un RIA kits y un ELISA kits respectivamente. Ácidos



grasos de cadena corta (SCFA) se midieron usando un cromatógrafo de gases. Los resultados mostraron que los fructanos de agave estimularon el crecimiento de Bifidobacteria y Lactobacilli más eficientemente (2 campos) que las inulinas comerciales. La biomasa y el descenso del pH fueron más grandes cuando el substrato tuvo mayor contenido de fructanos de bajo DP es decir, el contenido de fructanos de bajo DP en las mezclas influyó en la velocidad de fermentación. En general, la suplementación de la dieta con fructanos disminuyó la ingesta de energía y/o de alimentos y la ganancia de peso del cuerpo comparada con la dieta STD, el grupo de ratones alimentados con APSDP mostraron los valores más bajos. Los niveles de glucosa y colesterol en la sangre fueron bajos en todos los grupos alimentados con fructanos comparado con el grupo STD. Un decremento significativo de triglicéridos se observó en el grupo alimentado con AASDP. Las dietas AASDP, APSDP y RSE incrementaron los niveles de GLP-1 (40, 93, y 16%, respectivamente vs. STD) ( $P \leq 0.05$ ), mientras que la grelina disminuyó (16, 38, y 42%, respectivamente) ( $P \leq 0.05$ ). Los resultados también mostraron un incremento significativo de butirato en el grupo de los ratones alimentados con APSDP ( $26.59 \text{ mmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ) comparado con aquellos ratones alimentados con AASDP y RSE. Como previamente se mostró para *A. tequilana* la suplementación con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* indujeron una alta concentración de GLP-1 en los diferentes segmentos colónicos, esto sugiere que las agavinas de diferentes especies son capaces de promover la secreción de los péptido involucrados en la regulación del apetito, lo cual puede ayudar al control de la obesidad y sus desórdenes metabólicos asociados.

## ABSTRACT

In Mexico, the growing prevalence of overweightness and obesity in the population is one of the most pressing public health problems, in part because these conditions promote serious metabolic disorders. Inulin-type fructans, due to its prebiotic capacity, can regulate the metabolism of lipids and glucose through the modulation of colonic microbiota and the hormones related to satiety. These effects are often associated with a higher plasma content of peptides of the colon that influence the intake of energy, such as glucagon-like peptide (GLP-1) and its precursor proglucagon mRNA. Fructans are fructose polymers that are found naturally in chicory, wheat, onion, garlic or agave. The fructans in agaves are not inulins, but instead are complex mixtures of fructans with links  $\beta$  (2-1) and  $\beta$  (2-6) with a unit of external glucose (graminans) and an internal glucose (fructans neoserie). These fructans are called agavins and have nutraceutical properties that may reduce the risk of disease. To date, only agavins from *A. tequilana* have been reported to have physiological effects, shown to affect the homeostasis of glucose and lipids in mice. For agave species that contain agavins in the state of Oaxaca, *Agave angustifolia* and *A. potatorum* appear to be important, although there are few reports of their prebiotic and physiological effects when incorporated in the diet. The aim of this work was to investigate the growth rate of six Bifidobacteria and four of Lactobacilli strains when fructans and mixtures with different degrees of polymerization (DP) from *A. angustifolia* and *A. potatorum* were used as an energy source. On the other hands, male C57BL/6 mice were fed a standard diet (STD) or diets supplemented with 10% of agavins with short degrees of polymerization (SDP) from *A. angustifolia* (AASDP) or *A. potatorum* (APSDP) and chicory fructans (RSE) as a reference. Energy intake was evaluated daily and weight was measured weekly. After 5 weeks, portal vein blood samples, as well as intestinal segments and stomach contents, were collected to measure GLP-1 and ghrelin levels using RIA and ELISA kits, respectively. Colon SCFAs were measured using gas chromatography. We observed that agave fructans stimulated growth of Bifidobacteria and Lactobacilli twice as efficiently as commercial inulins. Biomass and pH drops were higher when the substrate contained mostly short-DP fructans

that were highly fermented. In general, fructan supplementation decreased daily food and/or calorie intake and body weight gain, and increased feces excretion compared with the STD diet, with APSDP leading to the lowest value. Serum glucose and cholesterol were similarly lower in all fructans-fed groups compared to the STD group. Only the AASDP diet led to a significant decrease in serum triglycerides (TAG), while the APSDP diet showed butyrogenic properties. The AASDP, APSDP, and RSE diets increased serum levels of GLP-1 (40%, 93%, and 16%, respectively vs. STD;  $P \leq 0.05$ ), whereas ghrelin levels decreased (16%, 38%, and 42%, respectively;  $P \leq 0.05$ ). Butyric acid increased significantly in the APSDP-fed mice ( $26.59 \text{ mmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ) compared to the AASDP- and RSE-fed mice. As previously shown for *A. tequilana*, supplementation with short-DP agavins (*A. angustifolia* and *A. potatorum*) induced a higher concentration of GLP-1 in the different colonics segments, thus suggesting that fermentable agavins from different species are able to promote the secretion of peptides involved in appetite regulation, which may help control obesity and associated metabolic disorders.

## I. INTRODUCCIÓN

En México el incremento en la prevalencia del sobrepeso y obesidad (71.3%) en la población constituye uno de los más serios problemas de salud pública, debido a que estas condiciones predisponen a trastornos metabólicos como: resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2; hipertensión, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Barquera *et al.*, 2013). Se ha reportado que los fructanos tipo inulina y los fructooligosacáridos (FOS) funcionan como fibra dietaria, la cual reduce el riesgo de enfermedades asociadas con la obesidad (Du *et al.* 2010).

Los fructanos tipo inulina son polímeros de fructosa, son solubles y fermentables en el colon, y cambian la composición y actividad de la microbiota colonica, promoviendo la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) principalmente acetato, propionato, butirato y por lo tanto reducen el pH del colon, con un decremento en las bacterias patogénicas; una mayor tolerancia a la glucosa, un incremento en la secreción de insulina y una baja ingesta de alimento en animales y humanos (Letexier *et al.* 2003; Beylot *et al.* 2007; Cani *et al.* 2005). Estos efectos están frecuentemente asociados con un alto contenido en plasma del péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) y su precursor mRNA proglucagón (Cani *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2006).

Actualmente, la importancia del agave, no solo se debe a su relación con la producción de bebidas alcohólicas (tequila, mezcal, sotol), sino también al conocimiento del tipo de carbohidratos (fructanos) presentes en el cultivo. Mancilla Margalli & López (2006) reportaron la estructura de los fructanos presentes en *Agave tequilana* Weber variedad Azul llamandole agavinas. El efecto fisiológico de las agavinas lo reportaron el 2007; sin embargo, estos estudios son limitados principalmente a *A. tequilana* mostrando importantes efectos sobre la homeostasis de glucosa y lípidos en ratones (Urías-Silvas *et al.* 2007; Huazano-García & López, 2015).

El estado de Oaxaca tiene una gran diversidad de especies de agave de gran relevancia debido a que la hidrólisis de sus fructanos constituye el sustrato fermentable en la producción de mezcal, sin embargo, estos fructanos funcionan como una fibra dietaria soluble, con propiedades nutraceúticas y fisiológicas que aún faltan por ser estudiados. Por tal motivo el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* y determinar su efecto prebiótico de dos maneras: *in vitro* con Bifidobacteria y Lactobacilli e *in vivo* al evaluar sus efectos en la homeostasis de glucosa y lípidos, SCFAs en segmentos del colon así como la modulación de hormonas intestinales (GLP-1 y grelina) relacionadas con la saciedad en ratones.

## II. ANTECEDENTES

### II. 1. FRUCTANOS

Además del almidón, los fructanos son carbohidratos de reserva altamente distribuidos en el reino vegetal. Su presencia fue descrita por primera vez en 1804 por Rose, quien descubrió su presencia en las raíces de *Inula helenium* L. Los fructanos son polímeros de fructosa que derivan de la sacarosa (Vijn & Smeekens, 1999; Ritsema & Smeekens, 2003a), los cuáles pueden ser lineales o ramificados, altamente solubles en agua y son carbohidratos no reductores. Se conoce la existencia de fructanos en órdenes como las Poales (Poaceae), Liliales (Liliaceae), Asparagales (Asparagaceae), Asterales (Asteraceae y Campanulaceae) (Hendry, 1993).

#### II.1.1. Estructura química y su clasificación

De acuerdo con los tipos de enlaces glicosídicos presentes, se han descrito cuatro grupos o tipos de fructanos: inulinas, levanos, graminanos y fructanos neoserie, estos últimos caracterizados por una molécula de glucosa interna que puede ser elongada por enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6), produciendo inulina o levanos neoserie respectivamente (Vijn & Smeekens, 1999; Ritsema & Smeekens, 2003a).

Las inulinas son fructanos lineales constituidos principalmente por residuos fructosilo unidos mediante enlaces  $\beta$  (2-1), sintetizados principalmente por plantas de la familia Asteraceae, tal como achicoria (*Cichorium intybus*), alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y dalia (*Dalia variabilis*), siendo la molécula más pequeña el trisacárido 1-Kestosa. La longitud de la cadena polimérica varía entre las especies, la inulina de mayor grado de polimerización en la familia Asteraceae se encuentra en alcachofa con 200 residuos de fructosa (Edelman & Jefford, 1968; Lewis, 1993; Vijn & Smeekens, 1999; Ritsema & Smeekens, 2003b; Banguela & Hernández, 2006).

Los levanos o fleinas (fleinas es el término usado para referirse a fructanos tipo

levano sintetizados exclusivamente por las plantas) son fructanos lineales constituidos por residuos fructosilo unidos mediante enlaces  $\beta$  (2-6), encontrándose principalmente en plantas de la familia Poaceae como los pastos (*Dactylis glomerata* y *Poa secunda*). El trisacárido 6 Kestosa es su molécula más sencilla de este grupo (Pollock & Cairns 1991; Lewis 1993; Vijn & Smeekens 1999; Ritsema and Smeekens 2003a, 2003b; Banguela & Hernández 2006).

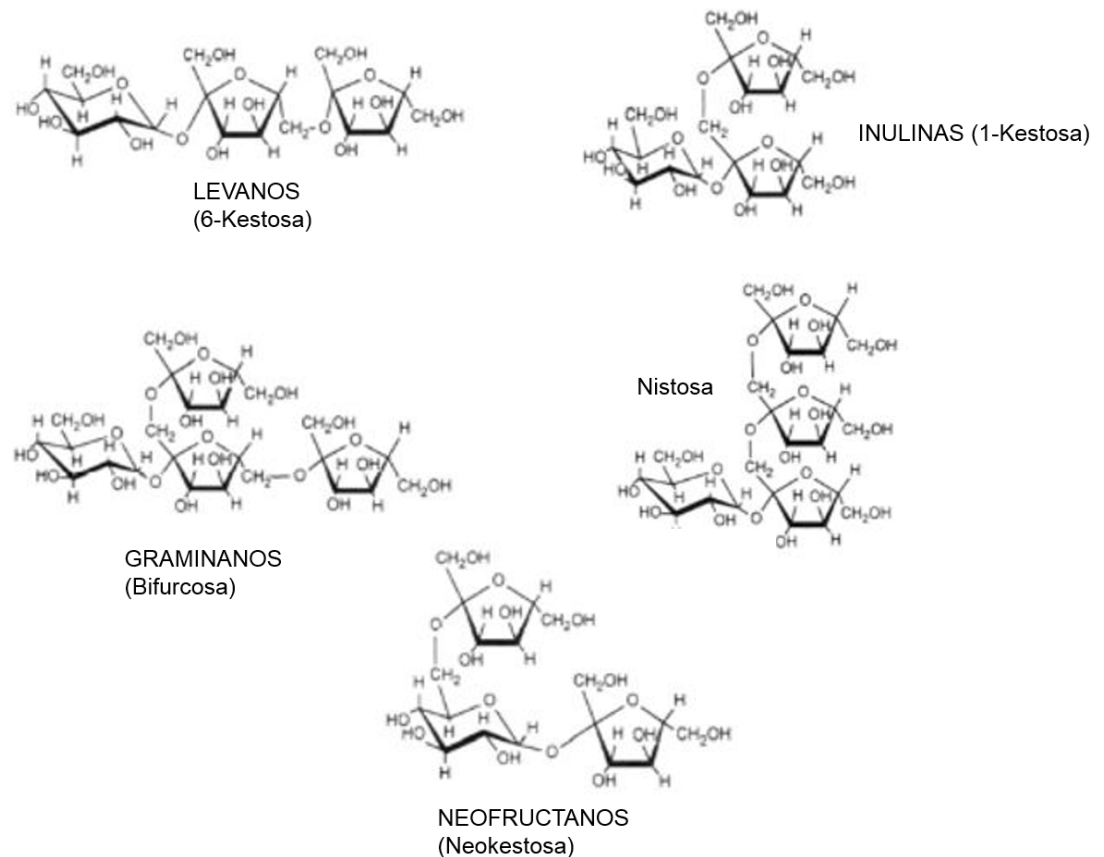
Los graminanos, también llamados levanos mixtos son fructanos ramificados constituidos por residuos fructosilo que presentan ambos tipos de enlaces  $\beta$  (2-1) y/o  $\beta$  (2-6) presentes en cereales como trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) y avena (*Avena sativa*). La bifurcosa (tetrasacárido) es la molécula más sencilla. Estos fructanos son almacenados principalmente en los tejidos vegetativos de los pastos templados y cereales (Pollock & Cairns 1991; Vijn & Smeekens 1999; Ritsema & Smeekens, 2003a, 2003b; Banguela & Hernández 2006).

Los fructanos neoserie están constituidos por cadenas de fructanos con enlaces  $\beta$  (2-1), los cuales son definidos como neoinulinas y/o fructanos unidos mediante enlaces  $\beta$  (2-6) como al carbono seis (C) denominados neolevanos que presentan residuos fructosilo unidos tanto al carbono uno (C) de la molécula de glucosa. El trisacárido neokestosa es su molécula más sencilla.

Las inulinas neoserie se almacenan principalmente en órganos de reserva como bulbos. La inulina neoserie tiene dos fructosas con enlaces  $\beta$  (2-1) unidas a la unidad inicial de sacarosa, una de las cadenas es enlazada al C1 (como el caso de la inulina) del residuo de fructosa y el otro al C seis de la glucosa, su unidad estructural está basada en la neokestosa. Las Liliáceas como el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) y la cebolla (*Allium cepa* L.)

Los levanos neoserie están compuestos de fructosa con uniones  $\beta$  (1-2) y  $\beta$  (2-6) sobre ambos extremos de una molécula de glucosa interna. Este tipo de fructano

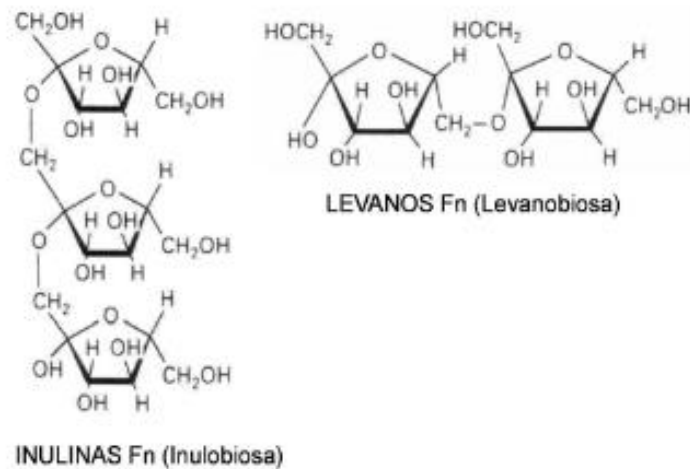
se presenta en pocas especies de plantas como avena (*Avena sativa*) y algunas especies de *Lolium* (Shiomi 1981; Pollock & Cairns 1991; Vijn & Smeekens 1999; Ritsema & Smeekens 2003a, 2003b; Banguela & Hernández 2006). Las estructuras de los fructanos descritas anteriormente se muestran en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Clasificación de fructanos almacenados en plantas de acuerdo con los enlaces glicosídicos presentes. Lewis (1993).

La segunda clasificación que existe para estos polímeros involucra la presencia o ausencia de una molécula de glucosa en su estructura, dando lugar a fructanos de la serie GF<sub>n</sub> o F<sub>n</sub>, respectivamente (**Figura 2**).





**Figura 2.** Clasificación de fructanos almacenados en plantas de acuerdo a la presencia o ausencia de una molécula glucosa en la estructura (GFn o Fn). Lewis (1993).

Finalmente estos polímeros se han clasificado de acuerdo a su tamaño y/o grado de polimerización (DP, degree of polymerization, por sus siglas en inglés) en fructanos de DP corto (SDP, short DP) aquellos con una longitud de 2 a 10 unidades denominados también fructooligosacáridos (FOS) y en fructanos con grado de polimerización mayor a 10 unidades de fructosa frecuentemente denominados fructanos de largo DP (LDP, large DP) o simplemente fructanos (Shiomi,1989; Pollock & Cairns 1991; Shiomi *et al.* 1991; Lewis, 1993; Vijn & Smeekens, 1999; Banguela & Hernández 2006).

### II.1.2. Función de los fructanos en plantas

En la vacuola se almacenan carbohidratos como glucosa, fructosa, sacarosa y a partir de la sacarosa son sintetizados carbohidratos tipo fructanos por acción de enzimas denominadas fructosiltransferasas (Vijn & Smeekens, 1999). Los fructanos son osmóticamente menos activos que la sacarosa por ser más solubles y por lo tanto pueden ser almacenados en mayor concentración. Por tal motivo, en raíces, tubérculos o tallos, el almacenamiento es hasta 70% del peso seco. La síntesis de fructanos disminuye la concentración de sacarosa en la célula y por lo tanto previene la inhibición de la fotosíntesis por retroalimentación negativa. Los

fructanos son además capaces de proteger a la planta contra sequía y estrés por frío por lo que las temperaturas y climas áridos con periodos estacionales largos de sequía y/o frío favorecen su producción (Vijn & Smeekens, 1999; Ritsema & Smeekens, 2003a). Se ha reportado también, que los fructanos están involucrados en la estabilización de la membrana celular durante la congelación y deshidratación celular a través de interacciones con los fosfolípidos (Hincha *et al.* 2000).

### **II.1.3 Aplicación de los fructanos en alimentos**

Los fructanos tipo inulina debido a su capacidad prebiótica tienen exitosas aplicaciones como ingredientes alimentarios, por lo que se ha incrementado el mercado de estos productos (Van de Ende *et al.* 2011).

En el área de los alimentos, los fructanos son considerados de interés económico por ofrecer beneficios en la salud humana ya que funcionan como una fibra dietaria (Roberfroid & Delzenne, 1998; Flamm *et al.* 2001). Los fructanos tipo inulina de alto DP confieren a los alimentos una consistencia cremosa y sabor neutro, por lo que son utilizados como emulsificantes y estabilizantes en productos como yogurt, helados, cremas, postres y chocolates (De Bruyn *et al.* 1992; Vijn & Smeekens, 1999; Archer *et al.* 2004). También pueden reemplazar a las grasas u otros carbohidratos para reducir las calorías de algunos alimentos (Franck, 2002; Roberfroid, 2005) ya que solo aportan de 1.0 a 2 Kcal g<sup>-1</sup> (Roberfroid, 1993; Roberfroid, 1998).

## **II.2 AGAVE**

El género *Agave* fue descrito por Linneo en 1753 dando a conocer al *Agave americana* como primera especie (Granados, 1993). Entre las 166 especies reconocidas en la familia Agavaceae, 125 están presentes en México (Eguiarte *et al.* 2000). Oaxaca es el estado con mayor biodiversidad del género *Agave* (42 tipos), Martínez *et al.* (1995) reportó 30 especies del total de las reportadas para México, dentro de estas especies el *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc., son de importancia económica ya que son los principales agaves utilizados

para la elaboración del mezcal en 7 regiones de Oaxaca (**Figura 3**).



**Figura 3.** Principales regiones de agave y mezcal en Oaxaca

### II.2.1. Clasificación taxonómica y botánica

De los miembros de la familia Agavaceae el género *Agave* es el más importante y fue dividido en dos subgéneros de acuerdo a su inflorescencia: *Litsea*, con un órgano floral espigado y agave, cuya inflorescencia es paniculada y con ramificaciones. El agave consta de una raíz fibrosa y exuberante que se combina con otras más gruesas llamadas rizomas, las cuales crecen cerca de la superficie de la tierra, en el momento que estas llegan a tener contacto con el sol, desarrollan una yema formando un hijuelo. Su tallo es grueso y corto del que salen las hojas conocidas como pencas, son de color verde, gruesas, cóncavas, con púas en los bordes y una espina en el extremo superior, las hojas son revestidas de una cutícula apergaminada muy resistente que le sirve para impedir la pérdida de agua, todas las hojas se encuentran colocadas alrededor del tallo formando una roseta. Florece una vez en su vida; cuando está próximo a florecer sale del centro de la planta un escapo floral al que se le da el nombre de “quiote”, el cual alcanza una altura de 3-5 metros, brotando en su parte superior una inflorescencia en forma de panícula, **Figura 4**, (Granados, 1993).



**Figura 4.** Morfología de la planta de agave

Los racimos de flores son de color amarillo verdoso, perigonio en forma de embudo de tubo corto y seis segmentos casi iguales; seis estambres filamentosos filiformes más largos que los segmentos del perigonio, con anteras amarillentas, ovario ínfero dividido en tres partes; fruto capsular leñoso alargado, dehiscente con numerosas semillas aplanadas y algo triangulares de testa negra.

Los agaves son monocárpicos, esto es, que solo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere (Granados, 1993). De la panícula floral se pueden obtener semillas siendo su ciclo de reproducción largo, por lo que se opta por la multiplicación por bulbillos que se obtienen al podar las flores y posteriormente de ahí brotan las pequeñas plantitas. Por otra parte, un quiote puede dar de 500-2000 hijuelos; ésta es otra forma de reproducción (apomíctica) de la planta. La inflorescencia emerge del tallo de manera espectacular cuando la planta llega a la madurez, alcanzando 1.8 m en especies pequeñas y hasta 12 m en las más grandes. La inflorescencia emerge tardíamente dependiendo de la especie, el largo tiempo en que la planta comienza a florecer, favorece que la propagación de la especie sea principalmente asexual a través de la generación de rizomas o hijuelos. Sin embargo, la edad y frecuencia con que los agaves comienzan a producir hijuelos también es variable (Nobel, 1987).

### II.2.2. *Agave angustifolia* Haworth

El *Agave angustifolia* es la especie más ampliamente distribuida en Norteamérica. Es una planta suculenta carnosa, sus hojas o pencas se extienden radialmente en forma de roseta, fibrosa, de color verde grisáceo originado por un alto contenido de ceras que impiden que la planta pierda agua. Sus hojas son rígidas, con espinas marginales y apicales. El tamaño y forma de *A. angustifolia* es altamente variable, su roseta puede ser de 1 a 1.5 m de alto y de 2 a 2.4 m de ancho, su peso alcanza mas de 90 Kg por planta en algunas ocasiones (**Figura 5**).



**Figura 5.** *Agave angustifolia* Haw.

Las plantas producen numerosos hijuelos, por lo que raramente son plantas solitarias. Sus hojas lanceoladas son numerosas y rígidas, de 2.5 a 10 cm de ancho y de 0.6 a 1.2 m de largo, planas en la superficie, convexas hacia la punta, angostas y gruesas hacia la base. Las pencas presentan pequeños dientes curvados y espaciados cada 1.3 a 3.8 cm y una espina terminal corta, generalmente color café o negro. La inflorescencia paniculada de *A. angustifolia* es de 3 a 5 m de largo con 10 a 20 ramificaciones con flores verdes a amarillas y matices rojos. Generalmente se le encuentra cerca del litoral, sabana tropical, bosques de espinas y bosques tropicales caducos; se distribuye en elevaciones que van desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm o más (Gentry, 1998). La región de Valles Centrales donde se siembra el *A. angustifolia* tiene un estrato altitudinal de 1300-1700 msnm con una temperatura media de 20.3 °C y una precipitación anual de 644, con climas predominante seco estepario y semicálido.

La madurez fisiológica de la planta se alcanza entre los 6-8 años. Los productores de mezcal cortan la inflorescencia cuando comienza a emerger, de ésta manera los carbohidratos (fructanos) se acumulan en el tallo o piña.

### II.2.3 *Agave potatorum* Zuccarini

Nombrado comunmente *tobalá* (zapoteco), *papalometl* (náhuatl: maguey mariposa) o *yauiticushi* (mixteco), es de los agaves silvestres más apreciados para la elaboración de mezcal en Oaxaca. Esta especie no es cultivada, se encuentra principalmente, en lugares de matorral espinoso en suelos desprovistos de vegetación y sujetos a erosión, tiene un amplio rango de variedades pero es característica su inflorescencia por sus pequeños brazos laterales que contienen flores en una umbela casi esférica. Se caracteriza por presentar hojas agudas, lanceoladas al revés de 30 a 40 cm de largo por 8 a 10 de ancho, provistas de una espina opaca pardusca y de dientes pequeños, sentados en prominencias carnosas poco elevadas, grises en la forma típica y verdes. El “tobalá” o papaplométl como es conocido es una especie pequeña y solitaria (**Figura 6**).



**Figura 6.** *Agave potatorum* Zucc.

Existen aproximadamente 33 variedades de acuerdo a las características de sus hojas, las cuales se encuentran entre 30 y 80, dispuestas simétricamente alrededor de un tallo pequeño para formar una roseta abierta. Las hojas varían en forma y color, desde ovaladas, cuadrículadas o cortas lanceoladas, de 9 a 18 cm

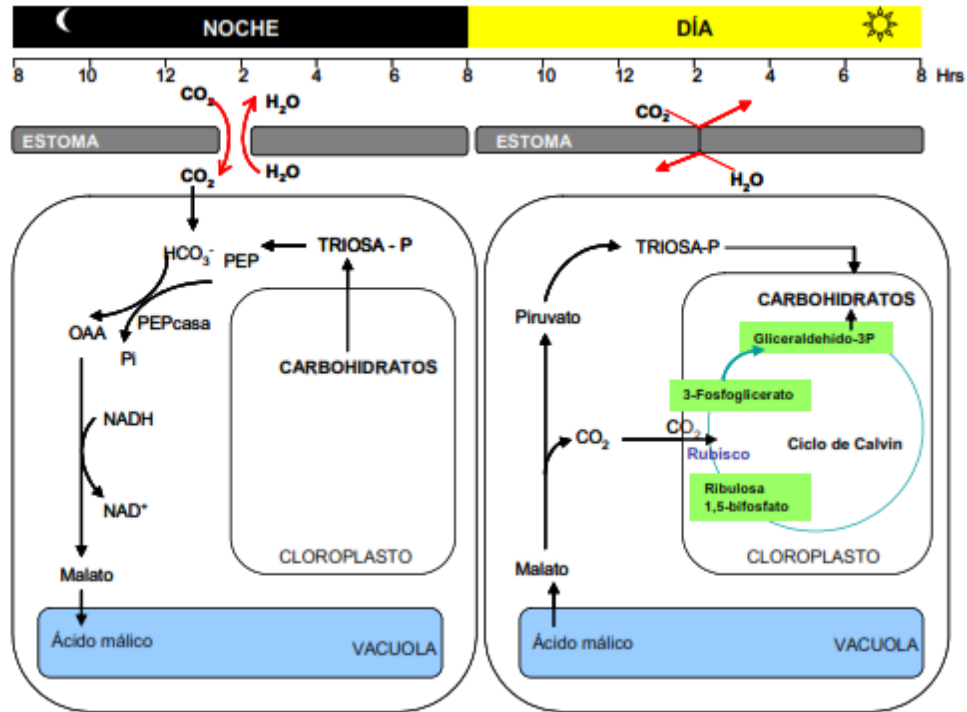
de ancho y de 25 a 40 cm de largo y de color verde grisáceo hasta blanca. El margen de las hojas presentan protuberancias así como dientes de 0.6 a 1.3 cm de largo y espaciados por 1.3 a 2.5 cm, con una espina terminal afilada de 2.5 a 4.4 cm de largo y de forma sinuosa o torcida.

La inflorescencia de *A. potatorum* puede ser un racimo o una panícula de 3 a 6 m de largo, con flores verde-amarillo y matices rojos; su reproducción es por semillas. Esta plantas se distribuye principalmente en tierras altas y semiáridas de Oaxaca y Puebla a elevaciones entre 1350 y 2250 msnm. Esta especie se produce de manera silvestre en Sola de Vega, Oaxaca en la región Sierra Sur con un estrato altitudinal de 800-1200 msnm, temperatura media de 23.7 °C y una precipitación de 609.3 mm los climas predominantes son: el semiárido subhúmedo y el templado. Esta planta alcanza su madurez fisiológica entre los 6-7 años para fines comerciales al igual que para *A. angustifolia* la inflorescencia se corta cuando comienza a emerger.

#### **II.2.4 Metabolismo de las plantas de agave**

Uno de los factores fisiológicos de mayor importancia para el desarrollo de los agaves en ambientes áridos y semiáridos es su proceso fotosintético el cual se lleva a través del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM proveniente del inglés Crassulacean Acid Metabolism), el cual se caracteriza por la fijación de CO<sub>2</sub> durante la noche cuando los estomas se encuentran abiertos, mediante la carboxilación del fosfoenol piruvato (PEP) utilizando la fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPC) en el citosol, formando ácidos orgánicos de cuatro carbonos (C4) principalmente malato, los cuales son almacenados en la vacuola de la célula vegetal (**Figura 7**). Durante el día, se lleva acabo la descarboxilación de estos ácidos orgánicos para producir CO<sub>2</sub>, el cual se fija por el ciclo C-3 y aunado al cierre del estoma generan una fuente interna de CO<sub>2</sub> que es reasimilado por ribulosa difosfato carboxilasa RuBisCo en el cloroplasto produciendo nuevamente fosfoenol piruvato incorporándolo al ciclo de Calvin para formar los carbohidratos de reserva mediante la gluconeogénesis.

Los fructanos en las plantas de agave son sintetizados y almacenados en el tallo y su principal función es como carbohidratos de reserva.



**Figura 7.** Metabolismo ácido de las Crasuláceas (metabolismo CAM). Durante el periodo de oscuridad, las estomas abiertas permiten la asimilación de CO<sub>2</sub> mediante la producción de malato que es almacenado en la vacuola. Durante el día, el cierre de los estomas reduce la pérdida de agua, mientras que el malato es descarboxilado y fosforilado en el citoplasma para la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin. (Hopkins 1999).

El proceso fotosintético CAM permite la vida de las plantas bajo condiciones extremadamente secas, cuando los estomas deben permanecer cerrados todo el día con el fin de conservarr agua, esto es debido a su bajo rendimiento fotosintético (ya que la absorción de dióxido de carbono está limitada a la cantidad de ácido málico que se puede almacenar en la vacuola) por lo que las plantas CAM son menos eficientes que las plantas C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>, pero permite la fotosíntesis y la sobrevivencia ante condiciones de extrema desecación.

También se ha reportado que actúan como osmoprotectores en medio ambiente de sequía, constituyendo quizás otra posible adaptación fisiológica hacia climas

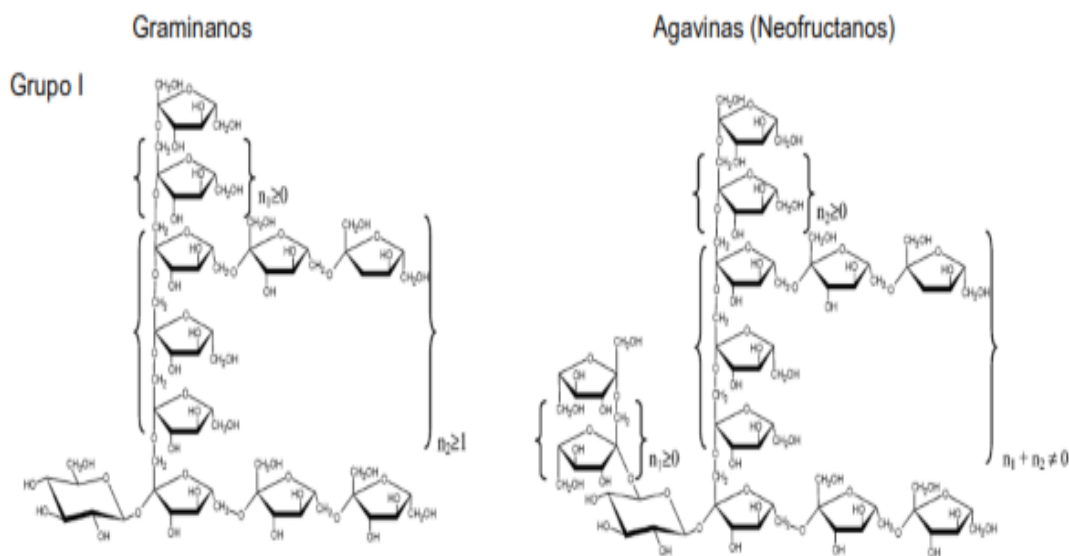


extremos (Wang y Nobel, 1998). La hidrólisis interna de los fructanos por endoinulinasas disminuye el grado de polimerización dando origen a fructanos tipo F<sub>m</sub> y GF<sub>n</sub> (en donde m y n corresponden a unidades de fructosa). Estas moléculas permiten que la planta se osmorregule, sobreviviendo períodos de frío y sequía (Boeckner *et al.* 2001). Existen plantas CAM constitutivas o adaptativas (estas últimas sólo tienen metabolismo ácido de crasuláceas bajo estrés hídrico, salinidad, etc.).

### II.2.5 Fructanos en agave

La presencia de fructanos en el género agave se describió desde 1888 (Suzuki, 1993), *Agave vera cruz* y *A. americana* han sido las especies más estudiadas, (Bhatia *et al.* 1979) indicando la presencia de fructanos tipo inulinas, gramineanos e inulinas neoserie. La presencia de fructanos tipo inulina en *Agave vera cruz* y su grado de polimerización fue reportado por Satyanarayana (1976). Sin embargo, Dorland *et al.* (1977) reportaron la presencia de fructanos de mayor complejidad en la misma especie. Respecto a *Agave americana*, Bhatia & Nandra (1979) reportaron en esta especie fructanos tipo inulina. De igual forma Wang & Nobel (1998) reportaron en *A. deserti* la presencia de fructanos tipo neoserie, además de la presencia de los oligosacáridos, kestosa (DP3) y nistosa (DP4).

El primer reporte de la presencia de fructanos en *Agave tequilana* Weber var. Azul fue descrito por Sánchez-Marroquín & Hope (1953), reportando fructanos tipo inulina como el carbohidrato de reserva en esta planta, fue 50 años después que López *et al.* (2003) reportaron por primera vez la estructura de los fructanos del género agave, ahora denominados “agavinas” (Mancilla-Margalli & López, 2006). Las agavinas son un grupo de fructanos complejos almacenados por el género *Agave* (**Figura 6**), constituidas por polímeros de fructosa presentando tanto enlaces β (2-1) como enlaces β (2-6), moléculas de glucosa interna (fructanos tipo neoserie) y terminales. (López *et al.* 2003).



**Figura 8.** Estructuras moleculares propuesta para las agavinas o fructanos del género agave (graminanos y agavinas) del Grupo I. Mancilla-Margalli & López (2006).

Mancilla-Margalli & López (2006) reportaron que *A. tequilana* Weber var. Azul, es una de las especies que almacena una alta cantidad de carbohidratos solubles no estructurales constituyendo los fructanos la mayoría de éstos (>60%) con pesos moleculares de 527–4739 Da, que corresponde a un rango de DP de 3 a 29. Aunado a esto, mediante el uso de herramientas como cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases acoplado a un detector de masa (GC-MS) lograron caracterizar las estructuras de los fructanos de *Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. fourcroydes*.

Las principales diferencias que mostraron los fructanos de las especies analizadas son de tipo cuantitativo, ya que no se observaron diferencias estructurales significativas y en base a esto se clasificaron en tres grupos dependiendo del grado de polimerización (DP), proporción agavinas/graminanos (glucosa interna/terminal), relación de enlaces tipo inulinas/levanos ( $\beta$  (2-1)/ $\beta$  (2-6)), así como la presencia y frecuencia de ramificaciones. De acuerdo con los anteriores criterios, los fructanos de *A. angustifolia* y *Agave potatorum* (Oaxaca) se clasificaron dentro del grupo I (**Tabla 1**) en el cual se encuentran los fructanos de

mayor DP promedio, con una mayor proporción de agavinas respecto a graminanos (4:1) y altamente ramificados, ya que aproximadamente se presenta una ramificación cada 4 residuos de fructosa de la cadena principal (Mancilla-Margalli & López 2006) (**Figura 8**).

Tabla 1. Características estructurales de At-J, *Agave tequilana* Weber var. Azul (Jalisco); Aa-S, *A. angustifolia* (Sonora); Aa-O, *A. angustifolia* (Oaxaca); Ap-O, *A. potatorum* (Oaxaca).

	DP	t-β-D-Fruf	t-α-D-Glcp	i-α-D-Glcp	1,6-di-β-D-Fruf	A/G	β(2-1)/β(2-6)
Grupo I							
At-J	18.12	4.70	0.20	0.79	3.42	3.95	1.6
Aa-S	13.07	4.51	0.18	0.82	1.74	4.56	2.06
Aa-O	31.75	10.51	0.21	0.79	4.59	3.76	1.6
Ap-O	15.34	5.19	0.17	0.83	2.19	4.88	2.28

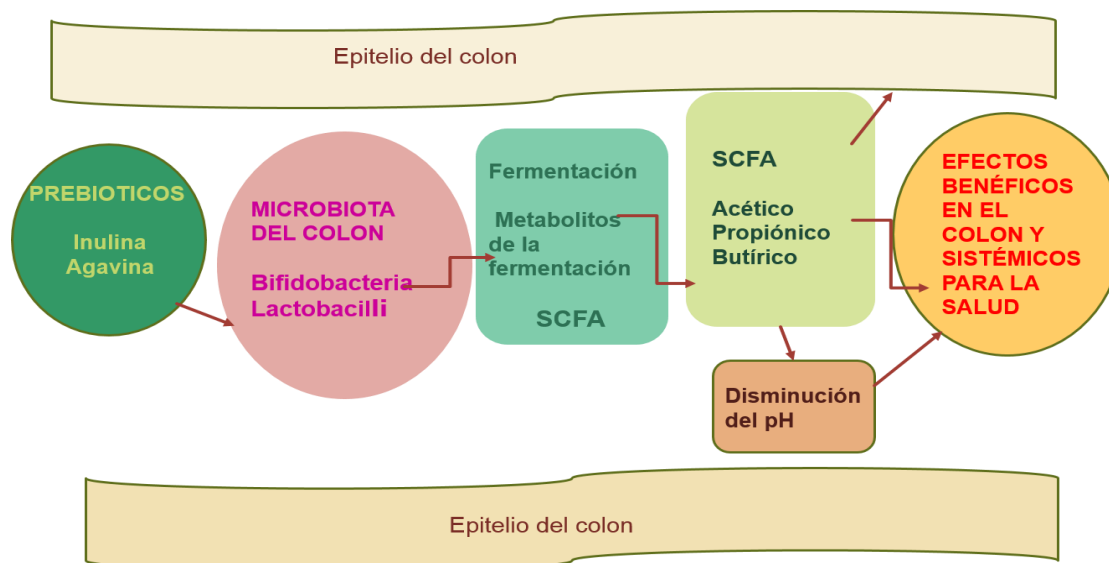
DP: Grado de polimerización; A/G: Agavina/Graminano; α-D-Glcp (t-i): Glucosa interna y terminal. MancillaMargalli & López (2006).

### II.3 PREBIOTICOS

Un prebiótico es un alimento o ingrediente alimentario selectivamente fermentado por bacterias probióticas que permite cambios específicos en la composición y actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo bienestar y salud del hospedero (Gibson *et al.* 2010). Los fructanos tipo inulina son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas (α-glucosidasa, maltasa-isomaltasa, sucrasa las cuales son específicas para hidrolizar enlaces α-glucósidos), por ello han sido clasificados como prebióticos. Los criterios para denominar a un ingrediente alimentario como prebiótico son los siguientes: 1) que sea resistente a la digestión, 2) que sea fermentado por la microbiota colónica y 3) que estimule selectivamente el crecimiento o la actividad de Bifidobacteria y Lactobacilli.

Es decir es un substrato específico para los probióticos quienes los fermentan y producen ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), acético, propiónico, butírico y láctico, incluyendo gases como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y CH<sub>4</sub> como productos de una

fermentación anaeróbica (Roberfroid, 2002; Roberfroid, 2005), generando efectos sistémicos en el organismo del hospedero, la **Figura 9** muestra un esquema general de los eventos que ocurren en el intestino grueso al ingerir fructanos.



**Figura 9.** Esquema representativo del colon en donde se lleva a cabo la fermentación anaeróbica de los prebióticos (fructanos) por Bifidobacteria y Lactobacilli con producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como productos de su fermentación productos metabólicos que mejoran la salud del hospedero (Modificado de Huazano-García & López, 2013).

Dentro de los efectos benéficos que se han reportado por consumo de los fructanos tipo inulina son: la estimulación del sistema inmune (Manning & Gibson, 2004), la disminución sérica de lípidos (Beylot *et al.* 2007), la absorción de minerales como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) (Coudray *et al.* 2005, Garcia Vieyra *et al.* 2014), que promueve la saciedad en humanos y animales (Cani *et al.* 2005), la disminución de los niveles de glucosa en sangre mejorando la respuesta de la insulina a la glucosa (Delzenne, 2003; Roberfroid, 2005 Urías-Silvas *et al.* 2007) así como su efecto en la prevención e inhibición del desarrollo de células cancerígenas del colon (Pietro-Femia, 2002).

### II.3.1 Efecto prebiótico

El efecto prebiótico, ha sido demostrado por estudios *in vitro* e *in vivo* por varios investigadores (Kolida *et al.* 2002; Roberfroid, 2002; Gibson, *et al.* 2010; Gómez *et al.* 2010; Velázquez-Martínez, *et al.* 2014; Moreno Vilet, *et al.* 2014; Allsopp *et al.* 2013) quienes han reportado que la fermentación de fructanos tipo inulina permitió la estimulación selectiva del crecimiento de Bifidobacteria y Lactobacilli en el colon, utilizándolos como fuente de carbono.

Los fructanos tipo inulina provenientes principalmente de la achicoria, son un ejemplo de tales carbohidratos los cuales tienen un grado de polimerización (DP) entre 3 y 60 y los fructooligosacáridos (FOS) quienes presentan un DP entre 3 y 10. En estudios *in vitro* Gibson & Wang (1994b) compararon el efecto de 10 g L<sup>-1</sup> de glucosa y de FOS en cultivos con microbiota fecal por un período de incubación de 12 h y observaron que la utilización de estos fructanos modificó significativamente la composición de dicha microbiota, estimulando el crecimiento de Bifidobacteria y reduciendo Bacteroides y Clostridia. Se sabe que el colon es la región más fuertemente colonizada del tracto gastrointestinal (10<sup>12</sup> UFC g<sup>-1</sup>) de los cuales Lactobacilli constituyen sólo 0.07 a 1% de la población bacteriana intestinal, mientras que Bifidobacteria representa del 25 al 30% .

El potencial prebiótico de los fructanos tipo inulina se ha demostrado en evaluaciones *in vitro* en cultivos puros con especies de *Bifidobacterium longum*, *B. animalis* (Kaplan & Hutkins, 2000), se ha encontrado que *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum* pueden ejercer un efecto inhibitorio directo sobre otras especies bacterianas patogénicas, este efecto bifidogénico se ha estudiado en el colon en humanos y en animales por la producción SCFAs (Kleesen *et al.* 2001; Nilsson & Nyman, 2005; Stewards *et al.* 2008).

Se ha reportado que el rompimiento de carbohidratos en el colon implica a más de una especie bacteriana, de allí que los productos de fermentación de algunas especies sean incorporados como metabolitos intermediarios a las rutas

metabólicas de otras especies de la microflora. Además la hidrólisis de los carbohidratos y particularmente de los fructanos es afectada en el intestino grueso por su composición química, su tamaño molecular y la solubilidad de ellos, entre otros.

Las Bifidobacterias poseen glicosidasas capaces de hidrolizar los enlaces de oligo y polisacáridos no digeridos o parcialmente digeridos por las enzimas intestinales y luego metabolizan los monosacáridos resultantes (Cumings & Englyst, 1995). Muchas glicosilhidrolasas del género *Bifidobacterium* han sido caracterizadas, tales como  $\beta$ -galactosidasa  $\beta$ -fructofuronidasa,  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Rossi *et al.* 2005).

Perrin *et al.* (2002) evaluaron tres cepas de *Bifidobacterium* encontrando que los fructanos de cadena corta (FOS) fueron fermentados a una mayor velocidad que los fructanos de cadena larga y presentaron mayor rendimiento en la producción de biomasa. Otros estudios *in vitro* indican la alta especificidad de las especies de *Bifidobacterium* para utilizar FOS, pero no inulinas (Kaplan & Hutkins, 2000; Bielecka & Biedrzycka, 2004; Rossi *et al.* 2005).

Manning & Gibson (2004) mencionan que teniendo una microflora óptima puede incrementarse la resistencia a bacterias patógenicas, incrementar la estimulación del sistema inmune y reducir el riesgo de cáncer. También se ha reportado que la modulación de la microflora con prebióticos puede disminuir las enfermedades intestinales y se ha mostrado que la fermentación de los fructanos en el intestino grueso promueven la producción de incretinas en animales y en humanos (Drucker, 2006; Knauf *et al.* 2005; Meier *et al.* 2002).

## **II.4 EFECTOS DE LOS FRUCTANOS EN LA SALUD**

### **II.4.1 Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)**

Las fibras dietarias son frecuentemente citadas como componentes alimentarios susceptibles a disminuir la concentración del colesterol y glucosa en el plasma, tanto en ayuno como en estado postprandial, por lo que se han propuesto como nutrientes claves en la dieta para el control de la glicemia (Roberfroid & Delzenne, 1998).

Como se mencionó anteriormente, la fermentación colónica de los fructanos produce SCFAs de los cuales el 95% son absorbidos y metabolizados por el hospedero y a quienes se le atribuyen el metabolismo de los colonocitos, el crecimiento y la diferenciación celular, la motilidad intestinal, el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el hígado y la absorción mineral (Delzenne, 2003). Daubioul *et al.* (2002) reportaron que los SCFAs obtenidos de la fermentación de la inulina decrecen la esteatosis hepática por reducir espontáneamente la ingesta de alimentos en ratas obesas Zucker Fa/Fa.

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), mayoritariamente acetato, propionato y butirato, así como lactato, succinato, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> y calor (Topping *et al.* 2001; Flamm *et al.* 2001) son los principales productos de la fermentación, los cuales se producen en el orden de acetato > propionato > butirato en una relación molar de 60:20:20 (Topping & Clifton, 2001; Cumming *et al.* 1997).

La producción de SCFA es afectada por factores tales como la fuente del sustrato, la composición química del sustrato fermentado, la disponibilidad del mismo y sus características físicas (solubilidad y tamaño) la composición bacteriana de la microbiota y el tiempo de tránsito intestinal (Macfarlane & Macfarlane, 2007). El ciego y colon proximal son los sitios principales donde se lleva a cabo la fermentación por tanto los SCFA son rápidamente absorbidos en esta región siendo excretados en las heces solo un 5-10% de ellos.

Recientemente se ha reportado que el género *Bifidobacterium* puede ayudar a prevenir infecciones patogénicas a través de la producción de acetato (Fukuda *et al.* 2011). Dentro de los SCFAs, el ácido acético es el que se produce más en el

colon, éste es fácilmente absorbido y transportado al hígado. La presencia de acetil-CoA sintasa en el citosol permite el uso del acetato para la lipogénesis una vez que entra al sistema circulatorio. El ácido acético es el sustrato principal para la síntesis del colesterol.

Otro efecto de consumir fructanos es el incremento de ácido propiónico el cuál también es asociado con efectos beneficios sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Henningsson *et al.* 2002), ya que se ha reportado que el propionato inhibe la síntesis de lípidos en hepatocitos asilados de ratas, particularmente, en la incorporación del acetato durante la síntesis del colesterol (Demigné *et al.* 1995).

El incremento en los niveles de los SCFAs especialmente el ácido butírico, permite una alta concentración de hormonas involucradas con la saciedad tales como péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) produciendo un impacto en la reducción de la ingesta de alimento y consecuentemente en la pérdida de peso del ratón (Cani, *et al.* 2005, 2007; Urías Silvas *et al.* 2007). El butirato es también importante en el metabolismo de los colonocitos, pues es el combustible preferido por las células epiteliales del colon (70% a 90%) y juega también un papel en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Topping *et al.* 2001).

En estudios *in vivo* Nilsson y Nyman (2005) evaluaron la formación de SCFAs del colon de ratas con diferentes sustratos. Los ácidos mayormente formados fueron ácido propiónico en el ciego, colon proximal y distal de ratas alimentadas con inulinas, mientras que los valores más altos de ácido butírico fueron encontrados en ratas alimentadas con fructooligosacáridos (FOS). Estos autores concluyeron que el DP y la solubilidad de los prebióticos usados fueron determinantes en la proporción de SCFAs que se produjeron.

Klessen *et al.* (2001) observaron que los FOS produjeron más ácido acético en el colon de ratas, mientras que las inulinas incrementaron en el ciego de las mismas la concentración de ácido propiónico. Licht *et al.* (2006), concluyeron que los



animales alimentados con inulinas incrementaron significativamente la concentración de ácido propionico, mientras que las concentraciones de ácido butírico fueron significativamente más altas en animales que recibieron FOS.

Estos estudios también se han llevado a cabo usando ratas obesas que recibieron una dieta suplementada con inulinas, las cuales incrementaron dos veces la concentración de ácido propionico en la vena porta y mostraron un decremento en la acumulación de los triglicéridos en el hígado de estos animales (Daubioul *et al.* 2002). El incremento de los niveles de SCFA a través de la fermentación de los fructanos influye en el descenso del pH y consecuentemente mejoran la salud del hospedero por estimulación de bacterias benéficas reduciendo los niveles de bacterias putrefactivas y/o patógenas en el colon.

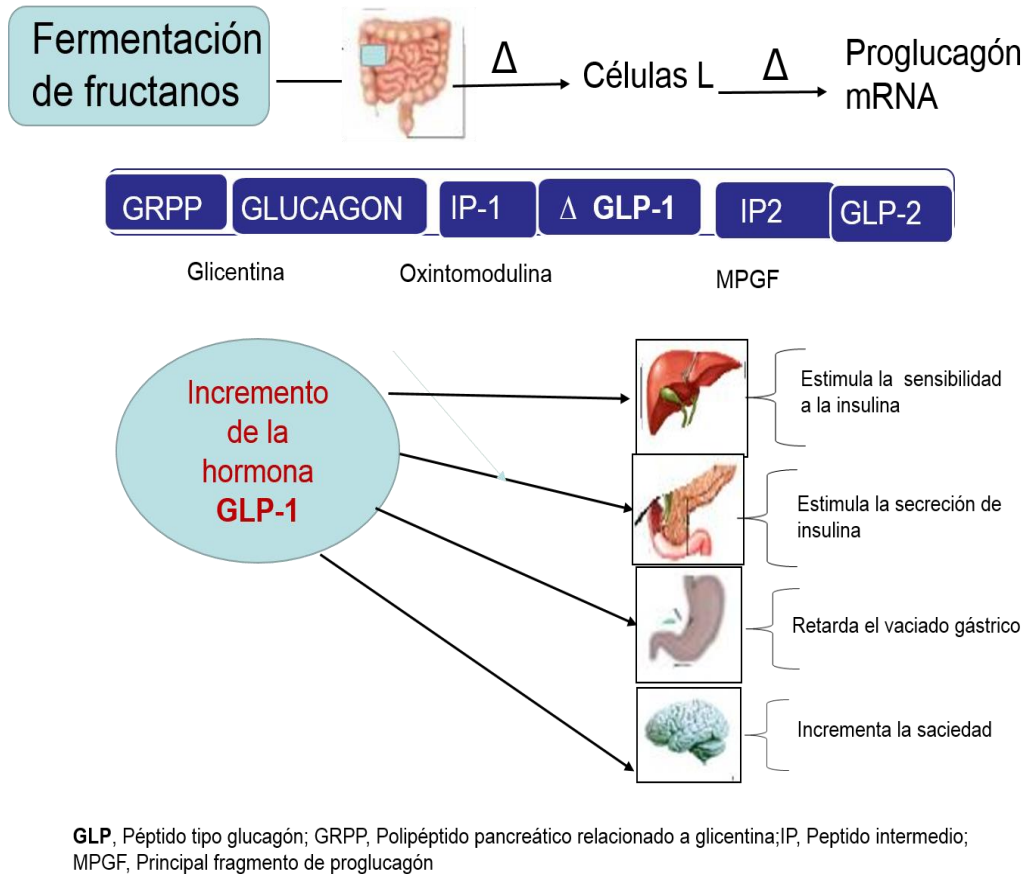
#### **II.4.2 Hormonas gastrointestinales**

La ingesta de alimentos es una necesidad biológica regulada por el sistema nervioso central vía la secreción de hormonas gastrointestinales. Muchos péptidos del colon han mostrado influir en la ingesta de energía. De estos péptidos, los más importantes son la colecistoquinina (CCK), péptido YY, GLP-1, y grelina, con la excepción de la grelina, estas hormonas actúan para incrementar la saciedad y disminuir la ingesta de alimento; al respecto, se ha observado también que cuando se adiciona fructanos tipo inulina a la dieta disminuye la ingesta de alimentos en animales y en humanos sugiriendo un efecto satietogénico, efectos asociados con un incremento de hormonas gastrointestinales en el plasma (Cani *et al.* 2006).

##### **II.4.2.1 Péptido-1 tipo glucagón (GLP-1)**

GLP-1 es una incretina secretada por las células L, es una hormona insulínica la cual incrementa la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas. (Holst, 2008). Esta hormona también inhibe la secreción y vaciado gástrico, suprimiendo la liberación del glucagón y promoviendo la saciedad (Meier *et al.* 2002; Knauf *et al.* 2005; Drucker *et al.* 2006; Cani *et al.* 2007). GLP-1 se sintetiza del precursor de glucagón, el cual no solamente codifica para GLP-1, sino

también para glucagon, principal fragmento del proglucagon, glicentina, oxintomodulina y GLP-2 (**Figura 10**) (Drucker, 2006).



**Figura 10.** Efectos de la fermentación de fructanos sobre péptidos gastrointestinales. (Modificado de Drucker, 2006).

Después de la ingestión de alimentos, se secretan 2 formas de GLP-1, GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida, las cuales difieren en un solo aminoácido. Ambos péptidos exhiben actividades plasmáticas idénticas actuando a través del mismo receptor (Nauck *et al.* 1993); sin embargo, la mayoría de GLP-1 activo (~80%) que se encuentra circulando, es GLP-1 (7-36) amida (Kieffer & Habener, 1999). GLP-1 es rápidamente degradada en metabolitos inactivos por la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV). La fermentación de fructanos ha mostrado un incremento en el proglucagon mRNA en el colon (Reimer & McBurney, 1996; Cani *et al.* 2004). En el intestino, la modificación postprandial del gen proglucagón permite la producción del péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) el cual participa en la proliferación

y neogénesis de las células pancreáticas  $\beta$  y está también involucrado en el control de la ingesta de alimento.

#### II.4.2.1.1 GLP-1 y su efecto relacionado con la saciedad

Diversos trabajos de investigación han mostrado una reducción significativa en peso corporal después de la administración de GLP-1 (Cani *et al.* 2004; Flint *et al.* 2001). Turton *et al.* (1996) administraron GLP-1 o un placebo de forma intracerebro-ventricular a ratas en ayunas, con una medición del consumo de alimentos a intervalos de 2 horas entre administraciones, encontrando que a medida que aumentaba la concentración de GLP-1 inyectado, disminuía de manera progresiva el consumo de alimentos, como cuando se utilizó exendina, un antagonista del receptor GLP-1 no hubo efecto sobre el consumo de alimentos, esto corroboró sus hallazgos.

Flint *et al.* (1998) examinaron el efecto de GLP-1 intravenoso ( $50 \text{ pmol Kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) sobre la sensación de apetito en humanos. Este grupo encontró que después del desayuno con contenido energético fijo, la infusión de GLP-1 aumento la saciedad comparada con el placebo (infusión salina). En el caso de la comida proporcionada *ad libitum*, ésta se redujo en un 12% por efecto de GLP-1. Además evaluaron los niveles de insulina, glucagón y glucosa en sangre y observaron que estos parámetros se vieron afectados de forma significativa por el tratamiento; concluyendo con ésto que GLP-1 aumenta la saciedad por lo que reduce la ingesta de alimento, jugando así un papel importante sobre la regulación fisiológica del apetito e ingesta de energía en humanos. La oxintomodulina (OXM) también podría estar involucrado, ya que recientemente se ha propuesto como un péptido intestinal prometedor derivado de proglucagón en el control de la ingestión de los alimentos (Druce *et al.* 2004).

La fermentación de fructanos ha mostrado un incremento en el proglucagon mRNA en el colon (Reimer & McBurney, 1996; Cani *et al.* 2004). En el intestino, la modificación postprandial del gen proglucagón permite la producción GLP-1, el cual participa en la proliferación y neogénesis de las células pancreáticas  $\beta$  y está también involucrado en el control de la ingesta de alimento.

Cani *et al.* (2004) analizaron la modulación de GLP-1 utilizando como modelo de estudio ratas Wistar macho. Las ratas se alimentaron con 3 tipos de fructanos de

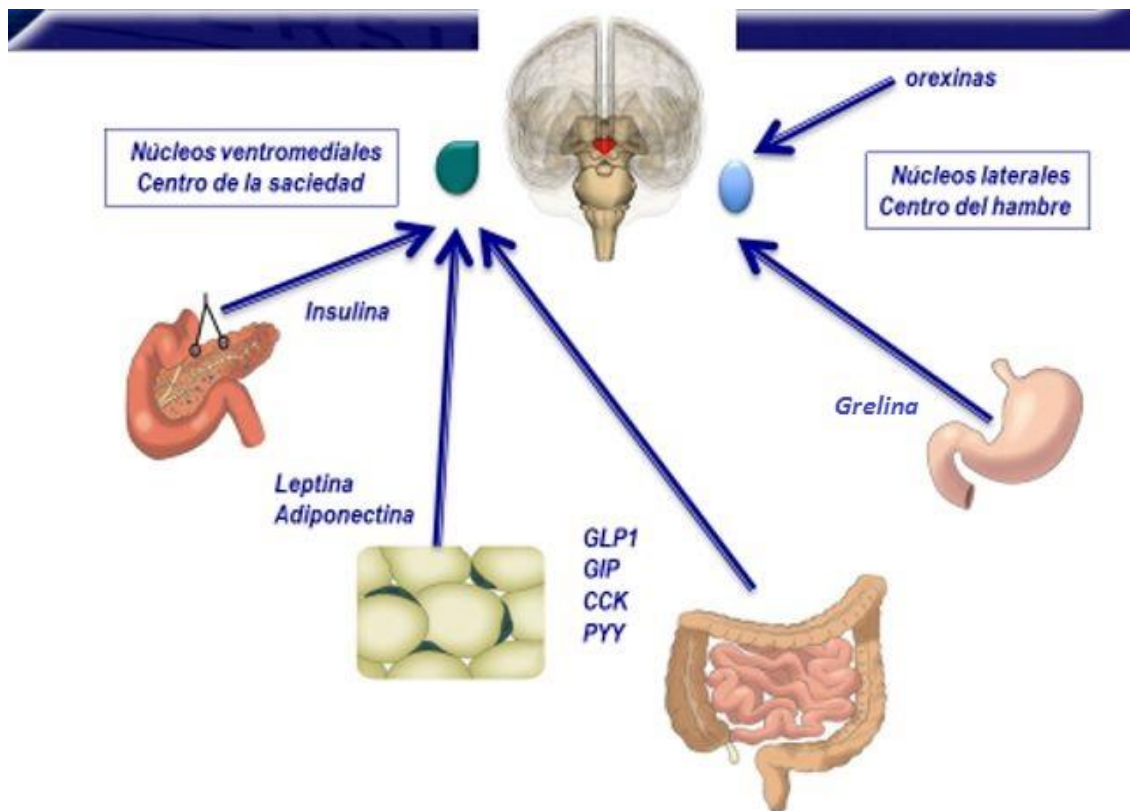
diferente DP y los compararon contra una dieta estándar, después de 3 semanas de tratamiento, la ingesta y la masa epididimal fueron menores en los grupos alimentados con fructanos de bajo DP, ellos encontraron que la concentración de GLP-1 y mRNA de proglucagon fueron significativamente mayores en el colon proximal de las ratas alimentadas con fructanos chicos.

En cuanto al efecto de GLP-1 sobre la diabetes, Cani *et al.* (2005) evaluaron el efecto de los fructooligosacáridos sobre la tolerancia a la glucosa y la producción de insulina, así como la producción de GLP-1 en ratas Wistar, después de 6 semanas, la concentración de insulina pancreática y portal fue el doble en las ratas alimentadas con FOS. Por lo tanto el consumo de fructanos induce un decremento significativo en los niveles de insulina en la sangre del hospedero a través de GLP-1, permitiendo una reducción sobre los niveles de glucosa en sangre (Cani *et al.* 2005).

Knauf *et al.* (2005) evaluaron el papel central de GLP-1 sobre la homeostasis de la glucosa. Ellos encontraron que durante hiperglicemia, GLP-1 aumentó la secreción de insulina y favoreció la redistribución de glucosa del músculo hacia el hígado, donde se almacenó como glucógeno. Por su parte Delzenne *et al.* (2005) evaluaron el efecto de los FOS en ratas Wistar sobre los péptidos gastrointestinales encontrando que los FOS administrados por tres semanas incrementan la concentración de incretinas intestinales involucrados en la regulación del apetito.

#### **II.4.2.2 Grelina**

El inicio y terminación de la comida es un proceso complejo y normativo que comprende mecanismos gastrointestinales y del sistema nervioso central, integrando funciones que se encuentran predominantemente en el hipotálamo. Después de la ingesta de una comida la distensión de la pared del estómago activa señales de saciedad que son transportadas a las áreas hipotalámicas las cuales regulan la alimentación principalmente por vías vagales (Hahn *et al.* 1998).



**Figura 11.** Sitio de acción de las señales que influyen en la ingesta de alimentos en el hipotálamo. (Wynne *et al.* 2004)

La grelina es un péptido endócrino de 28 aminoácidos que se secreta principalmente en el estómago por las células X/A de la glándula oxíntica ubicada en el fondo del estómago y circula en el torrente sanguíneo durante el ayuno. Intensifica el apetito e incrementa la ingesta calórica en ratones, favoreciendo un incremento en la adiposidad (Wren *et al.* 2001; Wren & Bloom, 2007; Reimer *et al.* 2003). Esta hormona es de los agentes fisiológicos orexigénico y adipogénicos más poderosos capaz de modular el hambre a través de sus fluctuaciones en la concentración en el plasma y dependiente de las vías aferentes vagales (Tschop *et al.* 2000).

Su identificación fue primero en ratas y posteriormente en el estómago de humanos, es el primer péptido endógeno n-octanoilado descrito que puede cruzar la barrera hematoencefálica. La grelina humana es homóloga a la grelina de rata con la excepción de dos residuos de aminoácidos (Kojima *et al.* 1999).

Por otro lado, los niveles de la grelina pueden cambiar de forma aguda durante el consumo de alimentos, Tschop *et al.* (2000) reportó que en roedores y humanos la liberación de la grelina endógena se reduce en el plasma rápidamente con la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos, volviendo progresivamente a los niveles basales hacia el período postprandial, por lo que concluyeron que la grelina contribuye a la regulación del apetito y de la saciedad (Tschop *et al.* 2001).

Erdmann (2003) reportó que la ingestión de proteína estimula la liberación de grelina en el hombre es decir los mecanismos que regulan los niveles plasmáticos de grelina están asociados a los nutrientes, de tal modo que las hormonas pancreáticas y gastrointestinales que se estimulan durante la ingesta de alimentos son candidatos para modificar la liberación de grelina postprandial, ejemplo de ello es la relación inversa que existe entre la grelina e insulina después de comidas ricas en carbohidratos lo cual sugiere una interacción reguladora (Wren *et al.* 2000).

Diversos estudios sobre la liberación de grelina en el hombre han demostrado que el contenido y tipo de nutrientes más que el volumen de una comida es responsable de la disminución de los niveles de grelina en el plasma postprandial (Overduin *et al.*, 2005; Druce *et al.* 2005). También se ha demostrado que la velocidad de la absorción de los nutrientes y la osmolaridad intestinal puede alterar la secreción de la misma (Lippl *et al.* 2004). Delzene *et al.* 2005 mostraron una reducción en la grelina en ratones al suplementar su dieta con FOS o una combinación de inulina y FOS.

#### **II.4.3 Influencia de los fructanos sobre la glicemia/ insulinemia**

La inulina como otras fibras dietarias pueden influenciar la absorción de macro nutrientes, especialmente carbohidratos, por retardación del llenado gástrico y/ o disminución del tiempo de tránsito en el intestino delgado. Los efectos del consumo de fructanos en la glicemia e insulinemia indican que esos efectos pueden

depender de condiciones fisiológicas o enfermedades como la diabetes o el sobrepeso (Kaur & Gupta, 2002). Por ejemplo Kok *et al.* (1996) reportaron que la ingesta de RSE redujo la glicemia e insulinemia postprandial por 17 y 26%, respectivamente, reforzando estos resultados los trabajos de Busserolles *et al.* (2003) quienes encontraron que la inulina decreció la relación glucosa/insulina en ratas alimentadas con dietas altas en fructosa. Otro estudio demostró que la glicemia postprandial fué más baja en ratas alimentadas con oligofructosa y que ésta participa en el decremento de la lipogenesis y secreción de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (Delzenne & Williams, 2002).

Concluyendo en estos estudios que la disminución de la gluconeogénesis hepática inducida por la ingesta de inulina y fructooligosacáridos puede ser mediada por los SCFA, especialmente por el propionato. Boillot *et al.* (1995) encontraron que el propionato adicionado a la dieta de ratas durante 4 semanas, redujo los niveles de glucosa en ayunas. El propionato también inhibió la gluconeogénesis en hepatocitos aislados, probablemente vía su conversión metabólica en metil malonil-CoA y succinil-CoA, los cuales son inhibidores específicos de la piruvato carboxilasa.

Por otro lado Yamashita *et al.* (1984) en un estudio con personas diabéticas, observaron que cuando la dieta fue suplementada con 8 g d<sup>-1</sup> de fructooligosacáridos durante 14 días, los niveles de glucosa sanguínea en ayunas disminuyeron. Además se ha reportado que el propionato incrementa la glucólisis, probablemente por la reducción del citrato hepático un inhibidor alostérico de la fosfofructoquinasa. La administración de fructooligosacáridos (FOS) ha demostrado que reduce la glicemia postprandial en ratones y aun en pacientes con sobrepeso y/o obesos.

GLP-1 también es involucrado en la regulación de la secreción pancreática de la insulina y la diferenciación de las células  $\beta$  en los islotes de Langher en el páncreas (Brubaker & Drucker, 2004).

#### **II.4.4 Efecto de los fructanos sobre el metabolismo de lípidos**

El efecto de los fructanos tipo inulina sobre la trigliceridemia ha sido estudiado en humanos y animales a través de la modificación de los niveles de glucosa o insulina debida a la modulación de la lipogenesis. El mecanismo de este efecto incluye efectos metabólicos por los SCFA y/o baja glicemia. Efectivamente los SCFA alcanzan el hígado a través del plasma de la vena porta ocasionando efectos sistémicos en el organismo. Por otro lado la inducción de enzimas lipogénicas por glucosa, ocurre vía un incremento de la trascrición genética, la cual es potenciada por la insulina.

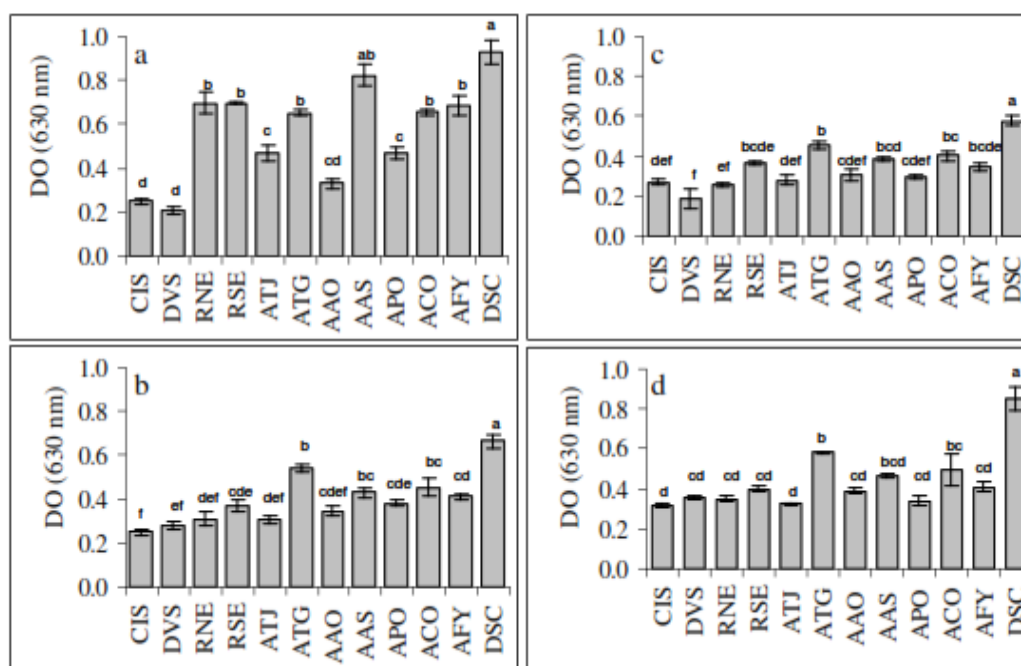
La asociación entre la glicemia/insulinemia y triglicéridos se demostró también para almidón resistente en ratas, en las cuales disminuyó la concentración de triglicéridos en suero, redujo la síntesis de grasa en un 20% y concomitantemente bajó la insulinemia postprandial, este efecto fué a través de la producción de SCFAs en el intestino grueso, permitiendo un incremento de dos campos en la concentración portal de acetato y propionato en ratas alimentadas con fructooligosacáridos reportando que el propionato inhibe la síntesis de lípidos, mientras que el acetato es un substrato lipogénico por ser un precursor del Acetil Co-A.

Se ha reportado que el incremento en la producción de propionato puede ser responsable de reducir las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres y lipoproteínas de baja densidad (LDL) mejorando la relación HDL/LDL. Estudios realizados en ratas sugieren que este efecto puede ser a nivel de una disminución en la síntesis *de novo* de enzimas lipogénicas del hígado (Tungland, 1998) incluyendo la sintasa ácido grasa (FAS) una enzima clave en la secreción de VLDL-TG (Kok *et al.* 1996) y/o a través del aumento de la flora bacteriana, como *Lactobacillus acidophilus*, que tiene efecto inhibitorio en la absorción del colesterol en las paredes intestinales.



## II.5 Agavinas y su potencial prebiótico

Agavinas actúan como un prebiótico, estudios *in vitro* con fructanos de plantas *A. tequilana*, *A. salmiana* tuvieron la capacidad para incrementar las bacterias probióticas tales como Bifidobacteria y Lactobacilli (Moreno-Vilet *et al.* 2014; López & Urías-Silvas, 2007). Este último grupo estudió el potencial prebiótico de los fructanos de agave de cinco especies de *Agave spp.* de diferentes regiones de México y *Dasyliirion spp.* y se compararon con las inulinas comerciales, en donde se encontró que los fructanos de *Dasyliirion* (DSC) y *A. tequilana* del estado de Guanajuato (ATG) con un DP entre 3 y 22 estimularon mejor el crecimiento de los dos géneros de bacterias **Figura 12.**

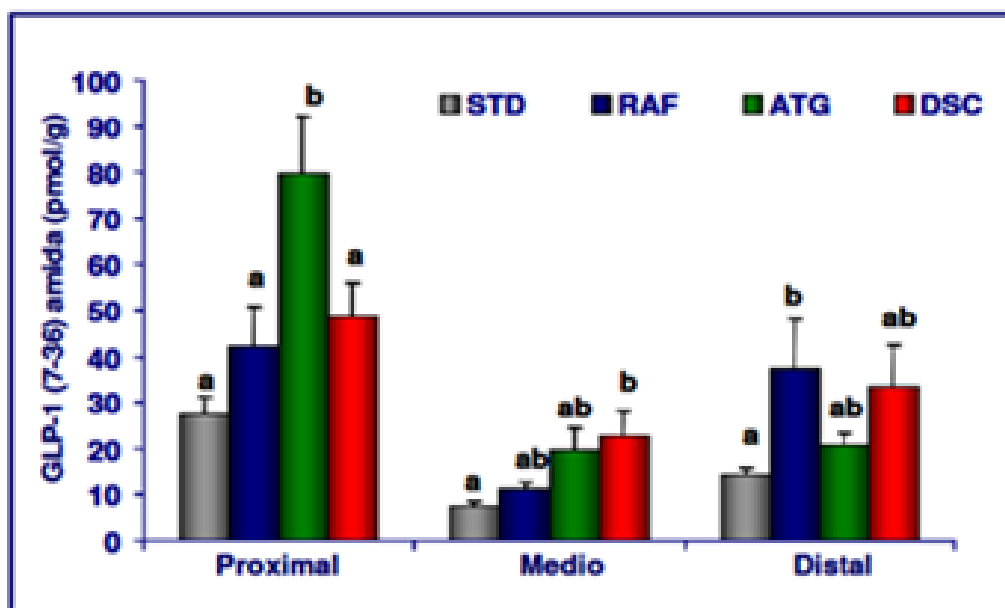


**Figura 12.** Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (a), *L. casei* (b), *L. paracasei*, (c) y *L. rhamnosus* (d). CIS, *Cichorium intybus* Sigma; DVS, *Dahlia variabilis* Sigma; RNE, Raftiline®GR; RSE, Raftilosa®Synergy1; ATJ, *Agave tequilana* var. Azul de Jal; ATG, *A. tequilana* var. Azul de Gto; AAO, *A. angustifolia* Oax; AAS, *A. angustifolia* Son; APO, *A. potatorum* Oax; ACO, *A. cantala* Oax; AFY, *A. fourcroydes* Yuc; DSC, *Dasyliirion* sp. Chih. (Urías-Silvas & López, 2007)

Reportando que el crecimiento de los Lactobacilli en fructanos de *Agave tequilana*, presentaron valores mayores de crecimiento que RNE y RSE. Los SCFAs

formados como producto de su fermentación fueron el ácido acético, fórmico y láctico, dependiendo del tipo de prebiótico usado por las diferentes bacterias. Observando que los fructanos ramificados de agave fueron capaces de producir más SCFA que los fructanos tipo inulina.

Con respecto a los efectos fisiológicos de los fructanos de agave reportados por Urías-Silvas *et al.* (2007) encontraron que los fructanos de *A. tequilana* Gto. y *Dasyilirion* sp. impactan de manera positiva en el metabolismo de lípidos y glucosa disminuyendo la concentración de glucosa y colesterol en sangre de ratones con dietas suplementadas con estos tipos de fructanos, reportando también que los ratones alimentados con fructanos tuvieron un incremento en el proglucagon mRNA en el colon similar a lo reportado por Cani *et al.* 2004, con un incremento significativo en la producción de GLP-1 en segmentos del colon y en plasma de la vena porta (**Figura 13**).



**Figura 13.** Concentración intestinal de GLP-1 (7-36) amida. STD, Estándar; RAF,rafitosa; ATG, *A. tequilana* var. Azul Gto.; DSC, *Dasyilirion* sp. Chih. Valores promedio con EEM. (Urías-Silva et al., 2007)

Huazano–García & López en el 2013 encontraron que los fructanos de *Agave angustifolia* de alto DP producen cantidades significativas de SCFA en el ciego,

colon medio y proximal en comparación con los ratones que consumieron fructanos tipo inulina. Finalmente Allsopp *et al.* 2013 reportaron una evaluación de la actividad prebiótica de fructanos de *Agave angustifolia* concluyendo que los fructanos de agave ramificados muestran actividad prebiótica, en particular sobre la función de la barrera intestinal, un aspecto importante de cáncer de colon.

### III. JUSTIFICACIÓN

En México el incremento de la población con sobrepeso y obesidad ha impactado en el desarrollo de diabetes tipo II. Por tal motivo, se buscan alimentos o ingredientes alimentarios que coadyuven a la disminución de esta problemática de salud pública. Los fructanos de agave son de gran importancia porque funcionan como fibra dietaria afectando la ingesta de energía y/o alimento. Por otro lado el estado de Oaxaca tiene una gran diversidad de especies de agave de gran relevancia en la entidad debido a que la hidrólisis de sus fructanos constituye el sustrato fermentable en la producción del mezcal, estos fructanos también funcionan como una fibra dietaria soluble, por lo que es de suma importancia evaluar el efecto prebiótico y fisiológico de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw. y *A. potatorum* Zucc. porque representan un potencial prebiótico con beneficios en la salud.

#### IV. HIPOTESIS

Las agavinas de las plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc. son de mayor complejidad estructural en el contenido, grado de polimerización y estructuras moleculares de los fructanos comparados con las inulinas de achicoria; tienen potencial prebiótico para ser fermentados por bacterias probióticas tales como Bifidobacteria y Lactobacilli así como presentan efectos sistémicos positivos sobre la ganancia de peso, niveles de glucosa y lípidos en sangre, ácidos grasos de cadena corta y regulan los péptidos relacionados con la saciedad (GLP-1 y grelina).

## V. OBJETIVOS

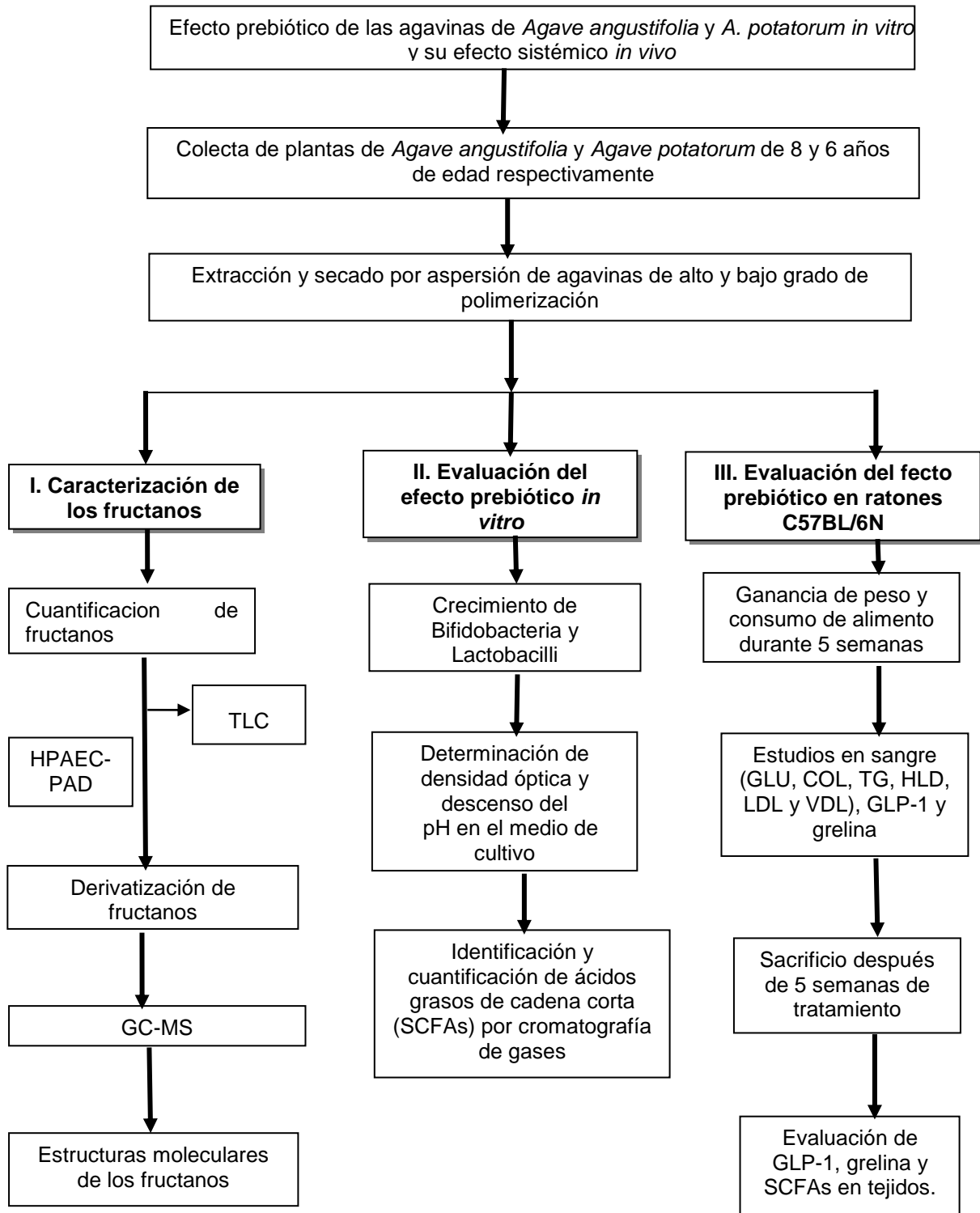
### V.1 Objetivo general

Extraer, comparar y evaluar el efecto prebiótico *in vitro* de las agavinas de *A. angustifolia* y *A. potatorum* y su efecto *in vivo* sobre la ingesta de energía, ganancia de peso, niveles de glucosa y lípidos en sangre, ácidos grasos de cadena corta y la modulación de péptidos relacionados con la saciedad (GLP-1 y grelina).

### V.2 Objetivos específicos

1. Extraer y deshidratar las agavinas de alto y bajo grado de polimerización (LDP y SDP) de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*.
2. Caracterizar las agavinas de las dos especies de agave por diferentes técnicas cromatográficas (TLC, HPAEC-PAD y GC-MS)
3. Evaluar el efecto prebiótico de las agavinas y mezclas de diferente grado de polimerización de las dos especies de agave en estudio utilizando *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* como probióticos.
4. Evaluar el efecto del consumo de agavinas de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* en ratones C57BL/6N sobre los siguientes parámetros: Ingesta de alimento, ingesta de energía y ganancia de peso corporal
5. Determinar el efecto de la dieta sobre los niveles de glucosa, y perfil de lípidos en sangre de ratones C57BL/6N.
6. Cuantificar la concentración intestinal y en vena porta del péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) en ratones alimentados con una dieta estándar o suplementada con fructanos.
7. Cuantificar la concentración gástrica y en vena porta del péptido grelina en ratones alimentados con una dieta estándar o suplementada con fructanos
8. Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en ciego y colon de ratones alimentados con una dieta estándar o suplementada con fructanos

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VII.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS**

#### **VII.1.1 Material biológico**

Plantas de *Agave angustifolia* Haw. de madurez fisiológica (8 años) con un peso promedio de tallo o piña de 79.6 Kg fueron colectados en Santiago Matatlán, Oaxaca. El mezontle limpio, se cortó en pedazos y fueron almacenados a -70 °C hasta la extracción de los carbohidratos.

Las plantas de *Agave potatorum* de madurez fisiológica (6 años) con un peso promedio de tallo de 46.5 Kg fueron colectadas en Sola de Vega Oaxaca, y se cortaron y almacenaron como se describió para *A. angustifolia*.

#### **VII.1.2 Extracción y purificación de fructanos**

La extracción de fructanos se realizó siguiendo el método reportado por López *et al.* (2003). Se molieron 100 g de mezontle de agave en un molino marca Grindomix GM20, se resuspendieron en 100 ml de etanol al 80% w/agua destilada (se ajustó el pH a 7.5-8.0 con CaOH<sub>2</sub> 1.0 N) y se agitó durante 1 h (120 rpm a 55 °C), posteriormente se filtraron las muestras y se extrajeron una vez más con 100 mL de agua con las mismas condiciones de agitación. Los filtrados se juntaron y se lavaron con 100 mL cloroformo para eliminar los residuos orgánicos, la muestra se dejó toda la noche a 4 °C en embudos de separación para lograr una mejor separación de fases; la fase acuosa se recuperó y su volumen se redujo a un 10% en un rota vapor (Buchi III) a 70 °C una vez evaporado se adicionaron 130 mL de etanol absoluto, finalmente se precipitó a 4 °C por 4 horas, logrando la separación de los fructanos de alto y bajo grado de polimerización (DP).

La separación de los fructanos de alto grado de polimerización (LDP) para cada una de las especies, se logró por precipitación con la adición de etanol absoluto; mientras que los fructanos de bajo grado de polimerización (SDP) permanecieron en el sobrenadante. Después de este tiempo se separó el sobrenadante del precipitado y se conservaron ambas fases a -70 °C hasta su deshidratación.



### **VII.1.3. Secado por aspersión**

Para deshidratar los fructanos de plantas agave de ambas especies se utilizó un secador por aspersión Modelo Mobil marca Niro. De los parámetros evaluados se utilizaron las siguientes condiciones de secado por aspersión para los fructanos de alto DP: contenido de sólidos de la solución 40%; temperaturas de entrada y salida del secador por aspersión 120–100 °C respectivamente; presión de aspersión 4 bars. Los fructanos de bajo grado de polimerización de ( $DP \leq 10$ ) con un contenido de sólidos solubles de  $19 \pm 2\%$  fueron pasados a través del atomizador a un flujo de  $1.5 \text{ L h}^{-1}$  y las temperaturas de secado seleccionadas en su entrada y salida del secador por aspersión fueron de 100–80 °C respectivamente con una presión de aspersión de 3 bars.

Una vez obtenido el polvo, todos los materiales fueron almacenados en contenedores libres de humedad y los fructanos de bajo DP fueron almacenados en desecadores hasta su análisis. Los fructanos de alto y bajo grado de polimerización secados por aspersión de cada uno de las especies en estudio, se identificaron por cromatografía en capa fina y fueron comparados con los deshidratados por liofilización.

#### **VII.1.3.1. Características fisicoquímicas**

Los fructanos secos fueron caracterizados evaluando contenido de humedad (%) y cenizas de acuerdo al AOAC (1990) métodos 925.10, 923.03 respectivamente. La actividad acuosa ( $A_w$ ) se determinó con un medidor de  $A_w$  marca Novacina y el contenido de carbohidratos siguiendo la técnica de Dubois, (1956).

##### **VII.1.3.1.1 Color**

La determinación de color se llevó a cabo con un colorímetro Hunter Lab Mini Scan midiendo los parámetros de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  donde:

$L^*$  = Luminosidad (0 a 100)

$a^*$  = Valores positivos son rojos y los negativos verdes

b\* = Valores positivos son amarillos y los valores negativos son azules

#### **VII.1.3.1.2 Determinación de carbohidratos totales**

Para la determinación de carbohidratos se preparó una solución de fructanos al 1% con agua desionizada (a la cual se le denominó solución stock). El contenido de carbohidratos se realizó siguiendo la técnica reportada por Dubois *et al.* (1956). Se tomó un mililitro de la solución stock y se le adicionó 1 mL de la solución de fenol al 5% posteriormente se agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de manera rápida y directa sobre la superficie del líquido, Se dejó reposar la mezcla de reacción por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se incubó a 29 °C por 20 minutos en un baño con agitación, posteriormente se dejó reposar la muestra y se determinó su absorbancia a 490 nm. La curva de calibración se realizó con soluciones de glucosa en concentraciones de 2 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **VII.1.3.1.3 Azúcares reductores directos**

Para la determinación de azúcares reductores se siguió la técnica reportada por Nelson, (1944). Se tomaron 100 µL de la solución stock (fructanos al 1%) y se llevaron a un volumen de 1 mL con agua desionizada. Se agregó 1 mL del reactivo C y se calentó la mezcla a 100 °C durante 15 minutos, después de este tiempo se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se adicionó 1 mL del reactivo D, se agitó y diluyó con 3 ml de agua y se leyó su absorbancia a λ 520 nm. El color azul-verde de la solución es inestable por lo que se leyó de inmediato para obtener su reproducibilidad.

Reactivo A: Se disolvieron 15 g de tartrato de sodio y potasio y 30 g de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en 300 mL de agua desionizada. Se agregaron 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). Por otro lado se disolvió 180 g de sulfato de sodio anhidro en 500 mL de agua previamente hervida y fría. Se mezclaron las dos soluciones y se aforó a un litro.

Reactivo B: Se disolvió 5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 45 g de sulfato de sodio anhidro en agua y se aforó a un volumen de 250 mL.

Reactivo C: Se mezcló A y B en una proporción 4:1 (v/v) antes de usarse.

Reactivo D: Se disolvieron 25 g de molibdato de amonio en 450 mL de agua, se adicionó cuidadosamente 21 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado con agitación constante. Se disolvió 3 g de arsenato de sodio en 25 mL de agua y se adicionó a la solución de molibdato. La solución se incubó a 37 °C por un periodo de 24 horas y se almacenó en un frasco ámbar. Antes de utilizar este reactivo se diluyó con 2 volúmenes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.75 M. Para esta determinación se realizó una curva de calibración con soluciones de glucosa en concentraciones de 2 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **VII.1.3.1.4 Determinación de Fructosa**

La determinación de fructosa se realizó mediante el método de la antrona-triptofano-ácido sulfúrico (ATS). A 100 µL de muestra de fructanos se le adicionó 900 µL de agua desionizada y 2 mL de reactivo ATS. Se agitó la mezcla en un vórtex por 20 min y se incubó en un baño maría a 55 °C por 90 minutos. Después de este tiempo las muestras se enfriaron a chorro de agua y se determinó su absorbancia a una  $\lambda$  de 520 nm.

Solución de Antrona-triptofano

Se disolvieron 10 mg de antrona y 10 mg de L-triptofano en 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 75%. Esta solución se denominó (ATS) y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C por un tiempo no mayor a 7 días.

La curva de calibración se realizó determinando la absorbancia de las soluciones que contienen concentraciones de fructosa en un rango de 1 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **VII.2 Cuantificación de fructanos**

El contenido de fructanos de los carbohidratos del mesquite de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* se determinó utilizando el kit comercial “Fructan Assay Procedure” de la marca megazyme (Megazyme International Ireland). La técnica se basa en la hidrólisis de los fructanos por medio de una fructanasa (exoinulinasa) específica y de alta pureza, y los azúcares producidos son determinados por el método de hidracida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) para azúcares reductores.

El protocolo del ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones del distribuidor como se describe a continuación. 100 mg de muestra secada por

aspersión fueron disueltas en 40 mL de agua destilada caliente, se incubó 15 min a  $\approx 80$  °C con agitación constante. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente, se filtró en Whatman 1 y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Para remover sacarosa, almidón y azúcares reductores se colocaron 50  $\mu$ L de la solución anterior en un tubo eppendorf y se agregaron 50  $\mu$ L de una mezcla de enzimas sacarasa/amilasa (100 U),  $\beta$ -amilasa (500 U, de *Bacillus subtilis*), pullulanasa (100 U, de *Klebsiella pneumoniae*) y maltasa (1,000 U, de levadura). Incubar a 40 °C por 30 min a 450 rpm en un termomixer. Para reducir los monosacáridos o azúcares reductores a alcohol azúcares se adicionó 50  $\mu$ L de borohidruro de sodio ( $\text{NaHB}_4$ ) recién preparado (10 mg  $\text{mL}^{-1}$  de  $\text{NaHB}_4$  en NaOH 50 mM), se agitó en vórtex 20 segundos e incubó a 40 °C durante 30 min. Para eliminar el exceso de borohidruro de sodio se adicionó 125  $\mu$ L de ácido acético 200 mM, y se agitó en vórtex 20 seg. Esta fué llamada **Solución “S”**.

Hidrólisis y cuantificación de fructanos. Para cuantificar los azúcares reductores recién formados, se adicionó a cada tubo 125  $\mu$ L de PAHBAH, se incubó en un baño de agua hirviendo por 6 min. y se enfrió (18-20 °C) durante 5 min y se determinó su absorbancia en los 10 min siguientes a  $\lambda$  410 nm.

#### Controles y muestras de referencia

- A) Blanco de la muestra: Se colocaron 50  $\mu$ L de la **solución “S”** en tubo eppendorf y se agregaron 25  $\mu$ L del buffer de acetato de sodio 100 mM, agitar en vórtex 20 seg e incubar a 40°C durante 20 min a 400 rpm en termomixer.
- B) Muestra problema. Se colocaron 50  $\mu$ L la **solución “S”** en un tubo eppendorf y se agregaron 25  $\mu$ L de fructanasa (exo-inulinasa), agitar en un vórtex 20 seg e incubar a 40 °C por 20 min a 400 rpm en termomixer para asegurar la completa hidrólisis de los fructanos a fructosa y glucosa.
- C) Blanco de reactivo: Se adicionaron a un tubo eppendorf 75  $\mu$ L de buffer de acetato de sodio 100 mM.

D) Estándar de D-fructosa: Se mezclaron 50  $\mu$ L de solución estándar de fructosa (1.5mg/mL) con 225  $\mu$ L de buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 4.5), se agitó en vortex 20 seg y se agregaron 50  $\mu$ L a un tubo eppendorf.

La concentración de fructanos se calculó según la siguiente manera:

$$\text{Fructano (\% w/w)} = \Delta A \times F \times 5 \times V \times (0.275/0.05) \times (100/w) \times (1/1000) \times (162/180)$$

Donde,  $\Delta A = (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco reactivo}}) - (A_{\text{blanco de muestra}} - A_{\text{blanco reactivo}})$

F = factor de conversión de absorbancia de fructosa a  $\mu$ g de fructosa

F = (54.5  $\mu$ g fructosa) / Absorbancia de 54.5  $\mu$ g de fructosa

5 = Factor para convertir de 0.05 mL ensayados a 0.25 mL

V = Volumen (mL) de aforo de la muestra

(0.275/0.05) = 0.05 mL tomados de 0.275 mL de la solución "A"

W = Peso de la muestra en mg

100/w = Factor para expresar los fructanos como porcentaje de peso seco

1/1000 = Factor de conversión de  $\mu$ g a mg

(162/180) = Factor de conversión de fructosa libre a fructosa anhidra (en los fructanos)

### VII.3. CARACTERIZACION DE AGAVINAS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

#### VII.3.1 Cromatografía en capa fina (TLC).

Se tomaron 25 mg de fructanos en polvo y se disolvieron en 1 mL de agua destilada, de la solución anterior, se tomó un microlitro y se aplicó a una placa de sílica gel con soporte de aluminio (Aldrich), la placa de TLC se desarrolló de 3 a 5 veces en un sistema de solventes butanol: propanol: agua (Kanaya *et al.* 1978). Las manchas correspondientes a carbohidratos (fructanos) se visualizaron con el reactivo anilina-difenilamina/ácido fosfórico en acetona (Anderson *et al.* 2000) y para ser reveladas se colocaron a 80 °C por 15 min. Este reactivo produce un color grisáceo en presencia de aldosas, mientras que las cetosas producen un color rosado. Se hizo una mezcla de estándares glucosa, fructosa, sacarosa,

(Sigma); 1-Kes (DP3), Nys (DP4) y 1, 1,1-kestopentaosa (DP5) e inulina de achicoria (*Cichorium intybus L.*) (Megazyme). La sensibilidad del revelador es de 1 µg.

### **VII.3.2. Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico de alta resolución acoplado a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).**

Los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* de alto y bajo grado de polimerización fueron analizados por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) utilizando un cromatógrafo de iones Dionex ICS-3000 con una guarda-columna CarboPacPA-100 y una columna analítica CarboPac-PA 100 siguiendo el protocolo establecido por Mellado-Mojica & López (2012).

Las muestras fueron diluidas con agua desionizada (resistividad 17 MΩ) a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> la cual se filtró en una membrana de nylon de 0.45 µm antes de inyectarla. 25 µL de la muestra se inyectaron a un cromatógrafo HPAEC-PAD marca Dionex. La separación de los fructanos se realizó con un gradiente de acetato de sodio, en 0.15 M de NaOH, a una temperatura de 25°C y un flujo de 0.8 mL/min, como sigue: 0–5 min, 45 mM NaOH; 5–60 min, 0–375 mM acetato de sodio; 60–65 min, 500 mM acetato de sodio; 65–75 min, 45 mM NaOH. El potencial aplicado para la detección por pulso amperométrica fueron los siguientes: para E1 (400 ms), E2 (20 ms), E3 (20 ms) y E4 (60 ms) fueron +0.1, -2.0, +0.6 y -0.1 V respectivamente (Shiomi *et al.* 1991; Mellado-Mojica & López, 2012).

### **VII.3.3. Derivatización de fructanos a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs).**

Para realizar el análisis de los enlaces glicosídicos y estructuras de los fructanos extraídos de las plantas de *A. angustifolia* y *A. potatorum* fueron derivatizados a sus alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) de acuerdo al método descrito por Mancilla-Margalli & López (2006) con algunas modificaciones. Se

pesaron 10 mg de fructanos secados por aspersión y se colocaron en ractiviales de 4 mL. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) agitando y sonicando hasta una total disolución.

### VII.3.3.1 Metilación

La metilación se realizó por adiciones subsecuentes de NaOH pulverizado y de yoduro de metilo ( $\text{CH}_3\text{I}$ ). La cantidad de NaOH añadida se calculó con base en lo siguiente:

- Número de moles del monosacárido anhidro base ( $162 \text{ mg mM}^{-1}$ )

Cantidad de muestra  $\div 162 \text{ mg mM}^{-1}$ .

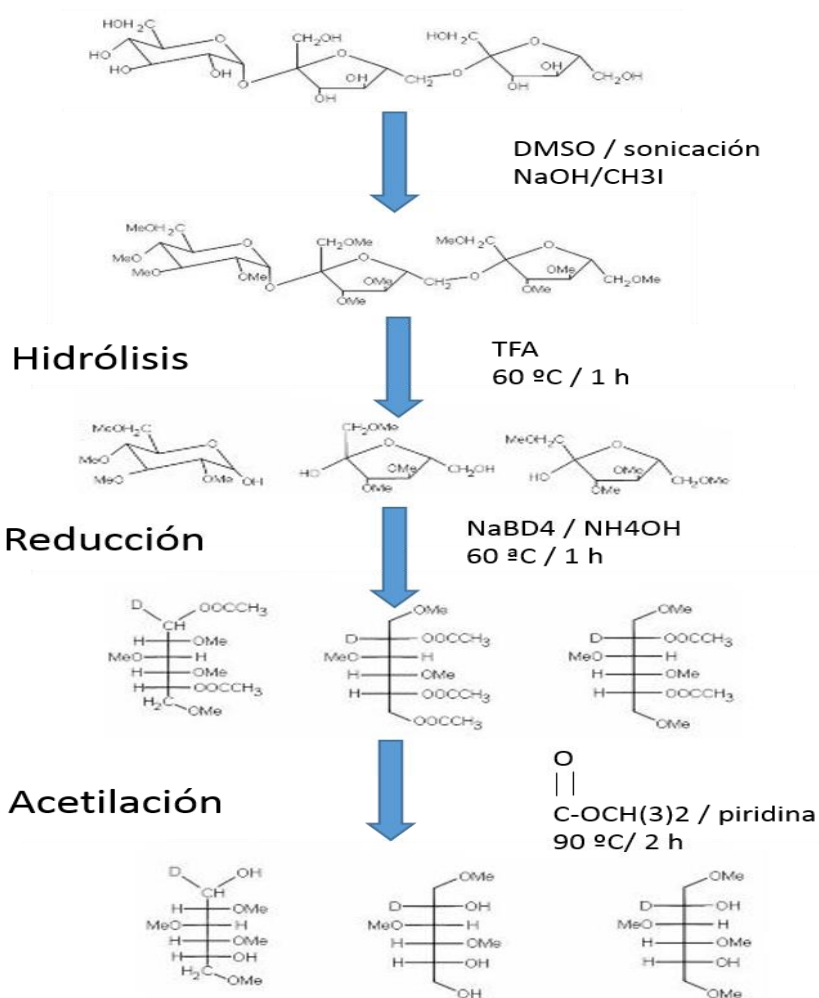
El número de moles se multiplicó por el número de grupos ( $-\text{OH}$ ) disponibles para la metilación en el polímero (en el caso de los fructanos, 3 para cada residuo de fructosa). Con el número de moles se calculó la masa de NaOH correspondiente y se multiplicó por tres para tener un exceso de reactivo y asegurar una metilación completa. Por su parte, el  $\text{CH}_3\text{I}$  se adiciona en una cantidad molar equivalente al NaOH considerando la densidad de este agente metilante ( $2.275 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ). Este proceso se realizó durante 3 días, adicionando los reactivos en intervalos de 4 a 5 h y manteniendo la agitación constante y las condiciones anhidras, hasta la formación de una suspensión lechosa que dificultó la agitación de la suspensión e indicó el final de la metilación.

### VII.3.3.2. Extracción de productos metilados

Los carbohidratos permetilados fueron extraídos dos veces con agua destilada (volumen de una pipeta pasteur) agitando en un vórtex y una tercera vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se adicionaron 5 gotas de tiosulfato de sodio  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 5% para reducir los iones yoduro que se generan con frecuencia y se mezcló por inversión. Se recuperó la fase orgánica (fase inferior) y se extrajo la fase acuosa 3 veces más con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , recuperando y juntando la fase orgánica (fase inferior) en tubo limpio. La fase orgánica se lavó con suficiente agua (3 veces) para eliminar reminiscencias de DMSO (retirando la fase acuosa o superior). Se agregó a la fase orgánica perlas de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para retirar la humedad, pasar la

muestra por columna de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro, lavar el tubo y la columna con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y llevar a completa sequedad con  $\text{N}_2$ . Se verificó la eficiencia de la metilación por análisis de infrarrojo, donde desaparece la banda correspondiente a la vibración de los OH de los grupos hidroxilos, en el rango de 3700 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ , lo cuál indicó una completa metilación. Los pasos de este proceso se muestran esquemáticamente en la **Figura 14** (tomando como ejemplo a la 6-Kes).

### Metilación



**Figura 14.** Metodología de la derivatización de fructanos a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs)



### **VII.3.3.3 Hidrólisis**

A los fructanos permetilados contenidos en reactivales de 4 mL se le adicionaron 900 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0.5 M y se realizó la hidrólisis de éstos a 90°C por 1 h (tubos tapados con septas). Se enfrió el reactival y se llevó a completa sequedad con N<sub>2</sub> con adición de tolueno para formar una mezcla azeotrópica, se añadió a la muestra seca 1 mL de tolueno y se llevó a completa sequedad con N<sub>2</sub>.

### **VII.3.3.4. Reducción**

Los compuestos hidrolizados fueron reducido por la adición de 5 mg de borohidruro de sodio deuterado (NaHBD<sub>4</sub>) y disueltos en 500 µL de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) 1 N, a 60 °C por 1 h. Se enfrió el reactival y se adicionó cuidadosamente 5 gotas de ácido acético para destruir el exceso de NaHBD<sub>4</sub> y un volumen de solución metanólica de ácido acético al 15%. Se evaporó hasta 1/3 de su volumen original utilizando N<sub>2</sub> manteniendo el termoblock a una temperatura inferior a 40°C. Se repitió el paso anterior dos veces más para asegurar la eliminación de boratos que puedan interferir en la acetilación o favorecer a producción difructosa anhidra. En el último paso se llevó la muestra a completa sequedad en presencia de la solución metanólica de ácido acético al 15%.

### **VII.3.3.5. Acetilación**

La acetilación de la muestra se realizó adicionando 500 µL de anhídrido acético más 250 µL de piridina como catalizador. Se acetiló durante 2 h a 90°C, se enfrió la muestra y se neutralizó la reacción adicionando cuidadosa y lentamente unas gotas de solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), esperando que poco a poco la solución dejara de producir CO<sub>2</sub>.

### **VII.3.3.6. Extracción de alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs)**

Para extraer los PMAAs se agregó lentamente al reactival la solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se pasó a un tubo limpio el contenido del reactival y se lavó dos veces con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y dos veces más con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se recuperó la

fase orgánica y colocó en tubo limpio, se lavó la fase acuosa dos veces más con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se recuperó y se juntó la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica recuperada dos veces más con agua y una tercera con HCl 0.1 M frío (eliminando la fase acuosa o superior) para destruir la piridina remanente. Se secó la fase orgánica con CaCl<sub>2</sub> anhidro por 30 min.

Se filtraron los PMAAs a través de una columna de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se lavó el tubo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y finalmente se lavó la columna una vez más con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se llevaron a completa sequedad con N<sub>2</sub>.

#### **VII.3.3.7 Identificación de derivados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

La separación mediante cromatografía de gases de los fructanos derivatizados se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Mancilla-Margalli & López, 2006. Los fructanos derivatizados fueron disueltos en 500 µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se tomaron 2.0 µL y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 Series II) acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett Packard 5972 Series). La separación de los derivados se realizó en una columna capilar de fenil metil silicón al 5 % (HP-5, 25 m × 0.31 mm d.i. × 0.52 µm de grosor) utilizando helio (He) como gas acarreador a una velocidad de flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>, con una presión de 5 psi. La temperatura inicial del horno fue de 60°C sostenida por 3 min, seguida de una rampa de temperatura de 4 °C min<sup>-1</sup> hasta 160 °C por un minuto, 0.5 °C min<sup>-1</sup> hasta 180 °C por 1 minuto y finalmente, 20 °C min<sup>-1</sup> hasta 300 °C por 10 min. La temperatura del inyector y del detector fue de 300 °C.

En el detector de masas, las muestras vaporizadas se ionizaron en alto vacío por bombardeo electrónico con una energía de ionización de 70 eV. RNE y RSE fueron derivatizados como se indicó anteriormente. La identificación de los derivados se hizo de acuerdo a su patrón de masas, comparación con los estándares y siguiendo el criterio establecido por Mancilla-Margalli & López, 2006.

## VII.4. EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FRUCTANOS DE *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*: ESTUDIOS *in vitro*.

### VII.4.1 Diseño experimental

En este estudio, 10 fructanos (**Tabla 2**) de diferente grado de polimerización fueron comparados como fuente de carbono para el crecimiento de bacterias probióticas y como controles se utilizaron los fructanos comerciales Raftiline (RNE) y Raftilose Synergyl (RSE) manufacturadas por la compañía Orafti-Beneo.

**Tabla 2.** Fructanos y mezclas de diferente grado de polimerización de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* utilizadas como fuente de carbono para el crecimiento de probióticos

Fructanos	<i>Agave angustifolia</i>	
LAA	Fructanos de alto DP	
SAA	Fructanos de bajo DP	
A	75% LAA	25% SAA
B	50% LAA	50% SAA
C	75% LAA	25% SAA
	<i>Agave potatorum</i>	
LAP	Fructanos de alto DP	
SAP	Fructanos de bajo DP	
D	75% LAP	25% SAP
E	50% LAP	50% SAP
F	25% LAP	75% SAP

LAA, fructanos de alto DP de *A. angustifolia*; SAA fructanos de bajo DP de *A. angustifolia*; LAP, fructanos de alto DP de *A. potatorum*; SAP, fructanos de bajo DP de *A. potatorum*.

### VII.4.2. Bacterias

La capacidad de fermentación de las agavinas se evaluó con 6 especies de *Bifidobacterium* y 4 especies de *Lactobacillus* las que se muestran en la **Tabla 3**. Todas ellas fueron obtenidas de la American Type Cultura Collection (ATCC), Rockvill, Md., estas especies bacterianas se almacenaron en medio Mann Rogosa y Sharpe (MRS/glucosa) suplementado con glicerol, a -70 °C hasta su regeneración.

**Tabla 3.** Especies de Bifidobacteria y Lactobacilli obtenidas de la American Type Cultura Collection (ATCC), Rockvill, Md., utilizadas en el estudio *in vitro*.

<b>Bifidobacterias</b>	<b>Lactobacilli</b>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC-15703	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
<i>B. animalis</i> ATCC 27536	<i>L. casei</i> ATCC 393
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	<i>L. paracasei</i> ATCC 25302
<i>B. breve</i> ATCC 15700	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103
<i>B. infantis</i> ATCC 25962	
<i>B. longum</i> ATCC 15707	

#### **VII.4.2.1. Regeneración de la cepa**

Las cepas se reactivaron con dos cultivos subsecuentes en medio Mann Rogosa y Sharpe (MRS) conteniendo 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa como única fuente de carbono y se incubaron a 37°C por 48 horas en condiciones anaeróbicas (8-10% de CO<sub>2</sub>)

#### **VII.4.2.2 Crecimiento bacteriano**

La capacidad probiótica de las especies bacterianas analizadas se determinó siguiendo el método reportado por Gibson & Wang, (1994a) con algunas modificaciones. Se preparó medio Mann Rogosa and Sharpe (MRS) en el caso de Bifidobacteria el medio de cultivo se suplementó con L-cisteína (0.05%). Se aplicó un inóculo bacteriano de 1% en 10 mL de medio de cultivo. Las bacterias se cultivaron bajo condiciones anaeróbicas utilizando una incubadora de CO<sub>2</sub> marca Lab Line por 20 h a 37°C. Las 20 h de crecimiento corresponde a la parte final de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Para evaluar el efecto de los diferentes fructanos en el crecimiento bacteriano, el medio se preparó sin glucosa, en seguida se adicionaron los fructanos como única fuente de carbono a una concentración de 10 g L<sup>-1</sup>. El crecimiento bacteriano se midió por densidad óptica (DO) a 630 nm en un espectrofotómetro Lemark.

La fermentación de los carbohidratos se observó por la disminución del pH en el medio y esto fue un indicador de la producción de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) por las bacterias probióticas durante la fermentación. Los cambios de pH en el medio se evaluaron tomando el valor del medio de cultivo al inicio del experimento así como después de la incubación, para lo cual se utilizó un medidor de pH digital Hanna Instrument. Los resultados se reportaron como el promedio de tres determinaciones independientes.

#### **VII.4.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)**

Después del período de incubación, se tomó 1 mL del medio de cultivo para el análisis de los SCFA con el protocolo descrito por Prieto-Femia *et al.* (2002). En breve, la muestra se centrifugó a 16,000 g a 4°C por 10 min en una microcentrífuga Eppendorf, se le adicionó al sobrenadante libre de células bacterianas 500 µL de solución estándar de ácido 2-metil-valérico al 0.01%, se acidificó con 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se homogenizó por 1 min. Los SCFA se obtuvieron por agitación con 2 mL de dietil éter y una subsecuente centrifugación a 3500 rpm por 5 min. Se inyectaron 2 µL de la fase orgánica dentro de la columna capilar (HP-FFAP) del cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 4890 D. La temperatura inicial de la columna del cromatógrafo de gases fue de 50°C y una temperatura final de 200°C, como gas acarreador se utilizó helio con un flujo de 18 mL min<sup>-1</sup>. Los ácidos grasos fueron detectados por cromatografía de gases y cuantificados utilizando las curvas de calibración realizadas para cada ácido (acético, propiónico, butírico y láctico) a una concentración de 10 a 100 mM.

#### **VII.4.4. Análisis estadístico**

Se realizaron tres determinaciones independientes, los valores promedios de las medidas de crecimiento, cambios de pH y producción de SCFA entre grupos fueron evaluadas con la prueba de ANOVA en una vía seguida por la prueba de Tukey usando el programa STATGRAPHICS Plus 5.1. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## **VII.5. EFECTO PREBIÓTICO DE LAS AGAVINAS DE *Agave angustifolia* y *A. potatorum* EN LA INGESTA DE ALIMENTO, GANANCIA DE PESO DEL CUERPO Y HORMONAS RELACIONADAS CON LA SACIEDAD (GLP-1 y grelina).**

### **VII.5.1. Animales de laboratorio**

Los ratones usados (C57BL/6N) en este estudio fueron adquiridos en Harlan México. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las guías del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav-México y de acuerdo a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los ratones machos C57BL/6N de 12 semanas de edad tuvieron un peso promedio inicial de 23-25 g y fueron divididos en 4 grupos los cuales fueron pesados, marcados y asignados al azar a cada uno de los grupos antes mencionados y se mantuvieron a temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Los animales fueron aclimatizados una semana.

Seguido del período de aclimatización, 24 ratones fueron pesados y separados en 4 grupos (6 ratones por grupo, 3 ratones por caja) dependiendo de la dieta. Todos los animales tuvieron acceso libre al agua y al alimento antes de iniciar el experimento. El esquema general de trabajo se muestra esquemáticamente en la **(Figura 15)**

### **VII.5.2. Dietas**

Las dietas fueron preparadas en LabDiet®TestDiet® Richmond, IN (USA). Los ratones control fueron alimentados con una dieta estandar 5053 (STD), mientras que los ratones con tratamiento recibieron una dieta preparada con 90 g de dieta STD con 10 g de agavinas de *A. angustifolia* de bajo DP (AASDP) o *A. potatorum* (APSDP) y Raftilosa P<sub>95</sub> (RSE).

### **VII.5.3. Ingesta de alimento, peso corporal y heces**

La ingesta de alimento y el peso corporal se monitorearon tres veces por semana

y la colecta de heces se realizó una vez por semana evaluando la producción de heces en 24 h. El promedio de la ingesta energética diaria ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) se calculó como sigue: ingesta de alimento (g) X valor energético de la dieta ( $\text{kJ d}^{-1}$ ). El valor energético de la dieta estándar fue de 14.86 kJ/g, para la dieta RSE de 14.36  $\text{kJ d}^{-1}$  mientras que para las dietas suplementadas con agavinas fue de 14.40 kJ.

#### **VII.5.4 Muestras de sangre.**

Las muestras de sangre se colectaron una vez por semana, haciendo una pequeña incisión en la cola de los ratones. A partir de éstas muestras se evaluaron los niveles de glucosa y perfil de lípidos. Glucosa se determinó tanto en sangre de la cola como en la sangre de la vena porta utilizando tiras reactivas en la cual una mezcla de enzimas específicamente glucosa oxidasa genera una reflectancia lumínica de los productos finales de la reacción (Cardio Chek®PA, Indianapolis, USA).

##### **VII.5.4.1 Evaluación del perfil lipídico colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja y muy baja densidad (COL, TG, HDL, LDL y VLDL).**

Colesterol, triglicéridos y HDL se determinó tanto en sangre de la cola como en la sangre de la vena porta, colectando la sangre en capilares heparinizados de 40 $\mu\text{L}$  utilizando tiras reactivas acopladas a reacciones enzimáticas y una detección por reflectancia de los productos finales de la reacción los cuales fueron medidos por Cardio Chek®PA.

La cuantificación enzimática del colesterol se basa en que colesterol esterasa hidroliza el éster de colesteril a colesterol, el cual es oxidado por la colesterol oxidasa generando peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); éste interactúa con una sonda de colesterol para producir resorufina que es detectado por reflectancia por el Cardio Chek®PA. La cantidad de colesterol es proporcional a la resorufina detectada.

Los niveles de triglicéridos fueron determinados utilizando tiras reactivas; en este ensayo los triglicéridos son convertidos a ácidos grasos libres y glicerol, el glicerol es oxidado para generar un producto el cual reacciona para producir un compuesto colorimétrico que es detectado por reflectancia en el Cardio Chek®PA. Lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL) fueron calculadas a partir de los valores de COL, HDL y TG de la siguiente manera:  
LDL colesterol = Colesterol total – HDL Colesterol – Triglicéridos / 5  
Cociente Colesterol total/Colesterol HDL

#### **VII.5.5 Sacrificio**

Al final del período experimental (35 días) los ratones fueron sacrificados anestesiándolos primero con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (60mg kg<sup>-1</sup> de peso). Se colectaron muestras de sangre de vena porta en un tubo con 50 µL de heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron (3000 rpm 10 min) y el suero se almacenó a -70 ° C. La concentración de GLP-1 se cuantificó usando un kit ELISA específico para este péptido sin reactividad hacia GLP-1 (9-36) amida, GLP-2 o glucagon (GLP-1 active ELISA kit; Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)).

La concentración de grelina activa en suero se determinó usando un kit RIA (Ghrelin active RIA kit, Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)).



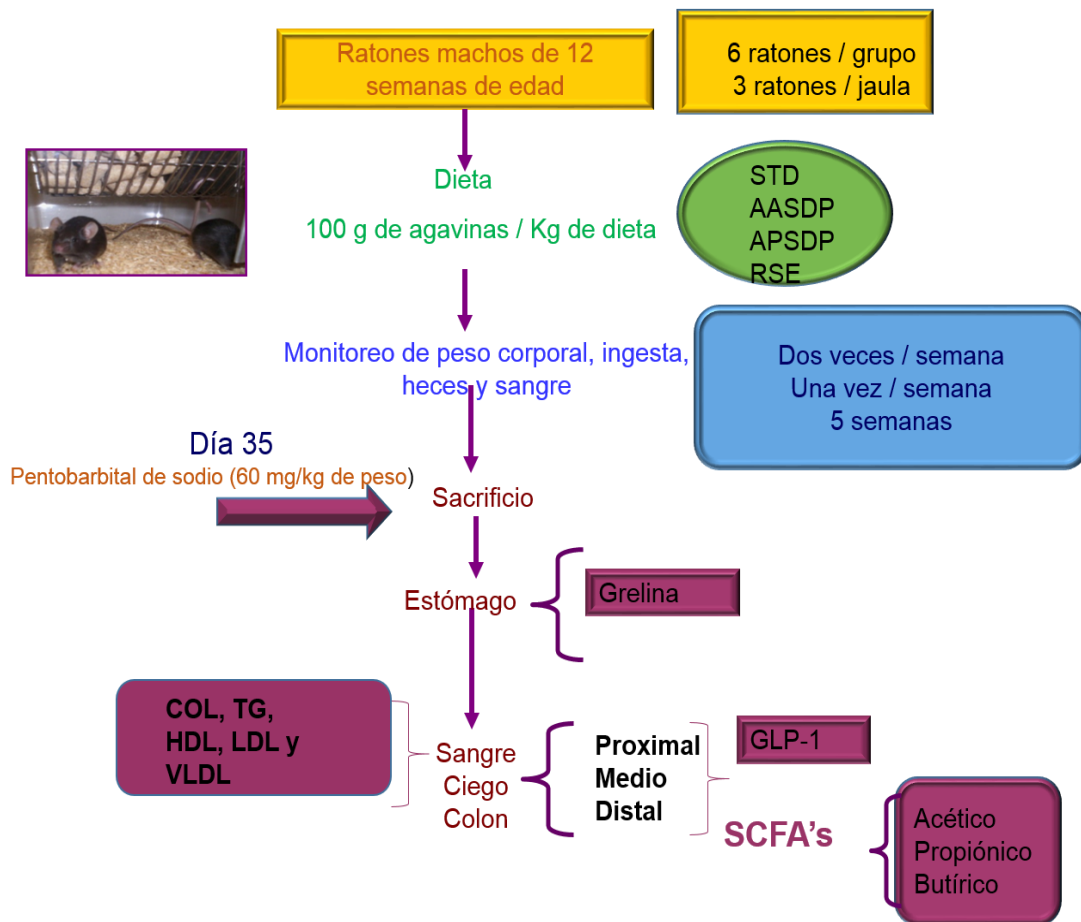


Figura 15. Esquema general del trabajo *in vivo*

### VII. 5.5.1 Muestras de tejido y análisis de péptidos intestinales

Los segmentos del ciego y colon (proximal, medio y distal) se extirparon inmediatamente, lavando con solución fisiológica (9 g NaCl/L), y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido almacenándolos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se requirieron para el análisis de GLP-1. El ciego y segmentos del colon vacíos, el hígado y el estómago se pesaron en una balanza analítica, se fijaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

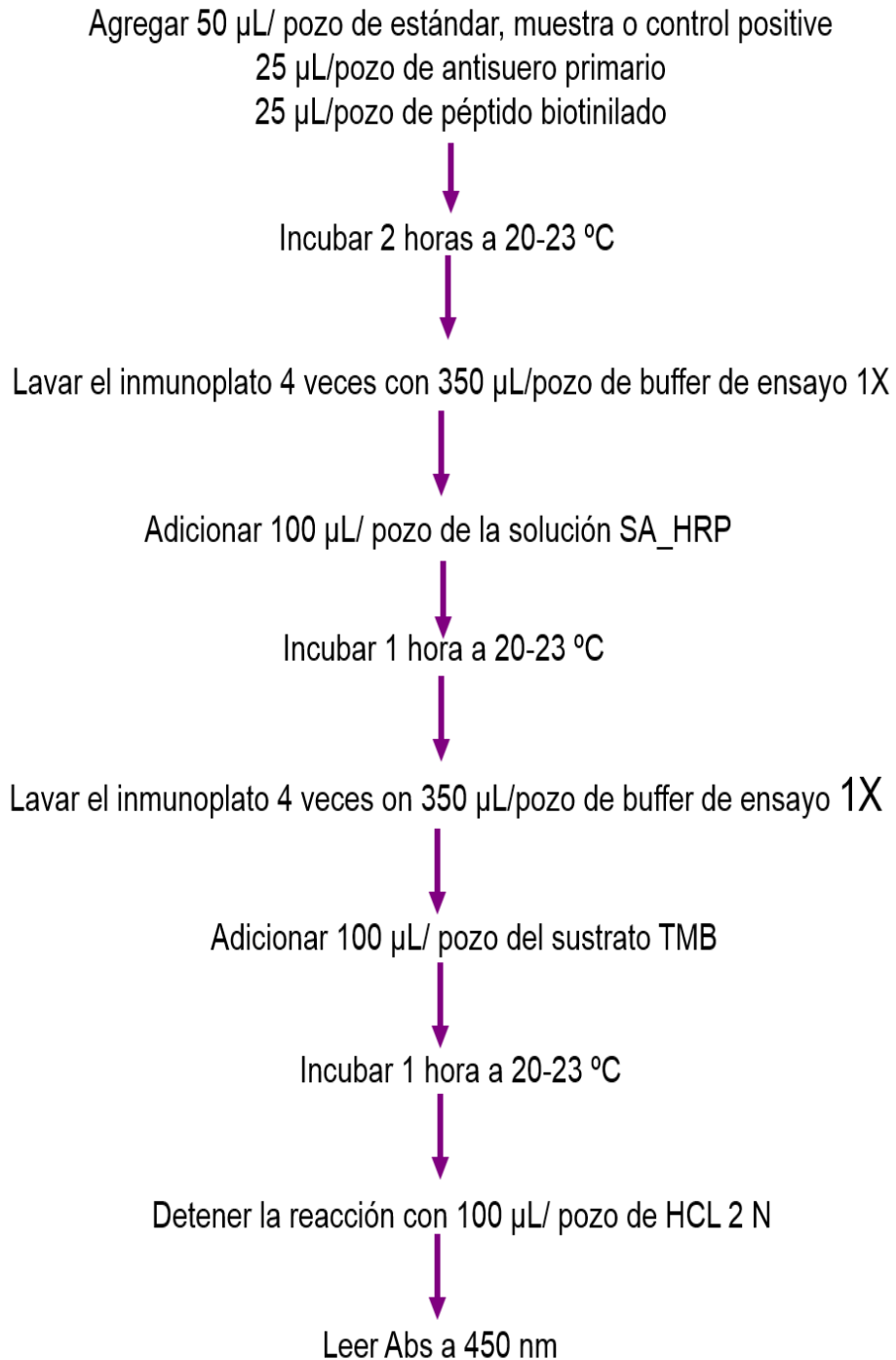
#### VII.5.5.1.1 Extracción del péptido-1 tipo glucagon intestinal

La cuantificación de GLP-1 se llevó a cabo según el protocolo de Cani *et al.* (2004). La extracción de GLP-1 de segmentos intestinales se realizó con una solución de etanol: agua: ácido clorhídrico 12 N (74:25:1). Las muestras se

homogenizaron y se llevaron a 4°C por 24 h. El homogenado se centrifugó y se colectó el sobrenadante para posteriormente diluirlo 200 y 500 veces en solución salina (0.09%) para ciego y colon, respectivamente. La concentración intestinal de GLP-1 se cuantificó usando un kit ELISA específico para este péptido como previamente se describió para las muestras de sangre.

Este kit detecta un péptido específico y su liberación basado en el principio de competitividad en una inmunoplaaca asperjada con un anticuerpo secundario con sus sitios de unión no específicos bloqueados. El anticuerpo secundario puede unirse a los fragmentos Fc del anticuerpo primario cuyo fragmento Fab se unirá competitivamente al péptido biotinilado, y al péptido estándar o péptido blanco de la muestra. El péptido biotinilado es capaz de interactuar con la peroxidasa de rábano con estreptavidina (SA-HRP) la cual cataliza el substrato TMB (solución compuesta por 3,3', 5, 5' tetrametilbenzina y peróxido de hidrógeno para producir una solución azulosa).

La reacción se detuvo con HCl y la solución cambió a color amarillo. La intensidad de color amarillo se detectó espectrofotométricamente a 450 nm y fué directamente proporcional a la cantidad del complejo péptido biotinilado-SA-HRP e inversamente proporcional a la cantidad de péptido presente en la solución estándar o en la muestra. Esto es debido a la competencia que existe entre el péptido biotinilado y el péptido estándar o de la muestra por el anticuerpo primario. La determinación de grelina en vena cava se realizó directamente de las muestras de suero. En la **Figura 16** se muestra brevemente el protocolo del inmunoensayo.



**Figura 16.** Protocolo del inmunoensayo enzimático (Phoenix Pharmaceuticals)

#### **VII. 5.5.1.2 Cuantificación de la grelina**

Para cuantificar el contenido de grelina gástrica se separó el estómago de los ratones. Se calentó a ebullición durante 5 min para inactivar algunas de las

proteasas que pueden degradar a la grelina, el tejido se homogenizó con ácido acético 1M y HCl 20 mM ( $10 \text{ g mL}^{-1}$ ) en homogenizador Heidolph a una velocidad de 14000 rpm durante 3 min. El extracto se centrifugó durante 10 min a 14000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se separó. Se determinó la grelina por prueba de ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay) con el kit RIA (Ghrelin active RIA kit, Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA)). Su fundamento es similar al descrito previamente para GLP-1.

#### **VII. 5.5.2 Extracción y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en ciego y colon**

Se pesaron 0.05 g de contenido cecal en base húmeda en un eppendorff, se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de ácido 2-metil-valérico (estándar interno). Se mezcló por 1 min en un vórtex 30 seg y se agregó a la solución 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Se mezcló nuevamente en vórtex por 1 min y enseguida se centrifugó a 14000 rpm por 3 min. Después de centrifugar se observaron dos fases, se retiró la fase acuosa y se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de dietil éter, esta solución se mezcló por 30 seg utilizando un vórtex y se centrifugó otros 30 seg a 14000 rpm, se separó la fase orgánica (diétil éter) de la fase acuosa en un vial para posteriormente inyectar al cromatografo 1  $\mu\text{L}$  de esta solución.

La cuantificación de los SCFAs se realizó en un cromatógrafo de gases de ionización de flama (GC-FID). Se empleó la columna analítica Nukol para la separación de los SCFAs con las siguientes condiciones de trabajo: temperatura inicial del horno 80 °C, temperatura inicial del equipo 80 °C, temperatura del inyector, temperatura del detector 230 °C. Para agilizar la separación de las muestras se emplearon 2 rampas de temperatura en el equipo, en la primera se incrementó la temperatura 15 °C/min hasta llegar a una temperatura final de 120 °C manteniéndose en esta temperatura 10 min. En la segunda rampa se incrementó la temperatura 5 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta llegar a una temperatura final de 200 °C quedándose allí por 8 min. Como gas acarreador se utilizó Helio. El tiempo de corrida para cada muestra fue de 45 minutos.

Todas las muestras se analizaron por triplicado en corridas independientes. Los ácidos grasos fueron detectados por cromatografía de gases y cuantificados utilizando las curvas de calibración realizadas para cada ácido (acético, propionico, butírico y láctico) a una concentración de 10 a 100 mM.

### **VII. 5.5.3 Cambios de pH en el intestino grueso de ratones**

El contenido cecal y colónico de cada grupo fue descongelado y se midió su pH en un potenciómetro con un microelectrodo marca Hanna instrument.

### **VII. 5.6. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados usando el programa Sigma Plot 11 (Copyright © Systat Software). Los valores fueron expresados como valores medios con el error estándar (SE) de la muestra. Diferencias estadísticas entre grupos fueron evaluadas usando ANOVA de una vía seguida por una diferencia mínima cuadrada o la prueba de Tukey. Para GLP-1 y grelina se utilizó el programa Origen 6.1. Para determinar la correlación entre los parámetros se empleó la prueba de correlación de Pearson. Valores con  $P \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente diferentes.

## **VIII. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **VIII.1 EXTRACCIÓN, SECADO POR ASPERSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE ALTO Y BAJO GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*.**

#### **VIII.1.1 Rendimiento de la extracción de fructanos**

El rendimiento en la extracción de fructanos varió de acuerdo con la especie de agave. Del mesontle de *Agave angustifolia* se obtuvieron  $23.8 \pm 4.88$  % de fructanos de alto grado de polimerización (AALDP) y solamente  $1.4 \pm 0.08$  % de fructanos de bajo grado de polimerización (AASDP). En las plantas de *A. potatorum* el valor fue menor obteniendo solo un rendimiento del  $18.8 \pm 1.5$  % para fructanos de alto grado de polimerización (APLDP) y un rendimiento de  $1.2 \pm 0.45$ % para fructanos de bajo grado de polimerización (APSDP).

#### **VIII.1.2 Secado por aspersión**

Con fructanos de alto DP se obtuvo un polvo blanco no higroscópico, altamente soluble y con un rendimiento de  $190 - 200$  g de fructanos  $\text{Kg}^{-1}$  de *Agave angustifolia*. Los fructanos de alto DP de *A. potatorum* presentaron una mayor velocidad de secado bajo estas mismas condiciones y su rendimiento fué de  $170$  g de fructanos  $\text{Kg}^{-1}$ . de agave. De los resultados del secado por aspersión se encontró que el contenido de humedad fué menor a mayor temperatura ocasionando una mayor transferencia de calor hacia la gota y por tanto incrementó la velocidad de secado.

Con las condiciones de secado utilizadas no hubo depósito de la emulsión en las paredes del secador y el tiempo de residencia de las partículas en la cámara de secado fue suficiente para permitir un secado homogéneo obteniendo un polvo altamente soluble no higroscópico. Las condiciones de secado por aspersión que se determinaron hicieron un proceso eficiente y de alta calidad ya que la gota de agua formada al asperjar el producto fue secada instantáneamente conservando

sus características organolépticas.

### VIII.1.2.1. Características fisicoquímicas de los fructanos en polvo

Las características fisicoquímicas de los fructanos secados por aspersión de ambas especies de agave son mostradas en la **Tabla 4**. El rango de humedad de los fructanos secados por aspersión fue de 1.44–1.88% es decir menor a 2% lo cual le confiere alta estabilidad, lo que se ve reflejada en el valor obtenido de actividad acuosa ( $A_w$ ) que fué de 0.25 la máxima.

**Tabla 4.** Características fisicoquímicas de las agavinas secadas por aspersión.

Parámetro	AALDP	AASDP	APLDP	APSDP
Contenido de humedad (%)	1.86 ± 0.04	1.44 ± 0.02	1.88 ± 0.04	1.54 ± 0.02
pH	4.51 ± 0.08	4.65 ± 0.04	4.75 ± 0.08	4.80 ± 0.04
Color				
L*	85.88 <sup>a</sup> ± 19.34	82.96 <sup>b</sup> ± 24.93	80.62 <sup>b</sup> ± 19.34	78.96 <sup>b</sup> ± 8.92
a*	0.21 <sup>b</sup> ± 0.02	1.72 <sup>b</sup> ± 0.06	5.21 <sup>b</sup> ± 0.02	8.72 <sup>c</sup> ± 0.06
b*	7.84 <sup>a</sup> ± 1.48	8.76 <sup>a</sup> ± 1.20	12.84 <sup>b</sup> ± 1.48	18.76 <sup>c</sup> ± 2.20
Densidad (g mL <sup>-1</sup> )	0.50 <sup>b</sup> ± 0.00	0.80 <sup>a</sup> ± 0.09	0.46 <sup>b</sup> ± 0.05	0.78 <sup>a</sup> ± 0.09
Solubilidad (%)	95.30 ± 1.20	90.30 ± 0.80	95.30 ± 1.20	90.90 ± 0.80
Actividad acuosa ( $A_w$ )	0.20	0.25	0.21	0.22
Azúcares reductores (mg g <sup>-1</sup> )	20.02 <sup>b</sup> ± 3.00	40.02 <sup>a</sup> ± 5.00	28.02 <sup>b</sup> ± 3.0	49.02 <sup>a</sup> ± 5.00
Fructosa (mg g <sup>-1</sup> )	681.25 <sup>a</sup> ± 20.00	267.25 <sup>c</sup> ± 20.00	490.25 <sup>b</sup> ± 20.00	267.25 <sup>c</sup> ± 20.00

Fructanos de alto DP de *Agave angustifolia* (AALDP); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (AASDP); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (APLDP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum* (APSDP). Valores con diferente letra son diferentes significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

El incremento de temperatura del aire de secado aumentó el tamaño de partícula, el tiempo promedio de humectabilidad y disminuyó la densidad y el contenido de humedad del polvo por lo que se obtuvo una densidad aparente promedio de  $0.46 \pm 0.007$  g mL<sup>-1</sup> y un rendimiento de 170 g de agavinas de alto DP Kg<sup>-1</sup> de mesontle con un contenido de fructanos de 80%. Las agavinas de bajo DP fueron más densas con valores de  $0.78 \pm 0.04$  g mL<sup>-1</sup>. Desde el punto de vista organoléptico las

agavinas de alto DP fueron blancas con valores de luminosidad en escala Hunter Lab de 85.88 como máxima para *A. angustifolia*, sin olor, sabor y con un 95% de solubilidad en agua. Las agavinas de bajo DP de ambas especies fueron higroscópicas, ligeramente más densas, solubles y ligeramente más dulces que los fructanos de alto DP. Las agavinas almacenadas en bolsas trilaminadas no presentaron crecimiento bacteriano, hongos o levaduras durante su almacenamiento, y el contenido de humedad incrementó solo a  $2.59 \pm 0.6\%$  después de 2 años de almacenamiento.

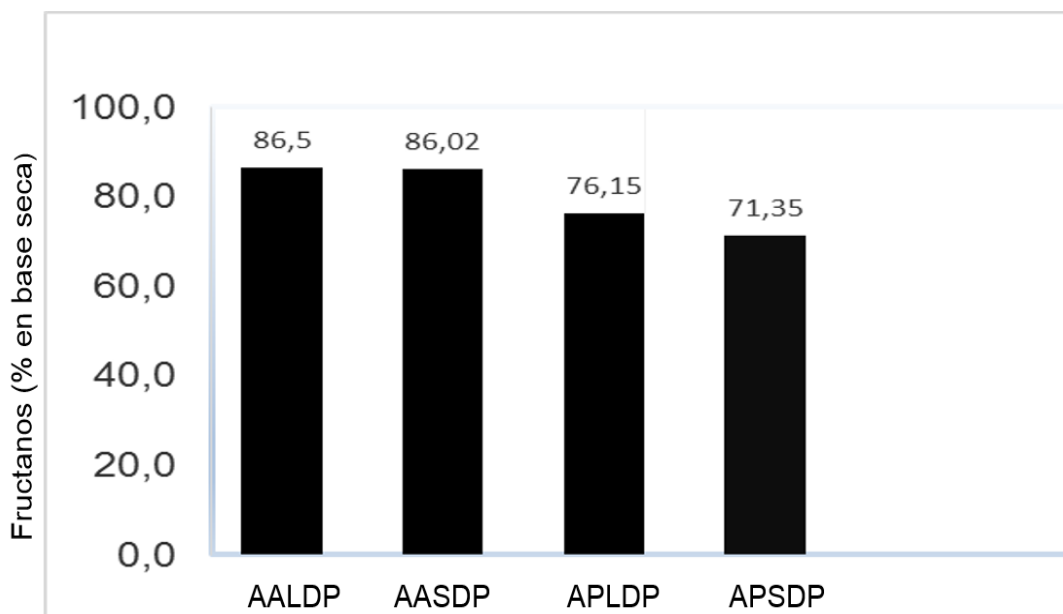
### VIII.1.3 Contenido de fructanos

El contenido de fructanos en las dos especies de agave se encontraron en un rango de 700-800 mg/g de polvo lo que corresponde de 70 a 80% del total de carbohidratos extraídos (**Figura 17**). *Agave potatorum* tuvo 12% menos de fructanos de alto DP en comparación con los fructanos de *A. angustifolia*. La concentración de fructanos de bajo DP en *Agave potatorum* fué 17% menos que en *A. angustifolia*. No obstante estas diferencias, la concentración de fructanos de alto DP en ambas especies fué similar con lo descrito por Mancilla-Margalli & López (2006) en donde se reporta una concentración de fructanos mayor a 700 mg/g de tejido en plantas de *A. tequilana* Weber var. Azul (Jalisco) entre 6 y 8 años de edad.

Desde el punto de vista bioquímico, se ha mostrado que las temperaturas nocturnas frescas favorecen la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en plantas CAM y aunado a una disminución de la transpiración, hay una mayor asimilación de carbono (Pimienta-Barrios *et al.* 2006), esto podría explicar porque *A. angustifolia* tuvo mayor concentración de fructanos. Siendo la temperatura entre la dos zonas de producción de *A. angustifolia* y *A. potatorum* la característica más contrastante, de ahí que puede ser la temperatura y la especie los parámetros que pueden influir en el contenido de carbohidratos como se ha reportado en otras especies que acumulan fructanos en función de las condiciones abióticas (Pimienta-Barrios *et al.* 2006) por lo tanto, esto sugiere realizar estudios paralelos evaluando las



condiciones abióticas y su relación con la producción de fructanos en otras especies de agave de la entidad.



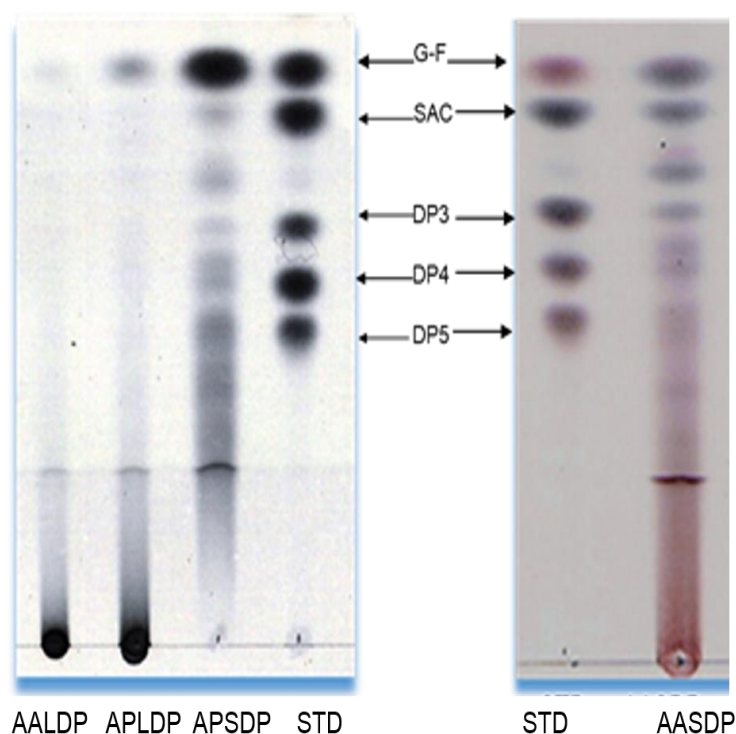
**Figura 17.** Contenido de fructanos de alto y bajo grado de polimerización en *Agave angustifolia* y en *A. potatorum*.

## VIII.2. CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE *Agave angustifolia* y *A. potatorum*

### VIII.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

El perfil cromatográfico (**Figura 18**) de los fructanos de alto DP de *A. angustifolia* mostró una mayor proporción de fructanos de alto DP que *A. potatorum* (APLDP), ésto únicamente basado en la intensidad de la mancha en el origen de la aplicación de la muestra. APSDP mostró una mayor cantidad de fructooligosacaridos comparado con AALDP quién presentó además de los fructooligosacaridos mayor intensidad de la mancha en la base. En todos los casos la intensidad de la mancha se relacionó con el factor de retención (Fr), la abundancia y tipo de carbohidrato, en donde la glucosa (Fr = 0.62 con color azul), fructosa (Fr = 0.62 con color rojizo) y sacarosa (Fr = 0.56 color café) se

identificaron en todas las muestras independientemente de la especie y grado de polimerización y fueron identificados por análisis comparativo con una mezcla de estándares glucosa, G; fructosa, F; sacarosa, S; 1-kestosa (DP3), 1K; nistosa (DP4), 1N y DP5.



**Figura 18.** Cromatografía de capa fina de los fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (AALDP); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (AASDP); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (APLDP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*, (APSDP); (STD) estándar. G, glucosa; F, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-kestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.

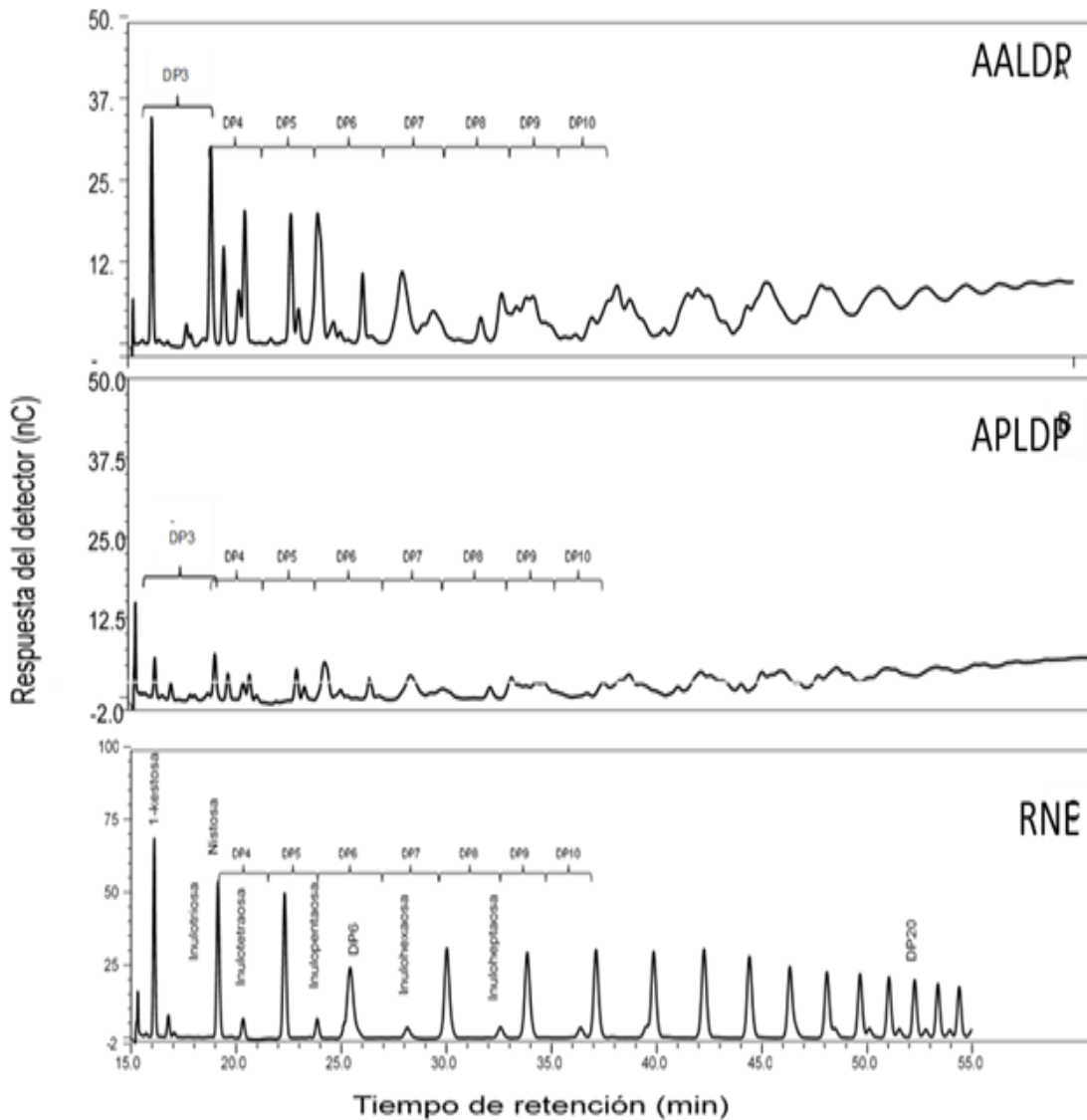
Todos los carbohidratos que se observan por debajo de la sacarosa corresponden a fructanos de bajo DP, mientras aquellas manchas observadas en la línea base de la TLC corresponden a fructanos con  $DP \geq 20$ . Como se puede ver en las dos especies de agave en los fructanos de bajo grado de polimerización, se presentaron: glucosa, fructosa, sacarosa, fructooligosacaridos (1-kestosa, 1-nistosa y DP5), identificándose la neokestosa (6G-Kes), caracterizada por una señal entre la sacarosa (S) y 1K (DP3). De acuerdo a TLC similares, se ha establecido que la serie de los neofructanos (con glucosa interna) presentan valores de Rf mayor a la serie de inulina con el mismo DP (Cairns *et al.* 1993,

López *et al.* 2003), por lo que debe corresponder a la 6G-Kes, molécula que caracteriza a los miembros de las Asparagales (espárrago y cebolla).

### **VIII.2.2. HPAEC-PAD de fructanos de plantas de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*.**

El perfil cromatográfico de los fructanos de alto DP de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* (**Figura 19**) fueron mas complejos comparados con los fructanos lineales (raftiline), en las agavinas se observa la presencia de la serie inulina como la inulotriosa (F3), además de la presencia dominante de los neofructanos, identificados por la presencia de una unidad interna de Glc (i-a-D-Glcp) es decir, la 1-Kes y la Neokestosa son los fructanos más abundante de esta serie (DP3); mientras que para los neofructanos superiores (DP4, D5 y DP6) hay diferentes isómeros además de las inulinas como lo reportado para *A. tequilana* (Mancilla-Margalli & López, 2006, Mellado-Mojica & López, 2012).

Fructanos de alto DP de *Agave potatorum* mostraron casi el mismo perfil cromatográfico con menor abundancia en 1-Kestosa y neokestosa y en general menor abundancia relativa en los fructooligosacáridos que en *A. angustifolia*. Además se observaron otros picos con tiempos de retención mayores pertenecientes a fructanos de mayor DP las cuales se vuelven mas anchos y menos diferenciados sugiriendo la presencia de una mezcla de isómeros, por lo que se torna mas difícil la separación e identificación de cada uno de ellos.



**Figura 19.** Perfil HPAEC-PAD de fructanos de alto grado de polimerización de *Agave angustifolia*, AALDP; *A. potatorum*, APLDP y raftiline (RNE).

En todos los casos los fructanos y sus isómeros se identificaron de acuerdo a la elución y al tiempo de retención (tr) descritos por Mellado Mojica & López (2012) mediante el análisis comparativo del tiempo de retención (tr) entre, 16.05 y 25.37 min (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Carbohidratos identificados en los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* mediante HPAEC-PAD.

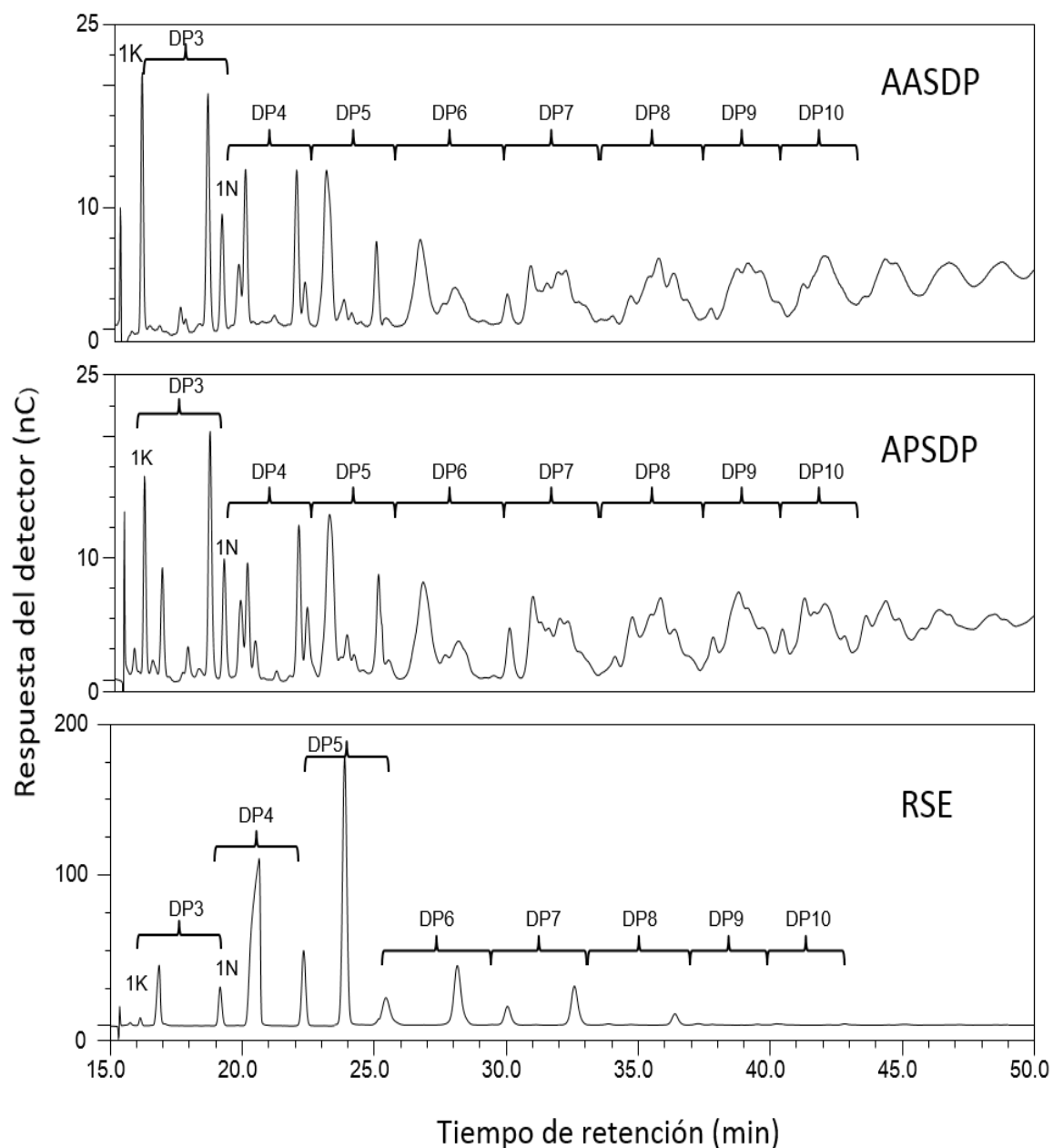
Tr <sup>a</sup>	Nomenclatura	Carbohidrato	DP <sup>b</sup>
6.83	G	Glucosa	1
7.92	F	Fructosa	1
12.68	S	Sacarosa	2
16.05	1K	1-Kestosa	3
16.73	F3	Inulotriosa	3
17.70	6K	6-Kestosa	3
18.53	NK	Neokestosa	3
19.07	1N	1-Nistosa	4
19.68	B	Bifurcosa	4
19.92	4c	Neonistosa	4
20.23	F4	Inulotetraosa	4
21.03	6n	6-Nistosa	4
21.87	4B	Neonistosa	4
22.20	Dp5	1-Fructofuranosilnistosa	5
23.02	5C	Neopentaosa	5
23.97	F5	Inulopentaosa	5
25.37	DP6	DP6	6

Tr<sup>a</sup>, tiempo de retención en HPAEC-PAD; DP<sup>b</sup>, grado de polimerización (Mellado-Mojica & López, 2012)

El perfil cromatográfico de AASDP y APSDP muestra también la presencia dominante de neofructanos. APSDP muestra mayor número de isómeros en los fructanos de DP3 que los fructanos SDP de *A.angustifolia* (**Figura 19**). Se encontró igual que en fructanos de alto DP de ambas especies de agave que las señales pertenecientes a fructanos DP  $\geq$  6 se vuelven anchas y poco resueltas. Probablemente, estos picos anchos y pocos definidos son debidos a moléculas con enlaces  $\beta$  (2-6) o a unidades ramificadas, tal como se ha reportado en otras plantas de agave (Mancilla-Margalli & López, 2006; Mellado-Mojica & López, 2012).

El análisis de la distribución y perfil de los fructanos AALDP y AASDP mediante HPAEC-PAD mostró que la diferencia en los fructanos almacenados en ellos son principalmente cuantitativos y no cualitativos pues no existen picos diferenciales entre los grados de polimerización; pero si entre especies ya que los picos identificados en *Agave potatorum* presentaron un mayor número de isómeros en DP3-DP5 que *A. angustifolia*. No obstante, la cuantificación de los fructooligosacaridos mostró que independientemente de la especie y del DP la 1-kestosa (1K) y la neokestosa (NK) fueron los fructanos más abundantes seguido

de la neonitosa. De los resultados se ve que la 1-kestosa se encuentra 10 veces más en AALDP que en APLDP y que la 1-Nitosa es cuatro veces más abundante en los fructanos de alto y bajo DP de *A. angustifolia* que los fructanos de *A. potatorum*.

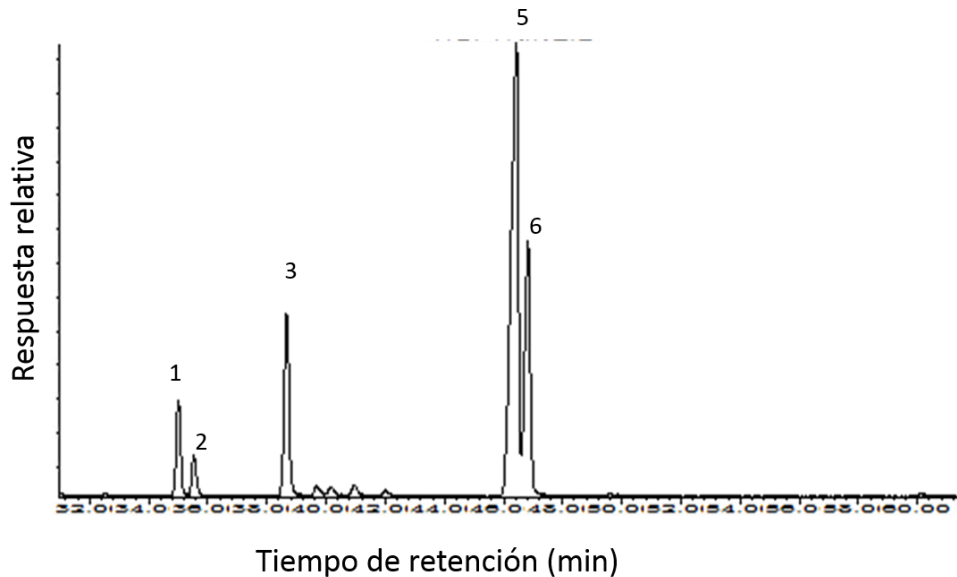


**Figura 20.** Perfil HPAEC-PAD de fructanos de bajo grado de polimerización de *Agave angustifolia*, AALDP; *A. potatorum*, APLDP y raftilosa (RSE).

El perfil cromatográfico de raftilosa (RSE) mostró que está constituido de dos tipos de fructanos (Fn y GFn) con el mismo DP (isómeros) con mayor abundancia de fructanos de la serie Fn (fructanos que carecen de una unidad de glucosa terminal) dentro de los cuales se encuentra la inulotriosa (F3), Inulotetraosa (F4) e Inulopentaosa (F5). Por el contrario ratiline (RNE) mostró mayor abundancia en fructanos de la serie GFn (1K, 1N, DP5, etc.). La comparación con estos perfiles corroboraron que los carbohidratos de agave no son inulinas sino una mezcla de fructanos los cuales además están constituidos por varios isómeros, con enlaces glicosídicos diferentes. La cromatografía de alta resolución HPAEC fué el método de elección para la visualización de la distribución de fructanos presentes en agave ya que ésta herramienta no solo permitió la separación de las diferentes series de fructanos (inulinas, levanos y neofructanos), sino que además, fué posible distinguir isómeros, como las kestotriosas (1-Kes, 6-Kes y 6-GKes) (Shiomi *et al.* 1991; Mellado-Mojica & López, 2012).

### **VIII.2.3. Análisis de enlaces por derivatización a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) de fructanos de plantas de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*.**

En el análisis por GC-MS de los derivados de fructanos a alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* de alto DP en la determinación de sus enlaces químicos, se observaron diferencias en el número de picos y compuestos con respecto a raftiline (RNE) como se observa en la **Figura 21**.



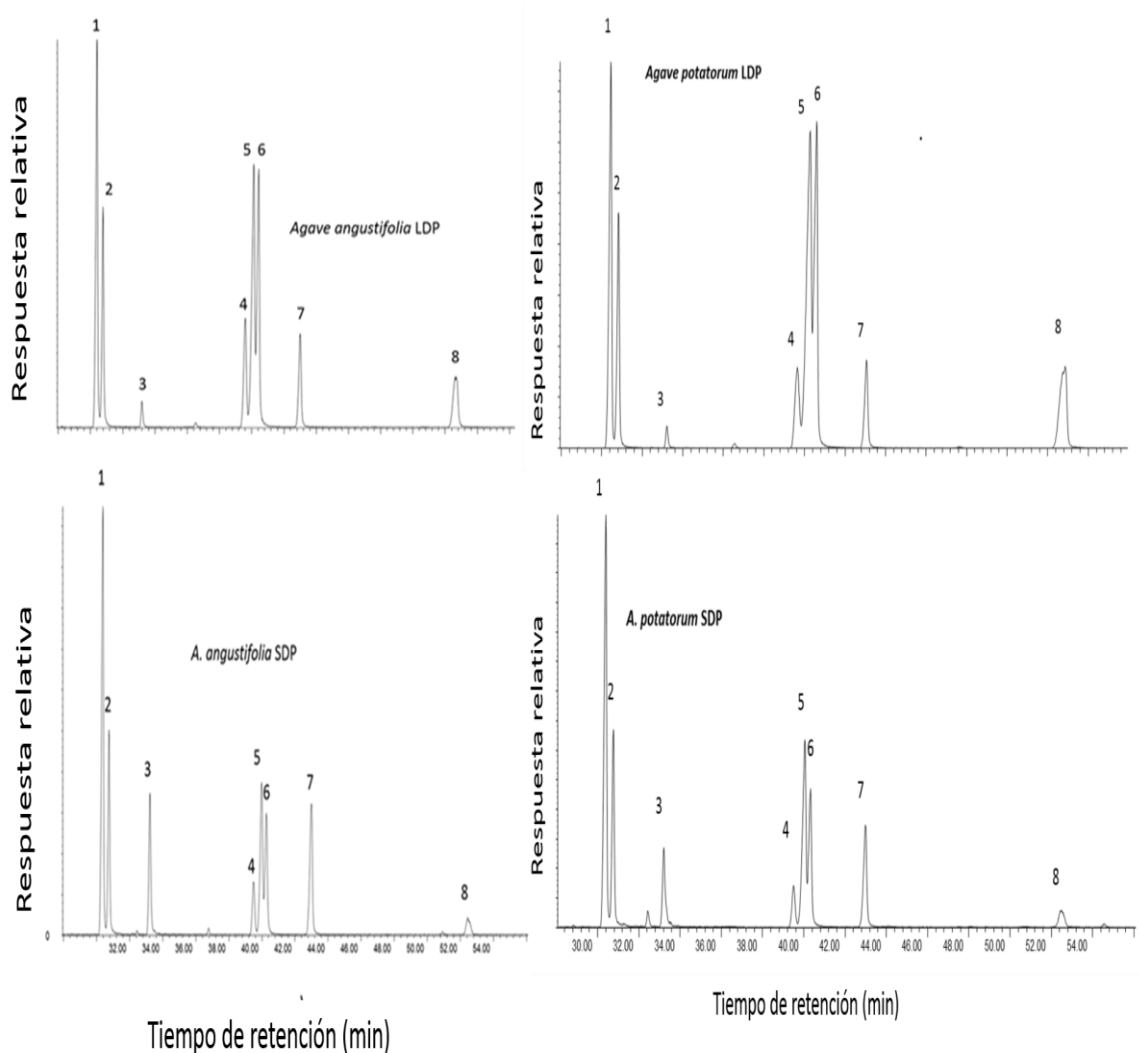
**Figura 21.** Perfil de elución de de fructanos derivados a alditol, acetatos parcialmente metilados de raftiline (RNE)

En los perfiles cromatográficos de los PMAAs de fructanos de alto y bajo DP de ambas especies (**Figura 22**) se observó el mismo número y tipo de compuestos correspondientes a los derivados glicosídicos (picos); los picos 1 y 2 correspondieron a: 2,5 Di-Oacetil-2 -deuterio-1, 3, 4, 6-tetra-O-metil-D-manitol y 2,5 Di-O-acetil-2-deuterio-1, 3, 4, 6-tetra-O-metilD-glucitol, derivados de la reducción de la fructosa terminal presente en los fructanos ( $\beta$ -D-Fruc-t), el pico 3 correspondió a la unidad terminal de  $\alpha$ -D-Glucopiranososa ( $\alpha$ -D-Gluc-t): 1,5-Di-O-acetil-(1-deuterio)-2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-glucitol. El fragmento base de esta molécula es  $m/z$  101, a diferencia del fragmento base  $m/z$  129, característico de los residuos de Fru.

El pico 4 se identificó como un derivado correspondiente a la configuración manitol del derivado  $\beta$  (2-6)- D- fructofuranosa: 2, 5, 6-Tri-O acetil-(2-deuterio)-1, 3, 4-tri-O-metil-manitol. Este pico representa los enlaces  $\beta$  (2-6); éste enlace es el que se encuentra en mayor abundancia en los fructanos AALDP, el pico 5 indica la presencia de enlaces  $\beta$  (2-1), dados por el compuesto 1, 2, 5 –Tri-O-acetil-(2-deuterio)-3, 4, 6-tri-O-metil-manitol. No se evidenció la separación del epímero glucitol, por lo que el pico 6 contiene las configuraciones glucitol para ambos tipos



de enlaces: 2, 5, 6-Tri-O-acetil-(2-deuterio)-1, 3, 4-tri-O-metil-glucitol + 1, 2, 5-Tri-O-acetil-(2-deuterio)-3, 4, 6-tri-O-metilglucitol, los cuales indican una cantidad importante de enlaces  $\beta$  (2-1) (compuesto 5,6) para APLDP; el pico 7 en estos cromatogramas confirma la presencia de neofructanos por la presencia de una glucosa interna: 1,5,6-Tri-Oacetil-(1-deuterio)-2,3,4-tri-O-metil-glucitol y el pico 8 corresponde a las ramificaciones 1, 2,5,6-Tetra-O-acetil (2-deuterio)-3,4-di-O-metil-hexitol (-glucitol y-manitol) las cuales son de mayor abundancia para fructanos de alto DP de ambas especies de agave.



**Figura 22.** Perfil de elución de fructanos derivados a alditol, acetatos parcialmente metilados de los fructanos secados por aspersión El nombre específico y tiempo de retención (min) de cada PMAA se enlistan en la Tabla 6.

La identidad de cada compuesto generado en el espectrómetro de masas se determinó usando el criterio establecido por Mancilla-Margalli & López (2006) mediante un análisis comparativo de los patrones de fragmentación generado por impacto de electrones en espectrometría de masas, la **Tabla 6** describe el orden de elución de cada derivado (pico) así como el tipo de enlace que corresponde a cada uno de éstos.

A partir de los perfiles cromatográficos de los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* (**Figura 22**) se puede decir que en estas plantas existe la presencia de una glucosa interna, característica del tipo de los neofructanos, enlaces  $\beta$  (2-1) y, en menor cantidad, enlaces  $\beta$  (2-6). También se corroboró la presencia de ramificaciones presentando mayor abundancia relativa en los fructanos de agave de alto DP. Los resultados obtenidos demuestran la complejidad estructural de estos compuestos, que es característica de la familia Agavaceae, encontrando los mismos enlaces de los fructanos reportados por (López *et al.* 2003; Mancilla-Margalli & López 2006; Mellado Mojica & López, 2012) en *Agave tequilana* Weber var. Azul.

**Tabla 6.** Alditol acetatos parcialmente metilados (PMAAs) identificados en los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*

Pico	Tr	Compuesto derivado	Tipo de enlace
1	31.2	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol	$\beta$ -D-Fruf-t
2	31.8	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol	$\beta$ -D-Fruf-t
3	34.0	1,5-Di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol	$\alpha$ -D-Glcp-t
4	40.5	2,5,6-Tri-O-acetil-1,3,4-tri-O-metilmanitol	(2-6)- $\beta$ -D-Fruft
5	40.8	1,2,5-Tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metilmanitol	(2-1)- $\beta$ -D-Fruft
6	41.2	1,2,5-Tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metilglucitol	(2-1)/(2-6)- $\beta$ -D-Fruf
7	44.0	1,5,6-Tri-O-acetil-2,3,4-Trio-O-metilglucitol	$\alpha$ -D-Glcp-i
8	53.6	1,2,5,6-Tetra-O-acetil-3,4-di-O-metilhexitol	1,6-di- $\beta$ -D-Fruft

Pico: Numero de pico de acuerdo a la orden de elución; Tr: tiempo de retención (min) en columna HP5; Tipo de enlace: i-, interna, t-, terminal.

La proporción molar de los productos derivados mostraron diferentes tendencias de acuerdo a la especie y al grado de polimerización, en el caso de los productos correspondientes a las ramificaciones, los enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6) se observó un incremento al ser fructanos de alto DP. Los PMAA correspondientes a la glucosa interna (i-Glucosa), glucosa terminal (t-Glucosa) se mantuvieron constantes y la fructosa terminal (t-Fructosa) incrementó linealmente con el grado de polimerización.

Una vez que se analizó la contribución molar de cada producto derivatizado (**Tabla 7**) y tomando como base que cada molécula de fructano posee una molécula de glucosa ( $\alpha$ -D-glucopiranososa interna o externa), se pueden establecer diferencias reales en la composición de los enlaces glicosídicos que presentan los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* de acuerdo a la especie y grado de polimerización, por ejemplo, existe un incremento en el grado de polimerización (DP) de los fructanos almacenados en plantas de *A. angustifolia* de 8 años con un grado de polimerización promedio 29-33, valor ligeramente mayor al reportado para *A. tequilana* de 6-7 años (DP18-DP28) (López *et al.* 2003; Mancilla-Margalli & López, 2006; Mellado-Mojica & López, 2012).

De manera similar a lo descrito por Mancilla-Margalli & López (2006), se encontró que independientemente de la edad, de la especie y del grado de polimerización *A. angustifolia* y *A. potatorum* almacena 2 tipos de fructanos: graminanos y neofructanos ramificados (agavinas). Se observó que en los fructanos de bajo DP, la presencia de ramificaciones fue menor, ya que de acuerdo al DP promedio los graminanos y agavinas pueden estar o no ramificaciones.

**Tabla 7.** Contribución cuantitativa (porcentaje por mol) de los PMAAs derivatizados en fructanos en *A. angustifolia* y *A. potatorum*. de alto y bajo DP

	DP	$\alpha$ -D-Glcp- <i>t</i>	$\alpha$ -D-Glcp- <i>i</i>	$\beta$ -D-Fruf- <i>t</i>	(2-6)- $\beta$ -D-Fruft	(2-1)- $\beta$ -D-Fruft	1,6-di- $\beta$ -D-Fruft
1	29.92±2.1	0.22±0.1	0.72±0.2	11.05±2.2	7.32±1.2	7.22±1.2	3.33±0.8
2	20.70±3.0	0.22±0.1	0.79±0.1	7.26±1.8	1.15±0.6	9.00±1.8	2.29±0.6
3	12.29±1.8	0.34±0.1	0.66±0.2	6.35±1.0	0.79±0.4	3.34±0.6	0.81±0.4
4	9.17±1.0	0,30±0.1	0.70±0.1	3.94±1.2	0.63±0.2	3.03±0.8	0.56±0.2

1, AALDP; 2, APLDP; 3, AASDP; 4, APSDP; DP: Grado de polimerización estimado; t-Gluc: glucosa terminal; i-Gluc: glucosa interna

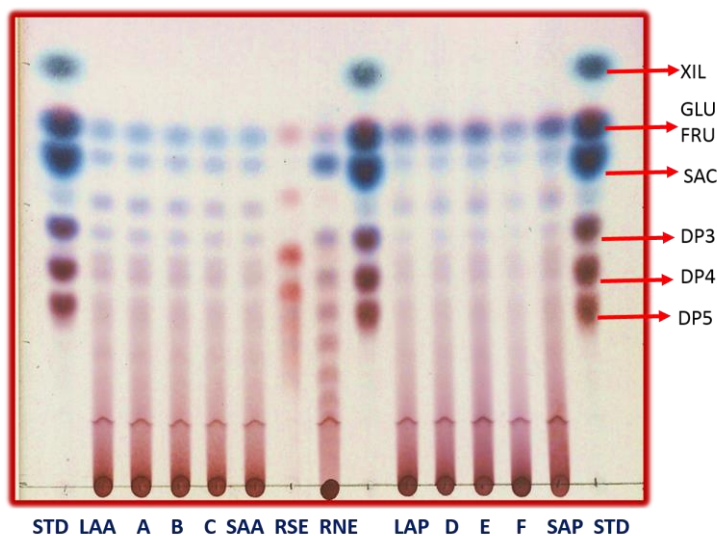
Las ramificaciones fueron más evidentes en los fructanos de alto DP; lo cual concuerda con los datos obtenidos de las unidades de fructosa terminal (*t*- $\beta$ -D-Fruft) pues los fructanos con mayor número de moléculas ramificadas exhiben también la proporción más alta de fructosa terminales. La información recopilada permitió establecer relaciones importantes entre los enlaces glicosídicos que conforman los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* de alto y bajo DP (**Tabla 8**). El análisis de la información mostró que la relación agavinas/graminanos aumentó con el grado de polimerización presentando una proporción de 3 agavinas/1 graminano y los fructanos de bajo DP almacenaron agavinas en una proporción 2 agavinas/1 graminano.

**Tabla 8.** Correlación entre los diferentes enlaces glicosídicos identificados en fructanos de alto y bajo DP de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*

Fructanos	Agavinas/Graminanos	$\beta$ (2-1)/ $\beta$ (2-6)	Frecuencia de ramificación
AALDP	3.22±1.5	0.99±0.6	4.13±1.2
APLDP	3.50±1.2	7.80±1.0	4.40±1.1
AASDP	1.94±0.6	5.49±1.5	2.89±1.2
APSDP	2.33±1.0	4.76±1.2	3.10±0.5

### VIII.3 EFECTO PREBIÓTICO DE LOS FRUCTANOS DE *Agave angustifolia* Haw. y *Agave potatorum* Zucc.

Después de obtener el perfil cromatográfico de los diferentes fructanos y sus mezclas (Figura 23), se analizó su efecto prebiótico *in vitro* utilizando bacterias probióticas, tanto del género *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, en donde se pudieron observar diferentes efectos en la estimulación del crecimiento de ambos géneros bacterianos.



**Figura 23.** Cromatografía de capa fina de los fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A =75% LAA + 25% SAA; B =50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia*; raftilosa (RSE); raftiline (RNE); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D =75% LAP + 25% SAP; E =50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); (STD) estándar. Xil, xilosa; Glu, glucosa; Fru, Fructosa, Sac, sacarosa; DP3, 1-cestosa; DP4, nistosa; DP5, fructosil-nistosa.

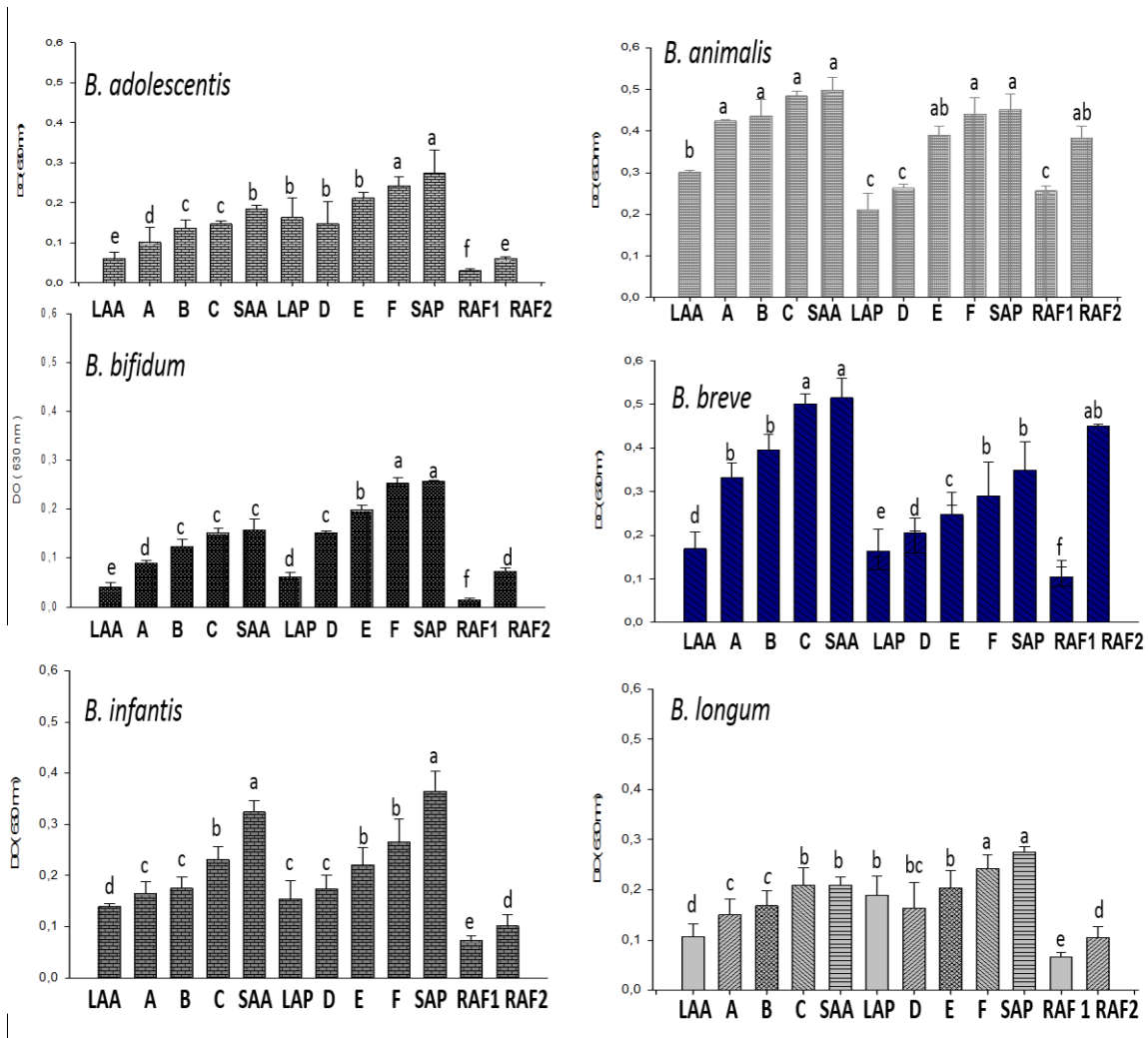
#### VIII.3.1. Efecto de fructanos de alto grado de polimerización sobre el crecimiento de *Bifidobacteria*

En general el medio suplementado con fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* mostraron el mejor crecimiento de *Bifidobacterias* independientemente de la especie **Figura 24**. *B. animalis* tuvo un mayor crecimiento ( $DO_{630} = 0.301$ ) con los fructanos de agave de alto DP de *A. angustifolia* (LAA) comparada con la de *B. breve* y *B. infantis* quienes tuvieron valores de 0.168. Valores de crecimiento ligeramente menores se observaron para *Bifidobacterium longum*, *B. adolescentis*

y *B. bifidum* quienes casi no utilizaron LAA. Por el contrario fructanos de agave de alto DP de *A. potatorum* (LAP) fueron mejores fuentes de prebióticos para *B. adolescentis* y *B. infantis*. También se observó que LAP no mostró diferencia significativa con los fructanos comerciales de alto DP (RNE) en *B. animalis* y *B. breve*.

### **VIII.3. 2 Efecto de los fructanos de bajo grado de polimerización.**

La mejor fuente prebiótica de los fructanos de bajo grado de polimerización fue SAA quien mostró el mayor crecimiento para *B. animalis* y *B. breve* (**Figura 24**) donde el crecimiento de estas especies fue mayor significativamente y 3.2 veces más que para *B. bifidum*, siendo ésta especie una de las bacterias con la producción de biomasa más baja en SAA. Con respecto a los fructanos de *A. potatorum* la mejor fuente de prebiótico fue SAP y no mostró diferencia significativa con SAA en *B. infantis*. SAA y SAP mostraron diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) con Raftilosa (RAF2) en *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis* y *B. longum*.



**Figura 24.** Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de bifidobacterias incubados anaerobicamente por 20 h en MSR conteniendo 10 g/L de fructanos. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Densidad óptica, DO. Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raitiline, (RAF1); raitilosa, (RAF2).

### VIII.3.3 Mezclas

El crecimiento de Bifidobacteria en las mezclas de fructanos de diferente grado de polimerización después de 20 horas también se muestra en la **Figura 24**. De los resultados se encontró que la mejor fuente prebiótica de las mezclas fue C (25% de fructanos de alto DP y 75% fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* en *B.animalis* y *B. breve*. *Bifidobacterium animalis* no mostró diferencia significativa

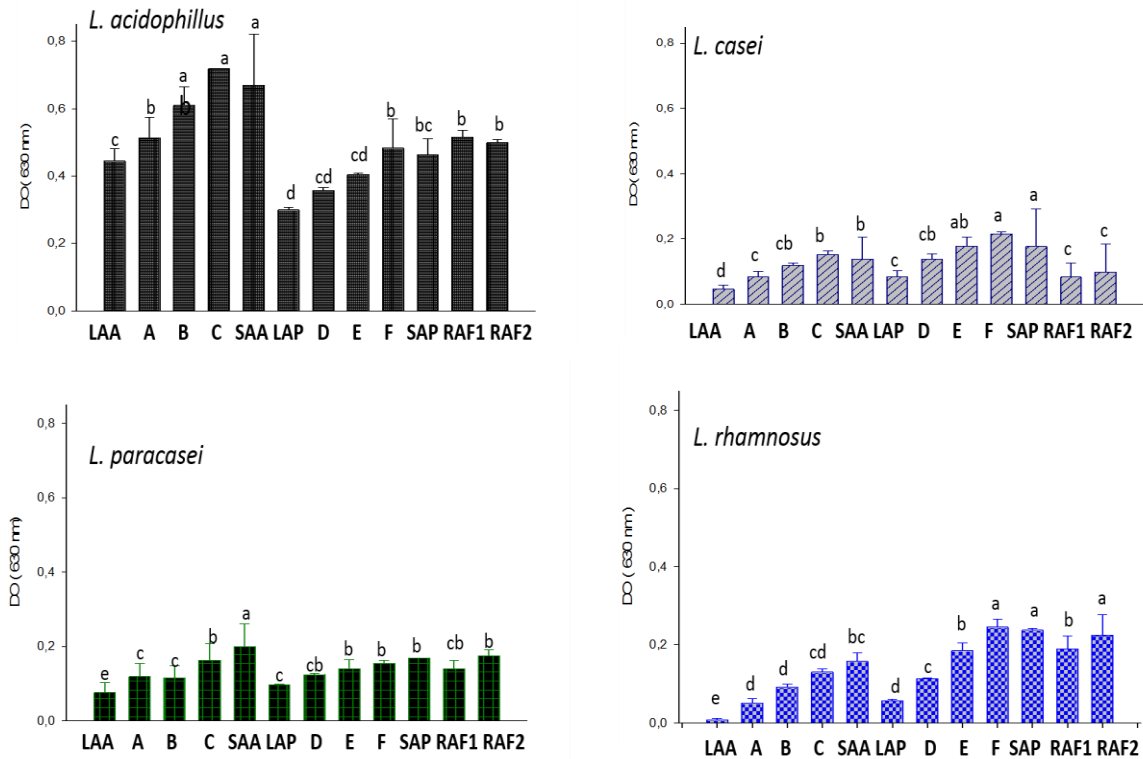
entre las mezclas C, A y B, observándose una velocidad de crecimiento similar a la obtenida en SAA, esto indica que *B. animalis* crece mejor en las agavinas que en las inulinas comerciales independientemente del grado de polimerización; no se observaron diferencias significativas entre la mezcla C y SAA en *B. breve*, es decir hubo mayor crecimiento a mayor contenido de fructanos de bajo grado de polimerización en la mezcla. *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum* mostraron la misma tendencia es decir, mayor crecimiento a mayor contenido de fructanos de abajo DP, pero con valores menores de DO.

Con respecto al crecimiento de Bifidobacterias en las mezclas de fructanos de *A. potatorum*, se observa que casi en todas las cepas excepto para *B. infantis*, no hubo diferencia significativa entre la mezcla F (25% de fructanos de alto DP y 75% de fructanos de bajo DP de *A. potatorum*) y la DO obtenida con los fructanos de bajo DP (SAP). *B. adolescentis*, *B. bifidum* y *B. longum* mostraron valores mas bajos significativamente ( $P \leq 0.05$ ) con la mezcla C que con la mezcla F. La mezcla F no mostró diferencia significativa respecto a la mezcla C y su crecimiento fue similar a la obtenida en SAP en *B. animalis*, la mezcla E fue la segunda mejor fuente prebiótica de las mezclas en fructanos de *A. potatorum* y no mostró diferencia significativa con F en *B. breve* y *B. longum*.

#### **VIII.3.4 Efecto de fructanos de diferentes grado de polimerización sobre el crecimiento de Lactobacilli.**

El crecimiento de Lactobacilli en los fructanos de *Agave angustifolia* nuevamente fueron los mejores prebióticos, con una mayor estimulación del crecimiento de *L.acidophilus* (**Figura 25**).





**Figura 25.** Efecto de diferentes fructanos en el crecimiento de lactobacilli incubados anaerobicamente por 20 h en MSR conteniendo 10 g/L de fructanos. Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Densidad óptica, DO. Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raftiline (RAF1); raftilosa (RAF2).

El crecimiento de *L. acidophilus* en SAA (DO = 0.770) fue significativamente mayor ( $P \leq 0.01$ ) que el obtenido para *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (DO = 0.173); la mezcla C fue mejor sustrato que las mezclas A y B en las cuatro cepas de Lactobacilli evaluadas. SAP y F fueron los mejores prebióticos en *L. casei* y *L. rhamnosus*. SAP no fue significativamente diferente a C y F con *L. paracasei*. Con *L. rhamnosus* SAP y F fueron prebióticos similares a RAF2.

En este trabajo, SAA con valores de DP de 3 a 12 y SAP de 3 a 9 (ver tabla 7), estimularon mejor el crecimiento de ambos géneros bacterianos. También se observó que el grado de polimerización de las mezclas tuvo un efecto altamente

significativo ( $P \leq 0.001$ ) sobre el crecimiento, ya que a mayor cantidad de fructanos de cadena corta mayor crecimiento de microorganismos. Un comportamiento similar se vió con RSE y RNE, siendo RSE una mezcla de fructooligosacáridos comparado con RNE; los resultados también mostraron que las Bifidobacterias fermentaron mejor las agavinas que las inulinas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por McKellar y Modler (1989), donde ellos mencionan que las fructosidasas de *Bifidobacterium* spp. fueron más activas contra fructanos de la serie *neo* y menos activas contra inulinas.

El crecimiento preferencial en fructanos de bajo DP observado en todas las cepas de Bifidobacteria, probablemente fue producto de la enzima  $\beta$ -fructosidasa en la hidrólisis de enlaces glicosídicos  $\beta$  (2-1). Los resultados con los fructanos de *A. potatorum* coincide con lo reportado por Imamura *et al.*, (1994) quienes demostraron que las fructosidasas de algunas cepas de bifidobacterias son más efectivas sobre fructanos de cadena corta, este grupo reportó también que la kestosa y la nistosa son rápidamente hidrolizadas por *B. infantis* y que *B. adolescentis* tiene una alta especificidad para kestosa comparada con la inulina o fructanos de cadena larga.

Se ha reportado también que la estructura de los carbohidratos y la especie bacteriana presente en el ecosistema son factores determinantes en el control de la fermentación de prebióticos (Cummings & Macfarlane, 2002). Palframan *et al.* (2003) mencionaron que Bifidobacteria difirió en los perfiles de fermentación cuando se probaron en diferentes carbohidratos; Van der Meulen *et al.* (2004) evaluaron el crecimiento de *B. animalis* en diferentes fuentes de energía, reportando un mayor crecimiento y producción de SCFAs con fructooligosacáridos, similar a los resultados encontrados en este trabajo.

De manera general, las bifidobacterias poseen actividad hidrolasa intracelular fructano-fructano  $\beta$  (2-1) haciendo que las moléculas de fructanos sean un sustrato eficiente (Roberfroid *et al.* 1998). Van der Meulen *et al.* (2004) sugirieron

que el metabolismo preferencial por fructanos de bajo DP puede ser debido a la presencia también de fosfotransferasas las cuales están reportadas para *B. breve* durante la hidrólisis de fructanos tipo inulina por diversos autores (Gibson & Wang, 1994b; Hopkins *et al.* 1998; Kaplan & Hutkins 2000; Biedrzycka & Bielecka 2003; Kim *et al.* 2003; Van der Meulen *et al.* 2004). Perrin *et al.* (2002) reportaron resultados similares para *B. infantis*, otros trabajos atribuyeron ésta alta especificidad a la actividad de la  $\beta$ -fructosidasa que hidroliza los enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6) encontrada en *B. adolescentis* encontrando una progresiva liberación de glucosa y fructosa lo que induce mayor actividad de esta enzima sintetizadas intracelularmente en esta cepa (Amaretti *et al.* 2006) y constitutivas para otras bifidobacterias como *B. adolescentis* y *B. longum* (Perrin, 2002).

Con respecto al crecimiento de Lactobacilli, los fructanos de *A. angustifolia* fueron los mejores prebióticos para *L. acidophilus* probablemente por que tienen  $\beta$ -fructosidasas quienes hidrolizan extracelularmente los fructanos de cadena larga y corta altamente ramificados liberando (FOS) y fructosa la cual entra a la célula para promover la fermentación. Kaplan & Hutkins (2000) reportaron que *L. acidophilus* no requieren de un período de inducción para usar fructanos, esto explicaría porque la diferencia que encontramos en el crecimiento de *B. acidophilus* con respecto a los otros *Lactobacillus*; en cambio *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* no usaron los fructanos tan efectivamente para incrementar biomasa, sugiriendo que además de fructosidasa requerieren un sistema de transporte dependiente de ATP para ingerir fructanos, como lo reportaron para *L. casei* y *L. paracasei* Kaplan & Hutkins, (2003).

En el presente trabajo, los fructanos con el DP más grande fueron las agavinas de *A. angustifolia* y *A. potatorum* de alto DP (29 y 20 respectivamente), ambas agavinas mostraron el menor efecto en la estimulación en el crecimiento bacteriano para todas las especies evaluadas (**Figuras 24 y 25**) en comparación con SAA, SAP o las mezclas. De manera general se observó que los fructanos de alto y bajo DP de *A. angustifolia* y *A. potatorum* estimularon el crecimiento de

Bifidobacteria y Lactobacilli mas eficientemente que las inulinas comerciales. También observamos que los fructanos de cadena corta influyeron altamente en la velocidad de la fermentación por las bacterias probióticas evaluadas en este trabajo.

La diferencia en el efecto prebiótico puede también ser explicado en base a la diversidad estructural que presentan los fructanos por ejemplo en *Agave potatorum* se encontró mayor diversidad en isómeros en DP3-DP5 y mayor número de enlaces  $\beta$  (2-6) que los fructanos de *A. angustifolia*. Estos resultados también coinciden con lo reportado por Mancilla-Margalli & López (2006) quienes reportaron que la concentración y DP de los fructanos de una planta de agave está relacionado con factores ambientales y las dos especies evaluadas en este trabajo fueron de diferente origen botánico por lo que presentaron un comportamiento diferente.

### **III.3.5.Efecto de la fermentación de fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum*.**

#### **VIII.3.5.1 Descenso del pH por efecto de las Bifidobacterias**

Otro parámetro importante durante la fermentación de fructanos fue el descenso del pH en el medio de crecimiento como una consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). En este trabajo, el mayor descenso de pH se observó con SAA y SAP en una relación directa con el crecimiento bacteriano. Con LAA el descenso de pH fue mayor en *B. animalis* y no mostró diferencias significativas con RNE. El descenso de pH para *B. adolescentis*, *B. breve* y *B. infantis* fue significativamente más alto ( $P \leq 0.5$ ) con SAA. Se encontró también que el descenso de pH en las mezclas fue proporcional a la concentración de fructanos de bajo grado de polimerización, por ejemplo *B. breve* y *B. bifidum* tuvieron una correlación con  $r^2 = 0.95$  entre el crecimiento y el descenso de pH (Tabla 9).

**Tabla 9.** Descenso de pH del medio de cultivo por efecto de la fermentación de fructanos por *B. adolescentis*, (BA); *B. animalis* (BAN), *B. bifidum*, (BBF) *B. breve*, (BBR); *B. infantis* (BI) y *B. longum* (BL).

Fructano	BA	BAN	BBF	BBR	BI	BL
LAA	0.58 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.92 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>c</sup>
A	0.47 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.89 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>c</sup>
B	0.48 ± 0.06 <sup>d</sup>	1.10 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>bc</sup>
C	0.65 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.68 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>b</sup>
SAA	0.98 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.07 <sup>a</sup>
LAP	0.45 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.63 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.63 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>c</sup>
D	0.87 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>b</sup>
E	0.71 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.08 <sup>b</sup>
F	0.95 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>b</sup>
SAP	0.99 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.07 <sup>a</sup>
RAF1	0.33 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>c</sup>
RAF2	0.76 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.69 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>b</sup>

El descenso de pH por la fermentación de fructanos se expresa como el pH al final de la fermentación menos el pH al inicio de la fermentación. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raftiline (RAF1); raftilosa (RAF2).

### VIII.3.5.2 Descenso del pH por efecto de Lactobacilli

Todos los fructanos mostraron una disminución significativa del pH con *L. acidophilus* en comparación con las inulinas comerciales; las mezclas C y F tuvieron un descenso de pH similar a SAA y SAP respectivamente con *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (**Tabla 10**). De estos resultados se puede concluir que a mayor crecimiento, mayor descenso de pH, lo que cuál se ha reportado que tiene efectos benéficos en la salud inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenicas (Gibson & Wang, 1994) e incrementando la absorción de minerales en el colon (García Vieyra *et al.* 2014).

**Tabla. 10.** Descenso de pH debido a la fermentación de fructanos por *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.

Fructano	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
LAA	2.16 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>b</sup>
A	2.31 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>b</sup>
B	2.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>
C	2.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>a</sup>
SAA	2.79 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.09 <sup>a</sup>
LAP	1.89 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.79 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.07 <sup>b</sup>
D	2.23 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.06 <sup>a</sup>
E	2.07 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.03 <sup>b</sup>
F	2.13 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.95 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.06 <sup>a</sup>
SAP	2.35 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.07 <sup>a</sup>
RAF1	1.68 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.81 ± 0.04 <sup>b</sup>
RAF2	1.80 ± 0.03 <sup>bcc</sup>	0.84 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.03 <sup>b</sup>

El descenso de pH por la fermentación de fructanos se expresa como el pH al final de la fermentación menos el pH al inicio de la fermentación. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raftiline (RAF1); raftilosa (RAF2).

### VIII.3.5.3 Producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

Las concentraciones de los SCFA de los diferentes fructanos se enlistan en la **Tabla 11** siendo acético, propiónico y láctico los ácidos detectados, los resultados muestran que la producción de ácido acético fue mayor significativamente con LAA en *B. infantis* y *B. longum*. *B. breve* tuvo un incremento en la producción de ácido acético cuando el substrato fue SAA. No se observó la producción de ácido láctico y propiónico durante la fermentación en cultivos con *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis* y *B. longum*. Los ácidos láctico y propiónico solo se produjeron con *B. breve* (5.89 y 18.4 mM, respectivamente) en la mezcla F y en SAA solo *B. bifidum* produjo ácido láctico (**Tabla 11**) como se observa las concentraciones de los ácidos variaron dependiendo de la fuente de carbono usado por las diferentes bacterias similar a lo reportado por Shene *et al.* (2005).

**Tabla 11.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) generados durante la fermentación de fructanos por *B. adolescentis*, BA; *B. animalis*, BAN; *B. bifidum*, BBF; *B. breve*, BBR; *B. infantis* BI y *B. longum* BL.

Fructanos	SCFAs	BA	BAN	BBF	BBR	BI	BL
LAA	Acético	60.94 <sup>a</sup>	58.33 <sup>a</sup>	45.41 <sup>bc</sup>	48.61 <sup>b</sup>	60.67 <sup>a</sup>	92.89 <sup>a</sup>
A	Acético	55.22 <sup>a</sup>	46.85 <sup>ab</sup>	47.09 <sup>abc</sup>	51.03 <sup>b</sup>	51.34 <sup>b</sup>	63.38 <sup>bc</sup>
B	Acético	53.02 <sup>a</sup>	45.49 <sup>ab</sup>	48.44 <sup>abc</sup>	54.17 <sup>b</sup>	58.04 <sup>b</sup>	57.47 <sup>c</sup>
C	Acético	54.73 <sup>a</sup>	56.75 <sup>a</sup>	46.37 <sup>abc</sup>	44.23 <sup>b</sup>	56.05 <sup>b</sup>	53.17 <sup>c</sup>
SAA	Acético	47.93 <sup>ab</sup>	54.27 <sup>ab</sup>	71.30 <sup>ab</sup>	54.77	45.49 <sup>c</sup>	59.91 <sup>a</sup>
	Láctico			3.95			
LAP	Acético	38.38 <sup>b</sup>	43.61 <sup>ab</sup>	53.65 <sup>b</sup>	84.86 <sup>b</sup>	57.83 <sup>b</sup>	55.11 <sup>b</sup>
D	Acético	63.89 <sup>ab</sup>	60.61 <sup>a</sup>	72.89 <sup>b</sup>	66.50 <sup>ab</sup>	74.98 <sup>a</sup>	21.56 <sup>c</sup>
E	Acético	63.39 <sup>ab</sup>	37.80 <sup>b</sup>	167.93 <sup>a</sup>	48.94 <sup>c</sup>	61.27 <sup>a</sup>	56.89 <sup>b</sup>
	Acético	93.38 <sup>a</sup>	38.90 <sup>b</sup>	39.42 <sup>c</sup>	45.17 <sup>c</sup>	46.32 <sup>b</sup>	44.19 <sup>a</sup>
F	Láctico				5.89		
	Propiónico				18.40		
SAP	Acético	51.80 <sup>ab</sup>	52.86 <sup>a</sup>	48.94 <sup>bc</sup>	57.00 <sup>c</sup>	47.84 <sup>b</sup>	61.60 <sup>a</sup>
RAF1	Acético	47.58 <sup>b</sup>	57.70 <sup>a</sup>	40.03 <sup>bc</sup>	105.58 <sup>a</sup>	53.32 <sup>ab</sup>	78.95 <sup>a</sup>
RAF2	Acético	27.00 <sup>c</sup>	32.10 <sup>b</sup>	64.73 <sup>b</sup>	91.90 <sup>a</sup>	67.80 <sup>a</sup>	58.35 <sup>b</sup>

Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); raftiline (RAF1); raftilosa (RAF2).

Los resultados muestran que el ácido acético fue el principal ácido detectado en los medios con fructanos con las 4 especies de Lactobacilli (**Tabla 12**). Solo la mezcla C permitió una producción de ácido láctico en *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*. Con fructanos de *Agave potatorum* la tendencia en la producción de ácidos grasos fue similar a los de *A. angustifolia* con mayor producción para el acético. La producción de los ácidos acético y láctico son de gran interés en la inhibición de patógenos intestinales como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (van Der Meulen *et al.* 2004; Fooks & Gibson, 2002). *In vitro* no se encontró en ningún tratamiento ácido butírico, resultados similares fueron reportados por Urías-Silvas & López (2007).

**Tabla 12.** Concentración de los ácidos grasos de cadena corta (mM) generados a través de la fermentación de fructanos por *L.acidophilus*, *L.casei*, *L. paracasei* y *L.rhamnosus*.

Fructano	SCFAs	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.paracasei</i>	<i>L.rhamnosus</i>
LAA	Acético	32.12 <sup>d</sup>	110.94 <sup>b</sup>	45.72 <sup>de</sup>	64.60 <sup>a</sup>
A	Acético	33.86 <sup>d</sup>	95.55 <sup>b</sup>	54.23 <sup>d</sup>	54.84 <sup>a</sup>
B	Acético	36.49 <sup>d</sup>	96.67 <sup>b</sup>	70.41 <sup>c</sup>	53.78 <sup>a</sup>
C	Acético	83.81 <sup>b</sup>	163.76 <sup>a</sup>	62.57 <sup>c</sup>	57.58 <sup>a</sup>
	Láctico	7.50			35.80 <sup>b</sup>
SAA	Acético	58.78 <sup>c</sup>	76.22 <sup>c</sup>	37.39 <sup>e</sup>	54.84 <sup>a</sup>
	Láctico	9.89			
LAP	Acético	131.00 <sup>a</sup>	36.98 <sup>d</sup>	42.75 <sup>de</sup>	17.55 <sup>c</sup>
D	Acético	45.05 <sup>d</sup>	114.00 <sup>b</sup>	39.87 <sup>d</sup>	35.46 <sup>b</sup>
E	Acético	59.00 <sup>c</sup>	163.00 <sup>a</sup>	56.28 <sup>c</sup>	38.20 <sup>b</sup>
	Láctico				2.00
F	Acético	63.00 <sup>c</sup>	73.00 <sup>c</sup>	27.00 <sup>f</sup>	34.50 <sup>b</sup>
	Láctico	4.78			15.10
SAP	Acético	64.00 <sup>c</sup>	68.00 <sup>d</sup>	108.90 <sup>b</sup>	40.98 <sup>b</sup>
	Láctico	5.00	10.00		5.90
RAF1	Acético	38.90 <sup>d</sup>	148.19 <sup>a</sup>	67.37 <sup>a</sup>	52.92 <sup>ab</sup>
RAF2	Acético	42.98 <sup>d</sup>	69.86 <sup>d</sup>	148.19 <sup>a</sup>	52.92 <sup>ab</sup>

Los resultados son la media de 3 determinaciones independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Fructanos de alto DP de *A. angustifolia*, (LAA); A = 75% LAA + 25% SAA; B = 50% LAA + 25% SAA; C = 75% SAA + 25% LAA); fructanos de bajo DP de *A. angustifolia* (SAA); fructanos de alto DP de *A. potatorum* (LAP); D = 75% LAP + 25% SAP; E = 50% LAP + 25% SAP; F = 75% SAP + 25% LAP); fructanos de bajo DP de *A. potatorum*,(SAP); rafilosa (RSE); rafilina (RNE).

La conclusión final de la parte experimental *in vitro*, es que los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* de diferente grado de polimerización pero sobre todo los de bajo grado de polimerización ofrecen un importante potencial prebiótico abriendo nuevas alternativas como ingredientes alimenticios promotores de la salud.

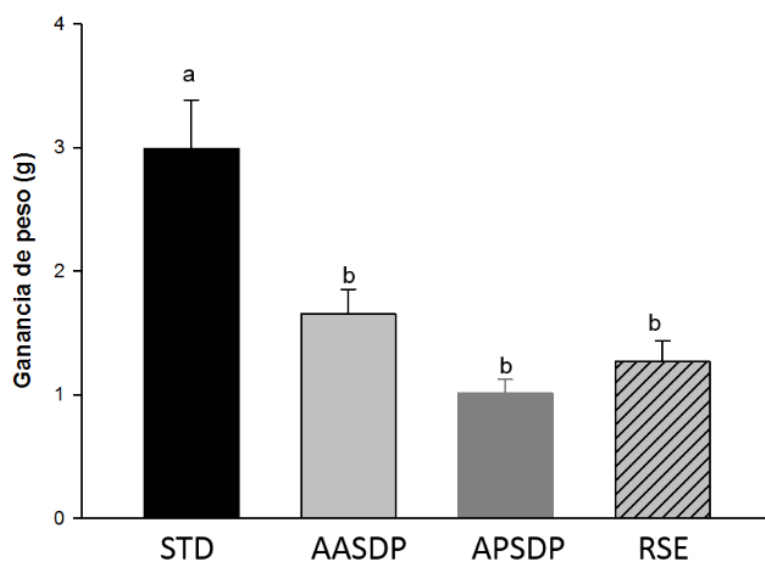
#### **VIII.4. EFECTO DEL CONSUMO DE AGAVINAS DE CADENA CORTA DE *Agave angustifolia* y *Agave potatorum* Y HORMONAS RELACIONADAS CON LA SACIEDAD (GLP-1 Y GRELINA) EN RATONES.**

##### **VIII.4.1 Ingesta de alimento y ganancia de peso**

Después de haber realizado los experimentos *in vitro*, se seleccionaron los fructanos de bajo DP de ambas especies de agave, ya que mostraron mejores características prebióticas. Se evaluó por primera vez el efecto del consumo de fructanos de *A. angustifolia* (AASDP) y de *A. potatorum* (APSDP) sobre la ingesta



de alimento, ganancia de peso y hormonas relacionadas con la saciedad (GLP-1 y grelina) en un experimento *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones macho C57BL/6N. Los ratones se alimentaron con una dieta estándar, o suplementada o no con fructanos (AASDP, APSDP y RSE) al 10%. Los tratamientos con fructanos fueron bien tolerados por los ratones. En general, el suplementar la dieta con fructanos disminuyó la ganancia de peso del cuerpo (**Figura 26**).



**Figura. 26.** Ganancia de peso de ratones alimentados con las diferentes dietas, dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) o *Agave potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE). Valores son medias con su error estándar y son mostradas por barras verticales (seis ratones por grupo). Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

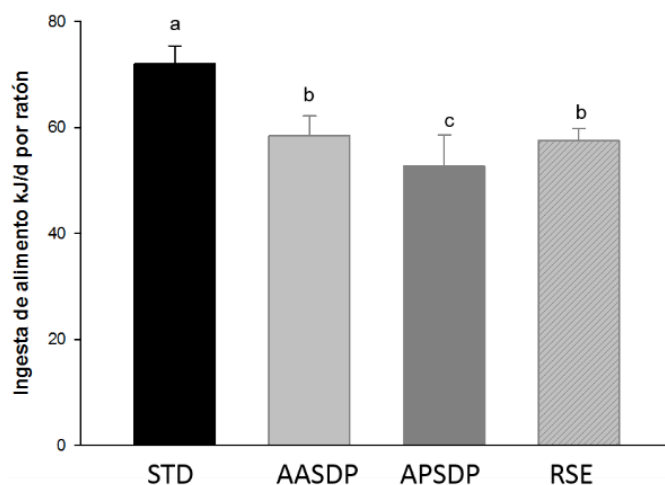
Los grupos alimentados con fructanos incrementaron significativamente la excreción de heces comparado con el grupo STD (17% más, en base seca), (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Ingesta de alimento, heces, peso del hígado y ciego, pH cecal y colónica de ratones alimentados con dieta standard (STD) o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) o *A. potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE).

	STD		AASDP		APSDP		RSE	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Ingesta de alimento (g/d por ratón)	5.34 <sup>a</sup>	0.07	4.05 <sup>b</sup>	0.12	3.59 <sup>c</sup>	0.09	3.99 <sup>b</sup>	0.14
Peso seco de heces (g/caja)	2.83 <sup>a</sup>	0.10	3.21 <sup>b</sup>	0.07	3.55 <sup>b</sup>	0.04	3.26 <sup>b</sup>	0.19
Peso del hígado (g)	1.73 <sup>a</sup>	0.08	1.22 <sup>b</sup>	0.04	1.23 <sup>b</sup>	0.06	1.25 <sup>b</sup>	0.07
Ciego lleno (% de peso del ratón)	1.80 <sup>a</sup>	0.05	3.00 <sup>b</sup>	0.08	3.41 <sup>c</sup>	0.03	2.99 <sup>b</sup>	0.08
pH cecal	6.27 <sup>a</sup>	0.02	6.25 <sup>a</sup>	0.01	5.55 <sup>b</sup>	0.08	5.90 <sup>a</sup>	0.07
pH colon	6.05 <sup>a</sup>	0.16	5.71 <sup>ab</sup>	0.10	5.35 <sup>b</sup>	0.08	5.48 <sup>b</sup>	0.03

Valores medios con error estándar de las medias (SEM). Medias con diferentes letras superscript fueron significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ).

La ingesta diaria de alimento y/o energía durante el experimento fue significativamente más baja ( $P \leq 0.05$ ) en todos los ratones alimentados con fructanos que los ratones alimentados con la dieta STD (**Figura 27**). Con respecto a la ingesta de alimento, los ratones alimentados con la dieta suplementada con AASDP, APSDP y RSE comieron 16, 24 y 20% menos respectivamente que los ratones alimentados con la dieta STD.

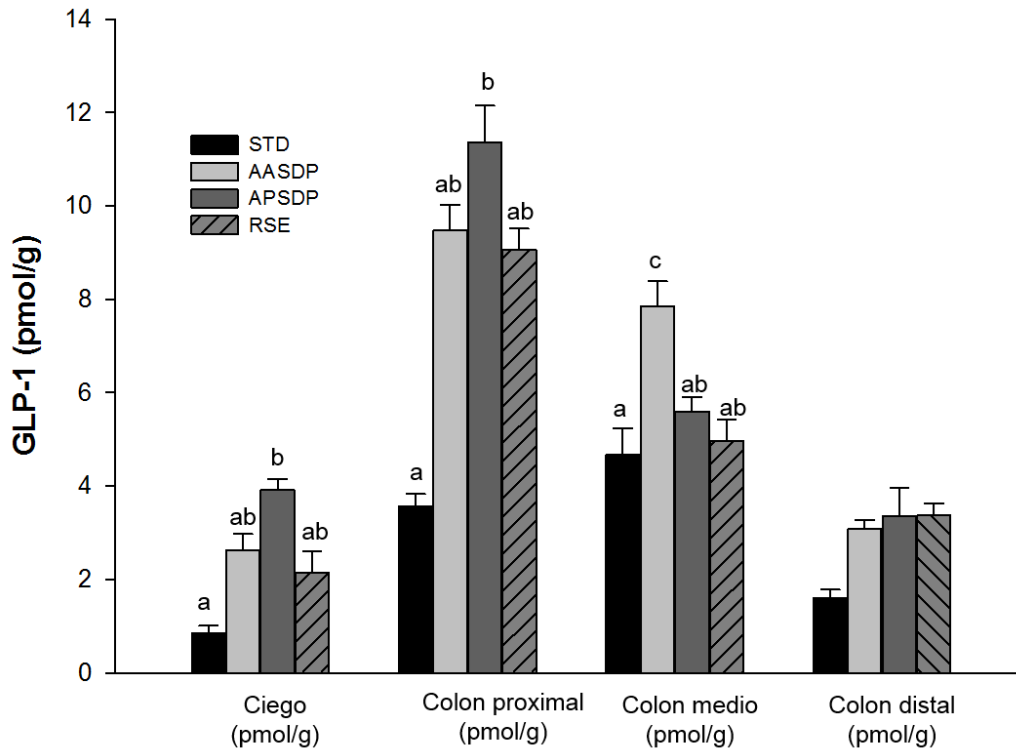


**Figura. 27.** Ingesta de alimento de ratones alimentados con las diferentes dietas, dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) o *A. potatorum* (APSDP) y raftilose (RSE). Valores son medias con su error estándar y se muestran por barras verticales (seis ratones por grupo). Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

#### VIII.4.2 Concentración de GLP-1 intestinal y en el plasma de la vena porta

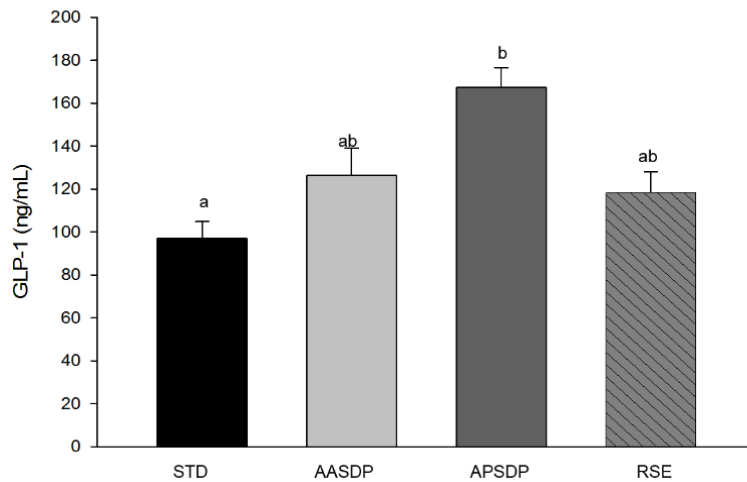
El contenido de GLP-1 en diferentes segmentos del colon (**Figura 27**) muestra que los ratones alimentados con la dieta suplementada con agavinas y/o inulinas exhiben una alta concentración de GLP-1 en el colon proximal y medio, que en los ratones alimentados con la dieta STD. Este incremento fue solo significativo en el colon proximal para la dieta APSDP ( $11.36 \text{ pmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ). La concentración de GLP-1 en el colon medio incrementó 2 campos para los ratones alimentados con AASDP comparado con el grupo de la dieta STD; sin embargo, en el colon distal no hubo diferencias significativas.

AASDP y RSE causaron un incremento en el contenido de GLP-1 del ciego comparado con los obtenidos con la dieta STD (2 vs.  $0.96 \text{ pmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ) pero este incremento fue significativamente mayor ( $4 \text{ pmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ) en los ratones alimentados con APSDP (**Figura 28**).



**Figura 28.** Concentración intestinal de GLP-1 de ratones alimentados con una dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) o *Agave potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE). Los resultados son la media con su error estándar de las medias. Valores medios con diferentes letras fueron diferentes significativamente cuando ( $P \leq 0.05$ ).

Cuando las concentraciones de GLP-1 se midieron en la vena porta (**Figura 29**), éstas fueron mayores en los ratones alimentados con las dietas suplementadas con fructanos, independientemente del tipo de éste, comparado con la dieta STD; siendo casi el doble en el grupo APSDP contra el control y los ratones alimentados con AASDP y RSE mostraron un incremento de 40 y 16%, respectivamente.

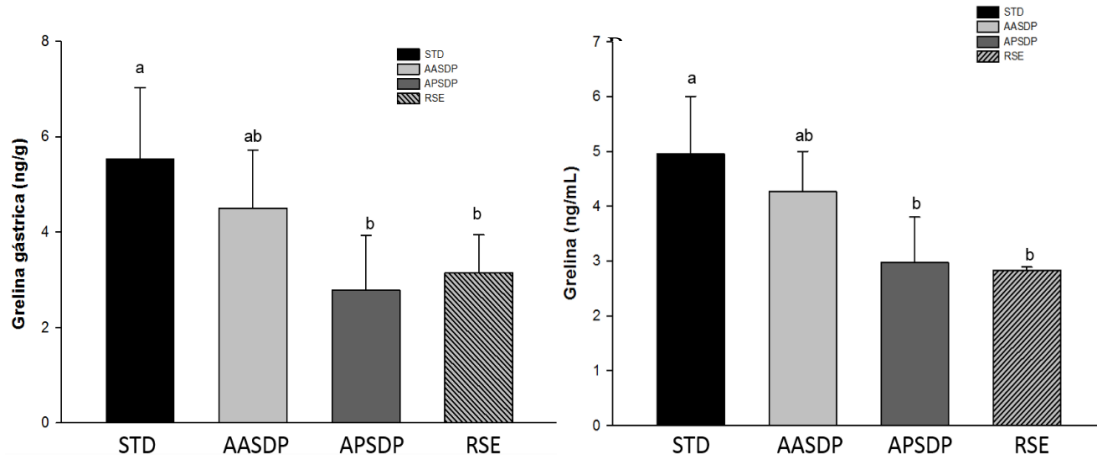


**Figura 29.** Concentración de GLP-1 en el plasma de la vena porta de ratones alimentados con la dieta estándar (STD), o dietas suplementadas con agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) o *A. potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE). Los resultados son la media con su error estándar de las medias. Valores medios con diferentes letras fueron diferentes significativamente cuando ( $P \leq 0.05$ ).

#### VIII.4.3. Concentración de grelina en plasma de la vena porta y en estómago.

La cuantificación de la grelina en estómago (**Figura 30 A**), reveló que los ratones alimentados con la dieta suplementada con diferentes fructanos presentaron una disminución significativamente (65%,  $P \leq 0.05$ ) en los ratones que consumieron agavinas e inulinas que con la dieta STD.

La concentración de grelina en sangre de la vena porta fue de  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  en los ratones alimentados con la dieta STD, y fue significativamente ( $P \leq 0.001$ ) más baja ( $4.39 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $3.10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $2.81 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) en los ratones que consumieron la dieta suplementada con AASDP, APSDP, y RSE respectivamente (**Figura 30 B**).



**Figura 30.** Concentración de grelina gástrica (A) y en vena porta (B) de ratones alimentados con la dieta estandar (STD) o dietas suplementadas con agavinas de DP chico de *Agave angustifolia* (AASDP) o *A.potatorum* (APSDP) y rafilose (RSE). Valores medios con su error estándar son mostrados por barras verticales. Valores medios con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

#### VIII.4.4. Concentración y proporción cecal de SCFAs

La cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta muestran que la ingestión de fructanos incrementó la proporción de acetato: propionato y butirato así como el total de los SCFAs en el ciego. El peso del ciego total fue significativamente mayor en los ratones alimentados con fructanos; con un decremento significativo del pH cecal y colonico en AASDP y APSDP, comparado con el grupo RSE y STD (Tabla 13).

El ácido acético ( $166 \text{ mmol g}^{-1}$ ) fue el mayor ácido generado en el ciego de los ratones alimentados con dieta STD, y el siguiente más común fue el ácido propiónico ( $68\text{-}72 \text{ mmol g}^{-1}$ ) (Tabla 14). El incremento en la producción de ácido butírico fue mayor (41%,  $P \leq 0.001$ ) en ciego de los ratones alimentados con la dieta APSDP que en el ciego de los alimentados con AASDP y RSE. Los ratones alimentados con AASDP y APSDP mostraron en el ciego una gran proporción de ácido propiónico (31%), mientras los ratones que recibieron la dieta STD generaron una alta proporción de ácido acético (65%) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mmol/g contenido colónico en base húmeda) en el colon de ratones alimentados con dieta estandar (STD) o dietas suplementadas con agavinas con DP chico de *Agave angustifolia* (AASDP) o *Agave potatorum* (APSDP) y raitilose (RSE).

	STD		AASDP		APSDP		RSE	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Mean	SEM
<b>Contenido cecal SCFAs</b>								
Acetato	166.05 <sup>a</sup>	5.48	125.62 <sup>ab</sup>	1.36	117.61 <sup>b</sup>	3.99	138.86 <sup>ab</sup>	1.54
Propionato	68.46	1.02	72.34	2.34	69.66	1.42	68.27	0.32
Butirato	21.44 <sup>a</sup>	1.02	23.25 <sup>a</sup>	1.31	34.59 <sup>b</sup>	2.29	26.80 <sup>a</sup>	1.20
Proporción	65/27/8		56/32/10		53/31/16		59/29/11	
Lactato	81.96	1.36	81.65	2.82	78.75	1.82	82.71	3.59
<b>Contenido colónico SCFAs</b>								
Acetato	159.20	1.00	147.98	1.23	138.34	1.53	142.35	1.95
Propionato	57.19 <sup>a</sup>	1.00	73.09 <sup>b</sup>	1.72	67.57 <sup>ab</sup>	1.23	69.62 <sup>ab</sup>	0.55
Butirato	19.14 <sup>a</sup>	0.65	24.54 <sup>ab</sup>	0.60	26.59 <sup>b</sup>	1.27	23.67 <sup>ab</sup>	1.78
Proporción	68/24/8		60/30/10		60/29/11		60/29/10	
Lactato	78.29	1.19	78.00	2.33	76.47	0.75	79.09	1.56
Total SCFAs	314		324		309		315	

Valores medios con su error estándar (SEM). Valores medios con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

En el colon, el incremento del ácido propiónico fue solo significativo para ratones alimentado con AASDP (73 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ) y la proporción del propionato en relación al acetato y butirato permaneció similar que en el ciego (30%). Los niveles de ácido butírico también incrementaron significativamente en el ciego de los ratones alimentados con APSDP (26.59 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ). Los SCFAs fueron producidos en el colon y ciego por fermentación microbiana en una relación molar aproximadamente de 57: 30: 13 de acetato, propionato y butirato en los ratones alimentados con APSDP.

#### VIII.4.5. Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol y lípidos de alta densidad en el plasma.

La concentración de glucosa decreció por 24, 22, y 16% en los ratone alimentados con AASDP, APSDP y RSE respectivamente, comparados con los ratones alimentados con la dieta STD (**Tabla 15**) y el peso del hígado decreció

significativamente (45%,  $P \leq 0.001$ ) comparado con el peso del hígado de los ratones alimentados con la dieta STD. La modificación bioquímica observada en estos grupos incluye además el decremento en COL, TG, LDL y VLDL (**Tabla 15**).

La concentración de TG en sangre decreció significativamente 55% (1.17 – 0.57 mM,  $P \leq 0.05$ ) en los ratones alimentados con AASDP y fue asociada con una reducción de los niveles de VLDL en el plasma, los cuales decrecieron 17% comparados con aquellos valores encontrados en los ratones alimentados con la dieta STD. Por el contrario, la concentración de HDL incremento significativamente (73%,  $P \leq 0.05$ ) en los ratones que consumieron dietas suplementadas con fructanos. LDL decreció en un 34% y tuvo una correlación positiva con la ingesta de energía, la cual fue significativamente más baja para las dietas suplementadas con fructanos.

**Tabla 15.** Concentración en plasma de glucosa y perfil de lípidos (colesterol total (COL), triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL), baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL)) de ratones alimentados con dieta estandar (STD) agavinas de bajo DP de *Agave angustifolia* Haw. (AASDP) y *A. potatorum* Zucc. (APSDP) y Raftilose (RSE).

Dieta	Glucosa (mM)		Triglicéridos (mM)		Colesterol (mM)		HDL (mM)		LDL (mM)		VLDL (mM)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
STD	8.79 <sup>a</sup>	0.53	1.17 <sup>b</sup>	0.09	2.59	0.00	0.36 <sup>a</sup>	0.02	2.11 <sup>a</sup>	0.03	0.12	0.01
AASDP	7.00 <sup>b</sup>	0.35	0.57 <sup>a</sup>	0.05	2.40	0.06	0.62 <sup>b</sup>	0.05	1.39 <sup>b</sup>	0.07	0.10	0.00
APSDP	7.05 <sup>b</sup>	0.25	0.62 <sup>ab</sup>	0.16	2.30	0.05	0.55 <sup>b</sup>	0.06	1.33 <sup>b</sup>	0.04	0.11	0.03
RSE	7.98 <sup>ab</sup>	0.24	0.66 <sup>ab</sup>	0.07	2.30	0.00	0.70 <sup>b</sup>	0.04	1.16 <sup>b</sup>	0.08	0.13	0.01

Valores son medios con su error estándar (SEM). Valores medios con diferente letra son estadísticamente diferentes, ( $P \leq 0.05$ ).

En este trabajo observamos que la ingesta de energía y la ganancia de peso del cuerpo disminuyeron de una manera similar en los grupos de ratones que recibieron fructanos comparados con el grupo de la dieta STD y el decremento fue solo significativo ( $P \leq 0.05$ ) para el grupo de ratones alimentados con APSDP. El efecto de los fructanos en la reducción de la ingesta de energía y del alimento puede ser asociado a su fermentación en el ciego y el colon, ya que la



fermentación de fructanos permite la producción de SCFAs, los cuales están involucrados en la modulación de las funciones fisiológicas del colon y esta relacionado con el incremento en el peso del ciego observado, similar a otros trabajos sobre el consumo de fructanos en ratones (Wren & Bloom, 2007; Meir *et al.* 2002; Urías-Silvas *et al.* 2007).

En éste trabajo se observó que las dietas AASDP y APSDP incrementaron la concentración de GLP-1 en el colon proximal y el ciego a valores similares a los reportados previamente por Cani *et al.* (2007) usando oligofruktosa con ratas Wistar, este incremento de GLP-1 puede jugar un papel en la disminución de la ingesta de alimentos y en la glicemia como lo reportara Kok *et al.* (1998). Como se mencionó en la introducción, el GLP-1 actúa como una hormona incretina y es conocido como un agente antidiabético que combina efectos insulínotropicos y anorécticos (Meier *et al.* 2002).

El péptido-1 tipo glucagon juega un importante papel en disminuir los niveles de glucosa en sangre, principalmente a través de potenciar el efecto estimulante de la glucosa sobre la secreción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas. También afecta los niveles de glucosa en sangre a través de su efecto inhibitorio de vaciado gástrico (Nauck *et al.* 1997), diversos estudios (Cani *et al.* 2007; Tschop *et al.* 2000; Flint *et al.* 2001; Urías-Silvas *et al.* 2007) han reportado que GLP-1 reduce la liberación de glucagón y disminuye el vaciado gástrico, incrementando con ello el llenado abdominal, controlando la ingesta de alimento.

La fermentación de los carbohidratos no digeribles a SCFAs particularmente el butirato promueve la expresión del mRNA proglucagón y la producción de GLP-1 en las células L (Reimer & Burney, 1996). Esto ha sido comprobado con los trabajos de Cani *et al.* (2006) quienes mostraron que el efecto de la saciedad no se afectó cuando RSE fue dado a ratones sin receptores de GLP-1, o cuando fueron dados a ratones que fueron tratados con un antagonista al receptor de GLP-1; mostrando así que el efecto de los fructanos sobre la saciedad (ganancia

de peso), es debido a la interacción con la producción de GLP-1. Algunos efectos positivos similares a estos fueron reportados para las agavinas de *A. tequilana* (Urías-Silvas *et al.* 2007) principalmente el decremento en la ingesta de energía y ganancia de peso, tanto como un incremento en GLP-1.

El incremento en la concentración de GLP-1 en ciego y segmentos del colon encontrados en los ratones alimentados con AASDP, APSDP y RSE fueron consistentes con el incremento de GLP-1 observada en la vena porta ( $r^2 = 0.777$ ,  $P \leq 0.0044$ ). Estos hallazgos fueron asociados a un decremento significativo observado en la ingesta de energía e incremento de GLP-1, sugiriendo una correlación negativa ( $r^2 = -0.665$ ,  $P \leq 0.0068$ ), y es asociada con la correlación entre la ganancia de peso del cuerpo y GLP-1 ( $r^2 = -0.564$  y  $P \leq 0.020$ ) para los grupos que recibieron la dieta con fructanos comparada con el grupo STD.

Se encontró que la grelina gástrica, un péptido orexigénico, decreció en los ratones que consumieron agavinas o inulinas. La reducción en la concentración de grelina en el plasma de la vena porta de los ratones que consumieron fructanos está de acuerdo con lo reportado por Lee *et al.* 2002 donde se muestra un decremento en los niveles circulantes de la grelina en el estómago de ratas que consumieron oligosacáridos. La reducción en la grelina presentó una correlación inversa con GLP-1 ( $r^2 = -0.634$ ,  $P \leq 0.05$ ) en el plasma de la vena porta; por lo tanto, este decremento puede ser atribuido a la secreción de GLP-1 similar a lo que reportó Lippl *et al.* (2004).

Estudios específicos han demostrado que GLP-1 en suero de la vena porta y el tipo de nutrientes ingeridos, puede influenciar la producción y secreción de la grelina en función de la velocidad de absorción de los nutrientes y la osmolaridad intestinal (Lippl *et al.* 2004; Overduin *et al.* 2005). Lippl *et al.* (2004) han demostrado que GLP-1 contribuye a la inhibición de la secreción de grelina en estómago de rata. Cummings (2006) reportó que la secreción de grelina puede ser dependiente de la cantidad de la ingesta de calorías, y del tipo de nutrientes

debido a que la velocidad de secreción puede depender de la cantidad de calorías ingeridas y del tipo de nutrientes ya que la velocidad de absorción de los nutrientes y osmolaridad intestinal afecta su secreción. Por lo tanto, el decremento en la concentración de grelina en este estudio podría en parte, ser atribuido al valor calórico de cada dieta.

La concentración de SCFAs en el ciego y en el colon, particularmente ácido propionico y butírico, incrementaron significativamente en los ratones que consumieron agavinas. APSDP fue fermentado en el ciego y en colon proximal, incrementando el nivel de ácido butírico. Zhou *et al.* (2006) mostraron que el butirato fue el ácido más efectivo de los SCFAs comparado con el acetato y el propionato para incrementar la expresión del proglucagón en las células L en el ciego de ratas.

Los ratones alimentados con la dieta AASDP (DP 4 a 12) generó una cantidad significativa de ácido propionico en el colon, mientras que los ratones alimentados con APSDP con un DP ligeramente menor DP (4 a 9) generaron altos niveles de butirato en el ciego y en el colon, es decir, la proporción relativa de acetato, propionato y butirato dependió del grado de polimerización, solubilidad y estructura de las agavinas lo cual está de acuerdo con los reportado por (Nilsson & Nyman, 2005).

La alta fermentación observada en el ciego podría estar relacionada a la gran solubilidad de las agavinas que contienen enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6), los cuales proveen más unidades de fructosa accesibles. Como se mencionó anteriormente, las agavinas contienen ramificaciones en su molécula, esta característica es una ventaja para la fermentación, debido a que las bacterias tienen más sitios para iniciar la fermentación en estos fructanos que para RSE. Los resultados muestran que los grupos alimentados con las dietas STD y AASDP iniciaron con un pH similar en el ciego, y el grupo APSDP inició con un pH más ácido, indicando que los fructanos contenidos en la dieta APSDP fueron fermentados en el ciego. En el

colon los SCFAs incrementaron en el grupo AASDP, por lo tanto, el pH decreció significativamente aquí comparado con grupo STD. Este efecto sugiere un incremento en la actividad bifidogénica principalmente por la producción de SCFAs.

El incremento en la producción total de SCFAs a través de la fermentación bacteriana de AASDP y APSDP resultó en un decremento ( $P \leq 0.001$ ) del pH colónico, sugiriendo la reducción del crecimiento de patógenos en el colon.

En este estudio, cuando las agavinas o inulinas estuvieron presentes en la dieta (10%), se observó un incremento en la producción de SCFAs en el ciego; esto implica que los fructanos son candidatos interesantes en la regulación del metabolismo de lípidos. Los SCFAs alcanzan el hígado a través de la vena porta. Nosotros encontramos que la concentración de acetato decreció significativamente en el ciego de los ratones alimentados con las agavinas, esta disminución es importante porque el acetato es el precursor de Co-A, el cual es el precursor del colesterol en su biosíntesis en el hígado.

En el ciego y colon, la concentración de ácido propionico incrementó más del 20% en los ratones alimentados con fructanos. Este incremento puede ser asociado con efectos benéficos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Campbell *et al.* 1997; Henningson *et al.* 2002). Se ha reportado que el propionato inhibe la síntesis de lípidos en hepatocitos aislados de ratas normales, particularmente la incorporación de acetato durante la síntesis de colesterol (Demigné, 1994) ésta inhibición podría explicar el decremento en el COL y TG en el plasma de la vena porta de los ratones alimentados con agavinas.

La reducción en la producción de TG desde los ácidos grasos es debida a la inhibición de enzimas lipogénicas en el hígado, incluyendo la sintasa ácido graso (FAS) una enzima clave en la secreción de VLDL-TG. Por lo tanto, el efecto hipolipidémico de AASDP y APSDP puede ser debido a cambios en el metabolismo de lípidos, similar a aquellos reportados en ratones alimentados con RSE (Kok *et al.* 1996; Delzenne *et al.* 2007).

Este comportamiento puede también ser relacionado al balance de energía, sugiriendo una correlación positiva (prueba de Pearson`s) entre la ganancia del peso del cuerpo y la trigliceridemia con una  $r^2 = 0.992$  y  $P \leq 0.008$ . La disminución del peso del cuerpo puede estar asociado con un decremento en la concentración de TG en suero, similar a lo observado por Dobrian *et al.* (2000) con isoflavinas de soya. Ji & Friedman (2003) reportaron que la trigliceridemia durante el ayuno es un predictor potencial de una dieta que induce obesidad en ratones.

Por otro lado Kok *et al.* (1996) reportó que la ingesta de RSE reduce la glicemia posprandial y la insulinemia por 17 y 26%, respectivamente; este cambio puede también explicar la baja lipogénesis y así la baja producción hepática de TG. Aquí nosotros confirmamos el decremento en TG debido a la ingesta de RSE. Nuestros datos muestran que la ingestión de AASDP y APSDP reduce los niveles de glucosa. Estos resultados podrían sugerir que el decremento en TG debido a la ingesta de agavinas es también atribuible a un decremento en la disponibilidad de la glucosa. Las agavinas pueden mejorar la disponibilidad de la glucosa en sangre, lo que puede ser atribuido a un incremento en la insulina. GLP-1 juega un papel importante en la disminución de los niveles de glucosa, debido a un incremento en el nivel de la insulina circulante y así disminuir la concentración de glucosa en sangre o afectar esta concentración por inhibición de la secreción del glucagón; los datos aquí presentados muestran una correlación negativa entre GLP-1 y GLU con una  $r^2 = -0.653$  y  $P \leq 0.0061$ .

Entre los ácidos grasos de cadena corta, el ácido butírico es el más importante. La dieta con APSDP mostró propiedades butirogénicas similar a aquellas reportadas para RSE (Nilsson & Nyman 2005). El incremento en la concentración en el butirato en el tracto ciego-colon podría contribuir al incremento en la producción de GLP-1 vía dos mecanismos: diferenciación de las células L y/o un incremento en la expresión del proglucagón (Cani *et al.* 2007). Finalmente para concluir de los resultados *in vivo*, como se ha reportado previamente, el suplementar la dieta con agavinas tiene efectos benéficos ya que ayuda al control de peso, glucosa y lípidos, así como también sobre los niveles de GLP-1 y grelina, estos resultados

variaron de acuerdo a la especie y al grado de polimerización, por tal motivo pueden iniciarse estudios con otro tipo de fructanos, de diferente origen botánico y geográfico del estado de Oaxaca por su diversidad de agaves. Finalmente, los resultados de este estudio enfatizan el potencial de los fructanos de *A. angustifolia* y *A. potatorum* en el control del peso corporal, lo cual puede ser de interés en el control de la obesidad y sus desordenes metabólicos asociados.

## IX. CONCLUSIONES

- 1) El contenido promedio de fructanos encontrado en plantas de *A. angustifolia* y *A. potatorum* fue de 86.5 y 76.1% respectivamente.
- 2) Los fructanos en polvo tuvieron una  $A_w = 0,2$  es decir una alta estabilidad durante su almacenamiento.
- 3) El perfil cromatográfico por intercambio aniónico de alta resolución acoplado a un detector pulso amperométrico (HPAEC-PAD) corroboró la complejidad de los fructanos AALDP, APLDP, AASDP y APSDP la cual varió cuantitativamente en número de ramificaciones, isómeros y grado de polimerización dependiendo de la especie de agave.
- 4) Las agavinas de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* mostraron un potencial prebiótico mayor al compararlos con RNE y RSE (inulinas comerciales). La biomasa y el descenso del pH fueron más grandes cuando el substrato tuvo mayor contenido de fructanos de bajo DP es decir, el contenido de fructanos de bajo DP en las mezclas influyó en la velocidad de fermentación de las agavinas.
- 5) *In vitro* el ácido acético fué el principal producto de fermentación en todas las fuentes de energía probadas y se encontró diferencias significativas en su producción de acuerdo a la cepa y grado de polimerización.
- 6) Hubo una correlación positiva de  $r^2 = 0.98$  en el descenso de pH con el incremento de la biomasa y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).
- 7) La suplementación de la dieta de ratones con 10% de agavinas redujo el consumo de alimento y la ingesta total de energía comparada con el grupo control de ratones.

8) Las dietas AASDP, APSDP y RSE incrementaron los niveles de GLP-1 (40, 93, and 16%, respectivamente vs .STD) ( $P \leq 0.05$ ), mientras que la grelina disminuyó (16, 38, and 42%, respectivamente) ( $P \leq 0.05$ ).

9) Por primera vez se reportó el efecto hipotrigliceridémico de las agavinas de alto DP de *A. angustifolia*.

10) Los niveles de glucosa y colesterol en la sangre fueron bajos en todos los grupos alimentados con fructanos comparado con el grupo STD.

11) La dieta suplementada con agavinas de *A. angustifolia* generó alta cantidad de ácido propionico y con agavinas de *A. potatorum* exhibieron mayor efecto butirogénico.

12) Los resultados también mostraron un incremento significativo de butirato en el grupo de los ratones alimentados con APSDP (26.59 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ) comparado con aquellos ratones alimentados con AASDP y RSE.



## X. PERSPECTIVAS

Por los resultados obtenidos del efecto prebiótico *in vivo* de los fructanos de *Agave angustifolia* y *A. potatorum* con respecto a la regulación de hormonas relacionadas con la saciedad, resultaría muy valioso validar estos efectos con estudios clínicos en humanos sanos, con problemas de obesidad y/o diabetes para codyuvar en el control de la obesidad y sus desordenes metabólicos asociados.

Oaxaca es el estado con mayor diversidad de especies de agave por lo que resulta atractivo, extraer, caracterizar y analizar los fructanos de al menos 5 de las especies más representativas con la finalidad de determinar si el contenido, tipo, grado de polimerización (DP) y estructuras de los fructanos exhiben modificaciones derivadas de la edad, especie y estrés abiótico.

Otra área de oportunidad que nos permitiría profundizar en los efectos fisiológicos de fructanos de *Agave potatorum* sería la evaluación *in vitro* y/o *in vivo* en el control de cáncer de colon por la producción significativa de ácido butírico encontrada en este trabajo

Finalmente, con la información obtenida en este trabajo podría evaluarse el efecto de las agavinas de *A. angustifolia* y *A. potatorum* en la osteoporosis, su papel como antioxidante y/o como inmunomoduladores.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Allsopp P. Possemiers S. Campbell D. Saldaña Oyarzábal I. Gill C. & Rowlandd I. 2013.** An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22: 38-44.

**Amaretti A. Tamburini E. Bernardi T. Pompei A. Zanoni S. Vaccari G. Matteuzi D. & Rossi M. 2006.** Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:654-662.

**Anderson K. Li S C. & Li Y. 2000.** Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Anal. Biochem.* 287:337- 339.

**A.O.A.C. 1990.** Official methods of analysis. 15 th. Edn. Association of official agricultural chemists. Washington, D. C.

**Archer B. J. Jhonson S. K. Devereux H. M. & Baxter A. L. 2004.** Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sause patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in man. *Br. J. Nutri.* 91: 591-599.

**Banguela A. & Hernández L. 2006.** Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnol. Aplic.* 23:202- 210.

**Barquera S. Campos-Nonato I. Hernández-Barrera L. Pedroza A. & Rivera-Dommarco, J.A. 2013.** Prevalence of obesity in Mexican adults 2000-2012. *Salud Publica Mex.*, 55 (2):S151-S160.

**Bathia I. S. & Nandra K. S. 1979.** Studies on fructosyl transferase from *Agave Americana*. *Phytochemistry* 18:923-927.

**Beylot M. 2007.** Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *Brit. J.Nutri.* 93:S159- S163.

**Bielecka B. E. & Biedrzycka M. 2004.** Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polimerization. *Trends Food Sci Tech.* 170-175.

**Bloom A. M. & Wren S. R. 2007.** Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology.*132:2116-2130.

**Boeckner L. S. Schnepf M. I. & Tunglund B. C. 2001.** Inulin: a review of nutritional and health implications. *Adv. Food Nutr. Res.* 43:1-63.

**Boillot J. Alamowitch C. Berger A. M. Luo J. & Bruzzo F. 1995.** Effect of dietary propionate on hepatic glucose production, whole body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. *Br. J. Nutri.* 73:241-255.

**Briedzycka E. & Bielecka M. 2003.** Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Tech.* 15:170-175.

**Brubaker P. L. & Drucker D. J. 2004.** Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut and central nervous system. *Endocrinology* 145:2653-2659.

**Busserolles J. Gueux E. Rock E. Demigne C. Mazur A. & Rayssiguier E. 2003.** Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J. Nutr.* 133:1903-1908.

**Cairns A. J. & Ashton J. E. 1993.** Species-dependent patterns of fructan synthesis y enzymes from excised leaves of oat, wheat, barley and timothy. *New Phytol.* 124:381-388

**Campbell J. M. Fahey G. C. & Wolf B. W. 1997.** Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 127:130-136.

**Canı P. D. Daubioul C. A. Reusens B. Remacle C. Catillon G. & Delzenne N M. 2005.** Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* 185:457-465.

**Canı P. D. Dewever C. & Delzenne N. M. 2004.** Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br. J. Nutr.* 92:521-526.

**Canı P. D. Knauf C K. Iglesias M A. Drucker D J. Delzenne N M. & Burcelin R. 2006.** Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes.* 55: 1484-1490.

**Canı P. D. Hoste S. Guiot Y. & Delzenne N. M. 2007.** Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br. J. Nutr.* 98:32-37.

**Coudray C. Feillet-Coudray C. Tressol J. C. Gueux E. Thien S. Jaffrelo L. Mazur A. & Rayssiguier Y. 2005.** Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes short- and long-term balance studies. *Eur J Nutr.* 44 (5):293-302.

**Cummings D. E. 2006.** Ghrelin and the short and long term regulation of appetite and body weight. *Physiol. Behav.* 89:71-84.

**Cummings J. H. & Englyst H. 1995.** Gastrointestinal effects of food carbohydrates. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:324-328.

**Cummings J. H & Macfarlane G. T. 2002.** Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr.* 87 (2):S145-51.

**Cummings J. Roberfroid M. Andersson H. Barth C. Ferro-Luzzi C. Ferro-Luzzi A. Ghos Y. Gibney M. Hermosen K. James W. & Korver O. 1997.** A new look at dietary carbohydrate: Chemistry physiology and health. *Eur. J. Clin. Nutri.* 51:17-423.

**Daubioul C. Rousseau N. Demeure R. Gallez B. Taper H. Declerck B. & Delzenne N. 2002.** Dietary Fructans, but not, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa Rats. *J. Nutr.* 132:967-973.

**De Bruyn A. Alvarez A.P. Sandra P. & De Lenner L. 1992.** Isolation and identification of  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2-1)-D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Chicorium intibus* L. *Carbohydr Res.* 235:303-308.

**Delzenne N. M. 2003.** Oligosaccharides: state of the art. *Proc. Nutr. Soc.* 62:177-182.

**Delzenne N. M. Cani P. D. Daubioul C. & Neyrinck A M. 2005.** Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br. J. Nutr.* 93 (1):S157-S161.

**Delzenne N. M. & Williams C. M. 2002.** Prebiotics and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13(1):61-7.

**Delzenne N. M. Cani P. D. & Neyrinck A. M. 2007.** Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.* 137:2547S-2551S.

**Demigné C. & Remesey C. 1994.** Short chain fatty acids and hepatic metabolism. In: Short Chain Fatty Acids (ed. Binder H J. Cummings J H. and Soergel K H.). 272-282. Kluwer Academic Publishers, London.

**Demigné C. Morand C. Levrat M. A. Besson C. Moundras C. & Rémésy C. 1995.** Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 74:209-219.

**Dobrian A. D. Davies M. J. Prewitt R. & Lauterio T. J. 2000.** Development of hypertension in a rat model of diet induced obesity. *Hypertension.* 35:1009-1015.

**Dorland L. Kamerling J. P. Vilegenthart J. F. & Satyanarayana M. N. 1977.** Oligosaccharides isolated from *Agave vera cruz*. *Carbohydr. Res.* 54:275-28.

**Druce M. R. Small C. J. & Bloom S. R. 2004.** Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology* 145:2660-2665.

**Druce M. R. Wren A. M. Park A. J. Milton J. E. Patterson M. Frost G. Ghatei M. A. Small C. & Bloom S R. 2005.** Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int. J. Obes.* 29:1130-6.

**Drucker D. J. 2006.** The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3:153-165.

**Dubois M. Gilles K. A. Hamilton J. K. Rebers P. A. & Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.

**Du H. Van der A. D. Boshuizen H. C. Forouhi N. G. Wareham N. J et al. 2010.** Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *Am J Clin Nutr* 91:329-336.

**Edelman J. & Jefford T. G. 1968.** The mechanism of fructose and metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus*. *New Phytol.* 67:517-231.

**Eguiarte L. E. Souza V. & Silva-Montellano A. 2000.** Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva, y genética de la población. *Biol.Soc.Bot.Mex.* 66:131-150.

**Erdmann J. Lippl F. & Schusdziarra V. 2003.** Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul. Pept.*116:101-7.

**Flamm G. Glinsmann W. Kritchevsky D. & Prosky L. 2001.** Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of evidence. *Crit. Rev.Food Sci. Nutr.* 41 (5):353-362.

**Flint A. Raben A. Astrup A. & Holst J. J. 1998.** Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J. Clin. Invest.* 101:515-520

**Flint A. Raben A. Ersboll A K. Holst J. J. & Astrup A. 2001.** The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25: 781-792.

**Franck A. 2002.** Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87:S287-S291.

**Fooks L. & Gibson G. R. 2002.** *in vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39: 67-75.

**Fukuda S. Toh H. Hase K. Oshima K. Nakanishi Y. Yoshimura K. Tobe T. Clarke J. M. Topping D. L. Suzuki T. Taylor T. D. Itoh K. Kikuchi J. Morita H. Hattori M. & Ohno H. 2011.** Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 27, 469 (7331):543-7

**García-Vieyra M. I. Del Real A. & López M. G. 2014.** Agave Fructans: Their Effect on Mineral Absorption and Bone Mineral Content. *J. Medic. Food.* 17 (11): 1247–55.

**Gentry H. S. (1998).** Agaves of Continental America. University of Arizona.

**Gibson G. R. & Wang X. 1994a.** Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. *Food Microbiol.*11:491-498.

**Gibson G. R. & Wang X. 1994b.** Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bact.* 77:412-420.

**Gibson G. R. Scott K. P. Rastall R. A. Tuohy K. M. Hotchkiss A. Dubert-Ferrandon A. Gareau M. Murphy E. F. Saulnier D. Loh G. Macfarlane S. Delzenne N. Ringel Y. Kozianowski G. Dickmann R. Lenoir-Wijnkoop I. Walker C. & Buddington R. 2010.** Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods.* 7:1-19.

**Gomez E. Tuohy K. M. Gibson G. R. Klinder A. & Costabile A. 2010.** *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of agave fructans. *J. Appl. Microbiol.* 108:2114-2121.

**Granados S D. 1993.** Los Agaves en México. México: Universidad Autónoma de Chapingo.

**Hahn T. M. Breininger J F. Baskin D G. & Schwartz M W. 1998.** Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1:271-72.

**Hendry G. 1993.** Evolutionary origins and natural functions of fructans- a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123:3-14

**Henningsson A. Björck I. & Nyman G. 2002.** Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *J. Nutr.* 132(10):3098-3104

**Hincha D. K. Hellwege E. M. Heyer A. G. & Crow J. H. 2000.** Plant fructans stabilizes liposomes during freeze-drying. *Eur. J. Biochem.* 267:535-540.

**Holst J. J. Deacon C. F. Vilsboll T. Krarup T. & Madsbad S. 2008.** Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. *Trends Mol. Med.*14:161-168.

**Hopkins K. J. Cummings J. H. & Mcfarlane G. T. 1998.** Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrates source. *J. Appl. Microbiol.* 85: 381-386.

**Hopkins W. G. 1999.** Introduction to Plant Physiology. 2 ed. Ed. John Wiley.

**Hosoda H. Kojima M. Matsuo H. & Kangawa K. 2000.** Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:909-913.

**Huazano-García A. & López M. G. 2013.** Lipid metabolism. Chapter 8: Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diets with agave fructans. Ed. Valenzuela-Baez R. INTECH.

**Huazano-García A. & López M. G. 2015.** Agavins reverse the metabolic disorders in overweight mice through the increment of short chain fatty acids and hormones Food Funct. 6:3720-3727.

**Imamura L. Hisamitsu K. & Kobaschi K. 1994.** Purification and characterization of  $\beta$ - fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biol. Pharm. Bull.* 17:596-602.

**Ji H. & Friedman M. I. 2003.** Fasting plasma triglyceride levels and fat oxidation predicts dietary obesity in rats. *Physiol. Behaviour.* 78:767-772.

**Kanaya K. Chiba S. & Shimomura T. 1978.** Thin-layerchromatography of linear oligosaccharides. *Agri. Biol.Chem.* 42:1947-1948.

**Kaplan H. & Hutkins R. T. 2000.** Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*66: 2682-2684.

**Kaplan H. & Hutkins R. W. 2003.** Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl.Environ.Microbiol.*69:2217-2222.

**Kaur N. & Gupta A. K. 2002.** Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Biosci.* 27(7):703-714.

**Kieffer T. J. & Habener J. G. 1999.** The glucagon-like peptide. *Endocr. Rev.* 20:876-913.

**Kim T. B. Song S. H. Kang S C. & Oh D K. 2003.** Quantitative comparisonof lactose and glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures. *Biotechnol. Progr.* 19:672-675.

**Klessen B. Hartmann L. & Blaut M. 2001.** Oligofructose and long-chain inulin: Influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* 86(2):291-300.

**Knauf C. Cani P. D. Perrin C. Iglesias M A. Maury J. F. Bernard E. Benhamed F. Grémeaux T. Drucker D J. Kahn C R. Girard J. Tanti J F., Delzenne N M. Postic C. & Burcelin R. 2005.** Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.* 115:3554-3563.

**Kojima M. Hosoda H. Date Y. Nakazato M. Matsuo H. & Kangawa K. 1999.** Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-60.

**Kok N. N. Morgan L. Williams C. Roberfroid M. Thissen J. & Delzenne N. 1998.** Insulin, GLP-1, GIP and IGF-1 as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats, *J. Nutr.* 128:1199-1110.

**Kok N. Roberfroid M. Robert A. & Delzenne N. 1996.** Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br. J. Nutr.* 76:881-890.

**Kolida S. Tuohy K. & Gibson G. R. 2002.** Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87:193-197.

**Lee H. M. Wang G. Englander W. Kojima T. Nakahara K. & Ida T. 2002.** Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J. Endocrinol.* 174:283-288

**Letexier D. Diraison F. & Beylot M. 2003.** Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 77:559-564.

**Levrat M. Favier M. Moundras C. Remesy C. Demigne C. & Morand C. 1994.** Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *J. Nutr.* 124(4):531-538.

**Lewis D. H. 1993.** Nomenclature and diagrammatic representation of oligomer fructans a paper for discussion. *New Phytol.* 124: 583-594.

**Licht T. Hansen M. Poulsen M. & Dragsted L. 2006.** Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota. *BMC Microbiology.* 6: 981-7.

**Lippl F. Kircher F. Erdmann J. Allescher H D. and Schusdziarra V. 2004.** Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regul. Pept.* 119:93-98.

**López M. G. Mancilla-Margalli N. A. & Mendoza-Díaz G. 2003.** Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var Azul. *J. Agric. Food Chem.* 51:7835-7840.

**López, M. G. & Urías-Silvas J.E. 2007.** Prebiotic effect of fructans from Agave, Dasyliion, and Nopal. *Acta Horticulturae.* 744:397-404.

**Macfarlane G. and Macfarlane S. 2007.** Models for intestinal fermentation: Association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Chem. Biotech.* 18:156-162.

**McKellar R. & Modler H. 1989.** Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium spp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:537-541.

**Mancilla-Margalli N. A. & López M. G. 2006.** Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliion species. *J. Agric. Food Chem.* 54:7832-7839.



**Manning T. R. & Gibson G. R. 2004.** Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18(2):287-98.

**Martínez A. A. Martínez C. M. Palma C. F. & Córdoba F. 1995.** La distribución, usos y algunas características químicas, de los agaves de Oaxaca (México). *Interciencia* 20(1):14-19.

**Marx S. P. Winkler M. S. & Hart M. W. 2000.** Metabolization of  $\beta(2,6)$  linked fructose oligosaccharides by different Bifidobacteria. *FEMS Microbiology Lett.* 182:163-169.

**Meier J. J. Galwitz B. Schmidt W. E. & Nauck M. A. 2002.** Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur. J. Pharmacol.* 269-279.

**Mellado-Mojica E. & López M. G. 2012.** Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.* 60:11704-11713.

**Moreno-Vilet L. Garcia-Hernandez M. H. Delgado-Portales R. E. Corral-Fernandez N. E. Cortez-Espinosa N. Ruiz-Cabrera M. A. & Portales-Perez D. P. 2014.** *In vitro* assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *Int. J. Biol. Macromol.* 63:181-187.

**Nauck M. A. Kleine N. Orskov C. Holst J. J. Willms B & Creutzfeldt W. 1993.** Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7–36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetología.* 36: 741-744.

**Nauck M. A. 1997.** Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying out weights its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Met.* 273:981-988.

**Nelson N. 1944.** Photometric adoption of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.

**Nilsson U. & Nyman M. 2005.** Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerization and solubility. *Br. J. Nutr.* 94:705-713.

**Nobel P. 1987.** Water relations and plant size aspects of flowering for *Agave deserti*. *Bot. Gaz.* 148:79-84.

**Overduin J. Frayo R. S. Grill H. J. Kaplan J. M. & Cummings D. E. 2005.** Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology.* 146: 845-50.

**Palframan R.J. Gibson G. R. Rastall R. A. 2003.** Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Curr Issues Intest Microbiol.* 4 (2):71-5.

**Perrin S. Fougnes C. Grill J. P. Jacobs H. & Schneider F. 2002.** Fermentation of chicory fructooligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. *J. Microbiol.* 48:759-763.

**Pietro-Femia A. P. Luceri C. Dolara P. Giannini A. Biggeri A. Salvadori M. Clune Y. Collins K. J. Paglierani M. & Caderni G. 2002.** Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 23 (11):1953-1960.

**Pimienta-Barrios E. Zañudo-Hernández J. García-Galindo J. & Nobel P. S. 2006.** Ecofisiología del Agave Azul (*Agave tequilana*) Weber. 1er. Ed. Universidad de Guadalajara.

**Pollock C. J. & Cairns A. J. 1991.** Fructan metabolism in grass and cereals. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Bio.* 42:77-101.

**Reimer M. K. Pacini G. & Ahre'n B. O. 2003.** Dose-dependent inhibition and ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 144:916-921.

**Reimer R. A. & McBurney M. I. 1996.** Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and post-prandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology.* 13:3948-3956.

**Ritsema T. & Smeekens S. 2003a.** Fructans: Beneficial for plants and human. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:223-230.

**Ritsema T. & Smeekens S. 2003b.** Engineering fructan metabolism in plants. *J. Plant Physiol.* 160:811-820.

**Roberfroid M. B. 1993.** Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:103-148.

**Roberfroid M. B. & Delzenne N. 1998.** Dietary fructanos. *Annu Rev. Nutr.* 18:117-43.

**Roberfroid M. B. 1998.** Prebiotics and synbiotics. Concepts and nutritional properties. *Br. J. Nutr.* 80:S197-S202.

**Roberfroid M. B. Van Loo J. A. E. & Gibson G. R. 1998.** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* 128:11-19.

**Roberfroid M. B. 2002.** Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J Nutr.* 2:S139-S143.

**Roberfroid M. B. 2005.** Introducing inulin-type fructanos. *Br. J. Nutr.* 93:S13-S25.

- Roberfroid M. B. & Delzenne N. M. 1998.** Dietary fructans. *Ann. Rev. Nutr.* 18: 117-143.
- Rossi M. C. 2005.** Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study in pure and faecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6150-6158.
- Sánchez-Marroquín A. & Hope P. H. 1953.** Agave juice: Fermentation and chemical composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.* 1:246-249.
- Satyanarayana M. N. 1976.** Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in Agave vera cruz: Part II Biosynthesis of oligosaccharides. *Indian J. Biochem. Biophys.* 13:398-407.
- Shene C. Mardones M. Zamora P. & Bravo S. 2005.** Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 fermentations: effect of the dilution rate and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:623-630.
- Shiomi N. 1989.** Properties of fructosyltransferase involved in synthesis of fructan in Liliaceous plants. *J. Plant Physiol.* 134:151-155.
- Shiomi N. Onodera, S. Chatterton N. & Harrison P A. 1991.** Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. *J. Agric. Biol. Chem.* 55:1427-1428.
- Stewart M. Timm D. & Slavin J. 2008.** Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long chain inulin in a vitro fermentation system. *Nutr. Res.* 28(5) 329-334.
- Suzuki M. 1993.** History of the fructans research. In: Science and Technology of Fructans; Suzuki M. and Chatterton N. J. Eds. CRC Press: Boca Raton FL.
- Takahiro S. Nakamura Y. Shiimura Y. Ohgusu H. Kangawa K. & Kojima M. 2012.** Review structure, regulation and function of ghrelin. *Biochem.* 51(2):1191-1198.
- Topping D. & Clifton P. 2001.** Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 81(3):1031-1063.
- Tschop M. Smiley D L. & Heiman M L. 2000.** Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 407:908-913.
- Tschop M. Wawarta R. Riepl R. L. Friedrich S. Bidlingmaier M. Landgraf R. & Folwaczny C 2001.** Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 24:RC19-21.
- Tungland B. C. 1998.** A natural Prebiotic. *The World of ingredients* 39-41.

**Turton M. D. O´Shea D. Gunn I. Beak S. A. Edwards C. M. Meeran K. Choi S. J. Taylor G. M. Heath M. M. Lambert P. D. Wildinf J. P. Smith D. M. Ghatei M. A. Herbert J. & Bloom S. R. 1996.** A role for glucagon-like peptide1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 379:69-72.

**Urías-Silvas J. E. Cani P. D. Delmée E. Neyrinck A. López M. G. & Delzenne N. M. 2007.** Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyliirion* spp. *Br. J. Nutr.* 99:254-261.

**Van der Meulen R. Avonts L. & de Vuyst L. 2004.** Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4):1923-1930.

**Van den Ende W. Peshev D. & De Gara L. 2011.** *Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract.* *Trends Food Sci. Technol.* 22:689–697

**Velázquez-Martínez J. R. González-Cervantes R. M. Hernández-Gallegos, M. A. Campos Mendiola, R. Jiménez Aparicio A. R. & Arenas Ocampo, M L. 2014.** *Prebiotic potential of Agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization.* *Molecules* 19: 12660-12675.

**Vijn I. & Smeekens S. 1999.** Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*.120:351-359.

**Wang N. & Nobel P. S. 1998.** Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.*116:709-714.

**Wren A. M. Small C. J. Ward H. L. Murphy K. Dakin C. & Taheri S. 2000.**The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*.141:4325-4328.

**Wren A. M. Seal L. J. Cohen M. A, Brynes A. E. Frost G. S. & Murphy K. G. 2001.** Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*86:5992.

**Wren A. M. & Bloom S. R. 2007.** Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology*.132 (6):2116-30.

**Wynne K. Stanley S. & Bloom. 2004.** The gut and regulation of body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* 89(6):2576-2582

**Yamashita K. Kawai K. & Itakura K. 1984.** Effect of fructooligosaccharides on bloodglucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.* 4:961-966.

**Zhou J. Hegsted M. & Mc Cutcheon K. L. 2006.** Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity.* 14 (4):683-689.

# Prebiotic Effect of Agave Fructans and Mixtures of Different Degrees of Polymerization from *Agave angustifolia* Haw

Patricia Araceli Santiago-García<sup>1</sup> • Mercedes G. López<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN-U, Oaxaca, 68030, Oaxaca, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV-Irapuato, Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera León-Irapuato, 36821. Irapuato, Guanajuato, Mexico

Corresponding author: \* mlopez@ira.cinvestav.mx

## ABSTRACT

Agave fructans are complex and highly branched molecules, which cannot be digested in the upper gastrointestinal tract. As a result, when they reach the large intestine, they serve as fermentative substrates for bacterial growth. Previous reports have shown that fructans of the inulin-type, through both *in vitro* and *in vivo* assessments, are effective prebiotics, increasing the content of bifidobacteria and lactobacilli in the gut and, consequently, inhibiting the growth of pathogenic bacteria. Oaxaca has the largest diversity of *Agave* species in Mexico. *Agave angustifolia* contains high amount of fructans with potential health benefit for humans. The aim of this work was to investigate the growth rate of six bifidobacteria and four lactobacilli strains when fructans and mixtures with different degrees of polymerization (DP) from *A. angustifolia* were used as an energy source. We observed that agave fructans stimulated the growth of bifidobacteria and lactobacilli more efficiently (2-fold) than commercial inulins. Bacterial growth, pH drop and SCFA's production, mainly acetate, were different among strains; while *in vitro* fermentation revealed that mixtures of different degrees of polymerization and short-DP (< 10) fructans were highly fermented. Biomass and pH drop were larger when the substrate contained mostly short-DP fructans. In conclusion, the presence in the mixtures of short-DP fructans, influenced significantly the rate of fermentation by the probiotic bacteria.

**Keywords:** *in vitro* fermentation, bifidobacteria, lactobacilli, short chain fatty acids

**Abbreviations:** ATCC, american test culture cells; DP, degree of polymerization; FOS, fructooligosaccharides; GC, gas chromatographer; MRS, Mann Rogosa Sharpe; OD, optical density, SCFA, short chain fatty acids

## INTRODUCTION

Fructans are fructose polymers present in plants as a heterogeneous mixture presenting in their structure a moiety of terminal glucose, possessing mainly  $\beta(2-1)$  linkages, and their structure can be linear or branched. According to the type of linkage, fructans are classified into several categories including inulin,  $\beta(2-1)$  linkage, levan,  $\beta(2-6)$  linkage, and graminans which have both links (Vijn and Smeekens 1999). Other types also exist such as inulin neo-series, levano neo-series and mixed types (Ritsema *et al.* 2003). These carbohydrates are found in plants such as chicory, onion, garlic, and agaves among others. The molecular structures of *A. tequilana* fructans are very complex and highly branched, containing principally  $\beta(2-1)$  and  $\beta(2-6)$  linkages and with internal glucose, predominantly the neo-fructan series (López *et al.* 2003). Mancilla-Margalli and López (2006) showed the existence of at least two types of fructans in agaves: neoserries (agavins) and those with terminal glucose (graminans) moiety.

Previous reports showed that fructans of the inulin-type, through both *in vitro* and *in vivo* assessments are effective prebiotics, increasing the content of bifidobacteria and lactobacilli in the gut. This generates short chain fatty acids (SCFA), lactic and formic acids, and gases including H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and CH<sub>4</sub> as products of an anaerobic metabolism (Roberfroid 2005) favoring the maintenance and development of the colonic microbiota (Roberfroid 1998; Gibson *et al.* 2004).

Fructans of the inulin-type possess only  $\beta(2-1)$  linkage that escape the action of digestive enzymes, therefore they reach the large bowel unchanged, and serving consequently as fermentative substrates to the colonic microbiota (Cum-

mings and Macfarlane 2002; Kolida *et al.* 2002; Roberfroid 2005).

It is known that several pathogenic species can cause acute gastroenteritis and certain species may be involved in chronic gut disorders like ulcerative colitis, bowel cancer, and others diseases (Gibson *et al.* 2004). Previous reports indicated that fructans selectively stimulate the growth and activity of bifidobacteria and lactobacilli in the guts and consequently inhibit the growth of pathogenic bacteria by providing some protection against infections (Steer *et al.* 2000). The criteria used for the classification of food ingredient as prebiotic are as follows: resistance to digestion, hydrolysis and fermentation by colonic microbiota, and most importantly, selective stimulation of growth of one or a limited number of bacteria in the colon. One of the most important aspects of prebiotics ingestion is the fortification of the gut microbiota to resist acute infections (Gibson *et al.* 2004). Inulin-type fructans are an example of such carbohydrates that typically has a degree of polymerization (DP) between 3 and 60 and is extracted from chicory roots. Fructooligosaccharides (FOS) compounds have a DP between 2 and 20 and reach the colon unabsorbed and are utilized selectively as a substrate for the endogenous bacteria and by fermentation producing short chain fatty acids (SCFAs) mainly acetate, propionate, butyrate as well as lactate (Roberfroid 1993; Roberfroid *et al.* 1998; Roberfroid 2005).

Human trials have established that the addition of FOS or inulin to the diet leads to an increase in bifidobacteria (Gibson *et al.* 1995; Kolida *et al.* 2002) and several studies have described *in vitro* fermentation of FOS in pure cultures of *Bifidobacterium* (Gibson and Wang 1994; Kaplan and Hutkins 2000; Perrin *et al.* 2001, 2002). Nevertheless, little

is known regarding the influence of differing DP of fructans on fermentation capability. A single *in vitro* study on three *Bifidobacterium* strains suggested that short chains FOS were fermented at a higher rate than longer chains and resulted in a higher biomass yield (Perrin *et al.* 2002). The results of *in vitro* studies indicated the specificity of *Bifidobacterium* except for *B. bifidum* to utilize FOS, but not inulins (Kaplan and Hutkins 2000; Biedrzycka and Bielecka 2003; Rossi *et al.* 2005).

Higher concentration levels of GLP-1 and its precursor, proglucagon mRNA, in different colonic segments of male mice (C57B1/6J) were observed when their diet was supplemented with agave fructans from *A. tequilana* and *Dasyilirion* sp. These might have promising effects on glucose metabolism, body weight and fat mass development in humans (Urias-Silvas *et al.* 2008).

*Agave angustifolia* are succulent plants with spirally arranged leaves forming a rosette. Belonging to the family Agavaceae, they are nearly stemless. The leaves are bluish green, lanceolate-shaped over 1.87 m long in mature plants, and end in a sharp brown thorn. *A. angustifolia* is of great importance due to the report of the presence of fructans (Mancilla-Margalli and López 2006).

Based on the well-known health benefits of fructans and the differences among agave fructans and inulins, this study was carried out to determine the prebiotic effect of agave fructans and mixtures of different degrees of polymerization from *Agave angustifolia*.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Eight-year-old *A. angustifolia* were harvested from Santiago Matatlán, Mexico. The leaves were cut off, keeping the stems or "heart" of the plant (*piñas*). The *piñas* were milled and the pulp fraction was stored at -76°C until they were analyzed.

### Extraction of agave fructans

One hundred grams of agave pulp were extracted twice with 100 mL of 80% w/v ethanol and shaken for 1 h at 55°C. The sample was filtered and re-extracted with 100 mL of water at 55°C for 1 h. The filtered liquids were combined and were washed with chloroform. The organic phase was concentrated at 80 mL by rotatory evaporation under reduced pressure and the separation of fructans in long and short-DP was achieved by precipitation of long-DP fructans by the addition of 130 mL of absolute ethanol and short-DP fructans were obtained from the supernatant. Samples were spray-dried and stored in a humidity-free container.

### Experimental design

In this study, seven different types of fructans were compared: long-DP (LAA) and short-DP (SAA) Agave fructans and mixtures of different degrees of polymerization from *A. angustifolia* (A=75% LAA + 25% SAA; B=50% LAA + 50% SAA; C=25% LAA + 75% SAA) and as controls, Raftiline GR (RAF1) and Raftilose Synergyl (RAF2) manufactured by Orafiti. *Bifidobacterium* strains were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Md.). (A) *Bifidobacterium adolescentis*; (B) *B. animalis*; (C) *B. bifidum*; (D) *B. breve*; (E) *B. infantis*, and (F) *B. longum* and four lactobacilli strains (A) *Lactobacillus acidophilus*; (B) *L. casei*; (C) *L. paracasei* and (D) *L. rhamnosus* were tested as probiotics by following the method reported by Gibson and Wang (1994). Optical densities (OD<sub>630</sub>), pH and short chain fatty acids production were measured after 20 h incubation in Mann Rogosa and Sharpe (MRS) containing 10 gL<sup>-1</sup> of fructans. Three independent determinations were done and mean values from the measurement were compared using Tukey's test. Orthogonal contrasts were also used to determine significant differences. Differences were considered statistically significant when P ≤ 0.05.

## Bacterial growth

Culture broth of Mann, Rogosa, and Sharpe (MRS) for bacterial growth was used; in the case of bifidobacteria the culture broth was supplemented with L-cysteine. To inoculate, two anaerobic subcultures of 48 h at 37°C were carried out in 10 mL of MRS medium containing glucose as the sole energy source. Bacteria were inoculated in 10 mL of the culture broth. The transferred inocula were always 1%. The incubation conditions were 20 h at 37°C under an anaerobic atmosphere. To evaluate the effect of the different fructans on bacterial growth the broth was prepared without glucose and with a fructans concentration of 10 g/L as a carbon source (Fig. 1). Bacterial growth was measured by optical density (OD) at 630 nm and the uptake of fructans by bacteria (probiotics) was evaluated measuring the pH change.

### Determination of short chain fatty acids (SCFA's)

To determine acidic metabolites, samples were centrifuged (16,000 g for 10 min) and the amounts of acetic, butyric, lactic and propionic acids in the cell-free culture supernatants were determined by gas chromatography (GC). One milliliter of bacterial culture broth was extracted with diethyl ether according to Prieto-Femia *et al.* (2002). In brief, an internal standard solution (2-methyl-valeric acid 0.01%) was added to the broth, the solution was acidified with 0.5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and SCFA's were extracted by shaking with 2 mL of diethyl ether and subsequent centrifugation at 3500 rpm for 5 min. Two µL of the organic phase were injected directly into the capillary column (HP-FFAP) of the GC. The initial temperature was 50°C and the final temperature was 200°C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 18 mL min<sup>-1</sup>. Quantification of the samples was carried out using calibration curves for acetic, butyric, lactic and propionic acids.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of different fructans on the growth of *Bifidobacterium*

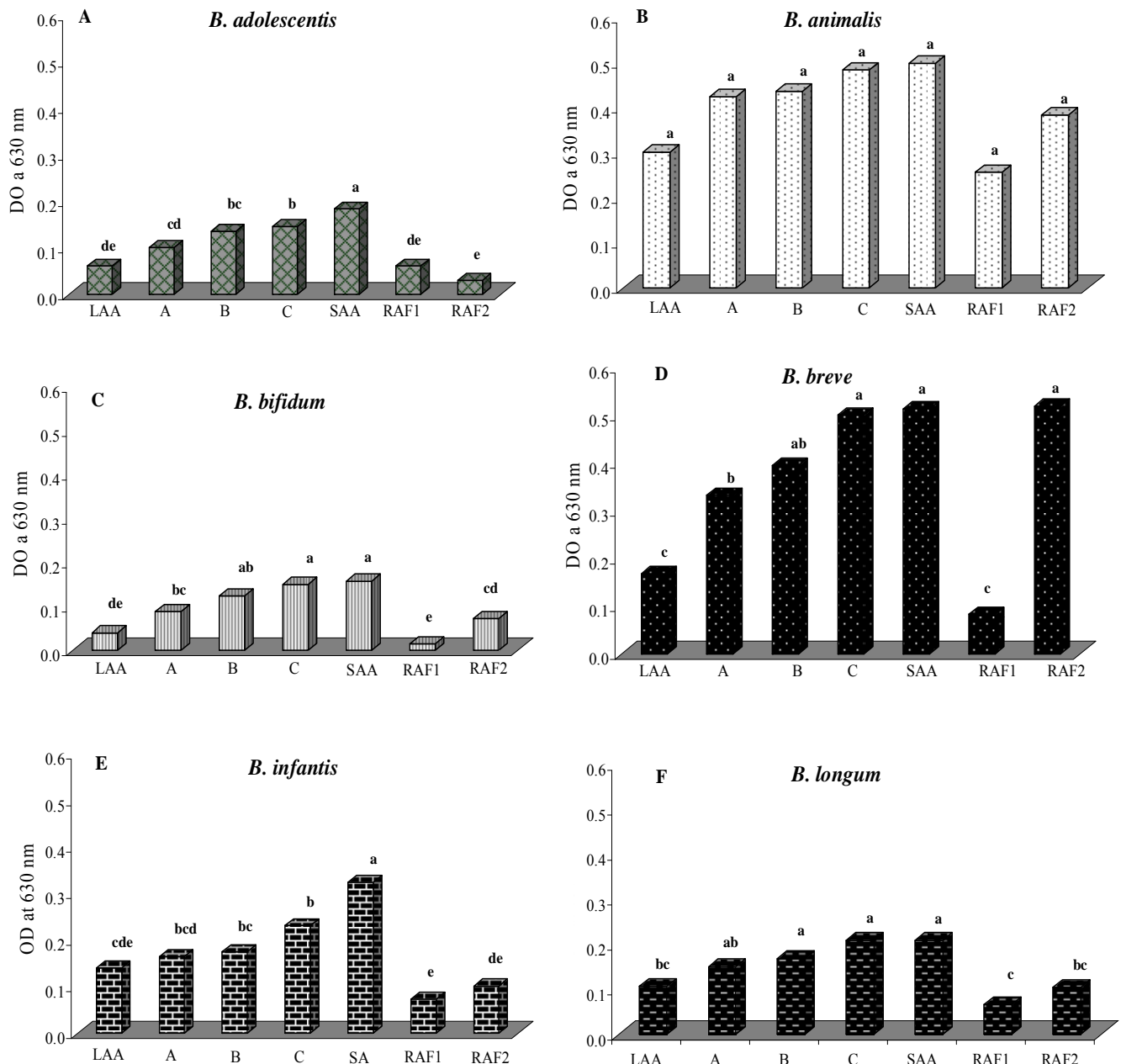
#### 1. Long-chain agave fructans

The growth of bifidobacteria after 20 h of fermentation is given in Fig. 2. LAA showed the best growth for *B. animalis* (Fig. 2B) that had an OD<sub>630</sub> 0.301 compared to the *B. breve* and *B. infantis* with values close to 0.168. Slightly lower growth values were obtained with *B. longum*, whereas *B. adolescentis* and *B. bifidum* almost did not utilize LAA as substrate. In agreement with this observation, *B. animalis* grew on both SAA and LAA (Fig. 2B), being able to hydrolyze and ferment LAA. We observed that bifidobacteria exhibited better growth in LAA than Raftiline® GR (inulin type fructan) in almost all cases. This suggests that bifidobacteria hydrolyzed better agave fructans branched with β(2-1) linkages, but it has a greater capacity to hydrolyze β (2-6). Such differences were remarkable with *B. bifidum*.

In general, bifidobacteria possess intracellular β (2-1)-fructan-fructan hydrolyase activity making the fructan molecules an efficient substrate (Roberfroid *et al.* 1998); however, long-DP fructans were slowly metabolized by *B. adolescentis* and *B. bifidum*. This difference in fermentability may be also reflected by the type of the enzymes that each evaluated strain contains or it lacks an adequate transport system (Van der Meulen *et al.* 2004).

#### 2. Short-chain agave fructans

The fermentation with 1% (w/v) SAA showed the best growth for *B. animalis* and *B. breve* (Fig. 2B, 2D). In SAA culture medium, *B. breve* had an OD<sub>630</sub> of 0.514 which was significantly different and 3.2 times greater than *B. bifidum*. This was one of the strains with the lowest biomass yields on SAA. *B. animalis* grew in short-DP fructans best and had the second highest growth level observed. *B. infantis* occupied third place. The results showed that the majority of



**Fig. 1** Effect of different fructans as the sole carbon source on the growth of bifidobacteria. (A) *Bifidobacterium adolescentis*; (B) *B. animalis*; (C) *B. bifidum*; (D) *B. breve*; (E) *B. infantis*; and (F) *B. longum*. Optical densities (OD<sub>630</sub>) were measured after 20 h incubation in Mann Rogosa and Sharpe (MRS) containing 10 g L<sup>-1</sup> of fructans. LAA, Large-DP fructans of *A. angustifolia*; A=75% LAA plus 25% SAA; B=50% LAA plus 50% SAA; C=25% LAA plus 75% SAA; SAA, short-DP fructans of *A. angustifolia*; RAF1, Raftiline®GR; RAF2, Raftilose®Synergyl. Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

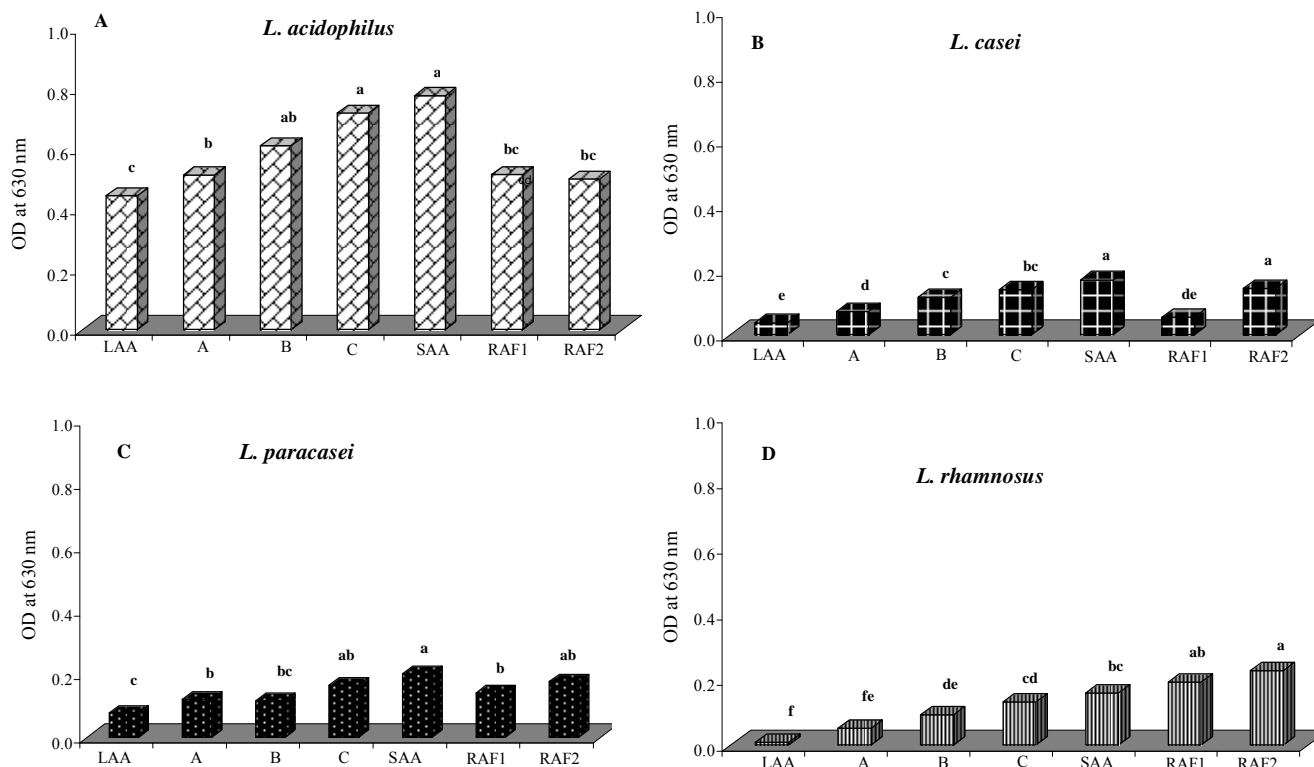
*Bifidobacterium* strains studied utilized SAA. Moreover, in comparison to RAF2 as control, the growth of strains *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, and *B. longum* (Fig. 2A, 2C, 2E, 2F) were stimulated between 2 to 3 times more.

High specificity of short-DP as a substrate for bifidobacteria results from the activity of the specific cell associated  $\beta$ -fructosidase which hydrolyse fructose monomers from the non-reducing end of the chain in which the fructose residue occurs at the  $\beta(2-1)$  position. The preferential growth in SAA observed in all strains probably was produced by  $\beta$ -fructosidase enzymes activity since these enzymes are most effective on short-DP fructans and hydrolyze  $\beta(2-1)$  and  $\alpha(1-2)$  glycosidic bonds (O'Sullivan 1996). Van der Meulen *et al.* (2004) reported similar results in *B. animalis* and argued that the preferential metabolism of FOS by bifidobacteria strains may be due also to the presence of phosphotransferases which occur also in *B. breve*. These results are in agreement with other studies that conclude that maximum growth is higher on oligosaccharides moiety (Gibson and Wang 1994; Hopkins *et al.* 1998;

Kaplan and Hutkins 2000; Biedrzycka and Bielecka 2003; Kim *et al.* 2003; Van der Meulen *et al.* 2004).

### Mixtures

The growth of bifidobacteria in mixtures of different degrees of polymerization from *Agave angustifolia* after 20 h of fermentation is given in Fig. 2. It was observed that growth was proportional to the concentration of SAA in each of the mixtures. The highest growth occurred in mixture C (25% long-chain and 75% short-chain agave fructans) in the 6 tested species. *B. animalis* (Fig. 2B) showed no significant difference between the mixtures from *A. angustifolia* (A, B, and C) and their growth rates were similar to those obtained in SAA. No statistically significant differences were observed between mixtures C and SAA with *B. breve* (Fig. 2D). *B. bifidum* and *B. longum* (Figs. 2C, 2F) showed the same trend but with lower growth rates, whereas *B. adolescentis* and *B. infantis* (Figs. 2A, 2E) showed values in mixture C significantly lower ( $P \leq 0.05$ ) than SAA. All the mix-



**Fig. 2** Effect of different fructans on the growth of lactobacilli. (A) *Lactobacillus acidophilus*; (B) *L. casei*; (C) *L. paracasei*; (D) *L. rhamnosus*. Optical densities (OD<sub>630</sub>) were measured after 20 h incubation in Mann Rogosa and Sharpe (MRS) containing 10 g L<sup>-1</sup> of fructans. LAA, large-DP fructans of *A. angustifolia*; A=75% LAA plus 25% SAA; B=50% LAA plus 50% SAA; C=25% LAA plus 75% SAA; SAA, Short-DP fructans of *A. angustifolia*; RAF1, Raftiline<sup>®</sup>GR; RAF2, Raftilose<sup>®</sup>Synergyl. Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

tures show more significant growth than the controls except *B. breve*. The six *Bifidobacterium* strains differed significantly ( $P \leq 0.05$ ) in their ability to grow on mixtures of different DP from *A. angustifolia*.

The increase utilization of the agave fructans by *B. adolescentis*, *B. bifidum* and *B. longum* as compared to commercial fructans type inulins (RAF1 and RAF2) suggests that these can also hydrolyze  $\beta(2-6)$  bonds, extra- and intracellular hydrolyzed FOS and simultaneously metabolize fructose. Perrin *et al.* (2002) reported the higher specificity of *B. infantis* for short-DP fructans and Imamura *et al.* (1994) attributed it to the activity of the  $\beta$ -fructosidase as well as to *B. adolescentis* GI (Amaretti *et al.* 2006). The results suggest that these species have a higher specificity for short-DP. On the other hand the progressive release of glucose and fructose induces  $\beta$ -fructosidase activity which causes hydrolysis of the short-DP fructan fraction with  $\beta(2-1)$  and  $\beta(2-6)$  bonds. The results of *B. adolescentis* are similar to those reported by Marx *et al.* (2000) who reported that *B. adolescentis* produced the best ferment of levans with  $\beta(2-6)$  fructosyl bonds among four different strains. This is similar to the results of Amaretti *et al.* (2006), who reported maximum growth yield in disaccharides and oligosaccharides. As noted, the prebiotic effectiveness of agave fructans not only depends on the on the DP, as mentioned by Van Loo (2004), but also on the type of link. The agave fructan of longer-DP are more resistant to fermentation. Hence, the presence of short-DP fructans in the mixtures highly influenced the rate of fermentation by the probiotic bacteria (Kaplan and Hutkins 2000; Biedrzycka and Bielecka 2003).

On the other hand the superior growth observed in LAA fructans, as compared with the control Raftiline<sup>®</sup>GR (RAF1), could be the result of induction of a  $\beta$ -fructosidase that hydrolyzes long-chain branched fructans with  $\beta(2-1)$  and  $\beta(2-6)$  bonds, therefore releasing FOS and fructose. The progressive release of glucose and fructose from agave fructan induced the  $\beta$ -fructofuranosidase activity responsible for the hydrolysis of these oligosaccharides (Perrin *et al.* 2001; Rossi *et al.* 2005).

The best bacterial growth in agave fructans could be an indication of the predominance of the branched types in the fructan molecule from *A. angustifolia*, allowing a faster hydrolysis of inulin,  $\beta(2-1)$  linkage and levan,  $\beta(2-6)$  linkage, being three times faster for *B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* and *B. adolescentis* than commercial fructans. Amaretti *et al.* 2006 reported that *B. adolescentis* simultaneously displayed  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -fructofuranosidase on FOS and other sugars.

Orthogonal contrasts showed that the growth of bifidobacteria was significantly different ( $P \leq 0.01$ ) than that noted between agave fructans and the control. A significant difference was also found in the effects of long and short fructans DP on the growth of bifidobacteria.

### pH drop

Another important parameter during fermentation was the pH drop due to the production of SCFAs. In the culture broth containing LAA fructans as substrate, the pH drop was slight for all bifidobacteria, being higher for the *B. animalis* but no significant differences were found with the control (Table 1). In SAA fructans the pH drop was  $\geq 1$  for all bifidobacteria. The level of pH drop with *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis* was significantly higher on SAA fructan than that observed ( $P \leq 0.5$ ) in control cultures. pH drop in the mixtures was proportional to the concentration of SAA fructans. In all cases bacterial growth was directly related to pH drop: *B. breve* and *B. bifidum* had an  $r^2 = 0.88$  between growth and pH drop (Table 1), which has been reported to have an increased beneficial effect by inhibiting the growth of pathogenic bacteria (Gibson and Wang 1994).

### Production of short chain fatty acids

Acetic, butyric, lactic and propionic acids were monitored during fermentation (Table 2). Acid production was much higher in cultures containing LAA fructan than in control culture. *B. infantis* and *B. longum* exhibited the same behaviour observed in LAA fructans. *B. breve* had increased pro-



**Table 1** Culture broth pH drop due to fermentation of fructans by *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, and *B. longum*.

Fructan	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>
LAA	0.58 bc	0.92 a	0.48 bc	0.68 b	0.61 ab	0.49 bc
A	0.47 cd	1.15 a	0.49 bc	0.89 ab	0.69 ab	0.49 bc
B	0.48 cd	1.10 a	0.57 bc	0.96 ab	0.85 c	0.55 ab
C	0.65 bc	1.25 a	0.68 b	1.14 ab	0.89 ab	0.75 bc
SAA	0.98 a	1.50 a	0.94 a	1.43 ab	1.22 a	0.86 a
RAF1	0.33 d	0.71 a	0.37 c	0.63 b	0.55 b	0.40 c
RAF2	0.76 ab	1.28 a	0.69 ab	1.70 a	0.90 ab	0.66 ab

Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ . The drop in pH of the cultures was measured directly in culture tube.

**Table 2** Short chain fatty (mM) liberated by bifidobacteria during fermentation on *Agave angustifolia* and commercial fructans. BA, *Bifidobacterium adolescentis*; BAN, *B. animalis*; BBF, *B. bifidum*; BBR, *B. breve*; BI, *B. infantis*; BL, *B. longum*.

Fructan	ACID	BA	BAN	BBF	BBR	BI	BL
LAA	Acetic	60.94 a	58.33 a	45.41 bc	48.61 b	4.67 a	92.89 a
	Lactic						
	Propionic						
A	Acetic	55.22 a	46.85 ab	47.09 abc	51.03 b	51.34 b	63.38 bc
	Lactic						
	Propionic						
B	Acetic	53.02 a	45.49 ab	48.44 abc	54.17 b	58.00 b	57.47 c
	Lactic						
	Propionic						
C	Acetic	54.73 a	56.75 a	46.37 abc	44.23 b	56.05 b	53.17 c
	Lactic						
	Propionic				18.50		
SAA	Acetic	59.91 a	47.93 ab	54.27 ab	71.30 ab	54.77 b	45.49 c
	Lactic				3.95		
	Propionic						
RAF1	Acetic	34.25 ab	51.47 a	40.03 c	63.69 ab	49.25 b	78.95 ba
	Lactic						
	Propionic				2.00		
RAF2	Acetic	15.06 b	30.77 b	58.06 a	83.13 a	66.32 ab	55.02 c

Different letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) compared with the commercial fructans of each strain, and SD  $n=3$

duction of acetic acid when the substrate was SAA fructan. *B. adolescentis* and *B. bifidum* produced an average 60 mM of acetic acid in SAA fructans. These two species grew slowly but attained notable metabolite production. Acetic acid was the main metabolite in all cases, which was also the case for bifidobacteria in general. No production of lactic and propionic acids were observed during fermentation in cultures with *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis* and *B. longum*. Lactic and propionic acids were only produced with *B. breve* (3.5 and 18.5 mM, respectively) in short-DP fructans and mixture C. Acetic acid production was slightly higher in cultures containing agave fructans than in control cultures concomitant with the pH reduction. Similar results were reported by López and Urías-Silvas (2007). Butyric acid was not observed in any treatment.

### Effect of different fructans on the growth of lactobacilli

The growth of lactobacilli after 20 h of fermentation is given in Fig. 3. The results show that long-DP fructan (LAA), are only used by *L. acidophilus* (Fig. 3A) that had an  $OD_{630}$  0.504. Lower values were obtained with *L. paracasei* (Fig. 3C), whereas *L. casei* (Fig. 3B) and *L. rhamnosus* (Fig. 3D) almost did not utilize LAA. This difference in fermentability may also be reflected by the type of enzymes contained in each strain evaluated. *L. acidophilus* grew effectively on all the evaluated fructans, although the highest level of growth was observed with SAA fructans (Fig. 3A). The growth of *L. acidophilus* ( $OD_{630} = 0.77$ ) was significantly greater ( $P \leq 0.01$ ) than that recorded for *L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus* ( $OD_{630} = 0.173$ ). In other words, the ability of *L. acidophilus* to ferment graminans and neo-series type highly branched fructans was 4.6 times greater than that of *L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus* on the SAA fructans.

On the other hand, the mixtures B and C showed a higher growth with *L. acidophilus*, *L. casei* and *L. paracasei* (Fig. 3A, 3B, 3C) than commercial fructans, while *L. rhamnosus* (Fig. 3D) growth was significantly higher in the cultures supplemented with commercial fructans. The degree of polymerization in the mixtures had a highly significant effect ( $P \leq 0.01$ ) on growth since the larger the amount of short-DP fructan content, the greater the growth of the microorganisms evaluated. When the degree of polymerization (DP) decreased in the mixture, optical density ( $OD_{630}$ ) increased and pH decreased; also as DP increased, growth decreased. Biomass concentration for *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* varied depending on the fructans DP. The observed behaviour of these micro-organisms in the tested culture media is a result of each species metabolism, which is not yet well established for some of them. The growth of lactobacilli on the agave fructans indicates that they probably ferment the fructans by producing  $\beta$ -fructosidases; more specifically, *L. acidophilus* probably extracellularly hydrolyzes, long-chain and highly branched fructans releasing (FOS) and fructose which enter the cell to promote fermentation. According to Kaplan and Hutkins (2000) this species does not require an induction period to use fructans. In contrast, the other species did not use fructans as effectively to increase biomass, suggesting that fructans metabolism and transport in *L. casei* and *L. paracasei* must be induced and requires an ATP-dependent transport system to ingest short-chain fructan; that is, their ability to transport fructans depends on the availability of intracellular ATP (Kaplan and Hutkins 2003). This indicates that an extracellular enzyme is needed for the degradation of long-DP and highly branched agave fructans, which then allows the accumulation of short-DP fructan which can be hydrolyzed within the cell.

### pH drop

The pH drop during fermentation with lactobacilli due to

**Table 3** pH drop due to fermentation of fructans by *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus*.

Fructan	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
LAA	2.16 c	0.68 d	0.64 c	0.73 c
A	2.31 c	0.74 bc	0.74 c	0.73 c
B	2.53 b	0.76 bc	0.86 b	0.84 bc
C	2.69 ab	1.01 b	0.98 ba	0.94 ba
SAA	2.79 a	1.17 a	1.06 a	1.09 a
RAF1	1.68 d	0.47 e	0.43 d	0.81 bc
RAF2	1.80 d	0.84 b	0.73 c	0.81 bc

The drop in pH induced by fructans fermentation is expressed as pH (means of 3 independent determinations) at the end of the substrate fermentation minus the pH at the beginning of the fermentation.

**Table 4** Short chain fatty (mM) liberated by lactobacilli during fermentation on *Agave angustifolia* and commercial fructans. LA, *Lactobacillus acidophilus*; LC, *L. casei*; LPC, *L. paracasei*; LR, *L. rhamnosus*.

Fructan	ACID	LA	LC	LPC	LR
LAA	Acetic	32.12 c	110.94 b	45.72 b	64.60 a
	Lactic				
	Propionic				
A	Acetic	33.86 c	95.55 cb	54.23 b	54.84 b
	Lactic				
	Propionic				
B	Acetic	36.49 c	93.67 cb	70.41 a	53.78 b
	Lactic				
	Propionic				
C	Acetic	83.81 a	163.76 a	62.57 a	57.58 a
	Lactic	7.50			35.80
	Propionic				
SAA	Acetic	58.78 b	76.22 cd	37.39 c	54.84 b
	Lactic				
	Propionic				
RAF1	Acetic	38.90 cb	148.19 a	67.37 a	52.92 b
	Lactic				
	Propionic				
RAF2	Acetic	42.98 cb	69.86 d	36.39 c	52.92 b

Different letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) compared with the commercial fructans of each strains, and SD n=3

SCFA production is shown in (Table 3). Bacterial growth and pH drop presented a 0.95 correlation. The largest pH drop with LAA was *L. acidophilus* with *L. rhamnosus*, *L. casei* and *L. paracasei* it was less. pH drop was significantly higher on SAA fructans in all species compared to the controls. At the beginning of the fermentation period of *L. acidophilus* with SAA fructans the pH was 7.0 but decreased to 4.21 after 20 h. In a culture that contained mixture C the pH drop was significantly larger ( $P \leq 0.05$ ) than in control cultures. Among the mixtures evaluated, the mixture C showed the largest drop after SAA, while mixtures A and B had a lower drop and that was related to the amount of SAA present in the mixture. Greater bacterial growth, therefore, was directly related to pH decrease which can have a beneficial effect by inhibiting the growth of pathogenic bacteria (Gibson and Wang 1994). López and Urías-Silvas (2007) reported similar results on pH drop with *Dasyliirion* sp. fructans as the energy source. The SCFA values for the lactobacilli cultures showed acetic acid to be the main metabolic product of the fermentations. Differences between acetic acid concentration on LAA and SAA fructans were statistically significant (Table 4). Little acetic acid was accumulated with *L. acidophilus* while significantly higher concentrations ( $P \leq 0.05$ ) were produced by *L. casei*. Acid production was much higher in cultures containing mixtures of different degrees of polymerization concomitant with the pH reduction. Short-chain agave fructans were a better carbon source for the production of metabolites, similar to results reported by Perrin *et al.* (2002). In particular, acetic acids were the major products of fructans fermentation. No production of lactic acid was observed during fermentation with controls, whereas the mixture C

led to a slight accumulation of this acid with *L. acidophilus* and *L. rhamnosus*. Propionic and butyric acids were absent in all treatments.

## CONCLUSIONS

From the results obtained in our work, it can be concluded that utilization of agave fructan by bifidobacteria and lactobacilli depends on the degree of polymerization of the fructooligomeric chains, chemical structure and linear or branched structure. Our *in vitro* experiment showed that the majority of *Bifidobacterium* strains studied utilized SAA. *B. animalis*, *B. breve* and *L. acidophilus* showed the highest growth with agave fructans and fructans type inulin. *B. animalis* showed the greatest hydrolysis capability and also fermented the longest chains of agave fructan but did not exhibit stringent selectivity based on DP. The response of the other strains varied depending on the fructan characteristics. The difference in behaviour of agave fructans as compared with RAF1 and RAF2 could be attributed to the linkage type, DP and the highly branched structural features of these fructans. These consist of a complex mixture of fructans containing principally  $\beta(2-1)$  linkages, but also some  $\beta(2-6)$  with terminal or internal glucose denominated graminans and agavins respectively. This assumes similarity with those structures previously reported for *A. tequilana*. The results found in this research, confirmed the bifidogenic effect of *A. angustifolia* fructans. Biomass and metabolite production by the bifidobacteria and lactobacilli tested in this work corroborate the preference to ferment short-DP fructans over long-DP fructans. Long-chain fructans are fermented more slowly. In conclusion, the presence of short-DP fructans in the mixtures highly influenced the rate of fermentation by the probiotic bacteria.

Acetic acid was the main fermentation product in all the tested energy sources and there were significant differences in its production. *Agave* fructans and mixtures offer possible prebiotic potential, thus opening new alternatives as food ingredients.

The prebiotic concept with its overall of its implications for health is generating a great amount of interest in the search for new sources of fructans to be used in a wide range of food products. Fructans from *Agave angustifolia* could be one of them.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by Fundación Produce Oaxaca A. C. and the Instituto Politécnico Nacional. We also very grateful to M.Sc. Araceli M. Vera-Guzmán for all her support on fatty acids determination by GC-FID.

## REFERENCES

- Amaretti A, Tamburini E, Bernardi T, Pompei A, Zanoni S, Vaccari G, Matteuzzi D, Rossi M (2006) Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**, 654-662
- Briedzycka E, Bielecka M (2003) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology* **15**, 170-175
- Cummings JH, Macfarlane GT (2002) Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition* **2**, 145-151
- Gibson GR, Wang X (1994) Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. *Food Microbiology* **11**, 491-498
- Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **108**, 975-982
- Gibson GR, Robert HM, Van Loo J, Rasta RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**, 259-275
- Hopkins KJ, Cummings JH, Mcfarlane GT (1998) Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrates source. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 381-386
- Imamura L, Hisamitsu K, Kobaschi K (1994) Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biological and*

- Pharmaceutical Bulletin* **17**, 596-602
- Kaplan H, Hutkins RW** (2003) Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 2217-2222
- Kaplan H, Hutkins RW** (2000) Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Applied Environmental Microbiology* **66**, 2682-2684
- Kim TB, Song SH, Kang SC, Oh DK** (2003) Quantitative comparison of lactose and glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures. *Biotechnology Progress* **19**, 672-675
- Kolida S, Tuohy K, Gibson GR** (2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* **87**, 193-197
- López MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Díaz G** (2003) Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7835-7840
- López MG, Urias-Silvas JE** (2007) Agave fructans as prebiotics. In: Shiomi N, Benklebia N, Onodera S (Eds) *Advances in Fructooligosaccharides Research*, Research Signpost, Kerala, India, pp 297-310
- Mancilla-Margalli NA, López MG** (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyllirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 7832-7839
- Marx SP, Winkler MS, Hartmeier W** (2000) Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different Bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 163-169
- O'Sullivan MC** (1996) Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – An overview. *Bulletin of the IDF* **313**, 23-30
- Perrin S, Warchol M, Grill JP, Schneider F** (2001) Fermentation of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 859-865
- Perrin S, Fournies C, Grill JP, Jacobs H, Schneider F** (2002) Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degree of polymerization by three strains of Bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 759-763
- Pietro-Femia AP, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G** (2002) Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **23**, 1953-1960
- Ritsema T, Smeekens SCM** (2003) Engineering fructan metabolism in plants. *Journal Plant Physiology* **160**, 811-820
- Roberfroid MB** (1993) Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **33**, 103-148
- Roberfroid MB** (1998) Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition* **80**, 197-202
- Roberfroid MB, Van Loo JAE, Gibson GR** (1998) The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* **33**, 103-148
- Roberfroid MB** (2005) Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* **93**, 13-25
- Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D** (2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied Environmental Microbiology* **71**, 6150-6158
- Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR** (2000) Perspectives on the role of the human gut microbiota in health and methods of study. *Nutrition Research Reviews* **13**, 229-254
- Urias-Silvas JE, Cani PD, Delmée E, Neyrinck A, López MG, Delzenne NM** (2008) Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana*. Gto. and *Dasyllirion* sp. *British Journal of Nutrition* **99**, 254-261
- Van Loo J** (2004) The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. *Nutrition Research Reviews* **17**, 89-98
- Van der Meulen R, Avonts L, de Vuyst L** (2004) Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1923-1930
- Vijn I, Smeekens S** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* **120**, 351-359



Cite this: *Food Funct.*, 2014, 5, 3311

## Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice

Patricia Araceli Santiago-García<sup>a</sup> and Mercedes G. López<sup>\*b</sup>

Agavins act as a fermentable dietary fiber and have attracted attention due to their potential for reducing the risk of disease. Therefore, we evaluated the effect of supplementation using 10% agavins with a short-degree of polymerization (SDP) from *Agave angustifolia* Haw. (AASDP) or *Agave potatorum* Zucc. (APSDP) along with chicory fructans (RSE) as a reference for 5 weeks, on the energy intake, body weight gain, satiety-related hormones from the gut and blood (GLP-1 and ghrelin), blood glucose and lipids, and short-chain fatty acids (SCFAs) from the gut of *ad libitum*-fed mice. We evaluated the energy intake daily and weight gain every week. At the end of the experiment, portal vein blood samples as well as intestinal segments and the stomach were collected to measure glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and ghrelin using RIA and ELISA kits, respectively. Colon SCFAs were measured using gas chromatography. The energy intake, body weight gain, and triglycerides were lower in the fructan-fed mice than in the STD-fed mice. The AASDP, APSDP, and RSE diets increased the serum levels of GLP-1 (40, 93, and 16%, respectively vs. STD) ( $P \leq 0.05$ ), whereas ghrelin was decreased (16, 38, and 42%, respectively) ( $P \leq 0.05$ ). Butyric acid increased significantly in the APSDP-fed mice (26.59 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ) compared with that in the AASDP- and RSE-fed mice. We concluded that AASDP and APSDP are able to promote the secretion of the peptides involved in appetite regulation, which might help to control obesity and its associated metabolic disorder.

Received 24th June 2014,  
Accepted 6th October 2014

DOI: 10.1039/c4fo00561a

www.rsc.org/foodfunction

### Introduction

Food intake is a biological necessity regulated by the central nervous system *via* the secretion of gastrointestinal hormones. Many gut peptides have been shown to influence energy intake. Of these peptides, the most important are cholecystokinin (CCK), peptide YY, GLP-1, oxyntomodulin and ghrelin.

With the exception of ghrelin, these hormones act to increase satiety and decrease food intake. GLP-1 is an incretin secreted by endocrine L-cells, an important regulator of pancreatic  $\beta$ -cells. The peptide mediates glucose-dependent insulin tropic effects in several species, including humans,<sup>1</sup> and it also inhibits gastric acid secretion and gastric emptying, suppresses glucagon release and promotes satiety.<sup>2,3</sup>

In contrast, ghrelin (acylated by the actions of ghrelin *o*-acyltransferase (GOAT)) is one of the most powerful physiological orexigenic and adipogenic agents capable of increasing hunger through fluctuations in its plasma concentrations.<sup>4</sup> This hormone is secreted in the stomach, leading to an increase in the appetite and caloric intake of mice, Zucker rats and humans, thus favoring adiposity.<sup>5,6</sup>

Inulin-type fructans (Fig. 1A) are lineal polymers of fructose with  $\beta(2-1)$  linkages and an outer glucose unit, and they are mainly fermented in the cecum and the upper part of the colon. When added to a diet, inulin-type fructans improve glucose tolerance and insulin secretion and lower food intake in animals and humans, suggesting a satietogenic effect.<sup>7,8</sup>

These effects are often associated with a higher plasma content of GLP-1 and its precursor proglucagon mRNA.<sup>3</sup> Cani *et al.*<sup>9</sup> showed that the effects of OFS (oligofructan) were abolished when OFS was administered in the diet of GLP-1 receptor knock-out mice; thus, the effect of fructans on satiety (body weight gain) is due to an interaction with GLP-1 production. Consistent with these studies, the intravenous infusion of GLP-1 in humans and rats enhances satiety and decreases energy intake during the infusion period.<sup>10-12</sup>

<sup>a</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, CP. 68030 Oaxaca, México

<sup>b</sup>Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. Apartado Postal 629, Irapuato, Gto. CP. 36821 México. E-mail: mlopez@ira.cinvestav.mx; Fax: +52 (462) 6245996; Tel: +52 (462) 6239644

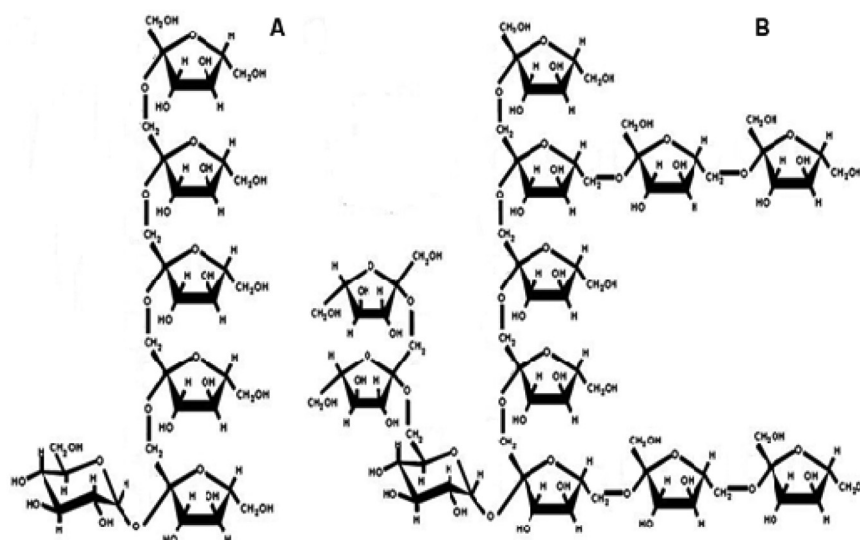


Fig. 1 Molecular structures of inulin-type fructans (A) and agavins (B).

Several lines of evidence suggest that prebiotics (substrates that selectively stimulate the growth of the bifidobacteria and lactobacilli that produce the SCFAs involved in the modulation of gut physiological functions) play an important role in the control of obesity and its associated metabolic disorders.<sup>13,14</sup> Inulin-type fructans are prebiotics, and they have specific effects on gut function.

López *et al.*<sup>15</sup> demonstrated that agave fructans are complex mixtures of fructans. Mancilla-Margalli and López<sup>16</sup> found that the fructans in *Agave tequilana* and other agave species, including *Agave angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana* and *A. fourcroydes*, are also complex mixtures of fructans that contain  $\beta(2-1)$  and  $\beta(2-6)$  linkages and outer (graminans fructans) and inner glucose (neoseris fructans) units; these fructans are called agavins (Fig. 1B). Mellado-Mojica and López<sup>17</sup> reported the presence of isomeric forms of agavins with different degrees of polymerization in 2- to 5-year-old *A. tequilana*, demonstrating the complex structures of these plants.

Agavins function as an indigestible dietary fiber, which is capable of promoting bifidobacteria and lactobacilli growth, and producing the SCFAs that are considered indicators of a well-balanced intestinal flora. To date, only the physiological effects of agavins from *A. tequilana* have been reported, and these agavins have shown important effects on the homeostasis of glucose and lipids in male C57BL/6J mice.<sup>18</sup> *Agave angustifolia* Haw. and *Agave potatorum* Zucc. are two economically important species from southeast Mexico, and these species mainly contain agavins. We previously studied the *in vitro* prebiotic effect of long- and short-DP agavins from *Agave angustifolia* Haw. as well as their mixtures. We observed that the agavins stimulated the growth of bifidobacteria and lactobacilli more efficiently than did commercial inulins. It was also shown that the short-DP agavins in the mixtures highly influenced the rate of fermentation.<sup>19</sup>

Therefore, in this study we evaluated in parallel the effect of supplementation with 10% agavins with short-DP from *Agave*

*angustifolia* Haw. (AASDP) or *Agave potatorum* Zucc. (APSDP) and chicory fructans (RSE) on energy intake, body weight gain, satiety-related hormones from the gut and blood (GLP-1 and ghrelin), blood glucose and lipids, and SCFAs from the gut of *ad libitum*-fed mice. In the present study, we test the hypothesis that compared with inulins, the short-DP agavins from two different species might also have a satietogenic effect that enhances satiety and decreases energy intake.

## Materials and methods

### Collection and purification of agavins from *Agave angustifolia* Haw. and *Agave potatorum* Zucc.

Plants from *A. angustifolia* and *A. potatorum* that were 8 and 6 years old, respectively, were collected from Santiago Matatlán and Sola de Vega, Oaxaca, Mexico. After the plant collection, agave stems were cut into four pieces, and the agavins were extracted according to López *et al.*<sup>15</sup> Briefly, one hundred grams of stem were extracted twice using 100 mL of 80% v/v ethanol with continuous shaking for 1 h at 55 °C. The sample was filtered, and the plant material was re-extracted using 100 mL of water for 60 min at 55 °C. The supernatants were mixed; chloroform was used to eliminate the organic fraction. The aqueous phase was concentrated by evaporation. The agavins were precipitated with absolute ethanol and separated into long- and short-DP agavins. AASDP and APSDP were spray-dried and stored in a desiccator until incorporated into the diets.

High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was used to determine the degree of polymerization of the agavins. The polymerization of AASDP and APSD ranged from 4 to 12 DP. RSE (Raftilose P95, Orafti, Tienen, Belgium) is a mixture of glucosyl-(fructosyl)*n*-fructose and (fructosyl)*m*-fructose with a range of 4 to 8.

## Experimental animals

The male (C57BL/6N) mice used in this study were purchased from Harlan Mexico. All the experiments were conducted according to the Guidelines of the Institutional Care and Use of Laboratory Animals Committee from Cinvestav-Mexico and according to Mexican Norm NOM-062-ZOO-1999. Male C57BL/6N mice (12 weeks of age at the beginning of the experiment, initially weighing approximately 23–25 g) were housed in a temperature- ( $22 \pm 2$  °C) and humidity-controlled room with a 12 h light–dark cycle. The animals were acclimatized for one week prior to the experiment. Following the acclimatization period, 24 mice were weighed and separated into four groups (6 mice per group, 3 mice per cage) depending on their diet. All animals had free access to water and food.

## Diets

The diets were prepared by LabDiet®/TestDiet® Richmond, IN. The control mice were fed a standard 5053 diet (STD), whereas the treated mice received a diet prepared by supplementing 90 g of STD diet with 10 g of AASDP or APSDP and RSE. The food intake was measured daily, the body weight was determined once a week, and the feces were collected weekly during the experimental period to evaluate the amount produced in 24 h. The mean daily energy intake ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) was calculated as follows: intake of food (g)  $\times$  energetic value of diet ( $\text{kJ g}^{-1}$ ). The energetic value was 14.86  $\text{kJ g}^{-1}$  for the STD diet, 14.36  $\text{kJ g}^{-1}$  for RSE and 14.40  $\text{kJ g}^{-1}$  for the diets with agavins.

## Blood samples

Blood samples from the tails were collected once a week to determine the serum glucose (GLU) and, lipid profiles (total cholesterol (COL), triglycerides (TG) and high-density lipoproteins (HDL)), which were measured using a Cardiocheck PA (FDA-approved). Low-density and very low-density (LDL and VLDL) lipoproteins were calculated from the COL, HDL, and TG. At the end of the experiment, the mice were anesthetized using an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (60  $\text{mg kg}^{-1}$  of body weight). Portal vein blood samples were collected in tubes containing heparin (50  $\mu\text{L}$ ); after centrifugation (3000 rpm per 10 min), the plasma was stored at  $-70$  °C until assayed. GLP-1 (7–36) amide was evaluated using a specific ELISA kit (GLP-1 active ELISA Kits, Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA). The active ghrelin concentration was measured using an RIA kit (active ghrelin RIA kit, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA).

## Tissue samples and analyses of intestinal peptides

The cecum and colon were immediately removed, and the colon was divided into three segments (proximal, medial, and distal) after the contents were removed. Each segment was weighed, fixed in liquid nitrogen, and stored at  $-70$  °C for further analysis. The segments of the cecum and colon were immediately washed using physiological saline (9 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl) and subsequently frozen using liquid nitrogen at  $-70$  °C stored until they were required for GLP-1 analysis. The full and

empty cecum, the liver, and the stomach were weighed, fixed in liquid nitrogen, and stored at  $-70$  °C for further analysis.

GLP-1 was extracted from the cecum and the intestinal segments using ethanol, acid (ethanol, sterile water, and 12 N HCl, 74 : 25 : 1), 5  $\text{mL g}^{-1}$  of tissue. The samples were homogenized at a velocity of 14 000 rpm and maintained at 4 °C for 24 h. The homogenates were centrifuged (10 min at 5000g), and the supernatant fractions were decanted and diluted 200- and 500-fold in a saline solution (9 g  $\text{NaCl L}^{-1}$ ) for the cecum and colon, respectively.<sup>4</sup> Intestinal GLP-1 concentrations were measured as previously described for the blood samples.

Ghrelin peptide was extracted from the mouse stomach by homogenizing the tissue with 1 M acetic acid and 20 mM HCl (10  $\text{mL g}^{-1}$ ) at a velocity of 14 000 rpm for 3 minutes. The homogenates were boiled for 5 min.<sup>20</sup> The homogenized tissue was centrifuged for 10 minutes at 14 000 rpm, and the supernatant was separated and used to determine the ghrelin content by ELISA testing (Ghrelin EIA kit, Phoenix Pharmaceuticals Belmont, CA).

## Short-chain fatty acids (SCFAs)

SCFAs were analyzed in a gas chromatograph using a flame ionization detector (GC-FID).<sup>21</sup> Briefly, the cecal and colonic contents were weighed (0.05 g) and an internal standard (2-methyl-valeric acid) was added. This solution was acidified using 50  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and subsequently centrifuged. SCFAs were extracted by shaking the solution with 600  $\mu\text{L}$  of diethyl-ether. One  $\mu\text{L}$  of the organic phase was injected directly into the capillary column (Nukol) of the GC-FID. The initial temperature was 80 °C, and the final temperature was 200 °C.

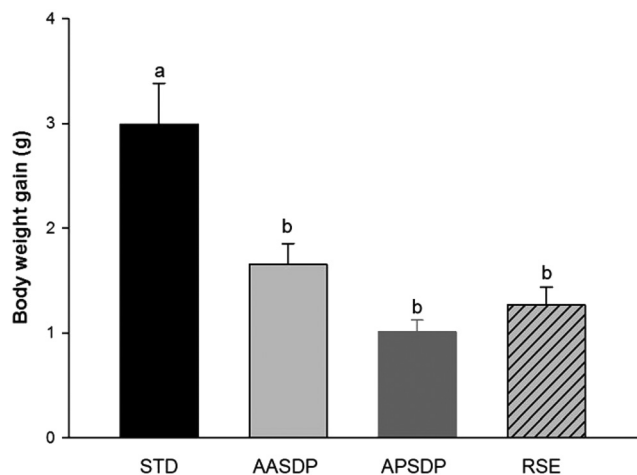
## Statistical analysis

The results are expressed as the mean values with the standard errors of the mean (SEM). Significant differences between the groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by the least squares difference or the Tukey test using Sigma Plot 11 (Copyright® Systat Software). Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ . Correlations between parameters were assessed using Pearson's correlation test.

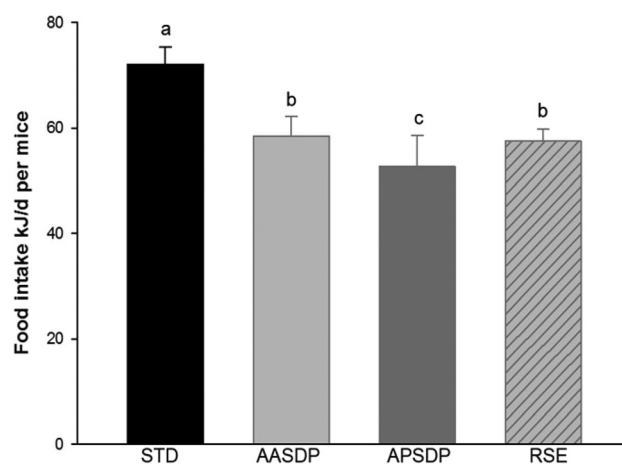
# Results

## Food intake and body weight gain

In general, a significant decrease in body weight gain (Fig. 2) and increase in feces excretion (Table 1) were observed in the fructan-fed mice compared with the mice in the STD diet group. The daily food and/or energy intake throughout the experiment was significantly lower ( $P \leq 0.05$ ) in all fructan-fed mice than in the STD-fed mice (Fig. 3). With regard to the food intake, the mice fed with the diets supplemented with AASDP-, APSDP-, and RSE- ate 16%, 24% and 20% less food, respectively, than the mice fed with the STD diet.



**Fig. 2** Body weight gain of mice fed with a standard diet STD or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE). Values are means with their standard errors and are shown by vertical bars (six mice per group). Mean values with different letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



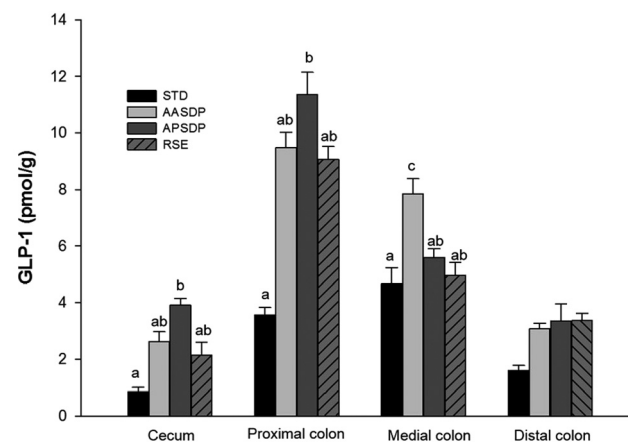
**Fig. 3** Food intake of mice fed a standard diet (STD), or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE). Mean values with their standard errors of the mean. Mean values with different letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

### Portal and intestinal concentrations of GLP-1

The measurement of the GLP-1 content in the different segments of the colon revealed (Fig. 4) that the mice fed with the diets supplemented with the agavins and inulin exhibited a higher GLP-1 concentration in the proximal and medial colon than that in the mice fed with the STD diet. This increment was only significant in the proximal colon for the APSDP diet ( $11.36 \text{ pmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ). The GLP-1 concentrations in the medial colon increased 2-fold for the AASDP-fed mice compared with the STD-fed mice; however, in the distal colon, there was no significant difference.

AASDP and RSE caused a 2-fold increment in the cecal GLP-1 content compared with that for the STD-diet ( $2 \text{ vs. } 0.96 \text{ pmol g}^{-1}$ ), but it was significantly higher ( $4 \text{ pmol g}^{-1}$ ,  $P \leq 0.001$ ) for the APSDP-fed mice (Fig. 4).

Compared with the STD-fed mice, the APSDP-, AASDP-, and RSE-fed mice showed a higher GLP-1 concentration in the portal plasma vein (40, 93, and 16%, respectively) (Fig. 5).



**Fig. 4** Intestinal GLP-1 concentrations of mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE). Values are means with their standard errors of the mean. Mean values with different letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 1** Food intake, feces, weights of liver and cecum, cecal and colonic pH of mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE)<sup>a</sup>

	STD		AASDP		APSDP		RSE	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Food intake ( $\text{g d}^{-1}$ per mice)	5.34 <sup>a</sup>	0.07	4.05 <sup>b</sup>	0.12	3.59 <sup>c</sup>	0.09	3.99 <sup>b</sup>	0.14
Feces dry weight (g per cage)	2.83 <sup>a</sup>	0.10	3.21 <sup>b</sup>	0.07	3.55 <sup>b</sup>	0.04	3.26 <sup>b</sup>	0.19
Liver weight (g)	1.73 <sup>a</sup>	0.08	1.22 <sup>b</sup>	0.04	1.23 <sup>b</sup>	0.06	1.25 <sup>b</sup>	0.07
Cecum full % of mice body weight	1.80 <sup>a</sup>	0.05	3.00 <sup>b</sup>	0.08	3.41 <sup>c</sup>	0.03	2.99 <sup>b</sup>	0.08
Cecal pH	6.27 <sup>a</sup>	0.02	6.25 <sup>a</sup>	0.01	5.55 <sup>b</sup>	0.08	5.90 <sup>a</sup>	0.07
Colon pH	6.05 <sup>a</sup>	0.16	5.71 <sup>ab</sup>	0.10	5.35 <sup>b</sup>	0.08	5.48 <sup>b</sup>	0.03

<sup>a</sup> Mean values with the standard errors of the mean (SEM). Mean values with different superscript letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

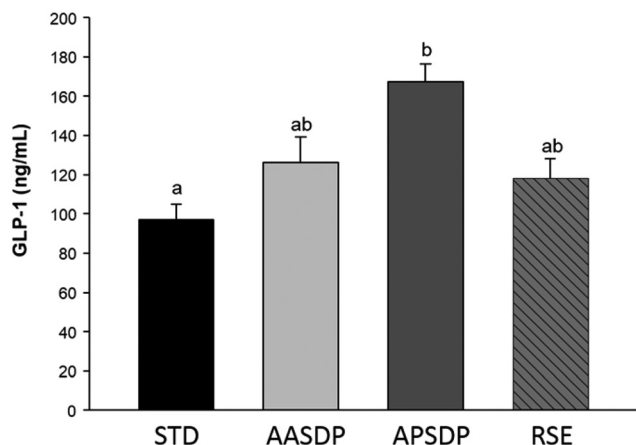


Fig. 5 Portal vein GLP-1 concentration of mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE). Mean values with their standard errors of the mean. Mean values with different letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

### Plasma and gastric ghrelin concentration

The ghrelin concentration in the portal plasma vein was  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  in the STD-fed mice, and it was significantly ( $P \leq 0.001$ ) lowered to  $4.39 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $3.10 \text{ ng mL}^{-1}$ , and  $2.81 \text{ ng mL}^{-1}$  in the AASDP-, APSDP-, and RSE-fed mice, respectively (Fig. 6A).

The gastric ghrelin concentration significantly decreased (65%,  $P \leq 0.05$ ) in the mice that consumed the agavin- and inulin-diets compared with that in the STD group (Fig. 6B).

### Cecal concentrations and proportions of SCFAs

Our results showed that the ingestion of fructans led to higher production of SCFAs in the gut. Additionally, the total cecum weight was significantly higher in the fructan-fed mice, with a

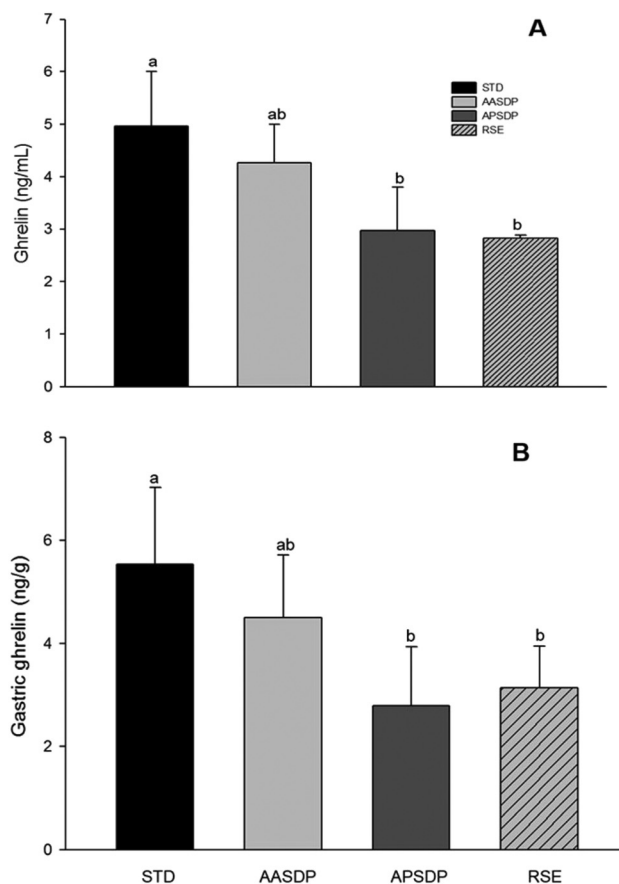


Fig. 6 Portal ghrelin (A) and gastric ghrelin concentration (B) of mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE). Values are means with their standard errors shown by vertical bars. Mean values with different letters were significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 2 Short chain fatty acids (SCFAs) concentrations ( $\text{mmol g}^{-1}$  wet content) in the gut mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* (AASDP) or *Agave potatorum* (APSDP) and raftilose (RSE)<sup>a</sup>

	STD		AASDP		APSDP		RSE	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
<b>Cecum content SCFAs</b>								
Acetate	166.05 <sup>a</sup>	5.48	125.62 <sup>ab</sup>	1.36	117.61 <sup>b</sup>	3.99	138.86 <sup>ab</sup>	1.54
Propionate	68.46	1.02	72.34	2.34	69.66	1.42	68.27	0.32
Butyrate	21.44 <sup>a</sup>	1.02	23.25 <sup>a</sup>	1.31	34.59 <sup>b</sup>	2.29	26.80 <sup>a</sup>	1.20
Proportion	65/27/8		56/32/10		53/31/16		59/29/11	
Lactate	81.96	1.36	81.65	2.82	78.75	1.82	82.71	3.59
<b>Colonic content SCFAs</b>								
Acetate	159.20	1.00	147.98	1.23	138.34	1.53	142.35	1.95
Propionate	57.19 <sup>a</sup>	1.00	73.09 <sup>b</sup>	1.72	67.57 <sup>ab</sup>	1.23	69.62 <sup>ab</sup>	0.55
Butyrate	19.14 <sup>a</sup>	0.65	24.54 <sup>ab</sup>	0.60	26.59 <sup>b</sup>	1.27	23.67 <sup>ab</sup>	1.78
Proportion	68/24/8		60/30/10		60/29/11		60/29/10	
Lactate	78.29	1.19	78.00	2.33	76.47	0.75	79.09	1.56
Total SCFAs	314		324		309		315	

<sup>a</sup> Values are means with the standard errors of the mean (SEM). Means values with different letters are statistically different, ( $P \leq 0.05$ ).



**Table 3** Plasma concentrations of glucose and lipid profile (total cholesterol (COL), triglycerides (TG), high-density lipoproteins (HDL), low-density and very low-density lipoproteins (LDL and VLDL) of mice fed a standard diet (STD) or diets supplemented with short-DP agavins from *Agave angustifolia* Haw. (AASDP), *A. potatorum* Zucc. (APSDP) and Raftilose (RSE)<sup>a</sup>

Diet	Glucose (mM)		Triglycerides (mM)		Cholesterol (mM)		HDL (mM)		LDL (mM)		VLDL (mM)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
STD	8.79 <sup>a</sup>	0.55	1.17 <sup>b</sup>	0.09	2.59	0.00	0.36 <sup>a</sup>	0.02	2.11 <sup>a</sup>	0.03	0.12	0.01
AASDP	7.00 <sup>b</sup>	0.35	0.57 <sup>a</sup>	0.05	2.40	0.06	0.62 <sup>b</sup>	0.05	1.39 <sup>b</sup>	0.07	0.10	0.00
APSDP	7.05 <sup>b</sup>	0.25	0.62 <sup>ab</sup>	0.16	2.30	0.05	0.55 <sup>b</sup>	0.06	1.33 <sup>b</sup>	0.04	0.11	0.03
RSE	7.98 <sup>ab</sup>	0.24	0.66 <sup>ab</sup>	0.07	2.30	0.00	0.70 <sup>b</sup>	0.04	1.16 <sup>b</sup>	0.08	0.13	0.01

<sup>a</sup> Values are means with the standard errors of the mean (SEM). Means values with different letters are statistically different, ( $P \leq 0.05$ ).

considerable decrement of cecal pH, compared with that in the STD group (Table 1). As expected, acetic acid (166 mmol g<sup>-1</sup>) was the most common acid generated in the cecum of the STD-fed mice, and the next most common was propionic acid (68–72 mmol g<sup>-1</sup>) (Table 2). The increase in butyric acid was significant (41%,  $P \leq 0.001$ ) when comparing the APSDP-fed mice with the AASDP- and RSE-fed mice. The AASDP- and APSDP-fed mice showed a greater proportion of propionic acid (31%), whereas the mice that received the STD diet generated a higher proportion of acetic acid (65%).

In the colon, the increase in propionic acid was only significant for the AASDP-fed mice (73 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ) and the proportion of propionic acid to other acids remained similar in the cecum (30%). The butyric acid level increased significantly in the APSDP-fed mice (26.59 mmol g<sup>-1</sup>,  $P \leq 0.001$ ). SCFAs were produced in the colon by microbial fermentation in an approximate molar ratio of 57 : 30 : 13 of acetate, propionate, and butyrate in the APSDP-fed mice.

### Serum glucose, TG, COL, and HDL

The concentration of glucose decreased by 24, 22, and 16% in the AASDP-, APSDP-, and RSE-fed mice, respectively, compared with the STD-fed mice (Table 3). However, the liver weight decreased significantly (45%,  $P \leq 0.001$ ) compared with that in the mice fed the STD diet. The biochemical modification observed in these groups included decreases in COL, TG, LDL, and VLDL (Table 3). We found a decrease in the cholesterol and TG in the portal vein plasma of the AASDP- and APSDP-fed mice. The serum concentration of TG decreased significantly by 55% (1.17–0.57 mM,  $P \leq 0.05$ ) in the AASDP-fed mice and was associated with a reduction of the VLDL plasma, which decreased by 17% compared with that in the STD-fed mice. In contrast, the HDL in the fructan-fed mice increased significantly (73%,  $P \leq 0.05$ ). The LDL decreased by 34% with a positive correlation with the energy intake, which was significantly lower for the fructan supplemented diets.

## Discussion

In the present paper, we report an interesting effect: dietary short-DP agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* modulate the satietogenic effect in mice. We observed that the

energy intake and body weight gain were similarly decreased in the three mouse groups that received fructans compared with those in the STD group, and the decrease was only significant ( $P \leq 0.05$ ) for APSDP-fed mice. The effect of fructans on the reduction in food and energy intake can be attributed to the fermentation in the cecum–colon. Other studies using RSE reported similar results.<sup>4,18</sup> The fermentation of fructans is key and leads to the production of SCFAs, which are involved in the modulation of gut physiological functions. The increase we observed in the cecum was similar to that of other reports from studies of the fructan consumption by rats and mice.<sup>4,11</sup>

Agavins, particularly those used in the APSDP-diet, more efficiently stimulated (2-fold) the production of GLP-1 than did the RSE-diet. The AASDP- and APSDP-diets increased the GLP-1 in the proximal colon and cecum to levels similar to those in previous reports using oligofructose in male Wistar rats.<sup>3</sup> GLP-1 might also play a role in the modulation of food intake, and glycaemia,<sup>22</sup> because the concentrations of both the agavins and inulin increased in the portal vein.

The fermentation of non-digestible carbohydrates into SCFAs allows these metabolites to promote both proglucagon mRNA expression in intestine L-cells and the production of GLP-1.<sup>23</sup> Diverse studies<sup>3,4,10,18</sup> have reported that GLP-1 reduces the release of glucagon and slows down gastric emptying, increasing abdominal fullness and controlling food intake. Cani *et al.*<sup>9</sup> showed that the effects of RSE did not affect satiety when RSE was given to GLP-1 receptor knock-out mice, or when given to mice that were chronically treated with a GLP-1 receptor antagonist; thus, the effect of fructans on satiety (body weight gain) is due to the interaction with GLP-1 production.

Some positive effects similar to those already described for the agavins from *A. tequilana*<sup>18</sup> were demonstrated, namely, decreases in energy intake and body weight gain, as well as, an increase in GLP-1. The increases in the GLP-1 content in the cecum and the colon segments are consistent with the GLP-1 secretion observed in the portal vein ( $r^2 = 0.777$ ,  $P \leq 0.0044$ ). This finding is associated with the significant decreases observed in energy intake and GLP-1, suggesting a negative correlation (Pearson's test;  $r^2 = -0.665$ ,  $P \leq 0.0068$ ), and is also associated with the correlation between the body weight gain and GLP-1 ( $r^2 = -0.564$  and  $P \leq 0.020$ ) for the groups that received the fructan diets compared with the STD group.

We found that the secreted gastric ghrelin, an orexigenic peptide, decreased in the mice that consumed agavins or inulin. The reduction in the ghrelin concentration in the portal plasma vein of the mice that consumed fructans agrees with a report that showed a decrease in the circulating ghrelin level in rats.<sup>24</sup> The reduction in the ghrelin concentration presented an inverse correlation with GLP-1 ( $r^2 = -0.634$ ,  $P \leq 0.05$ ) in the portal plasma vein; therefore, this decrease might be attributed to the secretion of GLP-1.<sup>25</sup>

Specific studies have shown that portal GLP-1 and the type of ingested nutrients might influence the production of ghrelin, because the speed of nutrient absorption and intestinal osmolality also affect secretion.<sup>25,26</sup> Lippel *et al.*<sup>25</sup> have demonstrated that GLP-1 contributes to the inhibition of ghrelin secretion in an isolated rat stomach model.

Cummings<sup>27</sup> reported that ghrelin secretion might be dependent on the amount of calories ingested, and on the type of nutrients because the speed of nutrient absorption and intestinal osmolality also affect ghrelin secretion. Therefore, the decrease in the ghrelin concentration in this study could also be attributed to the caloric value of each of the diets.

The concentration of SCFAs in the cecum and colon, particularly propionic and butyric acid, increased significantly in the agavin-fed mice. APSDP was fermented in the cecum and the proximal colon, increasing the butyric acid level.

Zhou *et al.*<sup>28</sup> showed that butyrate was the most effective SCFA compared with acetate and propionate at increasing the proglucagon expression in the L-cells in the cecum of rats. Our results showed that the AASDP diet (DP 4 to 12) generated a significant amount of propionic acid in the colon, whereas the APSDP diet with a slightly smaller DP (4 to 9) generated higher levels of butyrate in the cecum and colon. Moreover, the relative proportion of acetate, propionate, and butyrate depends on the grade of polymerization, solubility and fructan structure.<sup>29</sup>

The high amount of fermentation in the cecum could be related to the greater solubility of the agavins that contained  $\beta$  (2-1) and  $\beta$  (2-6) linkages, which provide more accessible fructose units. As mentioned previously, agavins contain branches in their molecules; this characteristic is advantageous for fermentation, because bacteria have several more starting points for initiating the fermentation of these carbohydrates than they do for RSE. The results show that the STD and AASDP groups begin with a similar pH in the cecum, and the APSDP group starts with a more acidic pH, indicating that it ferments in the cecum. In the colon, the total SCFAs increased in the AASDP group; thus, the pH decreased significantly compared with that in the STD group. This effect suggests a significant increase in the bifidogenic activity, principally in the production of SCFAs.

The increase in the production of total SCFAs through bacterial fermentation of the AASDP- and APSDP-diets resulted in a significant decrease ( $P \leq 0.001$ ) in the colonic pH, thus reducing the pathogen growth.

In this study, when agavins or inulins were present in the diet of mice (10%), an increase in the cecal SCFA production was observed; this result implies that fructans are interesting candidates for the regulation of lipid metabolism. Short-chain

fatty acids reach the liver through the portal vein. In this work, the concentration of acetate decreased significantly in the cecum of the agavin-fed mice, and this finding is relevant because acetate is a precursor of acetyl Co-A.

In the cecum and colon, the propionic acid concentration increased more than 20% in the fructan-fed mice. This increase is associated with beneficial effects on carbohydrate and lipid metabolism.<sup>30,31</sup> It has also been reported that propionate inhibits the synthesis of lipids in the isolated hepatocytes of normal rats, particularly the incorporation of acetate during the synthesis of cholesterol;<sup>32</sup> this inhibition could explain the decrease in the COL and TG in the portal vein plasma of the agavin-fed mice. The reduction in the production of TG from fatty acids is due to the inhibition of lipogenic enzymes in the liver, including fatty acid synthase (FAS) a key enzyme in the secretion of VLDL-TG. Therefore, the hypolipidemic effect of AASDP and APSDP may be due to changes in liver lipid metabolism, similar to those reported in RSE-fed mice.<sup>33-35</sup>

This behavior can also be connected to the energy balance, suggesting a positive correlation (Pearson's test) between the body weight gain and the triglyceridemia with an  $r^2 = 0.992$  and  $P \leq 0.008$ . A low body weight gain might be associated with a decrease in the serum concentration of triglycerides similar to that observed by Dobrian *et al.*<sup>36</sup> with soy isoflavin. Ji and Friedman<sup>37</sup> reported that triglyceridemia during fasting is a potential predictor of diet-induced obesity in mice.

In contrast, Kok *et al.*<sup>33</sup> reported that RSE intake reduces postprandial glycaemia and insulinemia by 17 and 26%, respectively; this change might also explain the lower lipogenesis and thus, lower hepatic TG production. Here, we confirm the decrease in TG due to RSE. Our data show that the ingestion of AASDP and APSDP reduces GLU. This finding would suggest that a decrease in TG due to agavin intake is also attributable to a decrease in the glucose availability. The agavins might improve the glucose availability in mice, a phenomenon that can be ascribed to insulin enhancement. GLP-1 plays an important role in lowering the blood glucose level, because it increases the level of circulating insulin, and thus lowers the blood glucose concentration or affects the blood glucose concentration by inhibiting glucagon secretion. Similar data have been reported for RSE.<sup>32</sup> Our data show a negative correlation between GLP-1 and GLU with an  $r^2 = -0.653$  and  $P \leq 0.0061$ .

Among SCFAs, butyric acid is the most relevant. The APSDP diet showed butyrogenic properties similar to those reported for RSE.<sup>29</sup> The increase in the butyrate concentration in the cecum-colon tract may influence gut functions. This change could contribute to the increased GLP-1 production *via* two mechanisms: L-cell differentiation and/or a proglucagon expression increment.<sup>3</sup>

## Conclusions

We showed that supplementing a mouse diet with 10% agavins reduced food consumption and total energy intake.

The body weight gain decreased by 42–49% in the animals ingesting fructans compared with the standard group of mice. Short-DP agavins from *A. angustifolia* Haw. and *A. potatorum* Zucc. modulated the satiety hormone secretion in different colonic segments with consequences on the portal GLP-1 concentration (increase) and the peripheral ghrelin concentration (decrease). The AASDP diet generated a significant amount of propionic acid in the colon, whereas the APSDP diet showed butyrogenic properties. This study reports for the first time the hypotriglyceridemic effect of the agavins AASDP and APSDP. The difference in the behavior of agavins compared with RSE could be attributed to the linkage type, DP and the highly branched structure of these fructans. We mainly attributed the capability of agavins to reduce food and energy intake to a metabolic effect in the cecum-colon, caused by the different fermentation of each agave species. Finally, these findings highlighted the potential of agavins from *A. angustifolia* and *A. potatorum* to improve glucose and lipid homeostasis through the production of SCFAs in the gut and through the secretion of the peptides involved in appetite regulation; these agavins displayed the potential for promising effects on obesity control and the associated metabolic disorders.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

We are grateful to the producers of agave in Santiago Matatlán and Sola de Vega, Oaxaca, for their support in collecting plant material. This work was financed by Fundación Produce Oaxaca, Mexico. Patricia A. Santiago García also thanks CII-DIR-IPN-Oaxaca and CINVESTAV-Irapuato, Gto. Mexico for the facilities granted to her during her doctoral studies.

## References

- 1 J. J. Holst, C. F. Deacon, T. Vilsboll, T. Krarup and S. Madsbad, Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes, *Trends Mol. Med.*, 2008, **14**, 161–168.
- 2 D. J. Drucker, The biology of incretin hormones, *Cell Metab.*, 2006, **3**, 153–165.
- 3 P. D. Cani, S. Hoste, Y. Guiot and N. M. Delzenne, Dietary non digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats, *Br. J. Nutr.*, 2007, **98**, 32–37.
- 4 M. Tschöp, D. L. Smiley and M. L. Heiman, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature*, 2000, **407**, 908–913.
- 5 A. M. Wren and S. R. Bloom, Gut hormones and appetite control, *Gastroenterology*, 2007, **132**, 2116–2130.
- 6 M. K. Reimer, G. Pacini and B. O. Ahrén, Dose-dependent inhibition and ghrelin of insulin secretion in the mouse, *Endocrinology*, 2003, **144**, 916–921.
- 7 P. D. Cani, C. Dewever and N. M. Delzenne, Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats, *Br. J. Nutr.*, 2004, **92**, 521–526.
- 8 P. D. Cani, C. A. Daubioul, B. Reusens, C. Remacle, G. Catillon and N. M. Delzenne, Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats, *J. Endocrinol.*, 2005, **185**, 457–465.
- 9 P. D. Cani, C. K. Knauf, M. A. Iglesias, D. J. Drucker, N. M. Delzenne and R. Burcelin, Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide-1 receptor, *Diabetes*, 2006, **55**, 1484–1490.
- 10 A. Flint, A. Raben, A. K. Ersboll, J. J. Holst and A. Astrup, The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2001, **25**, 781–792.
- 11 J. J. Meier, B. Gallwitz, W. E. Schmidt and M. A. Nauck, Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives, *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, **440**, 269–279.
- 12 J. C. K. Donahey, G. van Dijk, S. C. Woods and R. J. Seeley, Intraventricular GLP-1 reduces short but not long term food intake or body weight in lean and obese rats, *Brain Res.*, 1998, **229**, 75–83.
- 13 N. M. Delzenne, Oligosaccharides: state of the art, *Proc. Nutr. Soc.*, 2003, **62**, 177–182.
- 14 J. Busserolles, E. Gueux, E. Rock, C. Demigne, A. Mazur and Y. Rayssiguier, Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats, *J. Nutr.*, 2003, **133**, 1903–1908.
- 15 M. G. López, N. A. Mancilla-Margalli and G. Mendoza-Díaz, Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7835–7840.
- 16 N. A. Mancilla-Margalli and M. G. López, Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasylium* species, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7832–7839.
- 17 E. Mellado-Mojica and M. G. López, Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 11704–11713.
- 18 J. E. Urías-Silvas, P. D. Cani, E. Delmée, A. Neyrinck, M. G. López and N. M. Delzenne, Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasylium* spp., *Br. J. Nutr.*, 2007, **99**, 254–261.
- 19 P. A. Santiago-García and M. G. López, Prebiotic effect of agave fructans and mixtures of different degrees of polymerization from *Agave angustifolia* Haw., *Dyn. Biochem. Process Biotech. Mol. Biol.*, 2009, **1**, 52–58.
- 20 H. Suzuki, T. Masaoka, H. Hosoda, T. Ota, Y. Minegishi, S. Nomura and H. Ishii, *Helicobacter pylori* infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils, *Gut*, 2004, **53**, 187–194.

- 21 P. A. Femia, C. Luceri, P. Dolara, A. Giannini, A. Bigger and M. Salvadori, Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 2002, **23**, 1953–1960.
- 22 N. N. Kok, L. Morgan, C. Williams, M. Roberfroid, J. Thissen and N. Delzenne, Insulin, GLP-1, GIP and IGF-1 as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats, *J. Nutr.*, 1998, **128**, 1099–1110.
- 23 R. A. Reimer and M. I. Mc Burney, Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats, *Endocrinology*, 1996, **137**, 3948–3956.
- 24 H. M. Lee, G. Wang, E. W. Englander, T. Kojima, K. Nakahara and T. Ida, Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats, *J. Endocrinol.*, 2002, **174**, 283–288.
- 25 F. Lippl, F. Kircher, J. Erdmann, H. D. Allescher and V. Schusdziarra, Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach, *Regul. Pept.*, 2004, **119**, 93–98.
- 26 J. Overduin, R. S. Frayo, H. J. Grill, J. M. Kaplan and D. E. Cummings, Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation, *Endocrinology*, 2005, **146**, 845–850.
- 27 D. E. Cummings, Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight, *Physiol. Behav.*, 2006, **89**, 71–84.
- 28 J. Zhou, M. Hegsted, K. L. Mc Cutcheon, *et al.* Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut, *Obesity*, 2006, **14**, 683–689.
- 29 U. Nilsson and M. Nyman, Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition: degree of polymerization and solubility, *Br. J. Nutr.*, 2005, **94**, 705–713.
- 30 A. M. Henningsson, I. M. E. Bjo and E. M. G. L. Nyman, Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 3098–3104.
- 31 J. M. Campbell, G. C. Fahey and B. W. Wolf, Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats, *J. Nutr.*, 1997, **127**, 130–136.
- 32 C. Demigné, C. Morand, M. A. Levrat, C. Besson, C. Moundras and C. Rémésy, Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes, *Br. J. Nutr.*, 1995, **74**, 209–219.
- 33 N. Kok, M. Roberfroid, A. Robert and N. Delzenne, Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats, *Br. J. Nutr.*, 1996, **76**, 881–890.
- 34 M. Fiordaliso, N. Kok, J. P. Desager, F. Goethals, D. Deboyser, M. Roberfroid and N. Delzenne, Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats, *Lipids*, 1995, **30**, 163–167.
- 35 N. M. Delzenne, P. D. Cani and A. M. Neyrinck, Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data, *J. Nutr.*, 2007, **137**, 2547S–2551S.
- 36 A. D. Dobrian, M. J. Davies, R. L. Prewitt and T. J. Lauterio, Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity, *Hypertension*, 2000, **35**, 1009–1015.
- 37 H. Ji and M. I. Friedman, Fasting plasma triglyceride levels and fat oxidation predicts dietary obesity in rats, *Physiol. Behav.*, 2003, **78**, 767–772.

## *Agradecimientos...*

Agradezco a todas aquellas personas que contribuyeron en mi formación profesional a lo largo de este proyecto de Doctorado en especial a:

**Dra. Mercedes G. López** por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por contribuir a mi formación académica e invaluable apoyo en todo momento. Mi agradecimiento y admiración.

A los miembros de mi comité tutorial: **Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, Dr. Margarito Martínez Cruz, Dr. Celerino Robles Pérez y Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez**, por sus acertados comentarios, que permitió terminar finalmente este objetivo personal y profesional.

Al **Instituto Politécnico Nacional/ Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional (CIIDIR-OAX.)** por proporcionarme los recursos y las facilidades necesarias para mi desarrollo y formación como Doctora en Ciencias.

Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN)** por proporcionarme la infraestructura y recursos necesarios para el presente trabajo de Investigación.

A la **Dra. Erika Mellado Mojica, M en C. Ana Sarahí García, M. en C. María de Jesús Alvarado Balleza, M en C. Concepción García, Dra. Isabel García, M en C. Alicia Huazano, Dra. Elena Franco, Dra. Rosario Abraham**, estudiantes y colaboradores del Laboratorio de Química de Productos Naturales, por sus orientaciones y apoyo técnico proporcionado durante el desarrollo experimental del mismo; pero sobre todo, por su amistad y cariño.

A mi familia; a **Santi** mi nieto adorado! quien trajo a mi vida luz y alegría nuevamente; a **Maciel Martínez**, y **Gabriel Osorio** por su cariño, apoyo y solidaridad.

A mis hermanos, **América Santiago García, Dora María Melchor García, Virgilio Melchor García, Nicolás Melchor García y Fany Melchor García** por el amor que hemos compartido, por su cariño, apoyo y paciencia, durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Finalmente agradecer a **Dios** por permitirme alcanzar esta meta, a pesar de las adversidades.

*Patricia Araceli Santiago García*

2015