BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Extracción de fibra soluble del aguamiel y su posible uso como aditivo alimentario”

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:
Aída Irene Vallejo García

Directora:
Dra. Ivonne Pérez Xochipa
Codirectora:
Dra. Julia María Alatorre Cruz

Mayo 2024

BIO TECNOLOGÍA

Para mi familia, el motor de mi vida…

Índice

Resumen **4**
Marco teórico **5**
Definición de fibra dietética 5
Clasificaciones de la fibra 6
Alimentos que contienen fibra soluble e insoluble 8
Aguamiel 10
Fibra soluble del aguamiel y su composición. 10
Prebióticos 12
Propiedades funcionales de la fibra soluble 12
Valores recomendados para la ingesta de fibra dietética 13
Valores recomendados para la ingesta de inulina y FOS 14
Utilización de la fibra soluble en la industria alimentaria 15
Objetivo general **17**
Objetivos específicos **17**
Materiales y Metodología **18**
Adquisición del aguamiel 19
Extracción de la fibra soluble del aguamiel 19
Determinación del porcentaje de fibra soluble 19
Caracterización de la fibra soluble del aguamiel por cromatografía 20
Pruebas de capacidad antioxidante 20
Determinación de fenoles totales por el reactivo de Folin Ciocalteau 21
Ensayo de la capacidad antioxidante por el radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) 21
Prueba de capacidad de retención de agua 22
Prueba de capacidad de retención de aceite 22
Prueba de solubilidad en agua 23
Ensayo de digestión in vitro 23
Ensayo microbiológico 24
Búsqueda de la concentración óptima de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento del probiótico Bacillus clausii 25
Curva de crecimiento microbiano por densidad óptica 25
Preparación del medio de cultivo 25
Preparación del preinóculo 25
Mediciones de la curva de crecimiento utilizando el espectrofotómetro 25
Análisis estadístico 26
Resultados y discusión **26**
Determinación de fibra soluble 26

Capacidad antioxidante 28
Propiedades fisicoquímicas 30
Solubilidad en agua 30
Capacidad de retención de agua 31
Capacidad de retención de aceite 32
Ensayo de digestión in vitro 33
Ensayo microbiológico 34
Concentración óptima de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento del probiótico Bacillus clausii 34
Curva de crecimiento microbiano por densidad óptica 35
Conclusiones **37**
Anexo **38**
Bibliografía **39**

Resumen

En los últimos años, la savia del maguey (aguamiel) ha cobrado interés en el sector académico, debido a que es una fuente natural de diferentes compuestos nutracéuticos como aminoácidos, minerales, vitaminas, saponinas, compuestos fenólicos y fibra soluble; sin embargo, gran parte de la investigación se ha centrado en la diversidad microbiana y enzimática que participa en el proceso de fermentación del aguamiel para la producción de pulque; dejando de lado la posibilidad de que los metabolitos secundarios de la savia del maguey se utilicen como aditivos para mejorar la calidad nutricional de los alimentos. Por esa razón, el objetivo de este proyecto de tesis fue explorar el potencial de la fibra soluble del aguamiel para ser empleada como aditivo alimentario. Para ello fue necesario la obtención, cuantificación y caracterización de la fibra soluble del aguamiel, así como la determinación de su capacidad antioxidante, de sus propiedades fisicoquímicas y de su potencial prebiótico. Se extrajo la fibra soluble del aguamiel a razón de 2.37 gramos por litro, así también, se determinó que el 60% de la muestra es inulina, con un 14.5% perteneciente al subgrupo de fructooligosacáridos (FOS). Se encontró que la capacidad antioxidante de la fibra del aguamiel fue menor en comparación con lo reportado para la capacidad antioxidante de la bebida aguamiel. Se halló que las propiedades fisicoquímicas de la fibra soluble del aguamiel son equiparables con las de la inulina de agave comercial. Por otra parte, se detectó que la concentración óptima para el crecimiento del probiótico *Bacillus clausii* fue de 0.5 g de fibra soluble del aguamiel/ 100 mL. Además, se examinó su potencial como prebiótico, identificando que la muestra permaneció intacta tras la digestión *in vitro*, y que fue utilizada por el probiótico *Bacillus clausii* para su crecimiento, información que brinda las bases para la creación de futuros alimentos funcionales o simbióticos.

Marco teórico

Definición de fibra dietética

Definir el concepto de fibra dietética ha sido una tarea desafiante y llena controversias, debido a que dicho polímero incluye una amplia gama de compuestos complejos, sumado a que los diversos tipos de fibras pueden tener una o más funciones fisiológicas o beneficios para la salud (Westenbrink *et al*., 2013) .

A lo largo de los años, diversas instituciones han presentado su definición de fibra dietética, como se muestra a continuación:

-La American Association of Cereal Chemists mencionó que la fibra dietética es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso (Kohn, 2000) .

-Posteriormente, la European Food Safety Authority definió a la fibra dietaria como "carbohidratos no digeribles más lignina, incluidos todos los componentes de carbohidratos que se encuentran en los alimentos que no son digeribles en el intestino delgado humano y pasan al intestino grueso" (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2010).

-De igual manera, durante el mismo año, la comisión del CODEX Alimentarius la señaló como polímeros de carbohidratos con diez o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por las enzimas endógenas en el intestino delgado (SI) de los humanos y pertenecen a las siguientes categorías:

- Polímeros de carbohidratos comestibles que se producen naturalmente en los alimentos.
- Polímeros de carbohidratos obtenidos de materias primas alimentarias por medios físicos, enzimáticos o químicos.

- Polímeros de carbohidratos sintéticos con algún efecto fisiológico beneficioso para la salud.

Cabe destacar que las controversias en la definición de fibra dietética, se refieren a la inclusión o no de los oligosacáridos con grados de polimerización (DP) en el rango de 3 a 9 tales como la inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, maltodextrinas resistentes, rafinosa y otros (Flores, 2019).

Dicho debate se enfocó principalmente en la falta de apoyo científico para respaldar las diferencias en los efectos fisiológicos entre los oligómeros con DP 3-9 y aquellos con una mayor DP, y en la ausencia de métodos fácilmente aplicables que puedan distinguir claramente entre ellos (Howlett *et al*., 2010).

Por lo tanto, la decisión de incluir los oligosacáridos con DP de 3 a 9, la puede tomar las autoridades de salud competentes de cada país y México corresponde a uno de los países que la incluye (*Tabla 1.*).

Tabla 1. Listas de instituciones y países que aceptan oligosacáridos con DP 3-9 como fibra dietética.

Lista de instituciones	Lista de países
● Asociación Estadounidense de Químicos de Cereales (AACC) ● Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) ● Comisión del Codex Alimentarius (CAC) ● Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ● Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ● Normas alimentarias de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) ● Instituto de Medicina (IOM) ● Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI)	● Brasil ● Canadá ● Chile ● China ● Indonesia ● Japón ● Corea ● Malasia ● **México** ● Singapur ● Tailandia ● Taiwán

Tabla recuperada de (Dai & Chau, 2016)

Clasificaciones de la fibra

La suma de las fibras dietéticas, que son obtenidas de fuentes intrínsecas de plantas, más las fibras funcionales, las cuales son sintetizadas o fabricadas y agregadas a los alimentos, dan como resultado la fibra dietética total (Sharma *et al*., 2016)

La fibra dietética se puede clasificar de varias maneras. Una de sus clasificaciones es de acuerdo con su solubilidad en agua (*Imagen 1.*), y puede ser catalogada como fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble.

La fibra dietética soluble se fermenta en el colon y se encuentra frecuentemente en legumbres, frutas y verduras. Está compuestas por pectina, β-glucanos, galactomananos, fructanos, oligosacáridos, algunas hemicelulosas, guar, gomas y mucílagos (Sharma *et al*., 2016)

Mientras que la fibra dietética insoluble, como lo menciona su nombre no se disuelve en agua, se deriva comúnmente de los cereales y consiste principalmente en elementos de la pared celular como: celulosa, lignina y hemicelulosa (Moskovitz & Kim, 2004)

Otra clasificación de la fibra dietética toma en cuenta su efecto en el colon y se clasifica en fermentable (es decir, metabolizada por bacterias del colon) o no fermentable (Moskovitz & Kim, 2004).

Algunas de las fibras solubles, al ser fermentables, pueden presentar potencial prebiótico y se asocian más con reducción del colesterol en el cuerpo y disminución de la cantidad de glucosa absorbida en el intestino delgado.

En cambio los efectos fisiológicos de la fibra insoluble son aumentar la masa fecal, la regulación intestinal y la absorción de agua (Yangilar, 2013)

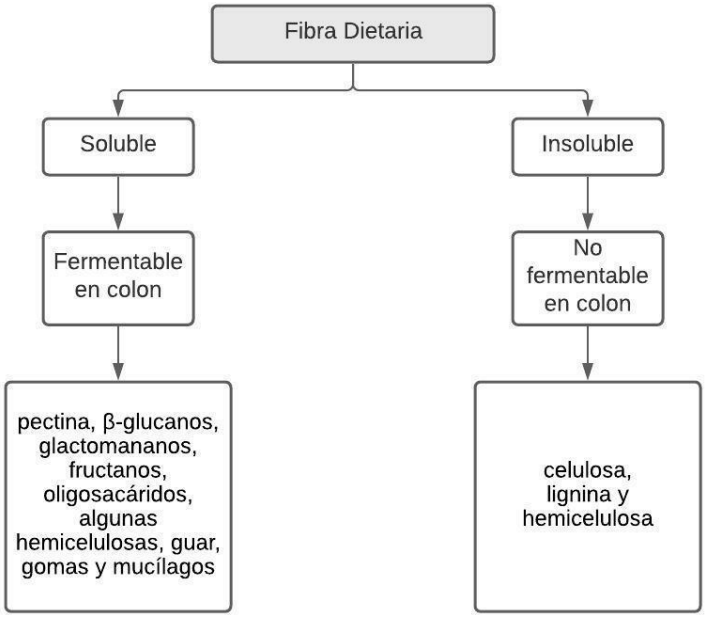

Imagen 1. Clasificación de la fibra dietética de acuerdo a su solubilidad en agua. Elaboración propia.

Alimentos que contienen fibra soluble e insoluble

Una amplia variedad de alimentos, como cereales, verduras, frutas y frutos secos, se consideran fuente de fibra soluble e insoluble y tanto la cantidad como la composición de fibras difieren de un alimento a otro (Sharma *et al*., 2016).

En 2005 se reportó que los cereales son una de las principales fuentes de fibra dietética, correspondiendo aproximadamente al 50% del consumo de fibra en países occidentales, las verduras contribuyen al 30-40% de la ingesta de fibra, las frutas aproximadamente al 16% y el 3% restante a otras fuentes menores (Lambo *et al*., 2005).

En la *Tabla 2*. Se presentan varios alimentos y su contenido de fibra soluble e insoluble.

Tabla 2. Contenido de fibra dietética de diversas fuentes alimentarias.

	Fibra dietética (g/ 100 g de porción comestible)		
Fuente	**Total**	**Insoluble**	**Soluble**
Granos			
Cebada	17.3	-	-
Maíz	13.4	-	-
Avena	10.3	6.5	3.8
Arroz (crudo)	1.3	1	0.3
Arroz (cocido)	0.7	0.7	0
Trigo (grano entero)	12.6	10.2	2.3
Germen de trigo	14	12.9	1.1
Legumbres			
Judías verdes	1.9	1.4	0.5
Soja	15	-	-
Chícharos verdes (congelados)	3.5	3.2	0.3
Lentejas (crudas)	11.4	10.3	1.1
Frijoles blancos (crudos)	17.7	13.4	4.3
Verduras			
Papa sin piel	1.3	1	0.3
Espinaca	2.6	2.1	0.5
Nabo	2	1.5	0.5
Tomate (crudo)	1.2	0.8	0.4
Berenjena	6.6	5.3	1.3
Pepinos (pelados)	0.6	0.5	0.1
Coliflor (cruda)	1.8	1.1	0.7
Apio (crudo)	1.5	1	0.5
Zanahoria (cruda)	2.5	2.3	0.2
Brócoli (crudo)	3.29	3	0.29
Frutas			
Manzana (sin pelar)	2	1.8	0.2
Kiwi	3.39	2.61	0.8
Mango	1.8	1.06	0.74
Piña	1.2	1.10	0.10
Granada	0.6	0.49	0.11
Sandía	0.5	0.3	0.2
Uvas	1.2	0.7	0.5
Naranjas	1.8	0.7	1.1
Ciruelas	1.6	0.7	0.9
Fresa	2.2	1.3	0.9
Pera	3	2	1
Nueces y semillas			
Almendras	11.2	10.10	1.10
Coco (crudo)	9	8.5	0.5
Cacahuate (tostado en seco)	8	7.5	0.5

Tabla recuperada de (Dhingra et al., 2012)

En México, la savia del maguey (aguamiel) es fuente natural de fibra soluble; sin embargo, gran parte de la investigación se ha centrado en la diversidad microbiana y enzimática que participa en su proceso de fermentación para la producción de pulque (Ortiz-Basurto *et al*., 2008); dejando de lado la posibilidad de

que sus compuestos se utilicen como aditivos para mejorar la calidad nutricional de los alimentos.

Por esa razón, el actual trabajo de tesis se enfoca en evaluar el potencial de la fibra soluble del aguamiel para ser empleada como aditivo alimentario.

Aguamiel

El aguamiel es un jugo dulce e incoloro, con consistencia similar a una savia, que se obtiene del núcleo de la planta de agave, denominada maguey pulquero (Salem *et al*., 2017). Existen distintas especies de maguey pulquero, incluidas *Agave atrovirens, Agave americana, Agave ferox, Agave mapisaga y Agave salmiana* (Leal-Díaz *et al*., 2015). En las regiones donde se cultivan estos tipos de magueyes pulqueros, el aguamiel es tomado como una bebida refrescante; sin embargo, además de tener un delicioso sabor, también posee compuestos nutracéuticos.

La composición de la savia de maguey o aguamiel está dada por proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos, saponinas y compuestos fenólicos, los cuales confieren actividad antihipocolesterolémica (Ortiz-Basurto *et al*., 2008). Adicionalmente, el aguamiel posee actividad probiótica debido a la presencia de microbiota autóctona como *Lactobacillus paracasei, Lactobacillus sanfranciscensis, Lactobacillus spp., Leuconostoc citreum, Acetobacter orientalis, Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc kimchii, Erwinia rhapontici*, *Enterobacter spp. y Acinetobacter radioresisten, así como levaduras como Clavispora lusitaniae (antes Candida lusitaniae) y Kluyveromyces marxianus* (Martínez-Ortiz *et al*., 2024). Sin mencionar que es rica en glucosa, sacarosa, fructosa, inulina y fructooligosacáridos (FOS) (Enríquez-Salazar *et al*., 2017).

Fibra soluble del aguamiel y su composición.

El aguamiel, al ser la savia de diferentes especies de agaves, es rica en fructanos, como la inulina y los FOS (Salem *et al*., 2017). En la última década, dicha bebida ha sido objeto de numerosos estudios con el fin de determinar su composición.

En 2008, se caracterizaron los componentes del aguamiel en diferentes periodos de cosecha de *Agave mapisaga*, para determinar la estabilidad de su contenido a través del tiempo.

Los resultados del estudio señalaron que el aguamiel contenía 11.5% en peso de materia seca, del cual el 75% estaba compuesto principalmente de azúcares y entre ellos, el 10% eran FOS. De igual manera, su trabajo concluyó en que solo existieron pequeñas variaciones en la composición del aguamiel recolectada en diferentes tiempos de cosecha, lo cual sugiere un potencial industrial en el uso de los componentes del aguamiel (Ortiz-Basurto *et al*., 2008).

Por otra parte, en 2015 se caracterizaron mediante métodos estandarizados los compuestos presentes en el aguamiel extraído de *Agave atrovirens*. Sus resultados mostraron que el contenido de fructooligosacáridos fue de 15.51% (%p/p en base seca) y el grado de polimerización fue de 5-10 el cual fue caracterizado por MALDI-TOF (Romero-López *et al.*, 2015).

Así mismo un año después, en el año 2016, el equipo de Santos-Zea, analizó el contenido del concentrado de aguamiel proveniente de *Agave salmiana*. En sus resultados obtuvieron que el aguamiel posee 13.39% de azúcares, de los cuales el 5.22% corresponde a fructosa, el 4.69% a sacarosa y el 3.48% a glucosa (Santos-Zea *et al*., 2016).

Un estudio realizado en 2020 examinó la cantidad de carbohidratos contenidos en el aguamiel proveniente de *A. mapisaga y A. salmiana,* durante su vida productiva. De acuerdo a sus resultados, se registraron 3.0, 1.7 y 2.1 kilogramos de fructanos en 676.6, 662.3 y 334.9 por litros de aguamiel respectivamente. Según los datos anteriores, el aguamiel recolectado contiene un promedio de 0.2 a 0.6 % p/v de fructanos, y basándose en su grado de polimerización (DP = 3), se determinó que los FOS predominan en la bebida ancestral (Peralta-García *et al.*, 2020).

Por lo tanto, se puede destacar que la bebida aguamiel es rica en azúcares como fructanos y sacarosa, los cuales son altamente fermentables por microorganismos, y se infiere que es una fuente potencial de fibra prebiótica.

Prebióticos

De acuerdo a la sexta reunión de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), la cual se llevó a cabo en 2008, el concepto de prebiótico se define como “un ingrediente fermentado selectivamente que produce cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así un beneficio(s) sobre la salud del huésped”.

De acuerdo a la revisión bibliográfica de (Olagnero *et al*., 2007), los tres criterios fundamentales para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico son los siguientes:

- El alimento no debe ser hidrolizado o absorbido en la parte superior del sistema digestivo.
- El ingrediente debe ser fermentable únicamente por un número selectivo de bacterias benéficas para el organismo, como las bifidobacterias y lactobacilos.
- El alimento debe tener la capacidad de modificar la microbiota del colón, volviéndola saludable al reducir la cantidad de organismos putrefactivos e incrementar las especies sacarolíticas.

Los fructanos, contenidos en el aguamiel, poseen los criterios enlistados anteriormente y se consideran prebióticos comunes en la industria alimentaria, los cuales son usados para agregar un valor adicional a los productos.

Propiedades funcionales de la fibra soluble

Gracias a la capacidad de retención de agua, cuando la fibra soluble entra en contacto con ella se forma un retículo, originando soluciones de gran viscosidad. Dicha propiedad es responsable de los efectos de la fibra soluble sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte de su potencial anticarcinogénico (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006)

De igual manera, la formación de una matriz de gel viscoso por las fibras solubles retiene los nutrientes y retrasa el vaciado gástrico, ralentizando la digestión (Howarth *et al*., 2001).

Por otra parte, la fermentación en el colon y su interacción con la microbiota residente es probablemente la propiedad funcional más conocida.

La fibra dietética llega al colon, donde es fermentada por la microbiota intestinal, generando ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como ácido butírico, propiónico y acético (Núñez-Gómez *et al.*, 2021).

Estos compuestos poseen una amplia variedad de funciones fisiológicas. Por ejemplo, los butiratos son una fuente de energía para las células epiteliales del colon. Además los propionatos pueden desempeñar un papel en la reducción de la producción hepática de colesterol al interferir con su síntesis (Guillon & Champ, 2002).

En cuanto a la fermentación y a la producción de ácidos de cadena corta, este proceso ocasiona una reducción en el pH, lo cual inhibe el crecimiento de patógenos, disminuye la actividad de enzimas bacterianas indeseables y reduce la degradación de péptidos al igual que la formación resultante de compuestos tóxicos como amoníaco y compuestos fenólicos (Guillon & Champ, 2002).

En general, estos compuestos mejoran los trastornos del tracto digestivo y promueven la saciedad.

Valores recomendados para la ingesta de fibra dietética

La fibra dietética ha sido reconocida como un componente importante para tener una dieta completa; sin embargo, su consumo diario recomendado varía en cada país, debido a los diferentes hábitos alimenticios, ritmos de vida y grados de procesamiento de los alimentos consumidos (Mehta *et al.*, 2015).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda ingerir 25 gramos diarios de fibra dietética. Sin embargo, la Secretaría de Salud (2016) reporta que, en México, el consumo de fibra dietética es menor que lo recomendado, pues los adultos solo consumen entre 16 y 18 gramos de fibra al día (Secretaría de Salud, 2016).

De acuerdo a (Yangilar, 2013) las ingestas recomendadas de fibra dietética para hombre y mujer varían a lo largo de las distintas etapas de la vida. Lo anterior está relacionado con el cambio en la función del tracto gastrointestinal, dieta y composición de la microbiota del colon. Debido a que la principal acción de la fibra es su efecto prebiótico, ayuda a preservar la diversidad de microorganismos benéficos (Donini *et al*., 2009).

Las cantidades recomendadas se resumen en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Valores de ingesta dietética de referencia para la fibra total por etapa de vida.

Rango de edad (años)	Consumo diario de fibra dietética recomendado (g)	
	Hombre	Mujer
1-3	19	19
4-8	25	25
9-13	31	26
14-18	38	26
19-30	38	25
31-50	38	15
51-70	30	21
Más de 70	30	21
Embarazo	-	28
Lactancia	-	29

Tabla recuperada de (Yangilar, 2013)

De igual manera, es importante recalcar que el aumento en la ingesta de fibra debe ser gradual y acompañado con un mayor consumo de agua, de lo contrario las heces pueden volverse demasiado voluminosas y secas ocasionando malestares como estreñimiento, producción de gases, distensión abdominal y calambres abdominales (Secretaria de Salud, 2016).

Valores recomendados para la ingesta de inulina y FOS

En México aún no se ha establecido un valor recomendado para la ingesta diaria de inulina, sin embargo, en Estados Unidos es recomendado ingerir de 1 a 4 g al

día de inulina y FOS, mientras que en Europa es sugerido un consumo de 3 a 11 g al día (Olagnero *et al*., 2007).

Por otra parte, basándose en el rango de edad, se aconseja no ingerir más de 20 g de FOS al día para adultos y no más de 4.2 g diarios para infantes (O. Ibrahim, 2021).

El consumo de inulina y FOS en cantidades recomendadas, y dependiendo del organismo de cada individuo permite mejorar la salud. Además, debido a la versatilidad de la inulina y los FOS, se ha facilitado su aplicación a una diversa gama de productos.

Utilización de la fibra soluble en la industria alimentaria

Los fructanos (inulina y FOS) tienen propiedades fisicoquímicas notables que incluyen estabilidad, espesamiento, absorción de agua, absorción de aceite y antihidrólisis (Ni *et al*., 2024); como resultado, se han utilizado ampliamente en sistemas alimentarios.

Yanguilar y colaboradores señalan que se pueden emplear como herramienta para mejorar la textura, para controlar la humedad en el reemplazo de la grasa, para mejorar la vida útil de los alimentos y también como antioxidante natural (Yangilar, 2013).

Actualmente, su uso en la industria alimentaria se centra en su aplicación a productos de panadería, productos cárnicos y productos lácteos (Dhingra *et al*., 2012).

En el caso de los productos de panadería, los fructanos se han incorporado a ellos debido a su propiedad de retención de agua, con el propósito de prolongar la frescura del pan y por ende también prolongar su vida útil, reduciendo así las pérdidas económicas (Yangilar, 2013).

En productos lácteos, también se ha utilizado la inulina. En 2005 se suplementó leche descremada con 1% de inulina y fue capaz de generar un producto comparable en atributos sensoriales a un yogurt equivalente fabricado con leche

entera, reduciendo de esta manera el contenido de grasa del alimento. Asimismo, en helados se ha reportado que la inulina inhibe el crecimiento de cristales de agua y reduce la pérdida de fluidos, mejorando la textura del producto (Chacón-Villalobos, 2006).

Encima, los FOS se han utilizado como sustituto de la sacarosa en bebidas dietéticas y otros alimentos bajos en calorías, así como edulcorante en productos alimenticios para diabéticos (O. Ibrahim, 2021).

En resumidas cuentas, se ha reportado el uso de la fibra soluble (particularmente inulina y FOS) en diferentes productos para dar lugar a nuevos alimentos funcionales, por lo que en el presente estudio, se busca explorar el potencial de la fibra soluble del aguamiel para su futura aplicación en alimentos.

Objetivo general

- Explorar el potencial de la fibra soluble del aguamiel para ser empleada como aditivo alimentario.

Objetivos específicos

- Extraer y cuantificar la fibra soluble del aguamiel.
- Caracterizar la fibra soluble del aguamiel.
- Determinar la capacidad antioxidante y las propiedades fisicoquímicas de la fibra soluble del aguamiel.
- Evaluar *in vitro* el potencial prebiótico de la fibra soluble del aguamiel.

Materiales y Metodología

Imagen 2. Esquema general de la metodología realizada. Elaboración propia.

Adquisición del aguamiel

Las muestras fueron recolectadas de magueyes provenientes de Nanacamilpa, Tlaxcala, México, por un vendedor tradicional de aguamiel, y refrigeradas durante su trayecto hacia Ciudad Universitaria, Puebla, México. Posteriormente, una vez en el laboratorio, fueron almacenadas en recipientes a -20°C hasta su análisis.

Extracción de la fibra soluble del aguamiel

Las muestras de aguamiel fueron descongeladas a 4°C. Se realizó el siguiente procedimiento, 3.7 litros de aguamiel fueron colocados en parrillas de calentamiento a 40°C con agitación a 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente 4 volúmenes de etanol al 96% fueron agregados y se dejó reposar en refrigeración a 4°C durante 3 días.

Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado fue recuperado mediante una serie de filtraciones. A continuación el precipitado se secó en una estufa a 50°C durante 24 horas y la muestra fue almacenada para posteriores análisis.

Determinación del porcentaje de fibra soluble

El porcentaje de fibra soluble se determinó de acuerdo con el boletín técnico para el ensayo de fibra dietética total de (SIGMA-ALDRICH, s. f.), con ligeras modificaciones. Esta prueba fue realizada por triplicado. Se pesó 0.5 g de fibra soluble del aguamiel “W1”, se agregaron 25 mL de buffer de fosfatos pH 6 y 0.5 mL de αα-Amilasa de *Bacillus licheniformis*, 1,4-α-D-glucano glucanohidrolasa (concentración al 100%). Se incubó en un baño de agua a 95°C con agitación ligera durante 18 minutos. Se enfrió a 25°C, y se ajustó el pH a 7.5 $\pm$ 0.2 con NaOH 0.275 N. Se agregó una solución de 0.025g/mL de proteasa de *Bacillus licheniformis*, Subtilisina A (≥2.4 U/mg) en buffer de fosfatos pH 6. Se agregó 0.5 mL de la solución anterior a la muestra, y se incubó en un baño de agua a 60°C con agitación suave durante 30 minutos. Posteriormente se enfrió a 25°C y se ajustó el pH, con 0.325M HCl, hasta llegar a pH 4 $\pm$ 0.6. Se añadió 0.5 mL de 1,4-α-D-Glucano glucohidrolasa de *Aspergillus niger* (≥260 U/mL) a la muestra, se

incubó nuevamente en un baño de agua a 60°C con agitación continua por 30 minutos. Después se adicionaron 4 volúmenes de etanol al 96% y se dejó reposar la muestra durante 72 horas para permitir una total precipitación.

Una vez pasado el lapso de tiempo, se filtró la suspensión y se enjuagó el residuo remanente, con 3 porciones de 10 mL de etanol al 78%, 2 porciones de 5 mL de etanol al 95% y 2 porciones de 5 mL de acetona. Seguidamente se colocó el residuo en un horno a 60°C durante toda la noche. Finalmente se pesó y se registró el peso final “W2”.

El porcentaje de fibra soluble (%FS) contenida en la muestra se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%FS = [W2A - CA/W1] \times 100$$

Donde:

W2A= promedio del peso final de la muestra “W2”

CA= promedio de los valores de ceniza “C”

W1A= promedio del peso de las muestras iniciales “W1”

Caracterización de la fibra soluble del aguamiel por cromatografía

Para caracterizar la fibra soluble del aguamiel se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés). Se utilizó un equipo HPLC Agilent acoplado a masas de alta resolución, con una columna C18 Agilent fase reversa, utilizando como eluyente sistema acetonitrilo agua con gradiente de 8,2 hasta 3,7, con un flujo de 500 microlitros por minuto.

Pruebas de capacidad antioxidante

La fibra soluble del aguamiel fue sometida a la prueba de determinación de fenoles totales por el reactivo de Folin Ciocalteau, y al ensayo de la capacidad antioxidante por el radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) para determinar su capacidad antioxidante.

Determinación de fenoles totales por el reactivo de Folin Ciocalteau

Este ensayo fue efectuado conforme a la metodología establecida por (Soto-Ortiz Saraluz *et al.*, 2023), y realizado por triplicado. Se tomaron 150 µL de la muestra (1 mg fibra soluble del aguamiel/mL H_2O), 150 µL del blanco (H_2O destilada) y 150 µL del estándar (Ác. Gálico 0.1mg/mL). Cada uno se colocó en una celda para espectrofotómetro. Se agregaron 2250 µL de agua destilada y 150 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau. Se incubó durante 7 minutos a 25°C y se homogeneizó la mezcla. Posteriormente se añadieron 450 µL de la disolución de Na_2CO_3 y se obtuvo un volumen total de 3 mL, que fue nuevamente homogeneizado. Finalmente se dejó reposar a 25°C en oscuridad, y pasadas 2 horas se midió la absorbancia a 760 nm.

Los equivalentes de ácido gálico en la muestra se calcularon con la ecuación, obtenida de la curva de calibración del ácido gálico *(Anexo*):

$$ABS = 5.37864\,C - 0.01318$$

Donde:

C= concentración en mg/mL de ácido gálico

ABS= absorbancia

Ensayo de la capacidad antioxidante por el radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl)

El presente ensayo fue realizado acorde con la metodología de (Soto-Ortiz Saraluz *et al.*, 2023) por triplicado. En una microplaca para ELISA de 96 pozos, se colocaron 25 µL de blanco (MeOH 80%), de control (Trolox 0.08 mg/ mL) y de muestra disuelta (1 mg fibra soluble del aguamiel/mL MeOH:H_2O 8:2).

Posteriormente se añadió a cada pozo a evaluar 200 µL de la disolución DPPH (150 µM). Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 492 nm transcurridos 60 minutos.

La capacidad antioxidante se calculó como el % de inhibición del radical mediante la siguiente ecuación:

$$\%I = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right] \times 100$$

Donde:

A0= Abs del blanco de DPPH a los 60 min

A1= Abs de la muestra (sin ruido) a los 60 min

Prueba de capacidad de retención de agua

Se determinó la capacidad de retención de agua de la fibra soluble del aguamiel. La prueba se realizó por triplicado y se determinó de acuerdo con el método de (Cong-Cong *et al*., 2021) con ligeras modificaciones. Se colocaron 0.016 g de muestra de fibra soluble del aguamiel (F.S del aguamiel) y 1000 µL de agua destilada en un microtubo de centrífuga y se colocó horizontalmente a 25°C durante 24 h. Una vez pasado el tiempo, se centrifugó a 400 rpm durante 20 minutos, luego se eliminó la solución sobrenadante, y se registró el peso del residuo hidratado (m1).

Posteriormente se secó el residuo a 105 °C hasta peso constante (m2).

La retención de agua mediante la siguiente ecuación:

$$WRC\ (g/g) = (m1 - m2)/m2$$

Donde:

m1: residuo hidratado

m2: residuo seco

Prueba de capacidad de retención de aceite

Se evaluó la capacidad de retención de aceite (ORC) de la fibra soluble del aguamiel. La prueba se realizó de acuerdo con el método de (Cong-Cong *et al*., 2021) con ligeras modificaciones, y por triplicado. Se colocaron 0.016 g de fibra

soluble del aguamiel (m1) y 1000 µL de aceite de maní comestible, marca comercial Inés®, en un microtubo de centrífuga (m2). Se colocó la mezcla horizontalmente a 25°C durante 24 h.

Posteriormente se centrifugó la mezcla a 400 rpm durante 24 min, se eliminó la solución sobrenadante y se registró el peso del residuo (m3).

La capacidad de retención de aceite se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$ORC\ (g/g) = (m3 - m2)/m1$$

Donde:

m1: peso de la muestra de fibra soluble del aguamiel

m2: peso del microtubo de centrífuga a peso constante

m3: peso del residuo

Prueba de solubilidad en agua

La prueba de solubilidad en agua (WS) de la fibra soluble del aguamiel se realizó por triplicado, y de acuerdo con la metodología de (Cong-Cong *et al.*, 2021) con ligeras modificaciones. Se mezcló suavemente 0.01 g de fibra soluble del aguamiel (m1) con 1000 µl de agua destilada en un microtubo de centrífuga, y se colocó en un baño de agua a 90 °C con agitación suave durante 60 minutos. A continuación, se secó el residuo hasta llegar a peso constante. La solubilidad en agua se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$WS(g/g) = (m3 - m2)/m1$$

Donde:

m1: peso de la muestra de fibra soluble del aguamiel

m2: peso del microtubo de centrífuga a peso constante

m3: peso total del residuo seco y el microtubo de centrífuga

Ensayo de digestión *in vitro*

La muestra de fibra soluble del aguamiel se sometió a una simulación de digestión gastrointestinal, para determinar si se hidroliza en la parte superior del sistema digestivo, evaluando así su potencial prebiótico.

La prueba fue realizada por triplicado y de acuerdo con la metodología de (Coscueta *et al*., 2019), con ligeras modificaciones. Se pesaron 0.280 g de muestra de fibra soluble del aguamiel y se agregaron 6 mL de agua acidificada (pH 2). A continuación se ajustó el pH agregando 1.0 N de HCl hasta llegar a pH 2. La mezcla se incubó a 37°C con agitación a 130 rpm durante 20 minutos. Para la etapa de digestión estomacal, se preparó una solución de 175 mg/mL pepsina (130 U/mg) en HCl 0.1 N para simular el jugo gástrico. Posteriormente se añadió 2.1 mL de la simulación de jugo gástrico y se incubó a 37°C a 130 rpm durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se aumentó el pH a 6.5 empleando una solución de $NaHCO_3$ 0.1M. Posteriormente, para la etapa intestinal, se preparó una solución de 2mg/ mL de pancreatina (4 x USP) en $NaHCO_3$ 0.1M para simular el jugo pancreático. Después se agregaron 1.5 mL de la simulación de jugo pancreático por cada mililitro que contenga el matraz con la muestra. Se incubó la mezcla a 37°C con agitación a 45 rpm durante 90 minutos. Finalmente se filtró el residuo y se puso a peso constante.

Se determinó el porcentaje de muestra remanente al finalizar la digestión *in vitro*, para determinar si la fibra soluble del aguamiel soporta la digestión humana. El porcentaje se calculó con la siguiente relación:

$$\% = \frac{promedio\ del\ residuo\ tras\ digestión}{promedio\ de\ la\ cantidad\ inicial\ muestra} \times 100\%$$

Ensayo microbiológico

Para el presente ensayo se empleó la bacteria probiótica *Bacillus clausii*, cepas O/C (CNCM I-276), N/R (CNCM I-274), SIN (CNCM I-275) y T (CNCM I-273), comercializadas como Enterogermina®.

Búsqueda de la concentración óptima de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento del probiótico *Bacillus clausii*

El probiótico fue cultivado en un medio mínimo (0.5g/ 100 mL peptona, 0.15g/ 100 mL KH_2PO_4 y 0.969g/ 100 mL K_2HPO_4), con distintas concentraciones de fibra soluble del aguamiel (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 g/ 100 mL) a pH 8 y 37 °C con agitación orbital. Usando medio de cultivo sin inocular como blanco. Posteriormente se midió la turbidez a las 24, 48 y 72 horas empleando un espectrofotómetro a 600 nm.

Curva de crecimiento microbiano por densidad óptica

La fibra soluble del aguamiel fue evaluada para determinar si es consumida por bacterias probióticas (*Bacillus clausii*) y si fomenta su crecimiento.

Preparación del medio de cultivo

Para el cultivo del probiótico se preparó un medio mínimo (0.5g/ 100 mL peptona, 0.15g/ 100 mL KH_2PO_4, 0.969g/ 100 mL K_2HPO_4 y 0.5g/100 mL de fibra soluble del aguamiel o de inulina de agave comercial). Finalmente se ajustó el pH a 8 con NaOH 1.0 M.

Preparación del preinóculo

Se inoculó una sola colonia de *Bacillus Clausii* en un tubo de cultivo con medio estéril. Se incubó a 37 °C con agitación orbital durante toda la noche.

Mediciones de la curva de crecimiento utilizando el espectrofotómetro

En 100 mL de cada variante de medio estéril (control: sin fuente de carbono, con fibra soluble del aguamiel y testigo: con inulina) se sembró 1 mL del preinóculo. Se tomaron asépticamente alícuotas del cultivo para determinar su absorbancia. Después se mantuvo el cultivo en incubación a 37 °C con agitación orbital. A intervalos regulares se midió la turbidez con un espectrofotómetro a 600 nm, y se usó medio sin inocular como blanco. Se registró la densidad óptica hasta las 13

horas de crecimiento. Finalmente se graficaron los valores de O.D600 en función del tiempo.

Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados están reportados como promedios más la desviación estándar. Las pruebas se efectuaron con el Software Minitab® versión 18. Para datos paramétricos y no paramétricos la diferencia se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

Resultados y discusión

Determinación de fibra soluble

De cada litro de aguamiel procesado se obtuvieron 2.37 $\pm$ 0.050 gramos de precipitado, muestra que posteriormente fue analizada para saber su contenido de fibra soluble.

En la *Tabla 3.* se presentan los resultados de la composición del precipitado de aguamiel. Se encontró que el 92 $\pm$ 10.350 % corresponde a fibra soluble.

Tabla 3. Contenido de fibra soluble y ceniza del aguamiel.

	% en peso (base seca)
Fibra soluble	92 $\pm$ 10.350

Por 0.5 g en peso seco. Media de tres réplicas.

El análisis para la caracterización de la fibra soluble se realizó mediante cromatografía HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) *(Imagen 3)*. Se obtuvo que la muestra en su mayoría es inulina, y un 14.5% de la inulina encontrada corresponde al subgrupo fructooligosacáridos (FOS) *(Tabla 4)*. Los datos recabados son similares con el 15% de fructooligosacáridos reportados por (Romero-López *et al*., 2015). De igual manera se asemeja con lo publicado por Ortiz-Basurto *et al*., 2008, que en su estudio afirmó que entre los azúcares presentes del aguamiel, el 10 % en peso son fructooligosacáridos (FOS).

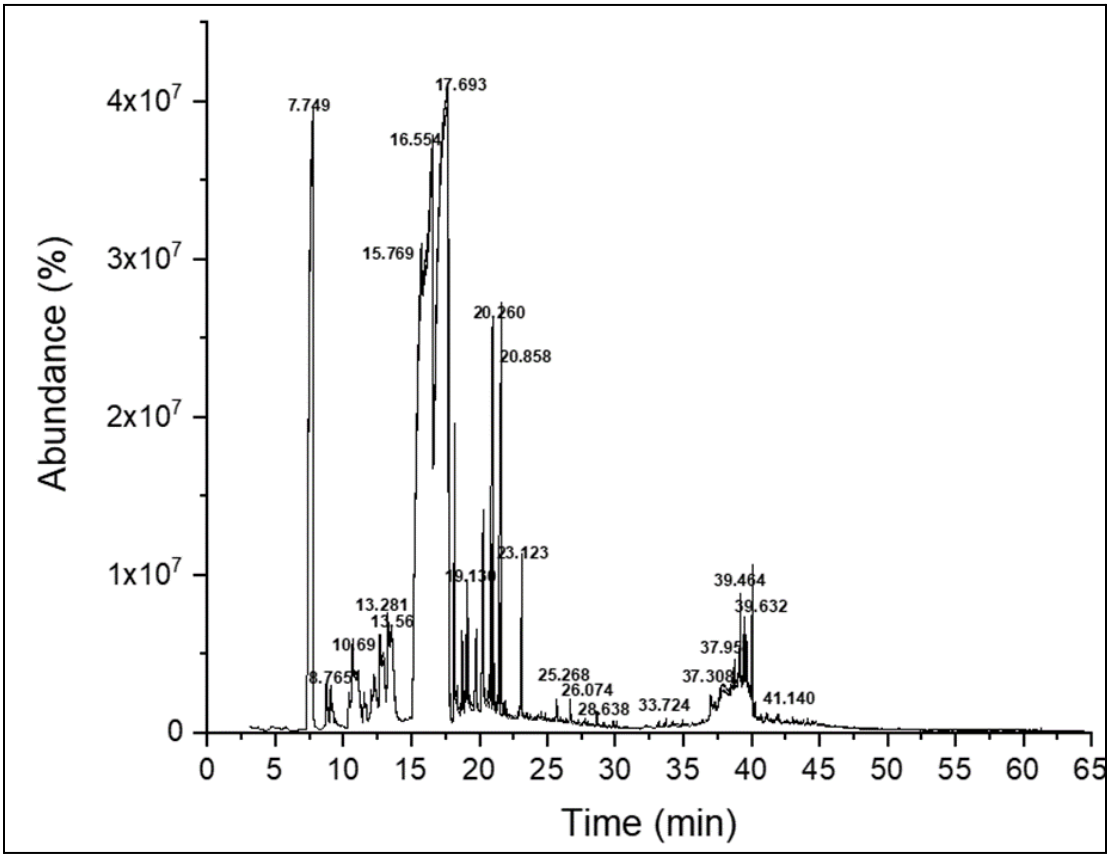

Imagen 3. Cromatograma de la fibra soluble del aguamiel por HPLC.

Tabla 4. Resultados de la cromatografía para la caracterización de la fibra soluble del aguamiel.

Tiempo (min)	Abundancia (%)	Fórmula	Número de Fructosas	Clasificación
7.749	10.41666667	$C_{30}H_{52}O_{26}$	4	Inulina (FOS)
8.765	0.766666667	$C_{42}H_{72}O_{36}$	6	
10.690	1.541666667	$C_{54}H_{92}O_{46}$	8	
13.281	1.775	$C_{60}H_{102}O_{51}$	9	
13.561	1.808333333	$C_{72}H_{122}O_{61}$	11	Inulina
15.769	15.76666667	$C_{84}H_{142}O_{71}$	13	
16.554	14.74166667	$C_{90}H_{152}O_{76}$	14	
17.693	18.20833333	$C_{96}H_{162}O_{81}$	15	
19.136	2.625	$C_{108}H_{182}O_{91}$	17	
20.260	2.658333333	$C_{132}H_{222}O_{111}$	21	
20.858	2.675	$C_{162}H_{272}O_{136}$	26	
23.123	0.9	$C_{228}H_{382}O_{191}$	37	
25.268	0.125	$C_{348}H_{582}O_{291}$	57	
26.074	0.1	$C_{474}H_{792}O_{369}$	78	
28.368	0.091666667	$C_{486}H_{812}O_{406}$	80	
33.724	0.15	$C_{582}H_{972}O_{486}$	96	

Tiempo (min)	Abundancia (%)	Fórmula	Número de Fructosas	Clasificación
37.308	5.166666667	$C_{606}H_{1012}O_{506}$	100	
37.950	1.04166	$C_{630}H_{1052}O_{256}$	104	

La composición del aguamiel varía de acuerdo con el tipo de maguey de dónde es extraída, sin embargo, independientemente de su origen se puede inferir que debido a su método de recolección parte de los nutrientes del maguey pasan al aguamiel (Vicente-Magueyal *et al*., 2020), lo cual convierte a esta bebida en una fuente interesante de compuestos benéficos a la salud.

Se ha comprobado que la riqueza en carbohidratos del aguamiel tiene uso potencial debido a la presencia de fructanos, especialmente inulina y FOS, que han adquirido interés por sus propiedades prebióticas (Castañeda-Ovando *et al*., 2023).

El efecto prebiótico de este tipo de azúcar incluye: promover la proliferación de la microbiota intestinal beneficiosa, regular la motilidad intestinal, activar el sistema inmunológico, aumentar la producción de ácido butírico, aumentar la absorción de minerales como el calcio y el magnesio e inhibir las lesiones precursoras de adenomas y carcinomas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023).

Por lo tanto, el usar fructanos provenientes del aguamiel como aditivo en alimentos, podría reducir algunos factores de riesgo que contribuyen a las enfermedades colorrectales, así como el riesgo de obesidad, cáncer de colon y enfermedades cardiovasculares.

Capacidad antioxidante

Los resultados de las pruebas de capacidad antioxidante se muestran en la *Tabla 5.* El contenido de fenoles totales fue 0.000035 $\pm$ 0.003 equivalentes de ácido gálico/g de fibra soluble del aguamiel, y la actividad antioxidante analizada por DPPH fue 0.004870 $\pm$ 0.570 (capacidad antioxidante equivalente de Trolox/ g de fibra soluble del aguamiel).

En el presente ensayo se obtuvieron valores menores en comparación con la capacidad antioxidante del aguamiel ya reportada.

Tabla 5. Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante de la fibra soluble del aguamiel.

Determinación	
Fenoles totales*	0.000035 ± 0.003
capacidad antioxidante DPPH**	0.004870 ± 0.570

Media de tres réplicas ± desviación estándar.
** Equivalente de ácido gálico (0.1mg/mL)*
***Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (0.08 mg/mL).*

En 2011, se determinó la concentración de fenoles totales del aguamiel en 2.26 de equivalentes de ácido gálico por gramo de aguamiel (Tovar-Robles *et al.*, 2011). Posteriormente se reportó un valor similar respecto al contenido de fenoles totales en aguamiel liofilizado (3.03 ± 0.47 equivalentes de ácido gálico/gramo de aguamiel), y la actividad antioxidante analizada por DPPH del aguamiel se determinó en 8.72 ± 0.10 capacidad antioxidante equivalente de Trolox/ g de aguamiel liofilizada (Romero-López *et al*., 2015).

La menor capacidad antioxidante obtenida, se podría atribuir a la diferencia en el procesamiento de la muestra para su almacenaje, ya que, en ambos estudios anteriormente citados, se analizó aguamiel liofilizada. El método de liofilización se considera un método eficaz para conservar fenoles y actividades antioxidantes (Kittibunchakul *et al.*, 2023), pues no provoca pérdida de compuestos bioactivos (Kumar *et al*., 2022), en comparación a la técnica de secado con aire caliente, la cual fue utilizada en el presente trabajo.

Adicionalmente, se piensa que la propiedad de capacidad antioxidante está relacionada con la presencia de azúcares reductores (principalmente fructosa debido a la naturaleza de la muestra), y carbohidratos hidrolizados. La hidrólisis de inulinas, puede liberar FOS, aumentando el contenido de fructosas terminales con efecto reductor capaces de participar en reacciones antioxidantes (Picazo *et al*., 2019). Dicha hipótesis fue comprobada en 2019, cuando se aplicó un tratamiento

enzimático al aguamiel para hidrolizar inulina y aumentar su contenido en FOS. Tras su aplicación, la actividad antioxidante por ensayo DPPH fue tres veces mayor en comparación con el aguamiel sin tratamiento (Picazo *et al.*, 2019).

Por lo tanto, para potencializar la actividad antioxidante de la fibra soluble del aguamiel, se propone hidrolizar los carbohidratos con el objetivo de obtener un mayor contenido de FOS con fructosas terminales, que poseen efecto reductor. De igual manera, para conservar los compuestos bioactivos presentes, se plantea liofilizar la muestra como método de conservación.

Propiedades fisicoquímicas

Los resultados para los atributos fisicoquímicos de la fibra soluble del aguamiel se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Solubilidad en agua, capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite de la fibra soluble del aguamiel.

	Fibra soluble del aguamiel	Inulina de agave comercial (marca NBF®)	Valor *p*
Solubilidad en agua (g/g)	1.128 ± 0.036	1.218 ± 0.168	0.017
Retención de agua (g/g)	1.989 ± 1.230	0.000 ± 0.000	0.049
Retención de aceite (g/g)	4.083 ± 0.485	3.000 ± 0.062	0.019

Media de tres réplicas ± desviación estándar.
Prueba estadística para datos normales: T de Student para muestras independientes.
Diferencia significativa $p < 0.05$.

Solubilidad en agua

Se determinó que la solubilidad en agua de la fibra soluble del aguamiel (1.128 ± 0.036 g/g) es equiparable con la solubilidad en agua de la inulina de agave comercial (1.218 ± 0.168 g/g).

El grado de hidrosolubilidad que posee la muestra de fibra del aguamiel podría explicarse por la configuración de las cadenas de inulina, ya que sus grupos

hidroxilo son más propensos a interactuar con las moléculas de agua que otros grupos funcionales presentes en su estructura (López-Castejón *et al.*, 2019).

Sin embargo, en el estudio de Rashid y colaboradores se encontró que la inulina extraída de raíces de achicoria (118.67±3.26 g/g), y la inulina de tubérculos de alcachofa de Jerusalén (4.62±0.18 g/g) (Rashid *et al*., 2018) poseen un mayor grado de solubilidad en comparación con la fibra soluble del aguamiel que se analizó en el presente proyecto.

Por lo que se sugiere que la solubilidad de la inulina contenida en la fibra del aguamiel disminuye al aumentar el grado de polimerización (DP) (Mensink *et al.*, 2015), ya que contiene polímeros de cadena larga, hasta un 5% correspondientes a 100 unidades de fructosa, lo que ocasiona que disminuya considerablemente la solubilidad en agua.

No obstante, la capacidad hidrosoluble de la fibra soluble del aguamiel brinda propiedades humectantes de valor para la industria, como la formación de geles cremosos cuando se calienta en medios acuosos (Chacón Villalobos, 2005). Sumado a que resulta más sencillo incorporar como aditivo a una variedad de alimentos (como lácteos, panadería y bebidas) sin alterar sus propiedades reológicas y sensoriales (Rashid *et al*., 2018), volviéndose atractiva para la elaboración de alimentos funcionales.

Capacidad de retención de agua

De acuerdo con la literatura la capacidad de retención de agua afecta positivamente la viscosidad en los alimentos, y puede evitar que se deshidraten y se contraigan, extendiendo su vida útil (Xie *et al*., 2022)**.**

La fibra soluble del aguamiel estudiada exhibió una buena capacidad de retención de agua (1.989 $\pm$ 1.230 g/g), superior a la capacidad de retención de agua de la inulina extraída de raíces de achicoria (1.51 ± 0.02 g/g) (Rashid *et al.*, 2018) y la fibra soluble del salvado de arroz (0.75 g/g) (Cong-Cong *et al*., 2021).

Esta propiedad está directamente relacionada con la existencia de regiones hidrofílicas en la estructura, principalmente por la presencia de grupos hidroxilo en

las cadenas que interactúan con las moléculas de agua, a través de puentes de hidrógeno. De igual manera, la capacidad de retención de agua está determinada fundamentalmente por el tamaño de las partículas y la porosidad de la matriz (Rashid *et al.*, 2018).

Es sabido que la fibra dietaria de alta calidad tiene propiedades de hidratación elevadas, lo que contribuye al aumento de volumen de los alimentos en el estómago y por ende favorece la saciedad, reduciendo la ingesta (Cong-Cong *et al*., 2021)**.**

Así mismo se ha informado que los fructanos hidratados al 40-45% adoptan una textura similar a la grasa, siendo por lo general la tasa de reemplazo equivalente 0.25 g de inulina para emular 1 g de grasa (Chacón-Villalobos, 2006).

Por este motivo la fibra soluble del aguamiel se puede considerar como una opción viable para su uso como aditivo en sistemas alimentarios, ya que no es necesario agregar en grandes cantidades para mejorar las propiedades de los alimentos.

Capacidad de retención de aceite

Una de las medidas más influyentes en las cualidades de naturaleza reológica de un alimento es la capacidad de retención de aceite (Huang & Hsieh, 2019), ya que determina la dureza, cremosidad, fragilidad o ternura que los humanos perciben en la boca cuando se consumen productos grasos (Peyronel et al., 2011). Por lo tanto, el uso de un ingrediente con alta capacidad de retención de aceite mejora la textura de un producto y su percepción sensorial.

La fibra soluble del aguamiel, obtenida en la presente investigación, mostró interesantes resultados *(Tabla 6.)* con un valor de 4.083 $\pm$0.485 g/g, el cual es aproximado al de la inulina de agave comercial (3.000 $\pm$ 0.062 g/g).

Adicionalmente, la fibra soluble del aguamiel estudiada tuvo una capacidad de retención de aceite aproximadamente cuatro veces mayor que la inulina extraída de otras fuentes, como los tubérculos de alcachofa de Jerusalén (1.02 ±0.02 g/g) y las raíces de achicoria (0.97 ±0.02 g/g) (Rashid *et al.*, 2018).

Este atributo de la fibra está vinculado con las características de la superficie, el tamaño de las partículas, la naturaleza hidrofóbica y la densidad de carga general de la fibra dietética (Cong-Cong *et al.*, 2021).

Finalmente, es importante mencionar que el uso de esta característica de la fibra soluble del aguamiel es fundamental para mantener el sabor y la grasa de los alimentos durante la cocción. Además, aporta beneficios a la salud, porque previene la absorción de grasa en el intestino, debido a que la fibra dietética soluble absorbe la grasa de los alimentos (Cong-Cong *et al.*, 2021).

Ensayo de digestión in vitro

Los resultados obtenidos de la simulación de digestión *in vitro* de la fibra soluble del aguamiel y de la inulina de agave comercial se muestran en la *Tabla 7.*

Tabla 7. Muestra remanente al finalizar la digestión in vitro.

	Cantidad inicial de muestra (g)	Residuo tras digestión (g)	Valor p
Fibra soluble del aguamiel	0.280 ± 0.000	0.280 ± 0.000	0.046
Inulina de agave comercial (marca NBF®)	0.281 ± 0.001	0.102 ± 0.006	

Media de tres réplicas ± desviación estándar.
Prueba estadística para datos no paramétricos: U de Mann Whitney.
Diferencia significativa $p < 0.05$.

La fibra soluble del aguamiel permaneció intacta tras la digestión *in vitro (Tabla 7)* a diferencia de la inulina de agave comercial.

La característica no digerible de la inulina (presente en ambas muestras analizadas) posiblemente se deba a su estructura química, ya que posee enlaces glicosídicos β-(2 → 1), los cuales son resistentes a la acción de las enzimas digestivas humanas (Guimarães *et al.*, 2020), sirviendo como un carbohidrato fermentable para la microbiota selectiva intestinal.

Por otra parte, se infiere que la disparidad entre la cantidad de muestra remanente podría deberse al mayor grado de solubilidad que posee la inulina de agave comercial.

No obstante, se puede considerar a la fibra soluble del aguamiel como candidata para ser prebiótica, ya que cumplió exitosamente con el primer criterio de ser resistente a la hidrólisis por las secreciones gástricas e intestinales (Olagnero *et al*., 2007). De esta manera, la fibra soluble del aguamiel podría pasar al colon y ser metabolizada por la microbiota selectiva presente en el organismo.

Ensayo microbiológico

Concentración óptima de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento del probiótico *Bacillus clausii*

En la *Imagen 4.* se muestran las diferentes concentraciones evaluadas para el crecimiento de *Bacillus clausii,* destacando que las preparaciones de 0.1 y 0.5 g de fibra soluble del aguamiel/ 100 mL de medio mínimo favoreció su proliferación.

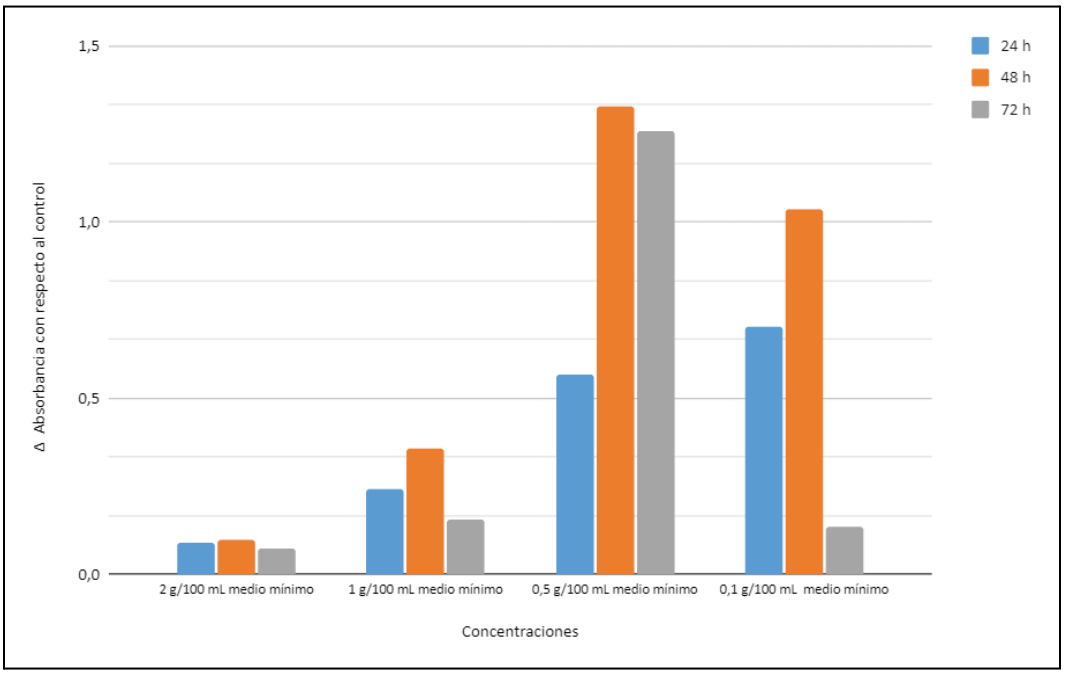

Imagen 4. Crecimiento de Bacillus clausii , a partir de la diferencia de la absorbancia entre el control y la muestra, con un perfil de concentraciones de fibra soluble del aguamiel durante 24, 48 y 72 horas.

La concentración de 0.5 gramos de fibra soluble del aguamiel/100 mL, encontrada en el estudio, se aproxima a la ingesta de fructanos, inulina y oligofructosa recomendada en los Estados Unidos que va de un rango de 1.0 a 4.0 gramos al día (Olagnero *et al*., 2007). Lo cual podría indicarnos que el empleo de la fibra soluble del aguamiel en dicha cantidad es una buena opción para futuras formulaciones de alimentos.

Por otro lado, se demostró que las concentraciones más altas de fibra soluble del aguamiel (2.0 y 1.0 g de fibra soluble del aguamiel/ 100 mL de medio mínimo) obstaculizaron el crecimiento de *Bacillus clausii (Imagen 4)*, lo cual se atribuye a la presión osmótica.

En resumen, los resultados sobre la concentración ideal de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento de *Bacillus clausii*, podrían ser útiles para la creación de futuros simbióticos.

Curva de crecimiento microbiano por densidad óptica

El crecimiento microbiológico mostró resultados diferentes entre los medios de cultivo empleados.

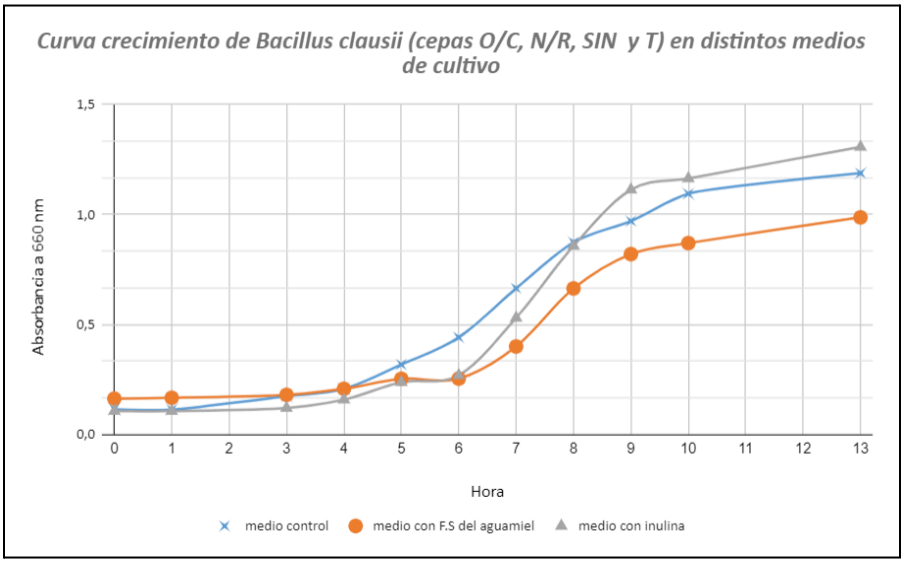

Imagen 5. Crecimiento de Bacillus clausii en tres medios distintos: control (sin fuente de carbono), medio enriquecido con fibra soluble del aguamiel (F.S del aguamiel) y medio enriquecido con inulina de agave comercial.

Como se aprecia en la *Imagen 5,* la especie *Bacillus Clausii* exhibió un crecimiento más lento en el medio enriquecido con la fibra soluble del aguamiel obtenida en el presente trabajo, en comparación con el medio control (sin fuente de carbono).

Este comportamiento pudo deberse a los diversos tamaños de las fracciones de inulina presentes en la F.S del aguamiel. Estudios *in vitro* han demostrado que el tiempo de fermentación de las fracciones DP cortas es dos veces mayor que el de la inulina de cadena larga (Shoaib *et al*., 2016). Por lo tanto, la fibra soluble del aguamiel al ser una mezcla de fracciones cortas y largas *(Tabla 4.)*, es probable que a las bacterias les haya tomado mayor tiempo metabolizar, prolongando la fase lag, hasta 6 horas, como se observa en la *Imagen 5.*

Por otra parte, en el medio de cultivo enriquecido con inulina de agave comercial fue donde se observó un mejor crecimiento de *Bacillus Clausii.* Esta fase del experimento concordó con lo ya reportado por Escobedo-Fregoso y colaboradores, donde demostraron que el uso de inulina como fuente de nutrientes fomenta el crecimiento de bacterias probióticas de los géneros *Bacillus* (Escobedo-Fregoso *et al*., 2021). Se infiere que el aprovechamiento de la inulina, por parte de las bacteria benéficas, está relacionado con su capacidad de liberar enzimas que hidrolizan los enlaces β-glucosídicos, lo que beneficia al microbioma intestinal del huésped (Sam-on *et al*., 2023) e impulsa su proliferación.

En cuanto al medio control (sin fuente de carbono), se percibió un crecimiento más rápido y una fase lag más corta, a diferencia del medio enriquecido con F.S del aguamiel (*Imagen 5*). Lo anterior podría atribuirse a que las células de *Bacillus Clausii* no tuvieron que acoplar su maquinaria para liberar enzimas capaces de degradar carbohidratos complejos, como la inulina, ya que ese tipo de nutriente no estaba presente en el medio.

En síntesis, la fibra soluble del aguamiel fue utilizada por el probiótico; sin embargo, se necesita analizar durante mayor tiempo el comportamiento de la curva de crecimiento de *Bacillus Clausii* para determinar si la fibra soluble de estudio promueve el crecimiento probiótico, a pesar de ser un carbohidrato de metabolización lenta.

Conclusiones

Se logró extraer la fibra soluble del aguamiel, de cada litro procesado se obtuvieron 2.37 $\pm$ 0.050 gramos.

Se determinó que el 60% de la muestra es inulina, con un 14.5% perteneciente al subgrupo de fructooligosacáridos (FOS).

Se encontró que la capacidad antioxidante de la fibra del aguamiel fue menor en comparación con lo reportado para la capacidad antioxidante de la bebida aguamiel. Además; se halló que las propiedades fisicoquímicas de la fibra soluble del aguamiel son equiparables con las de la inulina de agave comercial.

De igual manera, se examinó el potencial de la fibra soluble del aguamiel como prebiótico, revelando que la muestra permaneció intacta tras la digestión *in vitro*, y que fue utilizada por el probiótico *Bacillus clausii* para su crecimiento. Adicionalmente, se detectó que la concentración óptima de fibra soluble del aguamiel para el crecimiento del probiótico *Bacillus clausii* fue de 0.5 g de fibra soluble del aguamiel/ 100 mL, información que podría ser útil para la creación de futuros simbióticos.

Por lo tanto, los hallazgos de esta investigación brindan las bases para la incorporación futura de la fibra soluble del aguamiel como aditivo a una variedad de alimentos, debido a que ofrece propiedades útiles para la industria.

Anexo

Curva de calibración del ácido gálico

Se midió la absorbancia del ácido gálico para cada concentración conocida (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL) a 760 nm. Finalmente, los valores se representaron en un gráfico y se generó la ecuación de la recta, como se muestra en la *Imagen 6.*

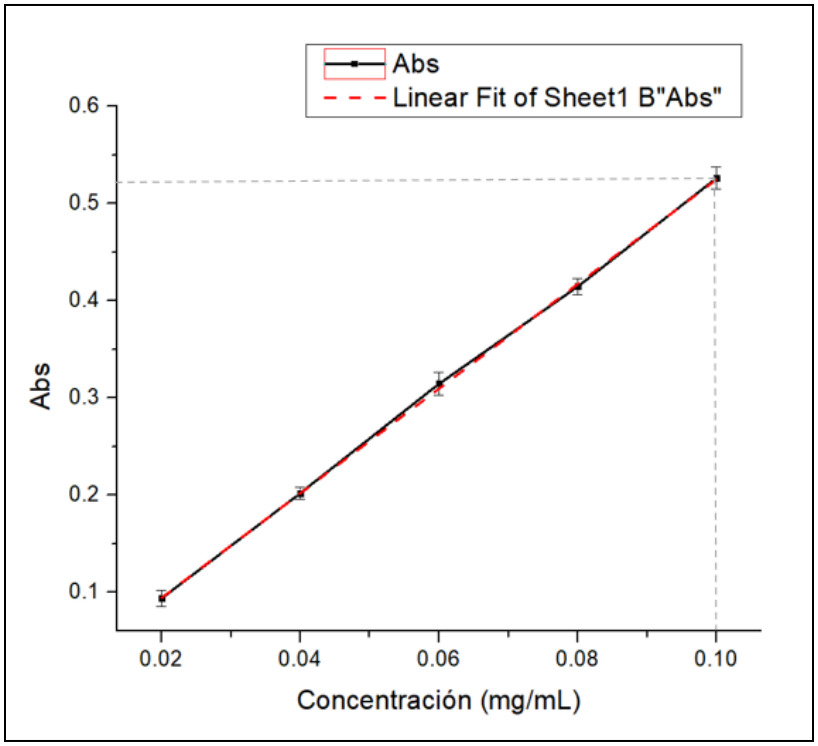

Imagen 6. Curva de calibración ácido gálico

Ecuación de la recta: $ABS = 5.37864\,C - 0.01318$

Donde C= Concentración en mg/mL de Ácido Gálico

Ajuste R-cuadrada: 0.99971

SD: 0.31929

Bibliografía

American Association of Cereal Chemists International (2001). Definition of dietary fiber. Cereal Foods World 46(3), pp. 112-125.

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. Food Chemistry, 122(1), 123–130. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.02

Baenas, N., Nuñez-Gómez, V., Navarro-González, I., Sánchez-Martínez, L., García-Alonso, J., Periago, M. J., & González-Barrio, R. (2020). Raspberry dietary fibre: Chemical properties, functional evaluation and prebiotic in vitro effect. LWT, 110140. doi:10.1016/j.lwt.2020.110140

Dai, F. J., & Chau, C. F. (2017). Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. Journal of Food and Drug Analysis, 25(1), 37–42. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.09.006

Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. Journal of food science and technology, 49(3), 255–266. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fiber and fiber-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. Food Chemistry, 124(2), 411–421. doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.07

Enríquez-Salazar, M. I, Veana, F., Aguilar, C. N., De la Garza-Rodríguez, I. M., López, M. G., Rutiaga-Quiñones, O. M., … Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from Agave salmiana and A. atrovirens during different seasons of year. Food Science and Biotechnology, 26(4), 1003–1011. doi:10.1007/s10068-017-0141-z

Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P.. (2006). La fibra dietética. Nutrición Hospitalaria, 21(Supl. 2), 61-72. Recuperado en 30 de noviembre de 2021, de

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500007&lng=es&tlng=es.

European Food Safety Authority .(2010). Outcome of the Public consultation on the Draft Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, Nutrition, and Allergies (NDA) on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. EFSA Journal, 8(3). doi:10.2903/j.efsa.2010.1508

Guillon, F., & Champ, M. M. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. The British journal of nutrition, 88 Suppl 3, S293–S306. https://doi.org/10.1079/BJN2002720

Howarth, N. C., Saltzman, E., & Roberts, S. B. (2009). Dietary Fiber and Weight Regulation. Nutrition Reviews, 59(5), 129–139. doi:10.1111/j.1753-4887.2001.tb07001.x

Howlett, JF, Betteridge, VA, Champ, M., Craig, SA, Meheust, A. y Jones, JM (2010). La definición de fibra dietética - discusiones en el Noveno Simposio de Fibra de Vahouny: construyendo un acuerdo científico. Investigación en alimentación y nutrición, 54 , 10.3402 / fnr.v54i0.5750. https://doi.org/10.3402/fnr.v54i0.5750

Joint, F. A. O. (2010). WHO Food Standards Programme, Secretariat of the CODEX Alimentarius Commission: CODEX Alimentarius (CODEX) Guidelines on Nutrition Labeling CAC/GL 2–1985 as Last Amended 2010. Rome: FAO.

Jones, J. M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap.” Nutrition Journal, 13(1). doi:10.1186/1475-2891-13-34

Kim, Y. (2000). AGA technical review: Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. Gastroenterology, 118(6), 1235–1257. doi:10.1016/s0016-5085(00)70377-5

Lambo, A. M., Öste, R., & Nyman, M. E. G.-L. (2005). Dietary fibre in fermented oat and barley β-glucan rich concentrates. Food Chemistry, 89(2), 283–293. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.03

Leal-Díaz, A. M., Santos-Zea, L., Martínez-Escobedo, H. C., Guajardo-Flores, D., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2015). Effect of Agave americana and Agave salmiana Ripeness on Saponin Content from Aguamiel (Agave Sap). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(15), 3924–3930. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00883

Mehta, N., Ahlawat, S. S., Sharma, D. P., & Dabur, R. S. (2013). Novel trends in development of dietary fiber rich meat products-a critical review. Journal of food science and technology, 52(2), 633–647. https://doi.org/10.1007/s13197-013-1010-2

Moskovitz, D. N., & Kim, Y.-I. (2004). Dietary Fiber. Encyclopedia of Gastroenterology, 597–612. doi:10.1016/b0-12-386860-2/00184-2

Muñiz-Márquez, D. B., Contreras, J. C., Rodríguez, R., Mussatto, S. I., Wong-Paz, J. E., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2015). Influence of thermal effect on sugars composition of Mexican Agave syrup. CyTA - Journal of Food, 1–6. https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1028452

Olagnero, G., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M.L (2006). Alimentos funcionales: Fibra, Prebióticos, Probióticos y Simbióticos. Diaeta (B. Aires), 20-33.

Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (Agave mapisaga) throughout the Harvest Period. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(10), 3682–3687. https://doi.org/10.1021/jf072767h

Peralta-García, I., González-Muñoz, F., Elena, R. M., Sánchez-Flores, A., & López Munguía, A. (2020). Evolution of Fructans in Aguamiel (Agave Sap) During the Plant Production Lifetime. Frontiers in nutrition, 7, 566950. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950

Romero-López, M.R., Osorio-Díaz, P., Flores-Morales, A., Robledo, N., & Mora-Escobedo, R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and

prebiotic effect of aguamiel (Agave atrovirens) during in vitro fermentation. Revista mexicana de ingeniería química, 14(2), 281-292. Recuperado en 29 de agosto de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382015000200005&lng=es&tlng=en

Salem, A. Z., Valdez, N. T., Olafadehan, O. A., Elghandour, M. M., Barbabosa Pliego, A., & Coyote, R. L. (2017). Influence of Aguamiel (Agave atrovirens) as a Natural Feed Additive on Cecal Fermentation Kinetics of Some Forage Species in Horse Feeding. Journal of Equine Veterinary Science, 48, 103–112. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.012

Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., & Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. Journal of Physiology and Biochemistry, 65(3), 315–328. doi:10.1007/bf03180584

Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A. M., Jacobo-Velázquez, D. A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S. & Gutiérrez-Uribe, J. A. 2016. Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. Journal of Food Composition and Analysis. 45(2016): 113-120.

Secretaría de Salud. (2016, 9 julio). ¿Cuánta fibra dietética se debe consumir? Recuperado 7 de diciembre de 2021, de https://www.gob.mx/salud/articulos/cuanta-fibra-dietetica-se-debe-consumir

Sharma, S. K., Bansal, S., Mangal, M., Dixit, A. K., Gupta, R. K., & Mangal, A. (2015). Utilization of Food Processing By-products as Dietary, Functional, and Novel Fiber: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(10), 1647–1661. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.794327

Westenbrink, S., Brunt, K., & van der Kamp, J.-W. (2013). Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. Food Chemistry, 140(3), 562–567. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.02

Yangilar, F. (2013). The Application of Dietary Fibre in Food Industry: Structural Features, Effects on Health and Definition, Obtaining and Analysis of Dietary Fibre:

A Review. Journal of Food and Nutrition Research, 1, 13–23. https://doi.org/10.12691/jfnr-1-3-1