



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
INFORME DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**“ELABORACIÓN DE GALLETA SUPLEMENTADA CON FRUCTANO TIPO
AGAVINA E INULINA”**

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

ZAVALA DE LA CRUZ MANUEL DE JESÚS

08270384

ASESOR INTERNO

ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN

ASESOR EXTERNO

PROFESOR INVESTIGADOR

DRA. MERCEDES GUADALUPE LÓPEZ PÉREZ

REVISORES

DR. FEDERICO GUTIÉRREZ MICELI
DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

SEMESTRE AGOSTO-DICIEMBRE 2013

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACIÓN	6
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO	7
Ubicación.....	7
Estructura Orgánica	7
PROBLEMAS A RESOLVER	8
OBJETIVOS	9
Objetivo General.....	9
Objetivos Específicos.....	9
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	10
Agave	10
Carbohidratos	12
Fructanos	13
Metabolismo de fructanos.	15
Fuente de fructanos	16
Aplicación en alimentos y farmacéutico	16
Alimentos prebióticos	17
Industria galletera	18
Componentes básicos de la galleta	18
Evaluación Sensorial.	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Ingredientes	21
Elaboración de Galletas	21
Método de Extracción de Fructanos en Galleta.	22
Determinación de Fructanos	23
RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
Prueba sensorial de galletas	26
Resultados Primera Prueba sensorial.	27
Resultados Segunda Prueba Sensorial.	28

Extracción de fructanos	33
Cromatografía en Capa Fina (TLC)	34
Caracterización del Perfil de Fructanos en Extracto de Galletas	36
Cuantificación del contenido de fructanos en galletas	38
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

INTRODUCCIÓN

Elaborar alimentos suplementados con fructanos, está siendo una demanda del consumidor. Los fructanos son conocidos como fibras solubles con efectos prebiótico, que generen un beneficio al cuerpo humano, ya que estos carbohidratos son una fuente principal de energía para las bacterias en la microflora intestinal.

Los fructanos son polisacáridos de fructosa, este tipo de carbohidratos están presentes en diferentes fuentes naturales como lo son plantas, tales como cebolla, ajo, puerro, espárrago, agaves y achicoria (*Cichorium intybus*). Generalmente se extraen de la planta de achicoria, ésta presenta fructanos tipo inulina con enlaces (2-1) de igual forma, se pueden extraer de las piñas de agave los cuales son fructanos tipo agavina que presentan enlaces (2-1) y (2-6).

Tanto los fructanos de inulina y como los de agavina presentan efectos fisiológicos y bioquímicos, que favorecen el crecimiento de bacterias benéficas en la microbiota intestinal e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas.

Las plantas del género agave almacenan fructanos (polímeros de fructosa) como principal carbohidrato de reserva (López et al., 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006). En este género, *Agave tequilana* Weber variedad Azul sobresale como un cultivo con importancia agronómica en México por ser la materia prima principal para la elaboración de tequila, por la capacidad prebiótica de sus fructanos y su efecto sistémico en la salud (Urías-Silvas et al., 2008; Urías-Silva y López, 2009).

La obesidad es una de las causas principales hacia otras enfermedades como la diabetes, hipertensión cardiaca, etc. Por lo que estudios con ratones han demostrado que los fructanos de inulina y agavina disminuyen los niveles de glucosa y colesterol sérico e incrementan la absorción de calcio en los huesos (Urías-silvas et al., 2008).

En algunos estudios clínicos que se aplicaron una ingesta de fructanos tipo inulina mediante una dieta de galletas enriquecidas con estos carbohidratos en donde evaluaron la posibilidad de ser una opción terapéutica para bajar los índices de

obesidad por lo que concluyeron que se obtuvieron resultados favorables en cuanto al bajo nivel de colesterol que presentaron los pacientes obesos mediante este tratamiento (de Luis et. al., 2010).

Dado que el consumidor demanda por ingerir alimentos que proporcionen beneficios al cuerpo también, se ve reflejado en cuanto a las propiedades organolépticas de estos alimentos.

Por ello que la sustitución de sacarosa por fructanos tipo inulina y/o agavina sugiere un cambio en las propiedades sensoriales de las galletas por lo que se han realizados estudios de sustitución de sacarosa por fructanos tipo inulina, pero no en los de tipo agavina. En general el azúcar afecta sabor, dimensiones, color, dureza, superficie características (Gallagher y et al. 2003) y frescura (Kulp, et. al. 1991).

JUSTIFICACIÓN

En cuanto a la dieta y la salud se refiere, los consumidores han instado por consumir menos grasa y más alimentos que contengan hidratos de carbono complejos (Khalil, 1998). Como la grasa tiene el valor energético más alto de todas las principales constituyentes de los alimentos, una manera prometedora para la industria de alimentos para proporcionar alimentos en los que se pueda sustituir la grasa por la fibra dietética.

En los últimos años, la fibra dietética ha recibido una atención creciente a partir de investigaciones y la industria debido a los posibles efectos beneficiosos sobre la reducción de las enfermedades relacionadas con la incidencia de diabetes y enfermedades como cáncer de colon.

La inulina se ha usado para reemplazar grasa y sacarosa en varios alimentos, como productos cárnicos y productos lácteos además como usos de la inulina en varios productos extensores de productos tales como mantequilla, postres congelados, salsas, sopas. En los alimentos se ha realizado, varios estudios relacionados con el efecto de la inulina propiedad física y propiedades sensoriales.

Es por ello que los fructanos de tipo agavina podrían ser utilizados como sustituyente de sacarosa en galletas y estudiar la idoneidad y las propiedades sensoriales de las galletas, esto con la finalidad de observar y comparar con una galleta control para obtener un producto deseado por consumidor y con un alto contenido de sustitución de sacarosa con fructanos.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

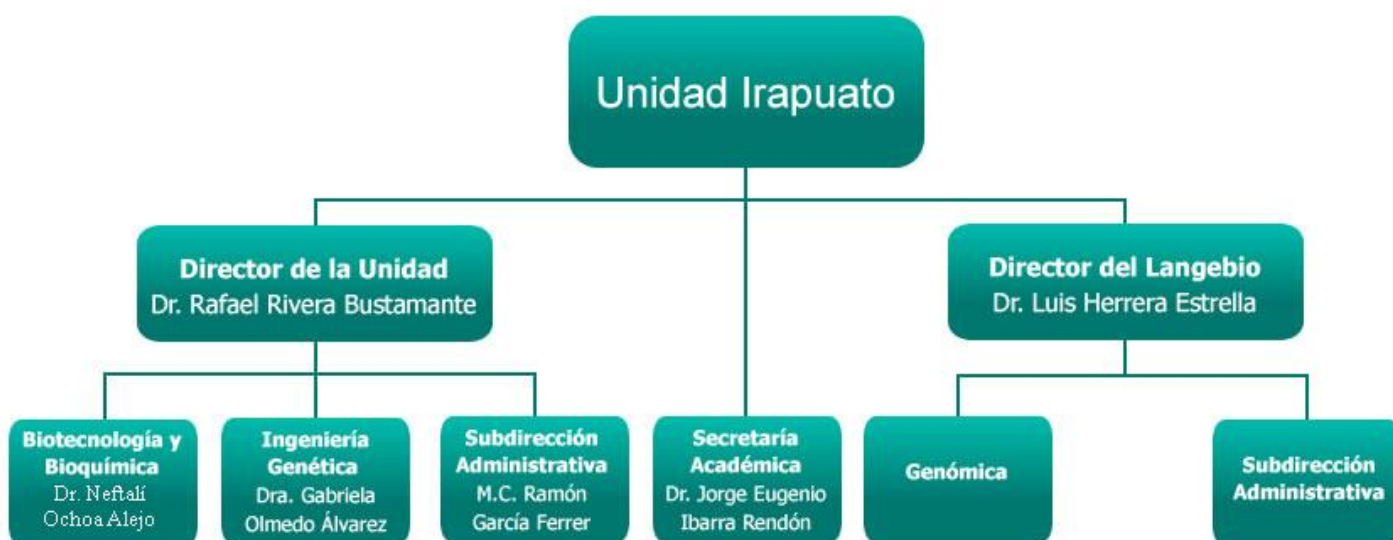
El presente proyecto de residencia profesional fue desarrollado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Irapuato.

Ubicación

Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León 36821 Irapuato, Gto. México.

La Unidad Irapuato ha mantenido su organización académica en dos departamentos: Ingeniería Genética de Plantas y Biotecnología y Bioquímica de Plantas. Ambos departamentos han reunido esfuerzos y ahora se ofrece, de manera conjunta, un solo programa de estudios, el cual se complementa con cursos optativos seleccionados en función de la orientación del propio estudiante y ha puesto especial interés en establecer un intenso intercambio académico, tecnológico y científico no sólo con las instituciones de la región, sino también con instituciones nacionales e internacionales, lo que ha permitido mantener una posición de vanguardia en sus áreas de trabajo.

Estructura Orgánica



PROBLEMAS A RESOLVER

Al haberse realizado diversos estudios, donde se implementa el uso de inulina en galletas como parte sustituyente de grasa y sacarosa, y han demostrado resultados no solo en las propiedades de la galleta; textura, color, sabor, etc., sino como parte fundamental de tener un efecto prebiótico, mejorándose en algunos consumidores los niveles de colesterol en pacientes con diabetes.

Es así como se requiere poner en práctica la utilización de fructanos de tipo agavina en galleta no solamente por obtener un efecto prebiótico, sino como una alternativa en el uso de elaboración de otros alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Suplementar galletas con fructanos tipo inulina y agavina, analizar las cualidades del alimento mediante prueba sensorial y el contenido de estos carbohidratos.

Objetivos Específicos

- Formular galletas con fructanos de agave e inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) como un sustituyente parcial de sacarosa.
- Estudiar los atributos sensoriales de las galletas mediante una evaluación sensorial.
- Determinar la estabilidad de los fructanos mediante una técnica de extracción e identificar la presencia de estos mediante cromatografía de capa fina (TLC), al término de la elaboración de galletas.
- Cuantificar el contenido de fructanos después de la elaboración de galletas.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Agave

Del griego, Agave, *Agavus*, significa admirable y fue a partir de la especie *Agave americana* que Carlos Linneo describió el género en 1753. Las plantas del género Agave son de gran importancia para México, debido a que nuestro país es considerado su centro de origen y biodiversidad. Actualmente se encuentran reportadas 136 especies dentro del territorio Mexicano (García-Mendoza y Galván, 1995; Nobel, 1998).

La variabilidad del género Agave es amplia y diversa, algunos ejemplos de tal variabilidad son los siguientes, *A. lechuguilla*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga* se encuentran en la altiplanicie Potosina; *A. tequilana*, *A. longisejala* y *A. subtilis* en la región Occidental; *A. pacífica*, *A. palmeri* y *A. zebra* en la zona del Pacífico; *A. americana*, *A. striata* y *A. lechuguilla* en el estado de Hidalgo; *A. fourcroydes* y *A. sisalana* en la península de Yucatán; *A. cantala*, *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii* en el estado de Oaxaca; *A. grijalvensis*, *A. americana* L. en Chiapas; *A. salmiana* y *A. mapisaga* en el Valle de México (Granados, 1993).

Agave tequilana Weber variedad Azul.

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul (Fig. 1) es una planta suculenta de tallo grueso y corto que alcanza de 30 a 50 cm en la madurez. El órgano floral mide de 5 a 6 cm y es densamente ramificado con 20 a 5 umbelas largas con flores verdes. Las pencas se extiende radialmente con una longitud de 90 a 120 cm de largo por 8 a 12 cm de ancho son lanceoladas, acuminadas, fibrosas, cóncavas más anchas en medio volviéndose angostas y más gruesas hacia la base; presenta un color azul verdoso lo que le da su nombre a la variedad. Es una planta que requiere de 7 a 10 años para su desarrollo y sus ciclos de cultivo se ven afectados por las condiciones ambientales, manejo y diferencias genéticas de las plantaciones. La planta del agave tequilero está conformada por dos partes principales que son: la cabeza o piña y las hojas. La cabeza representa la parte comercial de la planta y

se utiliza como materia prima en el proceso de elaboración de tequila, principal bebida alcohólica mexicana de consumo mundial.



Fig. 1.- *Agave tequilana* Weber variedad Azul

Agave angustifolia

El tamaño y forma de *A. angustifolia* es altamente variable, su roseta puede ser de 1 a 1.5 m de alta y de 2 a 2.4 m de ancho; las formas variegadas son mucho más pequeñas. Las plantas producen numerosos hijuelos. 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 las puntas, angosta hacia la base. El color de sus pencas varía de verde a verde grisáceo, con pequeños dientes curvados espaciados cada 1.3 a 3.8 cm y una espina terminal corta, generalmente color café o negro. (Mancilla-Margalli, 2006).

Agave potatorum

A. Potatorum, *tobala* o *papaometl* es una especie pequeña y solitaria. Existen 33 variedades de acuerdo a las características de sus hojas, las cuales se encuentran entre 30 y 80, dispuestas simétricamente alrededor del tallo para formar una roseta abierta. Las hojas varían de forma y color, desde ovalas, 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 (Mancilla-Margalli, 2006).

Carbohidratos

Constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra, a causa de sus diversas funciones tales como almacén de energía, intermediarios metabólicos. En el reino vegetal la mayor parte de los carbohidratos se presentan en formas de polisacáridos de elevado peso molecular. La unidad básica de los carbohidratos se conoce como monosacáridos o azúcares simples, mientras que los oligo y polisacáridos consisten de monosacáridos unidos covalentemente.

En la naturaleza éstos se encuentran distribuidos abundantemente como materiales estructurales algunos ejemplos son la celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. También como polisacáridos de reserva almidón, dextrina y fructanos.

La sacarosa y el almidón son los carbohidratos más comunes y mejor conocidos, son los carbohidratos de reserva en las plantas superiores, sin embargo, aproximadamente el 15% de las plantas con flores almacenan fructanos como una reserva en al menos uno de sus órganos durante su ciclo de vida.

Las especies vegetales que contienen fructanos se encuentran distribuidas en algunas familias de monotiledoneas y dicotiledóneas tales como Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae, Compositae y Agavaceae, existiendo diferencias estructurales entre dichas familias de plantas. Las especies de dicotiledóneas almacenan fructanos tipo inulina, mientras que en monocotiledóneas se pueden encontrar fructanos más complejos y de tipo ramificado (Kaur y Gupta, 2002; Vijn y Smeekens, 1999). Partes de varias especies de plantas que contienen fructanos son frecuentemente consumidos como vegetales, algunos ejemplos son los espárragos, ajo, cebolla, alcachofa y achicoria (Mancilla-Margalli, 2006).

Fructanos

Los fructanos son carbohidratos no reductores y solubles en agua, compuestos por unidades fructosil, que suelen contener una molécula de glucosa terminal.

Su estructura puede ser lineal o ramificada y algunas veces cíclica (López et al., 2003; Wang et. al., 1998). Vijn y Smeekens (1999) clasificaron a los fructanos en cinco grupos principales según las unidades estructurales mayoritarias que conforman su molécula en: inulinas, levanos, graminanos, inulinas neoserie y levanos neoserie (Fig. 2).

Clasificación de los fructanos.

La unidad estructural básica se forma por la transferencia de una fructosa a uno de los tres hidroxilos primarios que presenta la sacarosa. Los trisacáridos formados por un grado de polimerización de 3 unidades de fructosa (DP3) se denominan kestotriosas (Suszuki, 1993). La transferencia de una fructosa al oxígeno del C1 o C6 de la fructosa en una molécula de sacarosa genera la 1-kestotriosa y 6-kestotriosa propuestas por Waterhouse y Chartterton (1993); mientras que la adición de una fructosa al oxígeno del C6 de la glucosa genera la neokestosa. La 1 y 6 kestotetraosa (o bifurcosa) es un tetrasacárido (DP4) ramificado, es formado por la transferencia de una fructosa al grupo hidroxilo disponible del carbono 6 o 1 en la fructosa interna de la 1-kes o 6-kestotriosa.

Los fructanos del tipo de las inulinas consisten de unidades fructosil (2-1), inicialmente presentan una molécula de glucosa a partir de la cual se le unen por lo menos dos residuos de fructosa. La molécula de inulina más corta es la 1-kestosa también llamada isokestosa. Los levanos, en lugar de presentar el tipo de enlace que se observa en las inulinas, presentan enlaces (2-6). Los graminanos están compuestos tanto de enlaces (2-1) como (2-6). Un ejemplo de este tipo de fructanos es la bifurcosa. Las inulinas neoserie contienen unidades fructosil con enlaces (2-1) unidas tanto al carbono 1 como al 6 de la molécula de glucosa, la inulina neoserie más pequeña, es la neokestosa. Por último, los levanos neoserie son polímeros predominantemente con enlaces (2-6) unidos a ambos extremos

de la molécula de glucosa. Además de su función como carbohidratos de reserva, la síntesis de fructanos regula la concentración de sacarosa en la vacuola y ayuda a la planta a tolerar el estrés por sequía o frío (Vijn y Smeekeens, 1999).

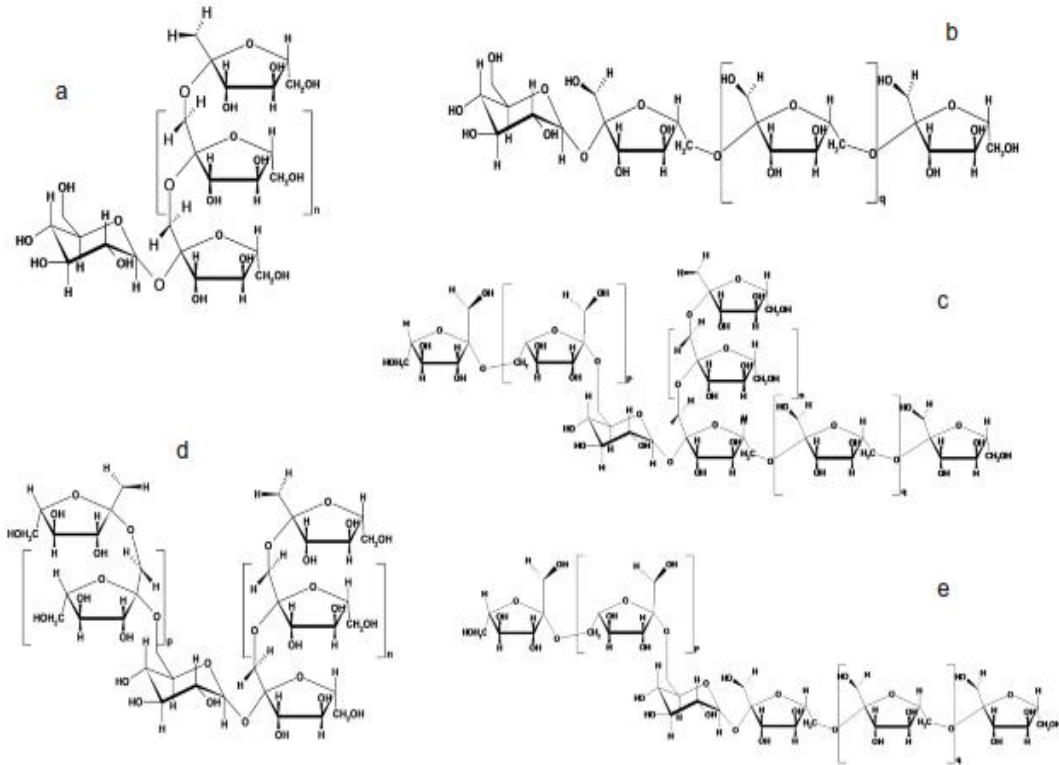


Figura 2.- Estructura de los fructano a) Inulina, b) Levanos, c) Fructano ramificado, d) Inulina Neoserie, e) Levanos Neoserie.

La inulina extraída de plantas por lo general contiene hasta un 10% de monosacáridos y disacáridos (principalmente sacarosa y fructosa), y una serie de oligosacáridos, donde se incluyen los fructoligosacáridos (FOS). En el caso de *A. tequilana* Weber variedad Azul debido a su alto grado de ramificaciones han sido nombrados agavina (Fig. 3). Por otra parte los derivados de la hidrólisis de estos fructanos se obtienen a los fructoligosacáridos (FOS) los cuales poseen bajo peso molecular y grado de polimerización menor a 10 unidades de fructosa (López et. al., 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006).

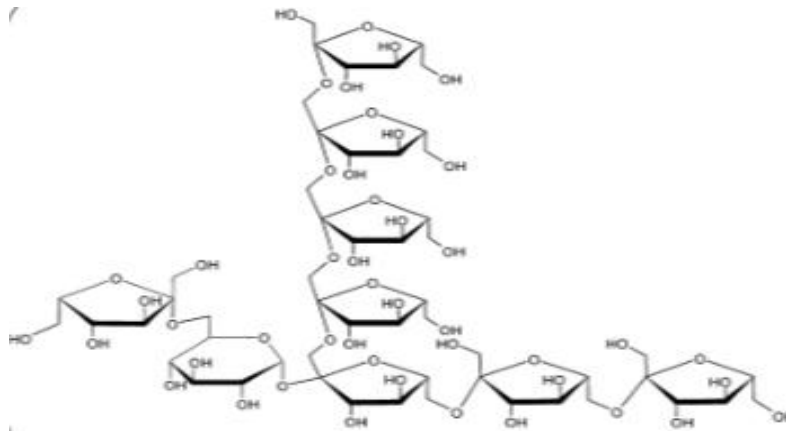


Figura 3. Estructura propuesta para fructanos de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Fuente: López y et. al. (2003).

Metabolismo de fructanos.

La sacarosa es sintetizada en el citoplasma y es el sustrato para la biosíntesis de fructanos, los cuales son almacenados en las vacuolas (Vijn y Smeekens, 1999). La biosíntesis de inulina de las plantas empieza por la acción de la enzima sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (SST) (ecuación 1), produciendo trisacáridos como la 1-kestosa o 6-kestosa.



La SST es solamente activa a altas concentraciones de sacarosa (6-15%), el crecimiento de la cadena de los fructanos es por la acción de la enzima fructano-fructano fructosiltransferasa (FFT), que transfiere unidades de fructosa a los trisacáridos formados por la SST (ecuación 2).



Tal y como describen Vijn y Smeekens (1999), a partir de la 1-kestosa y sacarosa, la enzima 6G-FFT puede producir neoketosa y la enzima 6-SFT puede producir bifurcosa, producto que puede ser elongado por la 1-FFT en la forma antes descrita para generar oligofructanos ramificados. Al parecer, la 1-kestosa es el metabolito central del cual se forman las diversas estructuras por acción de distintas enzimas fructosiltransferasa (FT) (Mellado-Mojica E. y López, 2013).

Fuente de fructanos

La mayoría de las plantas almacenan almidón o sacarosa como carbohidratos de reserva, pero aproximadamente del 12-15% de las plantas superiores sintetizan fructanos, como principal fuente de carbohidratos.

Entre las plantas que almacenan fructanos son de importancia económicamente debido a su contenido de fructanos como el caso de achicoria (*Cichorium intybus*), agave (*Agave sp*), alchofa (*Cynara scolymus*), dalia (*Dahlia variabilis*), ajo (*Allium ampeloprasum*), trigo (*Triticum aestivum*), cebolla (*Allium cepa*) y plátano (*Musa spp*).

Se estima que la raíz de la achicoria, de dónde se obtiene primordialmente la inulina comercial, contiene hasta un 17%-30% de fructanos de los cuales entre un 8% y un 14% son inulinas con grados de polimerización (DP) no mayores a 60 unidades.

Los fructanos se encuentran de manera natural en las plantas como una mezcla heterogénea con diferentes estructuras y grados de polimerización (DP). Los fructanos tipo inulina (2-60, DP 25), oligofruktosas (2-10, DP4) para las agavina (*A. tequilana* Weber var. Azul) (3-22, DP 7).

Aplicación en alimentos y farmacéutico

En la actualidad el mercado de productos alimenticios bajos en calorías, con bajo contenido en grasa, enriquecido con fibra y con beneficios para la salud sigue desarrollándose y creciendo ante nuevas tecnologías alimentarias. Los fructanos pueden cubrir cada una de las demandas como sustituyentes de grasa y azúcares.

En lo que respecta a los fructanos con bajo grado de polimerización (DP) se utilizan a nivel industrial como sustituyentes de azúcares debido a que son altamente solubles y poseen un sabor dulce. En cambio los que poseen alto grado

de polimerización (DP) son menos solubles y se emplean en la mayor parte como sustituyentes de grasa o estabilidad a emulsiones y espumas.

Sin embargo los fructanos no solo pueden traer beneficios en dichos alimentos si no también empleados en el sector farmacéutico en el que se empleen a estos como antibióticos para tratar enfermedades como cáncer de colon o la prevención de la misma.

Alimentos prebióticos

Debido a la gran variedad de alimentos que existen en la actualidad, en un futuro la tendencia de estos alimentos es que sean de carácter funcional, es decir que tengan efectos benéficos en el hospedero. Dando al cuerpo humano el consumo de carbohidratos no digeribles y fuente de energía para ciertos microorganismos.

El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid (1995), quienes lo definieron como ingredientes no digeribles, que afectan beneficiosamente al hospedero por una estimulación selectiva del crecimiento de bacterias o un determinado grupo de bacterias entre las más indicadas del género bifidobacterium.

Dentro de los carbohidratos se encuentran los llamados fructanos, no obstante los más utilizados son la inulina y oligofruktosas que son fibras prebióticas que tiene un efecto benéfico en el tracto digestivo, se utilizan para la fortificación de ciertos alimentos como yogurt, jugos de frutas, hoy en día se utilizan para la industria galletera y panadera como un sustituto de grasa.

Los prebióticos son generalmente carbohidratos de cadena corta que no son digeribles es decir para que cumplan este requisito no deben de ser hidrolizados ni absorbido en la parte alta de tracto intestinal.

En la década de los 90, Bélgica y Holanda comenzaron la extracción industrial de inulina utilizando achicoria como materia prima y recientemente se ha extendido a Estados Unidos y Alemania, por lo que en las últimas décadas la producción de

inulina ha aumentado considerablemente casi exclusivamente para fines alimentarios.

Industria galletera

La galleta es el producto alimenticio más elaborado y el que requiere mayor número de componentes, lo que ha incitado la integración vertical de las compañías ocupadas en su producción y la formación en torno de ellas.

El conocimiento de la funcionalidad de cada uno de los ingredientes que componen una galleta es de gran interés en la industria galletera. Este conocimiento permite no sólo reaccionar de forma rápida y eficaz ante posibles variaciones no deseadas de la galleta durante la producción, sino también la innovación y el desarrollo de nuevas formulaciones de galletas (Cabeza, 2009).

Componentes básicos de la galleta

Harina

Las harinas blandas son indispensables para la elaboración de galletas, estas harinas se obtienen normalmente a partir de los trigos. Su contenido proteico es normalmente inferior al 10%. La masa que se obtiene es menos elástica y menos resistente al estiramiento que la masa obtenida con harina fuerte (más del 10% de proteínas). Las proteínas del gluten pueden separarse en función de su solubilidad. Las más solubles son las gliadinas, que constituyen aproximadamente la tercera parte del gluten y contribuye a la cohesión y elasticidad de la masa, masa más blanda y más fluida (Duncan, 1989).

Azúcar

Los azúcares en su estado cristalino contribuyen decisivamente sobre el aspecto y la textura de las galletas. Además, los jarabes de los azúcares reductores también van a controlar la textura de las galletas. La fijación de agua por los azúcares y

polisacáridos tiene una contribución decisiva sobre las propiedades de las galletas. La adición de azúcar a la receta reduce la viscosidad de la masa y el tiempo de relajación. Promueve la longitud de las galletas y reduce su grosor y peso. Las galletas ricas en azúcar se caracterizan por una estructura altamente cohesiva y una textura crujiente (Duncan, 1989).

Grasas

Las grasas ocupan el tercer puesto en importancia dentro de los componentes de la industria galletera después de la harina y el azúcar. Las grasas desempeñan una misión antiglutinante en las masas, contribuyen a su plasticidad y su adición suaviza la masa y actúa como lubricante. Además, las grasas juegan un papel importante en la textura de las galletas, ya que las galletas resultan menos duras de lo que serían sin ellas.

Sal común

La sal común (cloruro sódico), se utiliza en todas las recetas de galletas por su sabor y por su propiedad de potenciar el sabor. Además la sal endurece el gluten (ayuda a mantener la red de gluten) y produce masas menos adherentes. (Duncan, 1989).

Evaluación Sensorial.

La evaluación sensorial es la medición de la aceptación de un producto, puede ser comestible o bebible, basado en la percepción de los sentidos fisiológicos tales como el sabor, olor, tacto y color.

Esto sujeto a datos relacionados con las diferentes cualidades que poseen, cada persona y la capacidad cerebral de percibir dichos factores en un alimento (Liria, 2007).

Desde un punto de vista práctico utilizamos nuestros sentidos para tener en cuenta que el alimento tiene propiedades nutricionales si no que lo adecuamos a una

serie de ideas complejas en el aspecto del mismo alimento como factores visuales esto influye en el tamaño, forma e integridad, incluyendo los defectos como manchas, deterioro. No obstante los factores de textura es la sensación que tenemos al tocar dicho alimento si es duro, blando o una textura suave. También podemos definir que dentro de éstos, está el sabor y olor que son los más representativos en el momento de una evaluación sensorial si dicho alimento dentro del sabor es dulce, salado, amargo y en el olor si es característico propio del alimento o que sientan olores extraños ajenos al propio. Se debe considerar que estos 2 últimos son muy difíciles de analizar, evaluar y medir (Godoy, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes

Las formulaciones de galletas utilizadas se muestran en el Cuadro 1, se ensayaron 10 muestras con una composición de masa corta, una galleta control con un porcentaje de sacarosa total, y 9 galletas con diferentes porcentaje de sustitución de sacarosa por fructanos. Los fructanos que se utilizaron para suplementar las galletas fueron fructanos comerciales de tipo inulina Raftiline (*RNE*), *Raftilose (RSE)*, y *Agavina CPI*.

Cuadro 1. Ingredientes empleados en el desempeño de la galleta (porcentajes dados en una base de harina).

Materiales	Control	20SF	30SF	40SF
Harina	100	100	100	100
Mantequilla	62	62	62	62
Azúcar	40	32	28	24
Fructanos	0	8	12	16
Huevo	1	1	1	1
Leche	5	5	5	5
Bicarbonato de sodio	1	1	1	1

20 SF, 20% de sustitución de sacarosa por fructanos; 30SF, 30% de sustitución de sacarosa por fructanos; 40SF, 40% de sustitución de sacarosa por fructanos.

Elaboración de Galletas

El proceso de elaboración de cada galleta se realizó de la siguiente manera: se mezclaron la mantequilla y azúcar con una mezcladora marca Black & Decker, a una velocidad baja durante 2 minutos, en esta operación se usaron aspas de globo, posteriormente se agregaron sal, huevo y leche. Por último se adicionó la

harina junto con los demás polvos bicarbonato de sodio y fructanos (exceptuando a la galleta control), aquí se usaron las espas de espiral a una velocidad 1 durante 2 minutos, hasta obtener una masa apta para laminarse y troquelarse. Se colocó una porción de la masa en una superficie plana y laminarse con un rodillo, hasta lograr un espesor uniforme y superficie plana. Se troqueló con los moldes y se colocaron las piezas formadas en una charola (previamente engrasada). Para el horneado de las galletas se utilizó un horno marca Hamilton Beach previamente calentado, el horneado se realizó durante 15 minutos a una temperatura aproximada de 175 °C. Al observarse una coloración café en la parte laterales de la galleta se retiraron para enfriar y llevarse a almacenamiento.

Método de Extracción de Fructanos en Galleta.

Los fructanos fueron extraído de acuerdo a la metodología establecida en el laboratorio (López et al., 2003). Se pesaron 5 gramos de la galleta (galleta control, galleta RNE, galleta CPI) las cuales se molieron en un mortero. Cada muestra se extrajo con etanol 80 %. Se calentó con agitación a 70°C durante 1 hora, la muestra se filtró con papel tipo whatman #1. El sobrante se volvió a extraer 2 veces con 50 mL de mezcla etanol al 80%. Al término de la extracción cada muestra se llevó a una centrifuga para obtener un líquido sin partículas suspendidas volviéndose a filtrar. Cada filtrado se concentró mediante una evaporación a baño maría 60°C en un rota vapor a vacío hasta lograr evaporar el líquido en su totalidad obteniéndose en la superficie una capa del secado con lo que se disolvió con 1 mL de agua destilada. Para poder concentrar mejor los fructanos y separar la mayor parte de grasa del concentrado se realizó un lavado con 10 mL de cloroformo dejándolo reposar durante 30 minutos, por lo consiguiente se adiciona 5 mL de etanol al 80%. Se concentró en un rotavapor al vacío en baño maría a 60°C por lo que se eliminó tanto el cloroformo y el etanol. Se disolvió con 1 mL de agua destilada haciendo un filtrado y se almacenaron en un refrigerador hasta su posible análisis.

Caracterización de Fructanos en TLC (Cromatografía de Capa Fina).

Para identificar las muestras extraídas se realizó cromatografía de capa fina (TLC). Se colocan las muestras en una capa plana relativamente delgada de un material que a la vez es el soporte, o bien que recubre una superficie de vidrio, plástico o aluminio. La fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad de la muestra. Se realizó la toma de la muestra 1 uL con micro pipeta (10 microlitros), el cual se depositó en una placa de sílice gel de una medida de (20 x 10 cm). Se introdujo la placa en una cámara de vidrio y se hicieron corridas de 3 a 4 veces en una mezcla de disolvente de propanol:butanol:agua (12:3:4). Al término del desarrollo de la placa se asperjo con una solución reveladora compuesta de difenilamina-anilina-ácido fosfórico, el secado del revelado se hizo en un horno a 100°C durante 3 minutos.

Determinación de Fructanos

La determinación del contenido de fructanos después de la elaboración en la galleta se realizó con el método de AOAC 999.03 mediante un kit comercial "Fructan Assay Procedure" (for the measurement of Fructo-ologosaccharides (FOS) and Fructan polysaccharide de la marca megazyme.

El principio de la técnica se basa en la hidrólisis de los fructanos a fructosas por la acción de la fructanasa (exoinulinasa), los azúcares reductores producidos son determinados con el método de hidracida del ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) para azúcares reductores.

Para la realización del ensayo se siguió la metodología del kit enzimático, se prepararon las muestras tomándose del concentrado de extracto de galleta diluidas en agua (1:100) y se utilizaron los controles que proporciona el protocolo del kit.

Remoción de sacarosa, almidón y azúcares reductores.

Se colocaron 50 uL de la solución anterior en tubos eppendorf y agregar 50 uL de una mezcla de enzimas: sacarasa, α -amilasa, pullunasa y maltasa. Se incubaron a 40°C durante 30 min a 450 rpm en termomixer. Para reducir los monosacáridos a alcohol azúcares se adicionaron 50 uL de borohidruro de sodio (NaHB_4), se agitó en vortex 15 segundos e incubó a 40 °C durante 30 min a 450 rpm. Para eliminar el exceso de NaHB_4 agregar 125 uL de ácido acético agitar en vortex 15 segundos. Estas soluciones se denominan muestras "S".

Controles, muestras e hidrólisis de fructanos.

Blanco de muestra: se colocaron 50 uL de la solución S en un tubo de eppendorf, agregar 25 uL de buffer de acetato de sodio 100 mM, luego se agito en vortex 20 segundos e incubó a 40 °C durante 20 min en termomixer.

Muestras problemas: se colocaron 50 uL de la muestras S en tubos eppendorf, agregar 25 uL de fructanasa, se agitaron en vortex 15 segundos e incubaron a 40 °C durante 20 min a 400 rpm en termomixer.

Blanco de reactivo: se adicionó 75 uL de buffer de acetato de sodio en tubo eppendorf.

Estándar de fructano.

La preparación del estándar consiste en mezclar 50 uL de estándar de fructano con 225 uL de hidróxido de sodio. Para la determinación se tomó 75 uL.

Cuantificación de fructanos: se adicionó a cada tubo 1.25 mL de solución PAHBAH, se llevó a baño maría (agua hirviendo) durante 6 min, de ahí se colocó las muestras en agua fría durante 5 min, se dejó reposar y se determinó su absorbancia a λ 410 nm contra blanco de reactivo.

La concentración de los fructanos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Fructanos (\%w/w)} = A \times F \times 5 \times V \times 1.1/0.2 \times 100/W \times 1/1000 \times 162/180$$

Dónde:

A = Abs. Muestra - Abs. Blanco de muestra (ambas leídas menos el blanco de reactivo)

- F= Factor para convertir los valores de absorbancia a mg de D-fructosa:

$$(54.5 \text{ mg D-fructosa}) / (\text{Absorbancia para } 54.5 \text{ mg de D-fructosa})$$

- 5= factor para convertir de 0.2 mL llevados a 1.0 mL
- V= Volumen (mL) de extracción usado
- 1.1/0.2= 0.2 se tomó de 1.1 mL de digestión enzimática para análisis
- W = Peso en mg de muestra extraída
- 100/W= Factor para expresar los fructanos como un porcentaje de peso de harina
- 1/1000= Factor para convertir de μg a mg
- 162/180= Factor para convertir de D-fructosa libre, como se determinó, a anhidrofructosa (anhidroglicosa), como ocurre en los fructanos.

$$\% \text{ de fructano} = A * F * V/W * 2.48$$

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante la elaboración de galletas suplementadas con fructanos, se observó que las masas que contenían fructanos de tipo inulina presentaban mejor estabilidad, ya que la masa era más manejable en comparación a las mezclas con fructanos tipo agavina, estas presentaban menos estabilidad debido a que las masas eran pastosas lo cual dificulta su manipulación en la elaboración de galleta.

Prueba sensorial de galletas

Se llevó a cabo el panel sensorial de la galleta control y de las suplementadas con diferente tipo de fructanos por lo que se presenta a continuación el Cuadro 2; la relación de orden de las galletas y las abreviaturas que se manejaran para cada una de ellas.

Cuadro 2. Relación de galletas y abreviatura.

Muestra de galleta y porcentaje empleado.	Abreviatura de muestra	Tipo de fructanos suplementado
Galleta Control	GC	-----
Raftiline 20 %	RNE2	Inulina
Raftiline 30 %	RNE3	Inulina
Raftiline 40 %	RNE4	Inulina
Raftilose 20 %	RSE2	Inulina
Raftilose 30 %	RSE3	Inulina
Raftilose 40 %	RSE4	Inulina
<i>Agave tequilana</i> W. var. A. 20 %	CPI2	Agavina
<i>Agave tequilana</i> W. var. A. 30 %	CPI3	Agavina
<i>Agave tequilana</i> W. var. A. 40 %	CPI4	Agavina

La prueba sensorial se realizó en la sala de juntas, contando con un total de 10 personas. Para efectuar las pruebas sensoriales, a cada individuo se le explicó la mecánica de la prueba, presentándose una hoja de evaluación con los diferentes parámetros a evaluar con respecto a la parte sensorial de las muestras.

Resultados Primera Prueba sensorial.

En base a lo que los panelistas notaron en relación a las galletas que contienen raftiline (RNE) indicaron en sus comentarios que este tipo de galleta les parecía más agradable en comparación a otras muestras, no obstante en cada una de los diferentes porcentajes que se presentó con raftiline (RNE) que obtuvo más aceptación es la RNE2 ya que como se puede observar en el Cuadro 3 esta muestra presentó un sabor con mayor dulzura y una textura crujiente con respectivo olor a galleta.

Cuadro 3. Propiedades evaluadas en galletas.

MUESTRA	COLOR		SABOR			TEXTURA			OLOR	
	BEIGE	CAFÉ	DULCE	SALADO	GRASOSA	CRUJIENTE	SUAVE	DURA	OLOR A GALLETA	SIN OLOR
GC	7	3	7	3	0	8	0	2	9	1
RNE2	8	2	9	1	0	9	1	0	9	1
RNE3	7	3	8	2	0	8	0	2	9	1
RNE4	4	6	8	1	1	7	3	0	10	0
RSE2	7	3	8	1	1	6	4	0	8	2
RS3	5	5	6	2	2	8	0	2	8	2
RSE4	6	4	8	2	0	6	4	0	7	3
CPI2	8	2	7	2	1	5	4	1	8	2
CPI3	5	6	4	5	1	4	3	3	9	1
CPI4	6	4	6	3	1	4	3	3	9	1

Debido al aroma de la galleta en las muestra de raftilose (RSE) debía tener un sabor similar igual a las galletas raftiline (RNE). Son conocidos como fructoligosacáridos (FOS) son fructanos de bajo grado de polimerización (< 10 DP), ya que presenta un poder edulcorante menor a la sacarosa.

Sin embargo, reportaron percibir poca dulzura, lo cual fue de menor agrado, además de un sabor ligeramente salado, con una textura quebradiza y una coloración café, de igual forma en las galletas con agavina (CPI).

Resultados Segunda Prueba Sensorial.

Entonces se realizó una segunda prueba sensorial de galletas esto, con la finalidad de comparar con los datos obtenidos en la anterior prueba sensorial, por lo que se presenta a continuación cada una de las propiedades organolépticas con que se evaluó las galletas.

Color.

Comparándose a los resultados de la primera prueba se obtuvieron como resultado en una escala 1 a 10, las galletas de mezcla raftiline (RNE) y raftilose (RSE) presentan mejores aspecto a la galleta control y a las galletas con agavina (CPI).

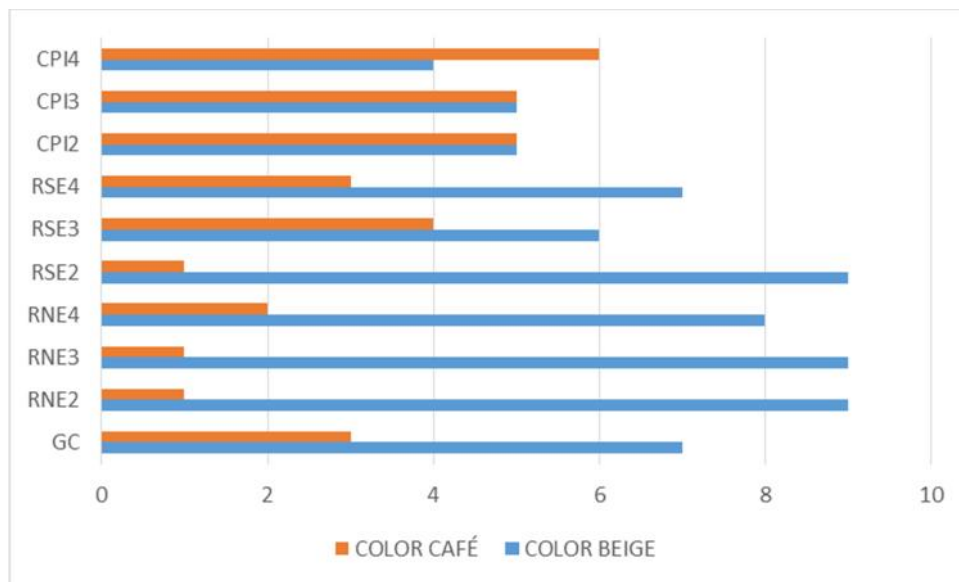


Figura. 4 Grafica de Color de galletas

Cabe destacar que la coloración, indica que los panelistas prefieren en una galleta beige a una coloración café, esta última se debe a que hay mayor reacción de caramelización de azúcares en la galleta.

Sabor

Para indicar que tipo de galleta presento mejor propiedad de sabor al haberse sustituido parcialmente sacarosa por fructanos, se muestra la Fig. 5 donde se observa que las galletas de inulina presentan mayor efecto de dulzor en comparación con agavina.

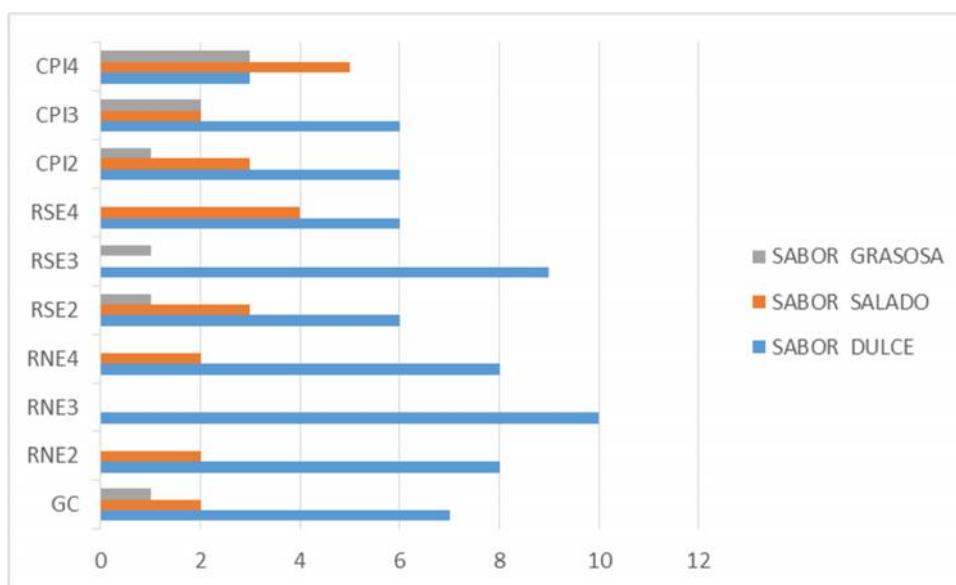


Figura 5. Grafica de Sabor en galletas.

El perfil de sabor que se ve en la gráfica anterior que las galletas de RNE3 presentó mejor sabor para los panelistas, casi igualitario a los de RSE3, este último por ser de cadenas de fructosas cortas posee un sabor parecido a la sacarosa.

Por lo que fructanos de inulina y los de cadena corta (FOS) a comparación de agavina (CPI), que tienen una cadena más compleja (ramificaciones) tiene mayor efecto de dulzor lo que proporcionara un efecto en la textura de las galletas.

Textura.

La textura que denotaron los panelistas en cada de la galletas (Fig. 6), sugiere que al utilizar inulina proporciona una textura crujiente en comparación de agavina.

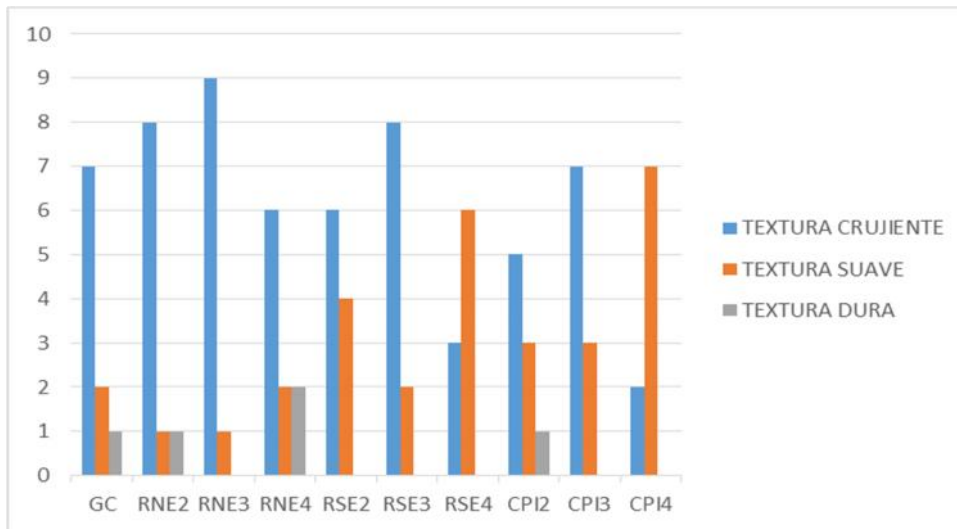


Figura 6. Textura en Galleta.

Se puede indicar que utilizar inulina (RNE y RSE), no solo como sustituyentes de sacarosa sino como extensor de grasas hace de las galletas una textura crujiente. Sin embargo RNE3 presenta una mejor textura según la percepción de los panelista.

Al usar un porcentaje mayor (40%) de agavina, la galleta presenta una textura suave casi similar a una textura crujiente (CPI2). Esto se debe a que entre mayor grado de polimerización (DP), la textura de la galleta será más suave por el efecto antiglutinante que desempeña tanto la grasa como los fructanos.

Por lo que sustituir en un 30% sacarosa se genera una buena textura en comparación de un 20 y 40% en cada una de las 3 diferentes mezclas de galletas con fructanos.

Olor

En la siguiente Figura 7, se hace una comparación de cada una de las galletas y una gráfica donde especifica que el olor de estas si pueden ser modificadas al sustituir la sacarosa.

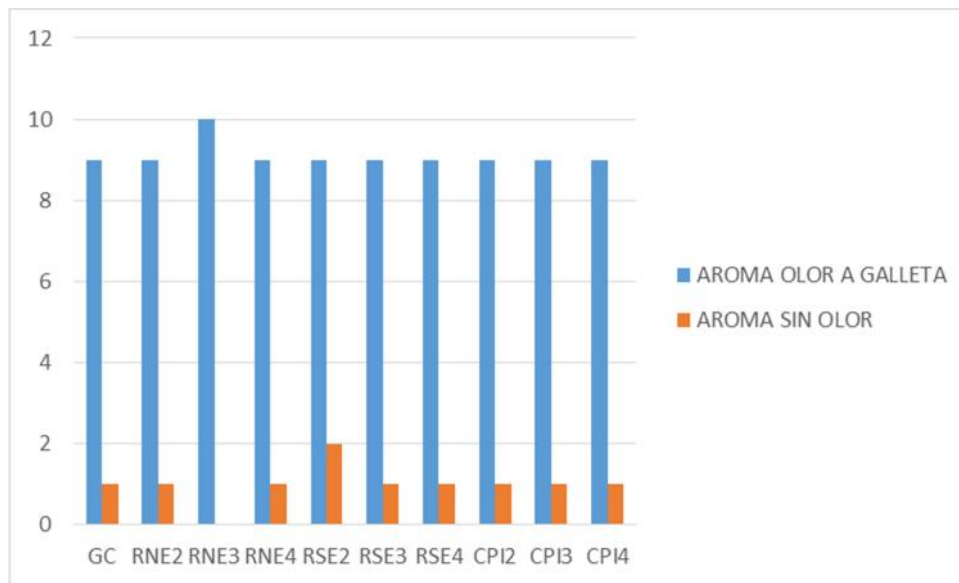


Figura 7. Grafica de Olor.

Se observa que si hay cambios en esta propiedad, debido a que los fructanos no presentan olor a comparación de la sacarosa.

Por lo que el olor característica de las galletas se adquiere en cuanto a la sacarosa y a la mantequilla. Entonces al sustituir la sacarosa por fructanos conlleva a un cambio en el olor característico de las galletas.

Grado de aceptabilidad.

Por lo que se muestra la siguiente Fig. 4 se realizó la gráfica de aceptabilidad de las galletas.

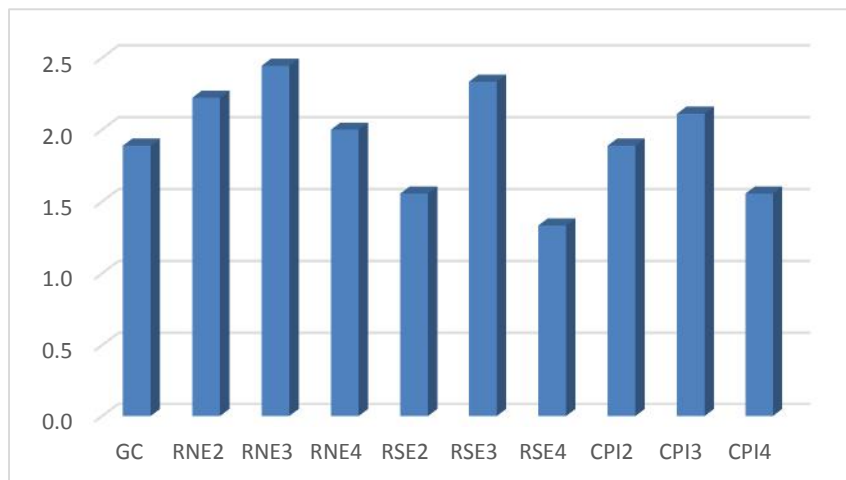


Figura 4. Grado de aceptabilidad de galletas

De los resultados en la pruebas sensoriales el porcentaje de 30% de suplementación obtuvo un grado aceptabilidad mayor en comparación a los porcentajes de 20 y 40%, haciendo mención a que la sustitución de inulina en este caso RNE mantiene aceptabilidades con diferencia mínimas.

Se observaron que las galletas RNE3, son las que se percibió más agradable para los panelistas, por lo que se puede estimar según otras fuentes de investigación en un porcentaje entre 20 y 30% de sustitución de sacarosa en galletas mantiene mejores perfiles sensoriales (Gallagher et. al., 2003).

Por lo que al utilizar inulina como sustituyente de sacarosa, presenta mejora no solo a los diferentes porcentajes empleados sino con otro tipo de fructano en este caso agavina y en relación a la galleta control.

Extracción de fructanos.

El método que se empleó para extraer los fructanos ya estaba establecido (López et al., 2003). Sin embargo se realizaron algunas modificaciones ya que no se podía obtener un resultado favorable para la caracterización de fructanos por cromatografía de capa fina (TLC), esto es debido a las altas concentraciones de otros compuestos que conforman a las galletas.

Las altas concentraciones de grasa (lípidos) u otros compuestos orgánicos se vieron reflejados al realizar la caracterización de los fructanos mediante cromatografía de capa fina (Fig. 5).



Figura 5. Análisis en cromatografía de capa fina de fructanos del extracto de galleta.

Se tuvo que emplear un solvente no polar, este solvente pudo separar la fase orgánica de la fase líquida (fructanos), por lo que se eliminó la parte lipídica, de los carbohidratos.

Con esto sería posible realizar la caracterización de las muestra en cromatografía de capa fina.

Cromatografía en Capa Fina (TLC).

La técnica de TLC es la más utilizada para la caracterización e identificación de fructanos, aunque no es de manera cuantitativa solo da información cualitativa.

La determinación de fructanos en galletas indica la presencia de estos carbohidratos después de haber sido sometido a un proceso de cocción durante la elaboración de galletas, considerando que se hayan degradado solo un cierto porcentaje de fructanos, esto se puede observar en el perfil de la TLC (Fig. 6).

En la parte inferior se colocó la muestra en el que se puede apreciar la existencia de fructanos sin embargo, en la parte superior de la TLC se aprecia que aún hay concentración de la muestra lo que sugiere que hay otros compuesto como lípidos, lo que no permite que se visualice mejor el perfil de fructanos.

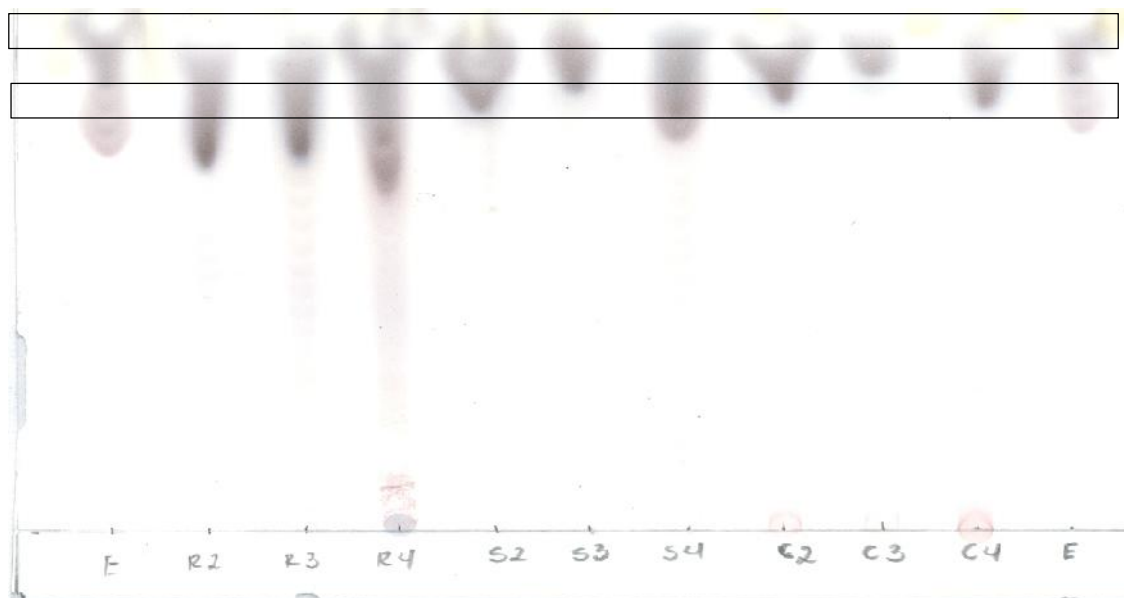


Fig. 6 Cromatografía en Capa Fina de agavina e inulina. La Cromatografía muestra la presencia de fructanos aplicado en galletas en sustitución de sacarosa en diferentes proporciones donde E (estándar); R2 (raftiline 20%), R3 (raftiline 30%), R4 (raftiline 40%), S2 (raftilose 20%), S3 (raftilose 30%), S4 (raftilose 40%), C2 (*A. tequilana* W. 20%), C3 (*A. tequilana* W. 30%), C4 (*A. tequilana* W. 40%).

Al haberse empleado cloroformo como solvente no polar, para poder eliminar la mayor parte de la fracción lipídica se puede apreciar mejor la presencia de fructanos y una separación de banda (DP) en el perfil de fructanos (Fig. 7).

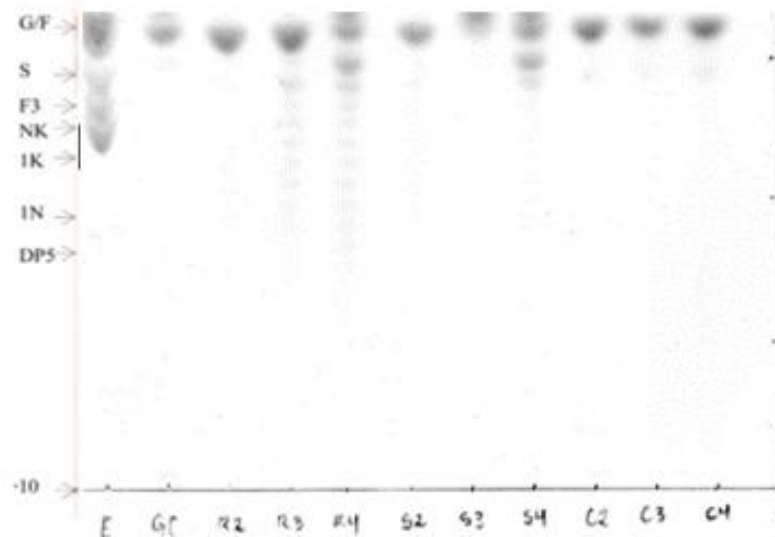


Figura 7. TLC de extractos de galletas despues de aplicación de un solvente no polar.

Caracterización del Perfil de Fructanos en Extracto de Galletas.

Para determinar el perfil cromatográfico de los fructanos del extractos de galleta se observa en la (Fig. 8f) Una típica TLC donde se puede diferenciar cada uno de los carbohidratos.

Donde la glucosa presenta una coloración azul, la sacarosa presenta una coloración café, en cuanto a la fructosa esta presenta una coloración rojiza.

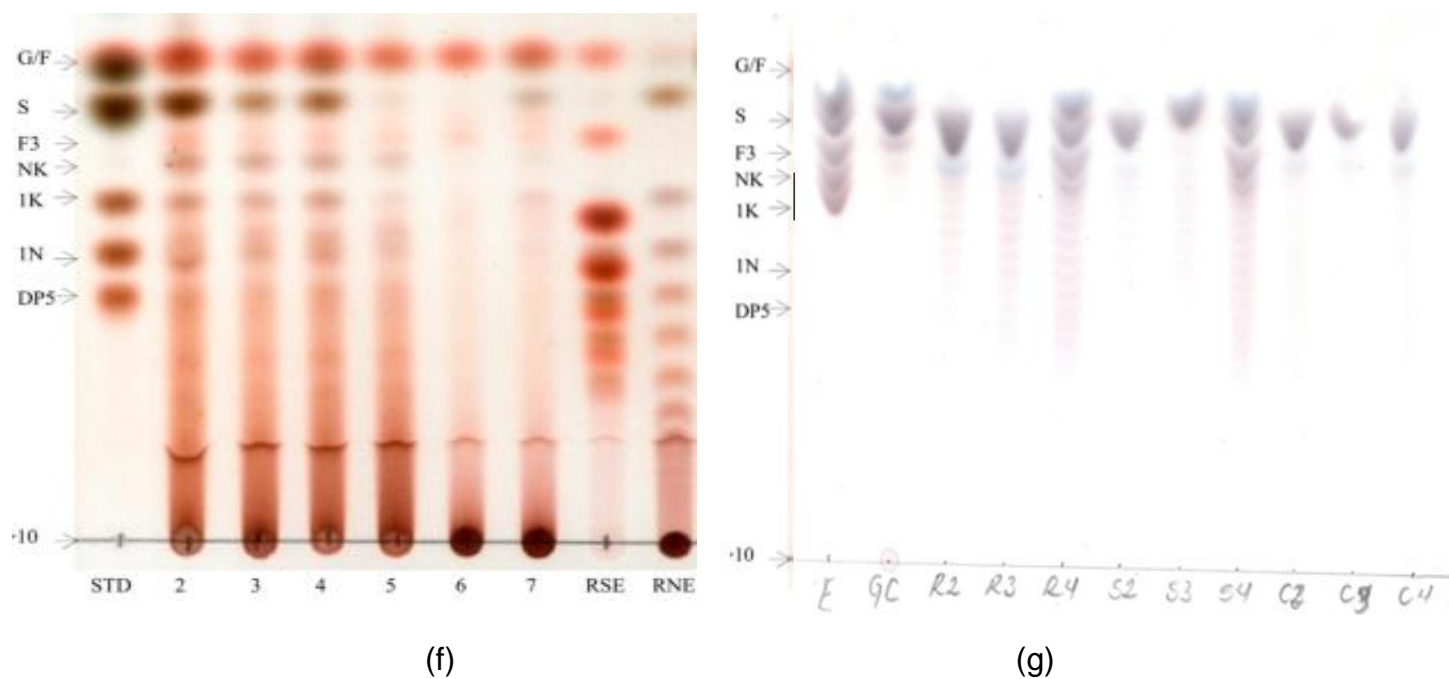


Figura 8. Cromatografía de Capa Fina de agavina e inulina. f.- TLC para determinar el perfil de los fructanos de tipo agavina e inulina se observa con mayor énfasis los DP. **g.** TLC realizado a partir de extracto de galleta donde E (estándar); R2 (rafitline 20%), R3 (rafitline 30%), R4 (rafitline 40%), S2 (rafitlose 20%), S3 (rafitlose 30%), S4 (rafitlose 40%), C2 (*A. tequilana* W. 20%), C3 (*A. tequilana* W. 30%), C4 (*A. tequilana* W. 40%).

Se realizó el perfil de fructanos de los extractos de galletas (Fig. 8g). Donde se pueden apreciar la coloración tanto de la glucosa y las cadenas de fructosa, pero en sacarosa no se puede distinguir esa coloración café, debido a la concentración de otros compuestos.

Se puede indicar que la información obtenida en la caracterización por cromatografía de capa fina (TLC), hace referencia a que los fructanos no sufrieron cambios y ninguna modificación en cuanto a su estructura, durante todo el proceso de elaboración.

Por lo que se pudieron identificar en las mayorías de las muestras (Figura 9) aparte de glucosa y fructosa, los carbohidratos por debajo de la sacarosa es decir manchas que corresponde a $DP \geq 2$ hasta 12 DP, estos son apreciable en las muestras de Raftiline (R3 y R4).

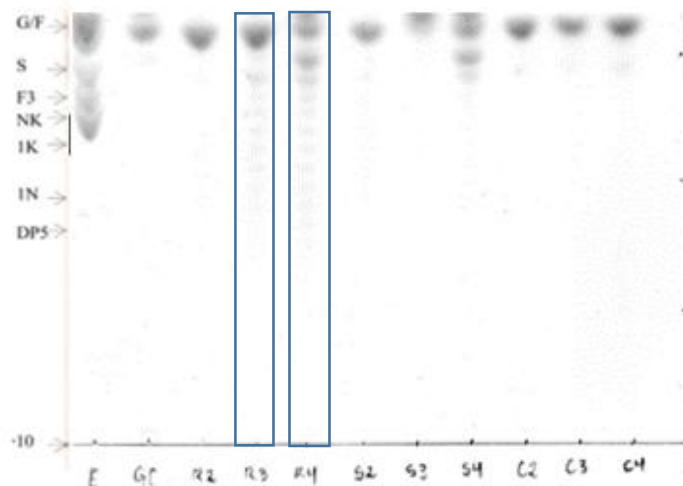


Figura 9. Cromatografía de Capa Fina. TLC del perfil de fructanos de agavina e inulina, donde se empleó una segunda extracción aplicando cloroformo para eliminar parte de la fracción de grasa; donde E (estándar); R2 (raftiline 20%), R3 (raftiline 30%), R4 (raftiline 40%), S2 (raftilose 20%), S3 (raftilose 30%), S4 (raftilose 40%), C2 (*A. tequilana* W. var A. 20%), C3 (*A. tequilana* W. var. A 30%), C4 (*A. tequilana* W. var. A. 40%).

Para el caso de muestras de galletas con fructanos tipo agavina no se puede apreciar, ya que presenta en su estructura, ramificaciones lo que hace difícil la separación en base al grado de polimerización.

Cuantificación del contenido de fructanos en galletas

Se llevó a cabo la cuantificación de fructanos presentes en las galletas, esto se realizó mediante un kit enzimático cuyo principio ya fue mencionado, en el que se pudo estimar a partir de 5 gramos de galleta de cada una de las diferentes muestras un porcentaje estimado del contenido de fructanos que se encuentran en las galletas.

Resultados obtenidos durante la cuantificación hace referencia en la Fig. 10, donde se presentan las diferentes muestras y el porcentaje de fructanos hallado de cada una de ellas.

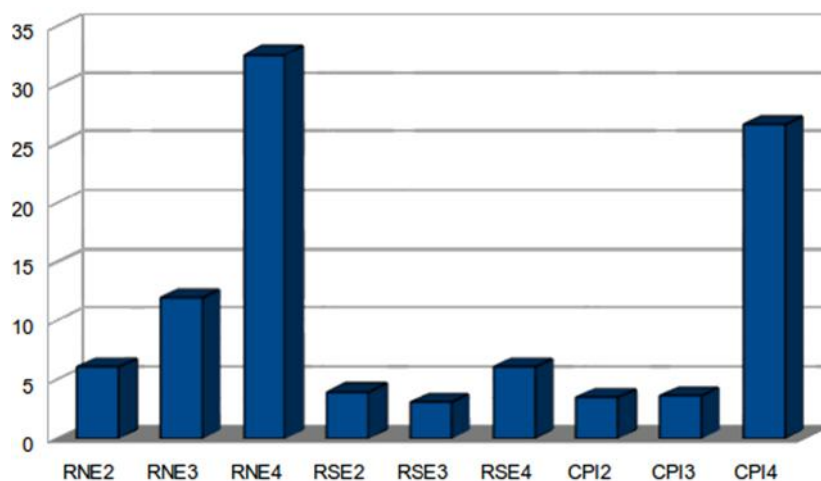


Figura 10. Gráficas de cuantificación del porcentaje de fructanos obtenidos.

Los porcentajes que se hallaron indican que de 5 a 33% se pudo encontrar en galletas de RNE, a diferencia de las galletas con RSE que se encontraron valores de entre 4 a 6%, en cuanto a las galletas que contienen CPI se encontraron porcentajes de entre 4 a 27%.

Se puede observar que los fructanos que se ven en mayor cantidad son aquellos de tipo inulina (RNE) a comparación de los FOS y de tipo agavina (CPI) en sus diferentes porcentajes.

En este ámbito es posible cuantificar fructanos a partir de haber suplementado en un alimento, es decir; después de todo el proceso de elaboración.

CONCLUSIONES

- La masa para galletas es un sistema complejo en el que todos los ingredientes interactúan entre sí haciendo difícil la realización de las masas, ya que la sustitución de sacarosa por fructanos de tipo Inulina proporcionan diferentes aspectos y cualidades después del horneado de las galletas, en cuanto a sabor, textura, olor y color a diferencia de las implementadas con Agavina.
- En el análisis sensorial fue más apreciada la suplementación de inulina, siendo preferida por los panelistas las galletas con raftiline 30% (RNE3), en comparación con las galletas suplementadas con otros fructanos o en diferentes porcentajes.
- Las determinaciones realizadas para el contenido de fructanos después del horneado de las galletas, indicaron la presencia de un porcentaje de estos carbohidratos, por ello que las galletas puedan considerarse un alimento con funciones prebióticas.

BIBLIOGRAFÍA

Cabeza S. (2009). Funcionalidad de las materias primas en la elaboración de galleta. Universidad de Burgos, pp 5-9.

De Luis DA, Aller R, González S.M. (2010). Ensayo clínico aleatorizado con una galleta enriquecida en inulina en el patrón de riesgo cardiovascular de pacientes obesos. *Nutr Hosp.*, 25(1):53-59.

García-Mendoza, A. y Galván, V. R. (1995). Riqueza de las familias Agavácea y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot. México*, 56: 7-24.

Gallagher E, O' Brien CM, Scannell AGM, Arendt EK. (2003). Evaluation of sugar replacers in short dough cookie production. *J Food Eng.* 56: 261–3.

Gibson G.R. & Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-12.

Granados, S. D. (1993). Los Agaves en México. Editorial Universidad Autónoma de Chapingo.

Godoy M. (2010). Análisis químico, Evaluación sensorial y valor proteico de una galleta de harina de trigo (*Triticum aestivum*) y harina de arveja dulce (*Pisum sativum*). Universidad de san carlos., pp 31-37.

Duncan J.R. Manley. (1989). Tecnología de la Industria Galletera: galletas, crackers y otros horneados. Ed: Acribia, S.A. Zaragoza.

Huazano, A. (2009). Estudio in vivo del efecto de los fructanos de *Agave angustifolia* Haw.

Kaur, N.; Guptan, A.K. (2002). Application of inulin and oligofructose en health and nutrition. *J. Biosci.*, 27: 703-714.

KulpK, Lorenz K, Stone M. (1991). Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. *FoodTech.* 45: 136–40.

Liria M. R. (2007). Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos. Agrosalud, Lima, Perú. 4-10.

López, M.G.; Mancilla-Margalli, N.A.; Mendoza-Díaz G. (2003). Molecular structure of Fructan from Agave tequilana Weber var azul. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7835-7840.

López, M.G.; Mancilla-Margalli, N.A. (2006). Caracterización molecular de fructanos de Agave y *Dasyliirion* ssp., identificación de fructosiltransferasas y su expresión en *Pichia pastoris*., 20: 7832-9.

López, M.G. & Urías- Silva, J.E. (2008), Efecto prebiótico de los Fructanos de Agave y *Dasyliirion* y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos en ratones. pp. 17- 32.

López, M.G. & Méndez-Ortiz M. (2005). Aplicación de Inulina como sustituto de Grasa en tortilla de harina de trigo.

Laguna L.; Primo-Martin C. (2013). Inulin and Erythritol as Sucrose Replacers in Short-dough Cookies: Sensory, Fracture, and Acoustic Properties. *J. Food Science.*, 78: 777-778.

Mellado Mojica, E. & López, M.G. (2013) Metabolismo de fructanos de Agave tequilana Weber variedad Azul a lo largo de su ciclo biológico en el campo: Carbohidratos solubles y Glicosilhidrolasas de la familia 32.

Mancilla-Margalli, N.A & López, M.G. (2006). Water soluble carbohydrate and fructane structure patterns from Agave Tequilana Weber var. Azul *J. Agricultural Food Chemistry*, 54: 7832-7839.

Suzuki, M. (1993). History of fructan research: Rose Edelman. En *Science and technology of fructans*; Suzuki, M., Chatterton N.J., Eds. CRC Press, Florida, 21-39.

Vijn I.; Smeekens, S. (1999). Fructan more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, 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.

Waterhouse, A; Chatterton, N.J. (1993). Glossary of fructans terms. En *science and Technology of fructans*. Eds. CRC Press, Florida, 2-7.