

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Extracción y Caracterización de Fructanos de Ajo no diferenciado (*Allium Sativum* L.) y su potencial efecto Prebiótico”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I. A. Francisco Ignacio Carrillo Navarrete

Dirigida por:

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios

Santiago de Querétaro, Qro. Diciembre, 2015

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**“Extracción y Caracterización de Fructanos de Ajo no diferenciado
(*Allium Sativum* L.) y su potencial efecto Prebiótico”**

TESIS

Que como parte para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I. A. Francisco Ignacio Carrillo Navarrete

Dirigido por:

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios

Sinodales

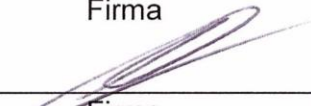
Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios
Presidente


Firma

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Secretario


Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Vocal



Firma

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
Suplente


Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2015

RESUMEN

Durante el desarrollo de la planta de ajo (*Allium sativum* L.) se presentan algunos defectos que afectan la calidad originando bulbos no diferenciados (BND) sin valor comercial que pueden llegar a representar hasta el 50% de pérdidas en la cosecha. La falta de diferenciación está relacionada con la escasa acumulación de horas frío (<550 hrs <5°C) que altera la biosíntesis y polimerización de los fructanos; principal componente del ajo. Estos carbohidratos presentan propiedades que estimulan el desarrollo de bacterias benéficas para la salud humana. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los fructanos de ajos BND (FBND) y evaluar sus propiedades funcionales y su efecto prebiótico en un modelo animal. El perfil de carbohidratos por cromatografía en capa fina, el contenido de azúcares reductores (AR), de fructanos y su grado de polimerización (DP) fueron determinados en muestras liofilizadas de FBND de la cosecha 2013-2014 y comparados con los fructanos de ajo diferenciado (FAD), de cebolla blanca (FCB) e inulina comercial (IC). Además se determinó el índice de absorción de agua (IAA) y la capacidad de absorción de aceite (CAA). En un estudio *in vivo* alimentando ratas sanas Wistar durante 28 días con dieta estándar adicionadas de FBND, FAD, FCB e IC se monitoreó la ingesta de alimento, la ganancia de peso y la talla; al final del experimento las ratas se sacrificaron, se determinó la concentración de triglicéridos (TG) y glucosa (G) en sangre; y la densidad bacteriana de la familia *Lachnospiraceae* en colon mediante qPCR. El contenido de AR de FBND fue de 1.89 ± 0.67 % similar al del FAD (1.44 ± 0.27 %). El contenido de fructanos fue de 96.65 ± 3.15 % en AD similar a IC (97.18 ± 1.78 %); mientras que en la cebolla fue de 22.32 ± 0.67 %, y de 82.33 ± 1.89 % en BND. El DP varió considerablemente para FCB (2), FBND (8), FAD (13) e IC (23). Los FBND absorbieron más del doble de su peso en agua (IAA= 2.42 ± 0.20 g/g), y la CAA fue similar en FAD y FBND (2.50 ± 0.07 y 2.54 ± 0.015 g/g, respectivamente). El estudio *in vivo* indicó que los animales con los diferentes tratamientos tuvieron una talla similar (20.77 ± 1.03 cm) sin embargo los que consumieron IC, FAD y FBND presentaron menor peso (138.89 ± 1.92 g, 146.66 ± 6.67 g, 136.67 ± 9.62 g, respectivamente) y bajos niveles de G (59.97 ± 3.21 mg/dL, 63.45 ± 4.16 mg/dL, 66.23 ± 3.05 mg/dL) y de TG (52.38 ± 7.41 mg/dL, 62.59 ± 11.91 mg/dL, 60.31 ± 7.75 mg/dL) respecto del grupo control (peso= 190.00 ± 8.82 g; G= 77.33 ± 4.31 mg/dL y TG= 128.85 ± 24.82 mg/dL). Los resultados del qPCR demostraron que el consumo de FBND y de FAD indujeron un mayor desarrollo de la bacteria *Lachnospira* en la microbiota del colon (78.97 ± 16.18 ngADN / μ L 108.22 ± 17.39 ngADN / μ L respectivamente). Los FBND pueden considerarse como una materia prima de gran potencial en la industria de alimentos por su alto IAA y CAA; además de estimular el desarrollo de bacterias de la familia *Lachnospiraceae*.

Palabras Clave: ajo, fructanos, prebióticos, qPCR, *Lachnospiraceae*.

ABSTRACT

During garlic (*Allium sativum* L.) plant development there are defects that affect bulb quality, originating non-differentiated garlic bulbs (NDB) without commercial value and represent up to 50% of harvest losses. The lack of differentiation is related to the limited cold hours accumulation (<550 hrs <5°C) that disrupts fructan biosynthesis and polymerization; fructans are the main garlic components. These carbohydrates present properties that stimulate bacteria beneficial to human health. The objective of this work was to characterize fructans from garlics NDB (FNDB) and evaluate its functional and the prebiotic effect on an animal model. Carbohydrate profile through thin layer chromatography (TLC), reducing sugars content (RS), fructan content and degree polymerization (DP) were determined in lyophilized samples of FNDB garlic 2013-2014 harvest and compared with fructans from differentiated garlic (FDG), white onion (FWO) and commercial inulin (CI). Also functional properties were determined such as Water absorption index (WAI) and Oil absorption capacity (OAC). An *in vivo* study was carried out for 28 days on healthy Wistar rats, feeding them with a standard diet added with FNDB, FDG, FWO and CI; food intake, body weight gain and size were tracked. At the end of the experiment rats were sacrificed, blood samples were obtained to determine glucose (G) and triglycerides (TG) concentration; and the colon was processed to extract DNA from intestinal microbiota whose was used to determine *Lachnospira* bacterium density by qPCR. FNDB present 1.89±0.67 % RS content, similar to FDG content (1.44±0.27 %). The AR content of FNDB was 1.89±0.67 % similar to FDG (1.44±0.27 %). Fructan content from FDG was 96.65±3.15 similar to CI (97.18±1.78 %); FWO present 22.32±0.67 % while FNDB have 82.33±1.89 %. DP varied considerably between FWO (2), FNDG (8), FDG (13) and CI (23). FNDB can absorb more than the double of its weight in water (2.42±0.20 g/g) and OAC was high and similar between FDG and FNDB (2.54±0.15 and 2.50±0.07 g/g, respectively). The *in vivo* study showed that animals with different treatments have similar size (20.77±1.03 cm), however animals who consumed CI, FDG and FNDB presented lower body weight (138.89±1.92g ,146.66±6.67g, 136.67±9.62g, respectively), and low levels of G (59.97±3.21 mg/dL, 63.45±4.16 mg/dL, 66.23±3.05 mg/dL) and TG concentration (52.38±7.41 mg/dL, 62.59±11.91 mg/dL,60.31±7.75 mg/dL) with respect to control group (weight=190.00±8.82 g; G=77.33±4.31 mg/dL; TG=128.85±24.82 mg/dL). Results from qPCR showed that the consumption of FNDB and FDG induced a higher development of *Lachnospira* bacteria from colon microbiota (78.97±16.18 ngADN /µL 108.22±17.39 ngADN /µL respectively). FNDB can be used as a great potential raw material in the food industry for its high WAI and OAC, also to stimulate the development of *Lachnospiraceae* bacteria family.

Key Words: Garlic, fructans, prebiotics, qPCR, *Lachnospiraceae*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios (to the big boss) por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y por haberme puesto en mí camino a todas las personas que me apoyaron durante la maestría, gracias por la aventura.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a PROMEP por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A mi familia; mamá, papá, Daniel, gracias por su apoyo incondicional y alentarme, aprecio mucho sus consejos, abrazos y palabras de apoyo.

A mi tía Adriana y a mi tío Don, gracias por su apoyo y sus llamadas, gracias por estar conmigo siempre en espíritu.

A mi abuelita, gracias por preocuparte por mí siempre.

A mi asesora de tesis; Dra. Estela, gracias por creer en mí y darme la oportunidad de realizar una de mis metas.

Al Dr. Mercado y a la Dra. Dulce por permitirme estar en su grupo de trabajo.

A mi segunda familia queretana, Omar y Mayra, de todo corazón gracias por su amistad y estar conmigo, gracias por las risas y la confianza, no pude elegir amigos mejores.

A mis compañeros de generación, Adriana gracias por las pláticas, Angel, gracias por los buenos momentos, Paty gracias por ser apoyo en el laboratorio; Julio gracias por hacerme reír. Juan Carlos, Ivanna, Mary, Wendy, Ali, Ricardo, Nataly, Edeli, Javier, Josué, Cesar, gracias a todos!!!

A todos los del laboratorio por la convivencia, Ana, Rossana y Luis, fue un gusto haber estado en el mismo lugar de trabajo y fue muy divertido, Jimena, gracias por tu amistad y consejos!!!, Dalia y David gracias por sus conocimientos. Gina, Fany, Celene y Kary gracias por su apoyo!!! Teresita gracias por los favores y las pláticas. Paz eres genial gracias por tu amistad. Ro, gracias por hacerme reír cuando lo necesitaba.

A la Dra. Rosalía y su grupo de trabajo, gracias por prestarme las instalaciones del bioterio y permitir gran parte del desarrollo de este trabajo, Mareli, Sarahi, Diana, gracias por su paciencia y apoyo con el estudio in vivo.

Al Dr. Nava y sus grupo de trabajo gracias por permitirme trabajar con ustedes.

A Beto, gracias por tus conocimiento y ayudarme a montar las técnicas de PCR, y permitirme estar en su laboratorio.

A los chicos de servicio, Clau, Armando, Emmanuel, gracias por su ayuda.

A todo el personal administrativo, gracias por su trabajo y permitirme estar aquí.

A Christian gracias por todo tu apoyo y por estar conmigo en esta etapa de mi vida, realmente lo aprecio mucho.

A mis Amigos, Pao, Elsy, Mony, Angel, Marina, Jaime, Itzvan, Benjamín y Sergio, gracias por sacarme de la rutina y convivir conmigo.

GRACIAS A TODOS!!!

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, Bajo la dirección de la Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Origen del ajo.....	3
2.2. Producción mundial y nacional del ajo	4
2.3. Composición química del ajo	6
2.4. Variedades del ajo	7
2.5. Morfología del ajo	8
2.6. Propagación del ajo	10
2.7. Factores ambientales involucrados en la formación del bulbo	12
2.8. Desordenes fisiológicos en la formación del bulbo: “acebollado y rebrote”	14
2.9. Fructanos de ajo	17
2.9.1. Biosíntesis de fructanos.....	19
2.9.2. Propiedades funcionales de los fructanos (oligofruetosacáridos)	25
2.9.3. Propiedad prebiótica	26
2.10. Familia <i>Lachnospiraceae</i>	27
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo general.....	30
5.2. Objetivos particulares.....	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Material biológico y manejo previo a los experimentos	31
6.2. Estrategia experimental	32
6.3. ETAPA 1:	33
6.3.1. Extracción de fructanos.....	33

6.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	33
6.3.3. Determinación de azúcares reductores y de sacarosa	34
6.3.4. Cuantificación de fructanos.....	35
6.3.5. Determinación del grado de polimerización	38
6.3.6. Índice de absorción de agua (IAA).....	40
6.3.7. Capacidad de absorción de aceite (CAA)	40
6.4. ETAPA 2:	41
6.4.1. Evaluación in vivo del efecto prebiótico de los fructanos	41
6.4.2. Determinación de la ganancia de peso	43
6.4.3. Monitoreo de la ingesta de alimento	43
6.4.4. Determinación de talla	43
6.4.5. Determinación de glucosa.....	44
6.4.6. Determinación de triglicéridos.....	44
6.4.4. Extracción de ADN.....	46
6.4.5. Determinación de la densidad microbiana de la familia <i>Lachnospiraceae</i> mediante tecnología PCR y qPCR.....	48
6.5. Diseño y análisis estadístico	49
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
7.1. ETAPA 1:	50
7.1.1. Extracción de Fructanos	50
7.1.2 Cromatografía en capa fina (TLC)	53
7.1.3 Determinación de azúcares reductores y de sacarosa	55
7.1.4. Cuantificación de fructanos.....	56
7.1.5. Grado de polimerización (DP).....	58
7.1.6. Índice de absorción de agua (IAA).....	59
7.1.7 Capacidad de absorción de aceite (CAA)	61
7.2. ETAPA 2:	63
7.2.1. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto prebiótico de los fructanos	63
7.2.2 Determinación de la ganancia de peso	63
7.2.3. Monitoreo de la ingesta de alimento	66
7.2.4. Determinación de talla	68

7.2.5. Determinación de glucosa.....	70
7.2.6. Determinación de triglicéridos.....	71
7.2.7. Determinación de la densidad microbiana de la familia <i>Lachnospira</i> mediante tecnología PCR y qPCR	72
VII. CONCLUSIONES	79
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	80
VIII. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Grupos del género <i>Allium</i> de los cultivos más importantes	3
2	Producción Mundial de Ajo	4
3	Producción Nacional de Ajo	5
4	Composición Nutrimental del Ajo Fresco	6
5	Agrupación de cultivares por aspectos agronómicos	13
6	Grupos experimentales y tratamientos administrados a ratas Wistar	41
7	Rendimiento en la extracción de fructanos de ajo diferenciado	50
8	Porcentaje de rendimiento en la extracción de fructanos	51
9	Perfil de carbohidratos	57
10	Índice de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite	60
11	Composición nutrimental del alimento para rata	63
12	Ganancia de peso de los grupos experimentales	65
13	Ingesta de alimentos de los grupos experimentales	67
14	Comparación de peso y talla de los grupos experimentales	68
15	Niveles de Glucosa y Triglicéridos de los grupos experimentales	72
16	Concentraciones de las diluciones utilizadas para curva de qPCR	75
17	Concentración de ADN de <i>Lachnospiraceae</i> en los tratamientos	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Reacción química de la Alicina	7
2 Estructura de la planta de ajo	9
3 Bulbo de ajo	9
4 Etapas del crecimiento de la planta del ajo	10
5 Defectos presentes en el ajo	14
6 Comparación visual de plantas de ajo	17
7 Estructura y enlaces de moléculas de fructano	19
8 Representación esquemática del metabolismo de carbohidratos en plantas Van Arkel et al., 2013	20
9 Esquematización de la biosíntesis de fructanos	21
10 Ruta Metabólica de la biosíntesis de fructanos	22
11 Estructura sugerida para el fructano de Ajo	23
12 Promedio de DP de fructanos de ajo medido durante su ciclo de cultivo (Baumgartner et. al. 2000)	24
13 Comparación de la diversidad microbiana en la zona digestiva (Digesta) y de pliegues (Interfold) del intestino. (Nava et. al., 2011).	28
14 Estrategia experimental	32
15 Diagrama para la estimación del DP	38
16 Esquema general de trabajo de los experimentos in vivo	42
17 Esquema general de extracción de fructanos	51
18 Diferencia morfológica de bulbos de ajo no diferenciado (izquierda) y de ajo diferenciado (derecha) en la cosecha 2013-2014	52
19 Cromatografía en Capa Fina de los fructanos de bulbos no diferenciados (FBND), de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB) e inulina comercial (IC) con estándares de Glucosa (Gluc), Fructosa (Fru), Sacarosa (Suc) y Kestosa (Kes)	54

20	Gráfica de perfil de Carbohidratos en muestras de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB), ajo no diferenciado (FBND) e inulina comercial (IC). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey	56
21	Gráfica de grado de polimerización de muestras de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB), ajo no diferenciado (FBND) e inulina comercial (IC). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey	59
22	Geles de fructanos de FBND retenidos en tubos en posición invertida después de 24 hrs de reposo derivados del índice de absorción de agua (IAA) y capacidad de absorción de aceite (CAA)	61
23	Gráfica de la ganancia de peso de los grupos experimentales de ratas con diferentes tratamientos, fructano de ajo diferenciado (FAD), fructano de cebolla blanca (FCB), fructano de ajo no diferenciado (FBND), inulina comercial (IC) y control sin fructanos (CSF)	64
24	Gráfica Ingesta de alimento con diferentes tratamientos, fructanos de ajo diferenciado (FAD), fructanos de cebolla blanca (FCB), fructanos de ajo no diferenciado (FBND), inulina comercial (IC) y control sin fructanos (CSF)	66
25	Gráfica de Comparación de peso y talla, en grupo experimentales; FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey. Lonh=longitud, Circ=circunferencia	69
26	Gráfica niveles de glucosa en sangre en grupos FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey	70
27	Gráfica niveles de triglicéridos en sangre en grupos FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey	71

28	Gel de integridad de ADN y concentraciones de ADN de algunas muestras. H= hisopo (hisopado del colon)	73
29	Resultados de PCR punto final para bacterias de la familia Lachnospiraceae. . H= hisopo (hisopado del colon), C+= (control positivo), C-= (control negativo).	74
30	Curva de calibración de qPCR para el cálculo de la concentración de la familia bacteriana Lachnospiraceae en el colon de ratas sanas macho Wistar	75
31	Gráfica de concentración de ADN de Lachnospira amplificada mediante qPCR en muestras de FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por la prueba de Tukey	76

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie monocotiledónea de la familia *Allium* y su origen se reporta en las regiones de Asia Central. El cultivo de ajo se propaga a través de los bulbillos (dientes), que funcionan como órganos de reproducción vegetativa.

De acuerdo con registros publicados por la FAO en 2013, México se colocó en el 4to lugar de producción en Latinoamérica y el 21° lugar en producción de ajo con 58,065 ton, mientras que China ocupó el primer lugar con 20,082,000 ton. A pesar de esta situación, el ajo cultivado en México es apreciado en el mercado internacional ya que es un producto que goza de alta calidad. Las principales características que definen la calidad de los bulbos son su tamaño, su forma regular, firmeza y la ausencia de defectos.

Al tratarse de un bulbo; los días fríos y fotoperiodos cortos durante las primeras etapas del desarrollo, seguidos de días con mayores temperaturas y mayores fotoperiodos determinan el proceso de bulbificación y diferenciación de la nueva planta.

En la cosecha 2011-2012 los productores de la región de Rincón de Romos, Aguascalientes registraron pérdidas desde 30 a 50% en la producción total debido bulbos defectuosos; en particular rebrotados y bulbos que no desarrollaron dientes dando una apariencia al corte transversal, como bulbos de cebolla, estos últimos carecen de valor comercial en el mercado. Este fenómeno es causado probablemente por las condiciones climatológicas no favorables para el propio desarrollo del ajo, ya que en ese periodo solo se alcanzaron 370 de las 550 horas abajo a 5°C que requieren para que se presente una adecuada bulbificación y diferenciación de la planta de ajo.

Durante la etapa del desarrollo del bulbo se ha reportado que existe un incremento en el contenido de carbohidratos y en particular el de fructanos. Este contenido disminuye cerca de la época de cosecha y es en este periodo donde se

presentan los desórdenes fisiológicos como el “acebollado”. No existen reportes de investigaciones previas que hayan estudiado este fenómeno; sin embargo se propone que esté relacionado con el metabolismo de los fructanos.

A los fructanos se les ha asociado una serie de funciones benéficas a la salud, dentro de las cuales destaca su efecto prebiótico; es decir que estimula el desarrollo y la actividad de bacterias benéficas, principalmente *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*. Reportes recientes discuten a cerca de las bacterias de la familia *Lachnospiraceae*, que al ser bacterias que se encuentran en la zona de pliegues del intestino del colon, podría haber un mayor efecto benéfico a la salud.

Por otro lado los fructanos son polisacáridos de fructosa similares a la inulina. Las propiedades funcionales de la inulina son importantes, ya que proporcionan información para determinar el nivel en que se puede usar como ingrediente en la formulación y en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. La capacidad para absorber aceite (CAA) y el índice de absorción de aceite (IAA) son dos de las propiedades funcionales de gran importancia en la tecnología de alimentos para productos congelados pre-cocidos listos para freír, en galletas y en algunos alimentos a base de cereales, además pueden mejorar el sabor y la textura de los alimentos funcionales para la industria de alimentos

Es por esto que resulta relevante explorar las alternativas que puedan presentar los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado que como tal no tienen valor comercial, pero pueden presentar propiedades fisiológicas en la alimentación humana así como componente funcional para la industria de los alimentos.

II. ANTECEDENTES

2.1. Origen del ajo

El Ajo (*Allium sativum* L.) es una planta monocotiledónea de hoja perenne originaria de Asia central y extendida por todo el mundo. El botánico Hanlet (1990) dividió el género *Allium* en cinco subgéneros, dos de los cuales contienen las especies comercialmente más importantes; la cebolla y el ajo. La tabla 1 muestra las especies que conforman el subgénero *Allium* y su nombre común.

Tabla 1. Grupos del género *Allium* de los cultivos más importantes.

Subgénero	Sección	Especies	Nombre Común
Rhizirideum	Rhizirideum	<i>A. tuberosum</i>	Cebollino chino
	Schoenoprasum	<i>A. schoenoprasum</i>	Cebollín
	Cepa	<i>A. cepa</i>	Cebolla de bulbo
		<i>A. fistulosum</i>	Cebolla de rama
Allium	Allium	<i>A. chinense</i>	Rakkyo
		<i>A. sativum</i>	Ajo
		<i>A. ampeloprasum</i>	Puerro

Fuente: Hanlet, 1990.

En los últimos años esta hortaliza ha tomado mucha importancia y difusión, sobre todo por sus propiedades medicinales ya que ha sido usada como medio preventivo y curativo en distintas enfermedades. En medicina popular se ha usado como calmante, para tratar afecciones bronquiales y estomacales, también se le ha atribuido poder antipirético, para el tratamiento de la arterioesclerosis y últimamente en tratamiento como la diabetes, entre otras de sus propiedades (Villalobos *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Chandrashekar y Venkatesh, 2012).

2.2. Producción mundial y nacional del ajo

A nivel mundial la cosecha anual del ajo supera el millón de hectáreas por año, de las que se reportó una producción de 25 millones de toneladas en el año 2013 (FAO, 2013). El continente asiático fue el de mayor importancia con una producción de 85.6%, siendo China el que ocupó el primer lugar con una producción con más de 20 millones toneladas de ajo; seguida por India y Corea ocupando el segundo y tercer lugar respectivamente. El continente Europeo representado principalmente por Rusia y España, ocuparon un 11.1% de la superficie cosechada y un 6.4% de la producción mundial. Aunque Brasil, Argentina y Perú son los primeros productores de ajo en Latinoamérica; México, en el cuarto lugar de producción en Latinoamérica y el número 22 a nivel mundial, reportó una producción mayor a 54 mil toneladas de ajo (FAO, 2013). La siguiente Tabla 2 muestra la producción mundial del ajo para el año 2013.

Tabla 2. Producción Mundial de Ajo 2013

Producción (ton)	Países	Producción (ton)	Países
20,082,000.00	China	107,009.00	Brasil
1,150,000.00	India	82,129.00	Perú
339,113.00	Corea	82,000.00	Taiwan
309,155.00	Egipto	77,738.00	Turquía
239,312.00	Rusia	77,648.00	Argelia
233,609.00	Bangladesh	77,000.00	Tailandia
222,548.00	Etiopía	62,000.00	Uzbekistán
213,000.00	Myanmar	59,368.00	Rumania
195,910.00	Estados Unidos	58,000.00	Pakistán
171,400.00	Ucrania	54,015.00	México
151,900.00	España	40,630.00	Nepal
135,000.00	Argentina	37,105.00	Kyrgistán

Fuente: FAO, 2013.

México ha sido uno de los principales países productores de ajo en el mundo, reconocido principalmente por su excelente calidad. Se ha reportado que el consumo per cápita anual de ajo fresco es alrededor de 400 gr. Por otro lado se considera que alrededor de un 10% de la producción nacional se destina para uso industrial; especialmente para la producción de aceite, polvos, medicamentos, entre otros; un

63% se consume en estado fresco y el 27% restante es exportado principalmente a los Estados Unidos. En la República Mexicana los estados productores más importantes son: Zacatecas, Guanajuato, Baja California, Sonora y Aguascalientes (Tabla 3). Siendo este último su área principal de siembra localizada en la región del norte del estado, colindando con la región sur de Zacatecas, los cuales forman una zona productora compacta con características ecológicas apropiadas para el cultivo del ajo; su altitud de encuentra aproximadamente a 2100 msnm, en la mayor parte de la región se presenta un clima templado seco con temperaturas altas (mayor a 30 °C) que se presentan en los meses de mayo y junio y temperaturas bajas (menor a 5 °C) en los meses de diciembre y enero. Las lluvias son escasas y se presentan durante el verano (SIAP, 2014). La precipitación total anual es de 526 mm, por lo que la práctica agrícola requiere de riego Este producto hortícola registra el primer lugar en relación a la superficie sembrada dentro de las hortalizas de invierno, en donde se obtiene un rendimiento promedio que fluctúa entre 8.5 y 9 ton/ha para ajos blancos y de 6ton/ha para ajos morados. Su importancia económica está basada en el alto valor de la producción que se obtiene y su importancia social se fundamenta en la mano de obra que genera, ya que se utilizan 140 jornales por ciclo por hectárea, lo cual genera empleo en el medio rural (Macías, 2009).

Tabla 3. Producción Nacional de Ajo 2014

Estado	Sup. Sembrada (Ha)	Producción (Ton)	PMR (\$/Ton)	Producción (MDP)
Aguascalientes	301.00	301.00	10,147.20	36,898.26
Baja California	529.50	399.50	29,854.21	165,748.78
Guanajuato	823.00	823.00	13,738.63	100,745.35
Guerrero	143.00	143.00	14,598.10	12,291.60
Nuevo León	180.00	180.00	14,995.15	23,205.00
Oaxaca	168.75	168.75	20,003.69	21,030.37
Puebla	365.00	363.00	12,004.37	26,115.50
Querétaro	90.00	90.00	9,253.39	6,690.20
Sonora	589.50	589.50	18,015.79	72,798.38
Zacatecas	1960.00	1948.00	7,987.37	198,247.25

Fuente: SAGARPA, 2014.

2.3. Composición química del ajo

La composición química del bulbo de ajo se resume en la Tabla 4 y aunque muchos factores como: el cultivar o variedad, prácticas agronómicas, clima, fertilidad del suelo y las condiciones de almacenamiento pueden modificarla; el ajo destaca por contener concentraciones importantes de sales minerales, azufre y potasio, y vitaminas de las cuales destaca la vitamina C. (Santosha *et al.*, 2013).

Tabla 4. Composición Nutricional del Ajo Fresco

Cantidad por 100g	
Agua	63.80%
Calorías	134kcal
Proteínas	5.30g
Lípidos	0.2g
Ac. Graso Saturado	0.09g
Ac. Graso Poliinsaturado	0.23g
Ac. Graso Monoinsaturado	0.01g
Colesterol	0.0mg
Carbohidratos	33.06g
Fibra total	2.1g
Cenizas	1.40g
Calcio	38mg
Hierro	1.40mg
Sodio	19mg
Potasio	529mg
Zinc	1.0mg
Vitamina A	9IU
Vitamina C	31.2mg
Vitamina B6	1.2mg
Tiamina	0.21mg

Fuente: USDA, 2013.

Después del agua, el componente principal del ajo son los carbohidratos los cuales representan más del 30% en base húmeda. Estos carbohidratos son principalmente fructanos y representan más de 80% de la materia seca del ajo. (USDA, 2013; Lorenzo- Manzanares, 2015).

Por sus compuestos azufrados, el ajo tiene aplicaciones farmacéuticas y es un excelente saborizante natural con un amplio uso gastronómico (Corradini *et al.*, 2012). La alina es un compuesto inodoro y estable, es el compuesto de azufre más abundante en el ajo fresco. Cuando las células del tejido celular se rompen, la alina entra en contacto con la enzima alinasa y se forma la alicina que es el compuesto que genera el aroma característico del ajo fresco Figura 1 (Laewson, 2005).

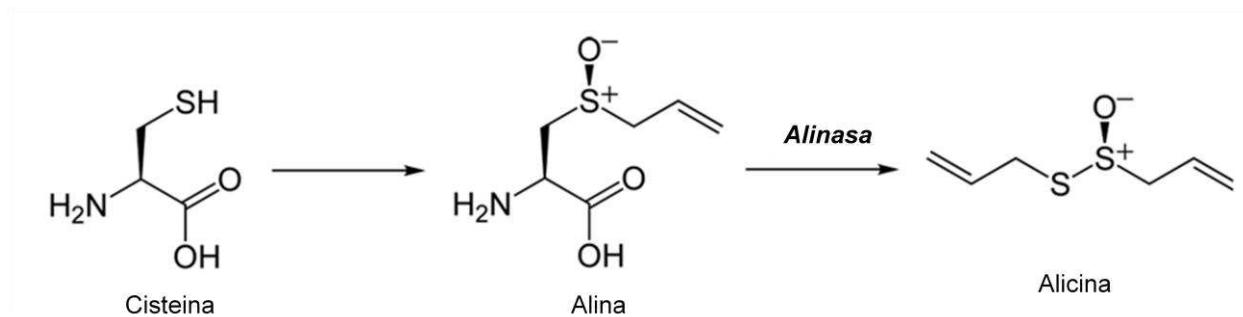


Figura 1. Reacción química de la Alicina.

2.4. Variedades del ajo

A nivel práctico Burba (1994) clasificó a los ajos en cuatro grupos comerciales según sus requerimientos agronómicos.

El grupo I, los ajos violetas, son bulbos de ajo medianos a grandes (calibre >10), son compactos, con túnicas de color violeta o púrpura, eventualmente con tintes violáceos, presentan entre 8 y 14 bulbillos o “dientes”, se caracterizan por ser de cosecha temprana o semi temprana y en general tienen buena capacidad de conservación. Presentan un corto periodo de letargo y ciclo de crecimiento, con bajos requerimientos de frío y de fotoperiodo prolongado.

El grupo II, son ajos rosados, con bulbos de ajos medianos a chicos (calibres 8 - 10), globosos a globosos compactos, con pocos bulbillos o “dientes” (entre 5 y 8), los colores que presentan en la túnicas son rosados, violáceos o parduscos. Estos bulbos requieren menos frío y presentan moderada necesidad de un fotoperiodo largo.

El grupo III, los ajos blancos, son bulbos de ajos grandes (calibres 11-12), de color blanco en su totalidad, con mediana cantidad de dientes y se caracterizan por ser de cosecha temprana; tienen un periodo de letargo medio y un ciclo de crecimiento medio-largo, con requerimientos de frío medianos a altos y fotoperiodo largo.

Por último el grupo IV, son bulbos de ajos chicos (calibre <10), con tintes morados y rojos en sus túnicas exteriores, se caracterizan por tener los cuellos duros y poseer pocos bulbillos o “dientes”; son bulbos de cosecha prolongada; es decir, presentan letargo largo con altos requerimientos de frío y fotoperiodo largo.

2.5. Morfología del ajo

El ajo es una planta bianual, es decir su ciclo de vida dura dos años (García, 1998). Debido a que el ajo es una especie que se reproduce vegetativamente, se debe de tener especial cuidado al seleccionar los dientes o “semillas” ya que se usarán para propagar el cultivo; el tamaño de bulbo y en particular del diente influye directamente sobre el rendimiento y la calidad de la cosecha del siguiente ciclo. Por lo tanto, al momento de cosechar, se deben elegir los bulbos que tengan la mejor forma, un buen tamaño (dependiendo de la variedad) y que estén sanos. Si se eligen bulbos pequeños, deformes se reducirá notablemente el rendimiento. (Burba, 1994).

La estructura de la planta y del bulbo de ajo se detalla en la Figura 2 y 3. De acuerdo con Purseglove (1985), el ajo es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura, de raíces adventicias superficiales, con bulbos compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas delgadas y secas que conforman la base de las hojas fotosintéticamente activas y bulbillos segmentados o “dientes” formados de las yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes. Las hojas funcionales son aplanadas, solidas, con 2.5 cm o menos de ancho, plegadas en forma longitudinal; estas varían en número pero generalmente son menos de 10. Al final del desarrollo de la planta algunas de ellas presentan escapo floral el cual es redondo, sólido y enrollado, y en

algunas ocasiones puede producirse pequeños bulbillos en la inflorescencia, las flores varían en número y muy rara vez producen semillas.

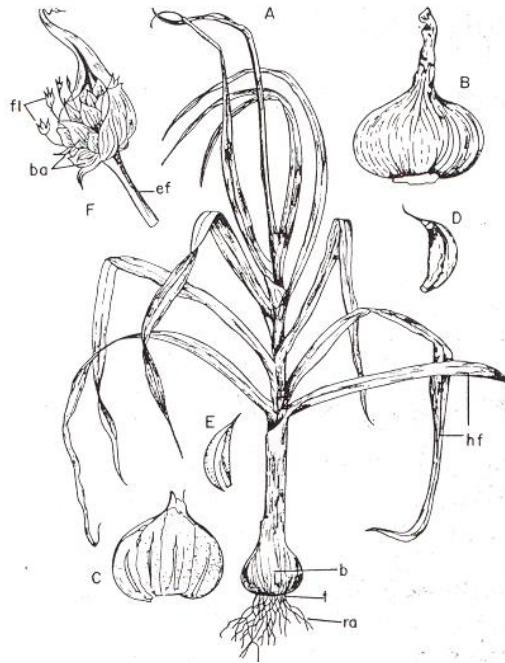


Figura 2. Estructura de la planta de ajo

(a) planta joven de ajo que muestra raíces adventicias (ra), tallo (t), bulbo (b) y hojas funcionarias (hf), (B) bulbo, (C) sección longitudinal del bulbo, (D) bulbillo o diente, (E). Sección longitudinal del bulbillo, (F) inflorescencia, escapo floral (ef), bulbillos aéreos (ha) y flores (fl). Fuente: Pursglove, 1985.

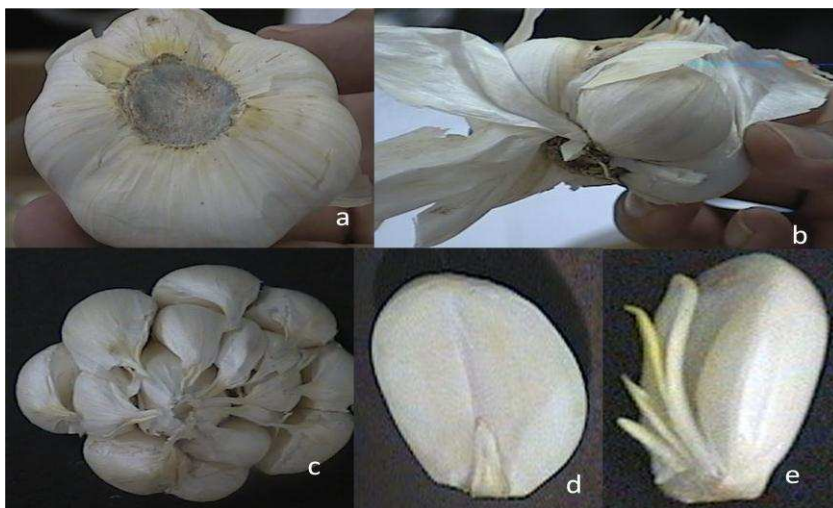


Figura 3. Bulbo de ajo

Tallo discoidal (a), hojas escamosas secas y delgadas (b), bulbillos o dientes formados (c), diente mostrando la hoja de brotación (d) y diente de ajo mostrando las yemas axilares de las hojas funcionales (e) (Mann, 1952; Hanelt, 1990).

2.6. Propagación del ajo

El ciclo de crecimiento del ajo está dividido principalmente por cinco etapas: brotación del bulbillo o diente, crecimiento vegetativo inicial, crecimiento vegetativo rápido, desarrollo del bulbo o “bulbificación” y diferenciación (Rahim y Fordham, 1988; Portela y Cavagnaro, 2005). La Figura 4 esquematiza el ciclo de desarrollo de la planta de ajo.

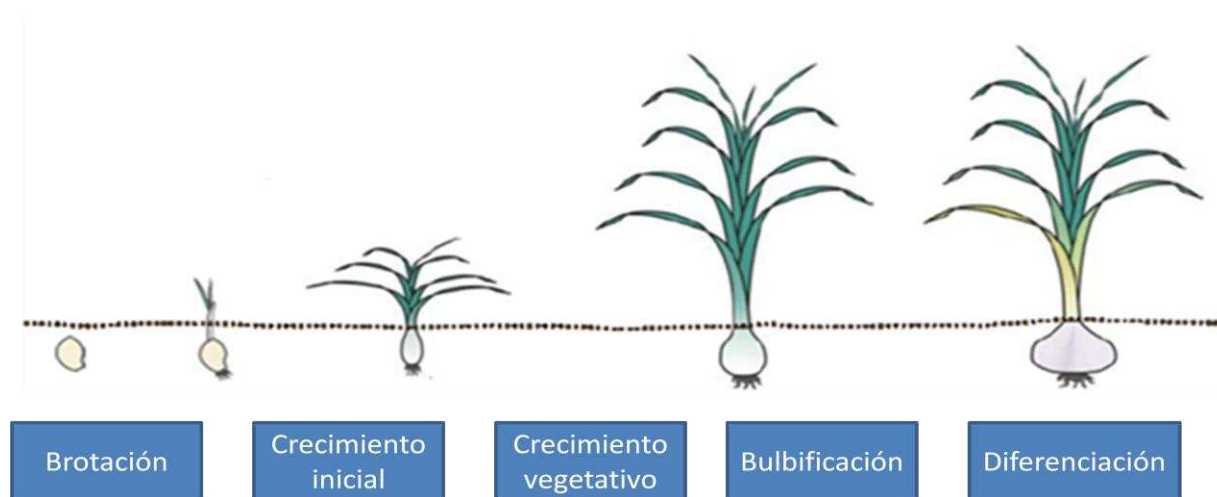


Figura 4. Etapas del crecimiento de la planta del ajo.
(Portela y Cavagnaro, 2005)

La primera etapa es la brotación; la cual comprende desde la plantación del diente de ajo hasta la emergencia de la hoja de brotación sobre el suelo. Este tiempo abarca un periodo que depende de la variedad o cultivar; sin embargo toma aproximadamente 30 días después de la siembra (DS). El inicio del crecimiento vegetativo dura aproximadamente 80 DS; el crecimiento vegetativo termina a los 145 DS para dar paso a la bulbificación hasta los 180 DS y finalmente a la diferenciación del nuevo bulbo lo cual se logra aproximadamente en (206 DS).

Durante su ciclo, en la etapa de crecimiento vegetativo inicial, los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta están orientados a formar el sistema radicular y las hojas. En ese periodo no hay desarrollo del bulbo ni del escapo floral. La emisión y

alargamiento de las raíces desde la base del diente es una de las primeras manifestaciones del crecimiento luego de la plantación. Esta etapa depende de las sustancias liberadas por la hoja de reserva de bulbillo o diente. Si las temperaturas mínimas son muy bajas y constantes, puede acortarse el periodo de esta etapa. En trabajos realizados en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de la UAQ se han demostrado que el almacenamiento a bajas temperaturas (menor a 5°C) reduce el tiempo necesario para que esta etapa se complete (López-Hernández, 2010; Dufoo *et al.*, 2015).

La tercera etapa denominada crecimiento vegetativo rápido está caracterizada por el crecimiento de las hojas aéreas, también tiene lugar la etapa del inicio de las yemas laterales la cual finalmente inducirá a la diferenciación del bulbo. La etapa de crecimiento vegetativo está relacionada con temperaturas en descenso. Si durante el desarrollo vegetativo de la planta del ajo no completa las horas frío necesarias a temperaturas menores de 5°C, la planta no formará adecuadamente un bulbo (Saluzzo *et al.*, 2009).

Para poder alcanzar la etapa de bulbificación, el ajo requiere de la combinación de bajas temperaturas seguidas de días largos. El bulbo se forma a partir del estímulo del foto-periodo atravesando dos etapas. En la primera, llamada etapa “inductiva”, el frío y los días largos son los factores determinantes del inicio del proceso, en tanto que en la segunda etapa, llamada “morfogénica”, las temperaturas en ascenso y el alargamiento de los días son capaces de modificar tan solo la velocidad del proceso. (Portela, 1996).

Por último, la etapa de diferenciación abarca desde la senescencia hasta la muerte de las hojas aéreas de la planta, que marca el final del ciclo y el inicio del estado del letargo del nuevo bulbo; en este periodo la planta se encuentra lista para ser cosechada. En esta etapa el ritmo de expansión del bulbo disminuye, aumentando el tamaño de los dientes; las hojas concéntricas se adelgazan para dar lugar a las túnicas que servirán de protección a los nuevos dientes. Cada diente está cubierto por una túnica; en ocasiones un conjunto de dientes quedan envueltos en otra túnica y

finalmente el bulbo completo quedará envuelto en alrededor de 6 túnicas. Este hecho es de suma importancia a nivel comercial ya que los bulbos deben estar totalmente cubiertos para ser considerados de primera calidad; los bulbos con dientes expuestos pasaran a ser de segunda calidad y por lo tanto de menor precio (Portela, 2006).

2. 7. Factores ambientales involucrados en la formación del bulbo

El bulbo ajo es una especie caracterizada por manifestar una amplia gama de respuestas a las condiciones ambientales del sitio en el que desarrolla, ocurriendo esto aún dentro de cultivares de gran uniformidad genética, como es el caso de los monoclonos (Portela, 1996). Esta gama de respuestas a las condiciones ambientales se traduce comercialmente en bulbos con defectos sin valor comercial.

El termo-fotoperiodo es uno de los condicionantes de mayor importancia para alcanzar la etapa de bulbificación, el ajo requiere la combinación de bajas temperaturas y fotoperiodo corto seguidos de días largos y temperaturas más altas. Está comprobado que los bulbos de ajo sometido a bajas temperaturas, cercanas a los 0°C, prolonga de forma natural el letargo de los bulbos. Una vez que el letargo se termina se presenta la brotación de los dientes con lo cual se puede dar paso a la siembra (Mann y Lewiss, 1956, Duffo *et al.*, 2015).

Los requerimientos de frío y días largos en el ajo están fuertemente relacionados con la longitud de las etapas de letargo, o latencia, y con la duración del cultivo, estos permiten asociar los diferentes cultivares en al menos cuatro grupos ecofisiológicos (Portela, 1996), como se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Agrupación de cultivares por aspectos agronómicos

Requerimientos				
Grupo	Frío	Días largos	Letargo	Ciclo
I	+	+	Muy corta	Corto
II	++	++	Corta	Medio
III	+++	+++	Media	Medio
IV	++++	++++	Larga	Largo

Fuete: Portela, 1996.

La temperatura regula el crecimiento y el desarrollo de la planta de ajo siendo necesario un periodo de bajas temperaturas para que se produzca el inicio de la formación de bulbo. Además, las bajas temperaturas durante el periodo de almacenamiento de la semilla también pueden modificar el inicio de la primera fase del cultivo. La longitud del día; es decir el fotoperiodo, es otro factor ambiental que regula el crecimiento del bulbo que junto con la temperatura regulan el crecimiento de la planta de ajo. (Saluzzo, 2009).

López-Hernández (2010) determinó que la variedad de ajo cv 'Coreano' requiere de 500-550 h de frío (<5°C) para que la bulbificación sea inducida. En diversos trabajos se ha reportado que si estos requerimientos no se alcanzan en condiciones ambientales pueden inducir una inadecuada diferenciación de los bulbos, como consecuencia el ajo presenta diversos problemas morfogénicos que conllevan a un producto de nula calidad comercial (Rodríguez-Lerma; 2013).

Los bulbos, como ocurre en la cebolla (*Allium cepa*, L.), en los tulipanes (*Tulipa* spp.), y en el Jacinto (*Muscari* spp.), son brotes subterráneos en los cuales el tallo se reduce a una placa con pequeños entrenudos; mientras que, las bases de las vainas foliáceas se hinchan para formar el órgano de reserva. En la madurez las hojas se encogen y mueren pero las bases de las hojas hinchadas se mantienen con vida, no hay una distinción anatómica de estas dos partes de la planta y por lo tanto no hay formación de una capa de protección en las zonas de abscisión de la peridermis. Por

lo tanto, se necesita un curado y secado adecuado para el cuello y la base de las hojas si se requiere mantener una buena calidad durante el periodo de poscosecha. (Rodríguez, 2013)

Los bulbos, como órganos de reserva, tienen periodos de letargo en los cuales la tasa metabólica es baja y se mantiene una buena calidad. Sin embargo, se mantienen intactos los nuevos brotes, es así como son capaces de crecer cuando el letargo se interrumpe y las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo. (Kays, 1991).

2.8. Desordenes fisiológicos en la formación del bulbo: “acebollado y rebrote”

Los bulbos de ajos maduros al ser cortados transversalmente, deben tener una apariencia circular con los dientes bien formados y diferenciados los cuales deben estar cubiertos por varias capas externas, a estos ajos se les considera uniformes y bien diferenciados (Figura 5a).



Figura 5. Defectos presentes en el ajo

Bulbo de ajo diferenciado (a), bulbo de ajo “acebollado” (b), bulbo de ajo con rebrote (c).

Durante la producción de ajo uno de los problemas principales que se presentan en los nuevos bulbos es el defecto llamado “acebollado”, se denomina así a las plantas de ajo con aspecto de cebolla, por tener bulbos globosos en su base, con vainas concéntricas grandes y gruesas, y una mínima o rudimentaria formación de bulbillos

(Figura 5b). Estos bulbos no sirven como donante de semillas para nuevos cultivos, Portela (2005) ha demostrado que no se trata de plantas que no han llegado a cubrir sus requerimientos de horas frío para bulbificar, ya que las plantas vecinas dentro de una misma parcela logran formar bulbo sin ningún inconveniente, por otro lado, el fenómeno parece responder a las condiciones agronómicas y climáticas de la región donde se cultiva, ya que su incidencia, o número de defectos, cambia de año en año de forma similar en localidades que se encuentran alejadas y con condiciones muy distintas, (Portela, 2005). Las plantas en campo presentan una deformación en los hombros y se puede ver que en la última fase del crecimiento de las mismas, los entrenudos de las hojas se encuentran muy juntos unos sobre otros, y por ende los tallos tienden a ser más gruesos (Figura 5b) (Portela, 1997). No se tiene información acerca de las causas que conllevan a la formación de este fenómeno pero podría estar relacionado con la biosíntesis de fructanos.

También se ha observado que una bulbificación demasiado rápida ocasiona la formación de un solo diente en el ápice foliar sin la generación de yemas laterales previo al desarrollo de los dientes y sin desarrollo de inflorescencia. Otras de las razones por las que se considera que este problema puede presentarse, es la incidencia de temperaturas altas después de la plantación, que promueven una rápida diferenciación de las hojas de almacenamiento, así que los dientes pueden formar ramificaciones axilares anticipadamente, resultando en bulbos de un solo diente. (Rodríguez-Lerma, 2013)

Otro defecto fisiológico importante lo presentan plantas “rebrotadas”, estas producen bulbos irregulares con cuello ensanchado y comúnmente abierto, con un número extremadamente grande de pequeños bulbillos. Es bien conocido que las condiciones térmicas antes y luego de la plantación, la duración del fotoperiodo del día, la alta disponibilidad de agua y de nitrógeno, así como y las plantaciones ralas, son factores involucrados en la expresión del “rebrote”. Hallazgos recientes han dado lugar a una serie de información adicional importante sobre este proceso fisiológico, y sobre sus implicaciones agronómicas en cultivos comerciales de ajo (Saluzzo *et al.*, 2009).

El “rebrote” se considera como una enfermedad de tipo fisiogénica (Portela, 1997), es la formación de tallos laterales en la planta como consecuencia del crecimiento secundario (Figura 5c). Tiene lugar durante el cultivo una vez que se ha completado la inducción del mismo para bulbificar, y se evidencia en la cosecha como bulbos abiertos (con gran espacio entre bulbillos), poco firmes e irregulares. Comercialmente, estos bulbos resultan defectuosos, y el “rebrote” se considera como una enfermedad de tipo fisiogénica (Portela, 1997).

En el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ se han llevado a cabo una serie de investigaciones en el cultivo de ajo; en particular el trabajo desarrollado por López-Hernández (2010) en el que evaluó el “efecto de la temperatura durante el almacenamiento de la semilla y de la aplicación de paclobutrazol en bulbos “semilla” durante el desarrollo de la planta de ajo, sobre la calidad de los bulbos en la cosecha y el perfil de fructanos” y encontró que la temperatura en la que almacenaron los dientes “semilla” presentó un importante efecto en el desarrollo del bulbo en el campo. En particular, al evaluar las plantas que se generaron de dientes almacenados a temperatura ambiente (TA) se observó que éstas completaron su ciclo a los 222 días, mientras que aquellas que se derivaron de dientes almacenados a 5°C lo completaron a 157d (65 días antes) Figura 6.

Aunque se acortó el ciclo de cultivo el rendimiento fue superior en los tratamientos procedentes de bulbos generados a partir de bulbos “semilla” almacenados a TA sin embargo en ambas situaciones se desarrollaron bulbos con defectos; en particular, en la cantidad de bulbos “acebollados” o “bombones” estos fueron notablemente mayores en los bulbos procedentes de las plantas a TA (16% de la producción total) y menores en los bulbos procedentes de plantas a 5 °C (menos del 1% de la producción total). No obstante, en cuanto a producción de defectos los bulbos procedentes de plantas a 5 °C mostraron una mayor producción de los mismos (6.6%) respecto de los bulbos procedentes de plantas a TA (13%). Tanto los bulbos acebollados y rebrotados no tienen valor comercial y representan cerca del 20% de la producción total; lo cual significa una pérdida económica para el productor. Lo anterior hace necesario buscar alguna alternativa de uso para estos desperdicios, dado que

aunque no se trata de bulbos diferenciados si podemos suponer que los carbohidratos (fructanos) que contienen pueden evaluarse para su posible utilidad en la industria de alimentos.



Figura 6. Comparación visual de plantas de ajo

Después de 157 días después de la siembra (DDS) de plantas de ajo 'Coreano' cuyos dientes "semillas" fueron almacenados a temperatura ambiente ó 5 °C.

2.9. Fructanos de ajo

Los fructanos, junto con el almidón y la sacarosa, son probablemente los carbohidratos de almacenamiento más abundantes y metabolizables encontrados en las plantas. En particular, los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la molécula de sacarosa. Los fructanos de plantas tienen diferentes estructuras y longitudes en su cadena, o grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés: Degree of Polimerization). El fructano más pequeño es la kestosa en el cual un residuo de fructosil está unido por enlace β 2-1 a la molécula de sacarosa (Figura 7a y 7b); el DP puede variar hasta alrededor de cientos de unidades de fructosa, con una gran variedad de enlaces, todos ellos de naturaleza β , lo que los hace no disponibles para las enzimas digestivas; sin embargo son susceptibles a las enzimas de las bacterias del colon. Los fructanos que son sintetizados en la naturaleza son solubles en agua y

son azúcares no reductores. Los fructanos con un grado de polimerización de 3 a 10 son comúnmente llamados fructooligosacaridos (FOS) y los de gran DP, dependiendo de la fuente botánica se consideran como inulinas o levanos. Estos compuestos pueden diferir por el grado de polimerización, la presencia de ramificaciones, el tipo de enlace entre las unidades de fructosa adyacentes y la posición de los residuos de glucosa. En la naturaleza se distinguen cinco clases de estructuras de fructanos: inulinas, levanos, mezclas de fructanos ramificados, neoserias de inulina y neoserias de levanos (Van de Ende, 2013).

En la figura 7 se ven representados a los fructanos que se clasifican de acuerdo al tipo de enlace que presentan sus moléculas; los levanos que se forman a partir de la 6-kestosa y cuentan con enlaces $\beta(2-6)$; las inulinas que se forman a partir de la 1-kestosa y presentan enlaces $\beta(2-1)$; las mezclas de levanos que tienen moléculas con ambos enlaces $\beta(2-6)$ y $\beta(2-1)$; las neoserias de inulina con enlaces $\beta(2-1)$ en los carbonos 1 y 6 de las glucosas dentro de las unidades de sacarosa; y por último las neoserias de levano que son polímeros de residuos fructosil unidos por enlaces $\beta(2-6)$ en la molécula de glucosa. (Van Laere y Van den Ende, 2002).

En las plantas los fructanos sirven como reserva de carbohidratos y son almacenados en los tallos, tubérculos, bulbos y raíces. También se ha sugerido que los fructanos sirven como protección para la planta en condiciones de estrés hídrico o el provocado por el frío (Van Arkel *et al.*, 2013) ya que, los fructanos pueden ligar agua pues estos, a diferencia del almidón, se caracterizan por poseer propiedades osmoreguladoras debido a su solubilidad en agua dentro de la vacuola (Darbyshire y Henry, 1979). Las plantas monocotiledoneas como las amarilidáceas producen fructanos muy complejos como las neoserias de inulina. (Ulloa *et al.*, 2010).

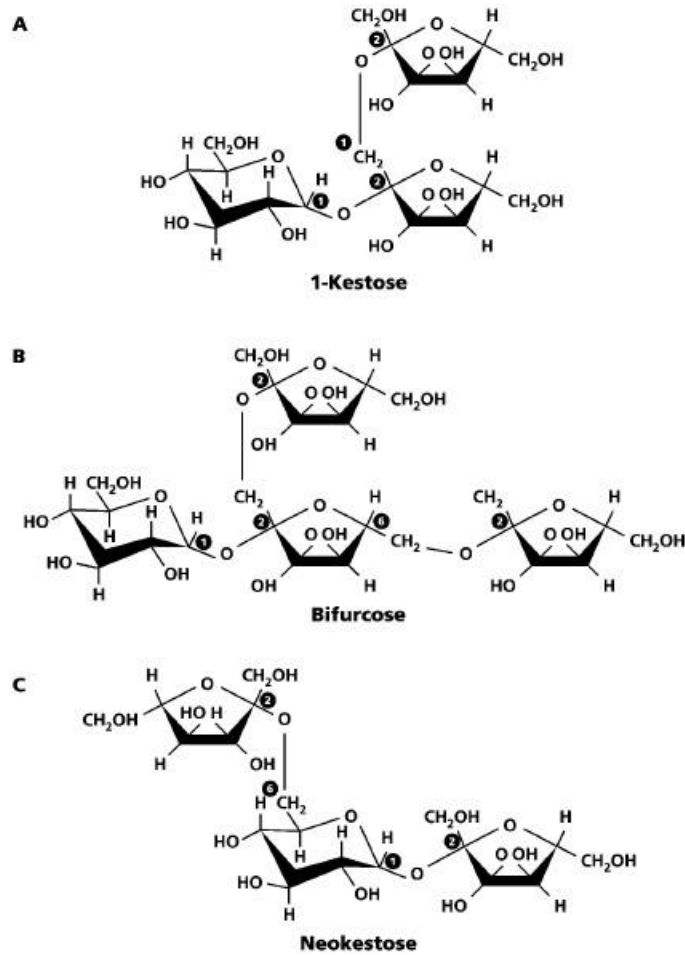


Figura 7. Estructura y enlaces de moléculas de fructanos
 (a) 1-kestosa, (b) bifurcosa, (c) Neokestosa. Ritsema et al., 2003.

2.9.1. Biosíntesis de fructanos

Para diferenciarse los polímeros de fructosa según su grado de polimerización (DP); se pueden considerar a los FOS a aquellos con un DP menor a 10, por tanto al resto se les puede llamar dependiendo de la fuente botánica; fructanos a los provenientes de ajo y cebolla, inulinas los de alcachofa, agavinas los de agave, levanos a los que provienen de avena o los de origen microbiano. La biosíntesis de estos

compuestos se lleva a cabo en las vacuolas de las células de las plantas como se presenta en la Figura 8.

La biosíntesis de fructanos comienza con la demanda de sacarosa. La sacarosa es el precursor de los fructanos sintetizados durante la fotosíntesis que se almacenan de manera natural en las plantas hasta que las concentraciones son altas. (Vázquez, *et al.*, 2006).

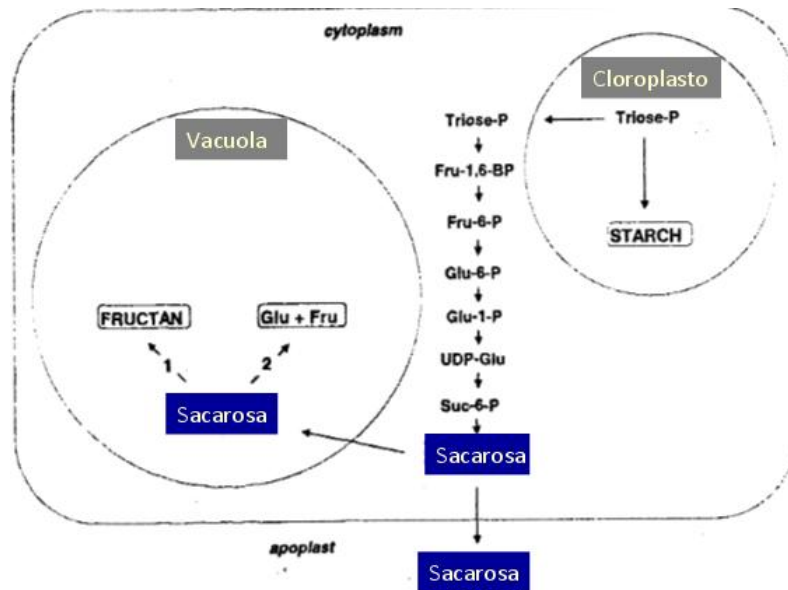
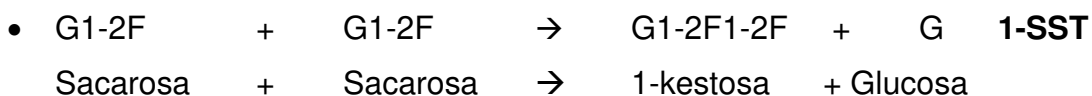


Figura 8. Representación esquemática del metabolismo de carbohidratos en plantas Van Arkel *et al.*, 2013.

La Figura 9 representa la primera reacción llevada a cabo por la enzima sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) cataliza la transferencia de un residuo de fructosa entre 2 moléculas de sacarosa para formar 1-kestosa y glucosa. También puede ser llevada a cabo por la enzima sacarosa:fructano fructosiltransferasa (6-SFT) para rendir 6-kestosa; a partir de la 1-Kestosa y otra molécula de sacarosa y por acción de la enzima 6G-FFT se sintetiza la neo-kestosa; según las siguientes reacciones:



- $G1-2F + G1-2F \rightarrow G1-2F6-2F + G$ **6-SFT**
 Sacarosa + Sacarosa \rightarrow 6-kestosa + Glucosa

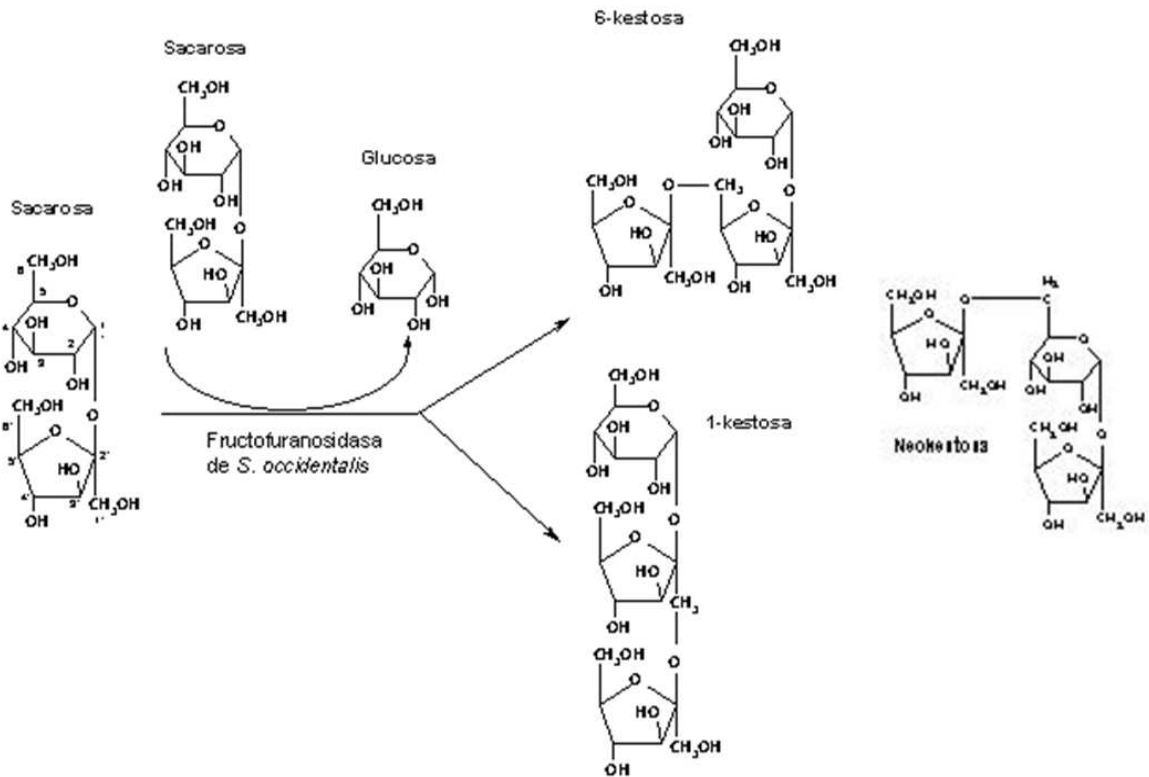


Figura 9. Esquemización de la biosíntesis de fructanos.

Una vez formado el primer trisacárido éste podrá aceptar residuos de fructosil hasta el DP que requiera la planta. El grado de polimerización consiste en una serie de reacciones de transfructosilación por un sistema enzimático multifuncional. Esta reacción es catalizada por la enzima fructano:fructano fructosiltransfera (1-FFT), en la cual la 1-kestosa producida por la 1-SST puede servir como aceptor para un residuo fructosil terminal, transferido a partir de otras cadenas de fructanos donadoras, esta enzima incrementa el grado de polimerización de la molécula de 1-kestosa.

- $G1-2F(1-2F)^m + G1-2F(1-2F)^n \rightarrow G1-2F(1-2F)^{m+1} + G1-2F(1-2F)^{n-1}$ **1-FFT**
 1-kestosa + 1-kestosa \rightarrow Elongación de la molécula

Por otro lado, la hidrólisis de los fructanos es catalizada por la enzima fructano exohidrolaza (FEH), que hidroliza las unidades frutosil terminales, dando como resultado una molécula de fructosa y un fructano con un grado de polimerización menor. (Van den Ende *et al.*, 2002).

- $G1-2F(1-2F)_n \rightarrow G1-2F(1-2F)_{n-1} + F$ **FEH**
 Fructano \rightarrow Fructano + Fructosa.

La Figura 10 muestra de manera resumida la síntesis de los fructanos a partir de la sacarosa.

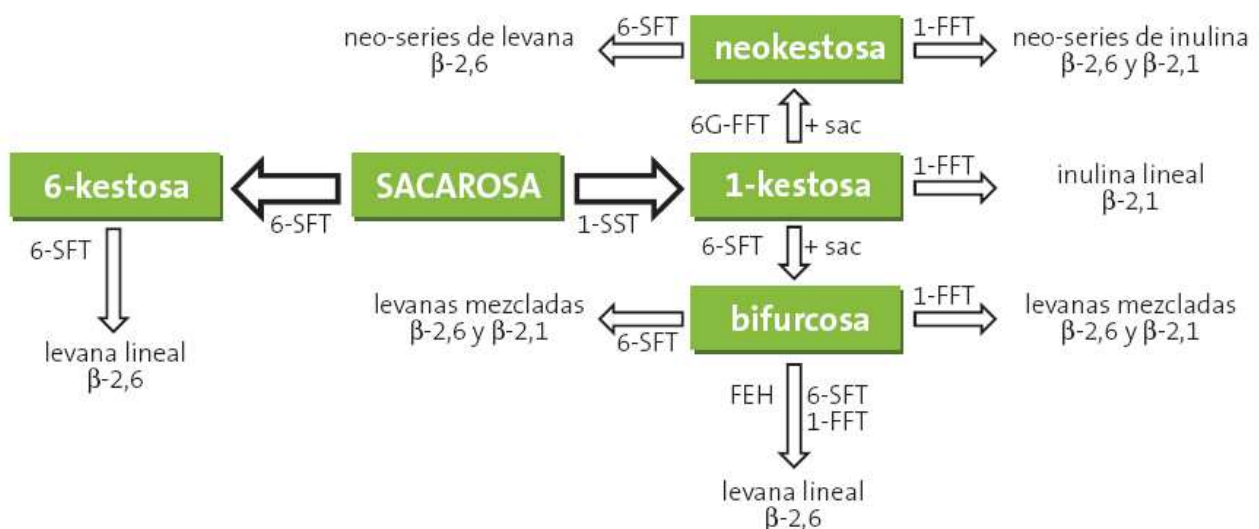


Figura 10. Ruta Metabólica de la biosíntesis de fructanos

Para la síntesis de fructanos en plantas, Ritsema y Smeekens (2003), reportan que de manera general, la enzima 1-SST es la enzima clave para la biosíntesis de fructanos debido a su participación en la primera reacción de la ruta.

Los carbohidratos del ajo los conforman una mezcla de monosacáridos solubles en agua (glucosa y fructosa), sacarosa, los trisacáridos 1-kestosa

(1F-fructosilsacarosa) y neokestosa (6G-fructosilsacarosa) y fructanos de distintos grados de polimerización. Baumgartner *et. al.* (2000), indicaron que la neokestosa es la unidad principal de la molécula de fructano de ajo (Figura 11) y que estos varían en su DP según el estado fisiológico de la planta.

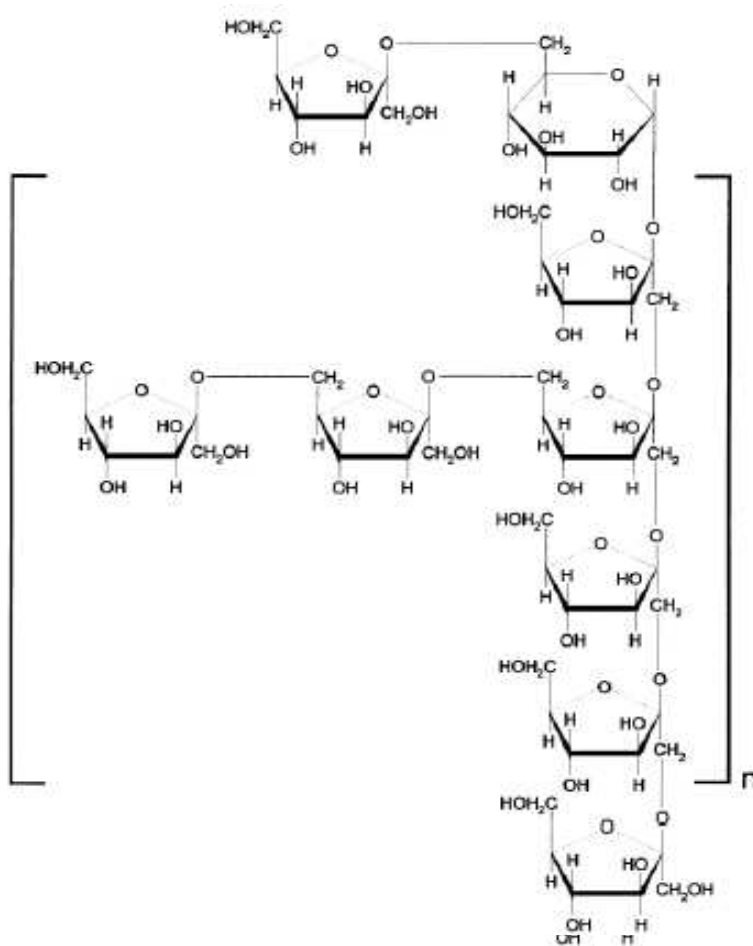


Figura 11. Estructura sugerida para el fructano de Ajo n_9 para un DP de 58. (Baumgartner *et. al.* 2000).

Al inicio de la siembra los fructanos de ajo presentan un DP de 12 y llegan a alcanzar un máximo de 58 cuando se encuentran en la etapa de crecimiento vegetativo rápido; los nuevos bulbos presentan un DP de 30 al final de la cosecha (Figura 12). Mientras que los autores Chandrashekar *et al.*, (2011) y Muir *et al.*, (2007) reportaron

un DP de 38 y 10 respectivamente para el ajo. Darbyshire y Henry (1981), señalaron que la cebolla, poro y ajo, no contienen almidón, por lo que los fructanos tienen funciones de reserva y funciones reguladoras en la fisiología de la planta. Los datos de Losso y Nakai (1997), corroboran la importancia que tienen los fructanos al indicar que de los contenidos de azúcares que tiene este alimento, 125-325 mg/g de peso seco corresponden a los fructanos, la proporción molar de fructosa y glucosa fue de 15:1.

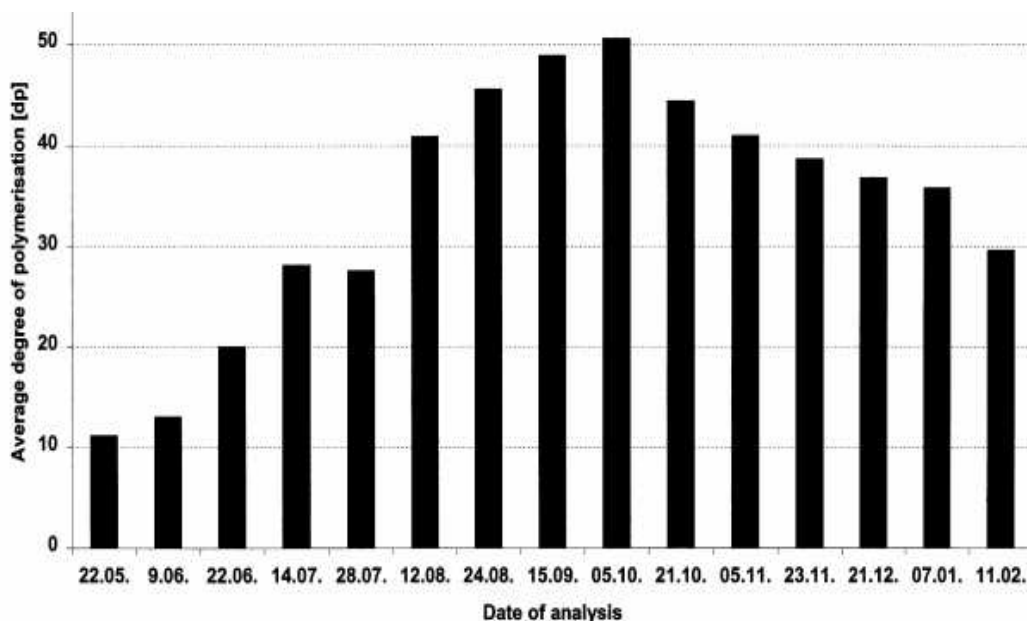


Figura 12. Promedio de DP de fructanos de ajo medido durante su ciclo de cultivo (Baumgartner *et. al.* 2000).

Brewster (1994) ha reportado en algunos trabajos que al inicio de la bulbificación existe acumulación de carbohidratos en las bases de las hojas. Además se han observado incrementos en la concentración de fructanos en plantas de cebolla expuestas a condiciones inductivas de bulbificación, incluso antes de que los bulbos comiencen a hincharse notoriamente.

Se ha visto que el grado de polimerización de ciertas plantas es más alto durante la etapa de crecimiento vegetativo rápido (tercera etapa de desarrollo del ajo),

y que decrece al momento de la cosecha. Tal es el caso de la planta de chicoria que cuando se cosecha su grado de polimerización es de 9 y anterior a la cosecha es de 18. La acción de que se disminuya el grado de polimerización es por acción de las enzimas 1-FFT y FEH, ya que ambas responden a los factores ambientales que recibe la planta. (Wittouck *et al.*, 2002).

2.9.2. Propiedades funcionales de los fructanos (oligofruetosacáridos)

Los oligofruetosacáridos representan una importante tendencia agroindustrial por sus aplicaciones técnicas, productivas y nutricionales; sus características químicas dan pie a diferentes aplicaciones industriales prácticas entre las que destacan; sustitutos de grasa, estabilizantes y mejoradores de la textura. (Chacón, 2006).

Los fructanos presentan una serie de características químicas, de acuerdo a los enlaces que presentan en su estructura $\beta(2-1)$, son los responsables de que no sean digestibles como cualquier otro tipo de carbohidrato, lo que a su vez trae como consecuencia que tengan un bajo valor calórico y una funcionalidad nutricional como fibra dietética. (Kaur y Gupta, 2002).

Se ha reportado que los fructanos tienen la capacidad de ser hidrosolubles lo cual les otorga la propiedad humectante cuando se emplean como aditivos en la industria de los alimentos, así como la capacidad de formar geles cremosos cuando se calientan en medios acuosos, estos suelen tener mayor viscosidad y mayor estabilidad térmica. Por otro lado, los fructanos que tienen un alto DP (>25); también han sido utilizados como sustitutos de grasa; mientras que los que presentan un DP bajo son usados en la industria de alimentos solamente como endulzantes o saborizantes en la industria de alimentos. También se ha reportado que los fructanos son estables a amplios rangos de pH y a temperaturas de refrigeración. (Collins y Rastall, 2008).

2.9.3. Propiedad prebiótica

Se denomina prebiótico a los alimentos o ingredientes no digeribles de los alimentos que estimula selectivamente el crecimiento de ciertos grupos de bacterias en el colon beneficiando y mejorando la salud (Ritsema y Smeekens, 2003). En otras palabras, es el alimento específico para las bacterias probióticas, como las del género *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*. El colon humano comprende un complejo ecosistema de diferentes especies de bacterias que constituyen una flora mayoritariamente anaerobia estricta acompañada por cantidades de flora facultativa, cuya actividad y cantidad se ve afectada por la fisiología gastrointestinal y por los sustratos de fermentación con los que dispongan. La capacidad de estimular el crecimiento en el colon de bacterias específicas consideradas beneficiosas, y hasta anular el crecimiento de bacterias patógenas se conoce como efecto prebiótico (Bosscher, 2009)

Cualquier compuesto para denominarse prebiótico tiene que ser resistente a los ácidos gástricos, y a las enzimas digestivas, ser susceptible a la fermentación por medio de las bacterias del colon y tener la habilidad para mejorar la actividad de los microorganismos. Los fructanos de ajo cumplen con las características para ser denominado prebiótico, además su el valor calórico de los fructanos tiende a ubicarse en un promedio de 1.6-2.7kcal/g (Murphy, 2001).

Los enlaces que presentan las moléculas de fructanos, $\beta(2-1)$, no son hidrolizables por las enzimas digestivas del cuerpo humano, ni a nivel del estómago ni del intestino delgado. (Rosado y Ordanza, 2003). Las bacterias Gram-positivas del colon logran sintetizar toda una serie de enzimas que sí pueden degradar a los oligofruetosacáridos, los cuales son fermentados anaerómicamente. La fermentación trae como consecuencia una disminución en el pH, lo cual provoca una generación de ácidos carboxílicos de cadena corta. (Roberfroid, 2001).

La fermentación de fructanos en el colon genera ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés de Short-Chain Fatty Acids) y lactato, más gases como

producto del metabolismo anaeróbico. En estudios *in vitro*, se demostró que los fructanos de achicoria estimularon el crecimiento bacteriano y produjeron SCFA's. También se han demostrado beneficios en estudios con animales principalmente en cáncer de colon, absorción de calcio, en estimulación del sistema inmunológico y en el metabolismo de lípidos. En un estudio realizado por Urías y López, 2004, usando fructanos de agave de bajo DP mostraron que dichos compuestos estimularon mejor el crecimiento de *B. breve* y generaron los ácidos acético, propiónico y butírico, reportados como responsables de los efectos positivos en la salud y mostraron actividad anticarcinogénica contra el cáncer de colon.

2.10. Familia *Lachnospiraceae*

El género *Clostridium* ha sido descrito como bacterias Gram-positivas, anaerobias estrictas y formadoras de esporas, aunque estudios taxonómicos recientes han dividido este género en nueve familias identificadas como *Incertae sedis* (Latin para colocación incierta) en un esfuerzo para reagrupar las especies encontradas que presentan características de otras familias de bacterias (Tap *et al.*, 2009).

La familia *Lachnospiraceae* es una de las familias más abundantes del orden del género *Clostridia* que se encuentran en el tracto intestinal de los mamíferos y han sido asociadas en la conservación de la salud del intestino (Nava *et al.*, 2011; Biddle *et al.*, 2013) Figura 13.

Además la familia *Lachnospiraceae* es una de las más abundantes de tipo endobacteria en el tracto intestinal, con más de un 50% de filotipos, (Nava *et al.*, 2011). También han sido asociadas con la producción de butirato necesario para la salud del tejido epitelial colónico y han mostrado tener un efecto positivo en la disminución de enfermedades inflamatorias intestinales (Duncan *et al.*, 2012).

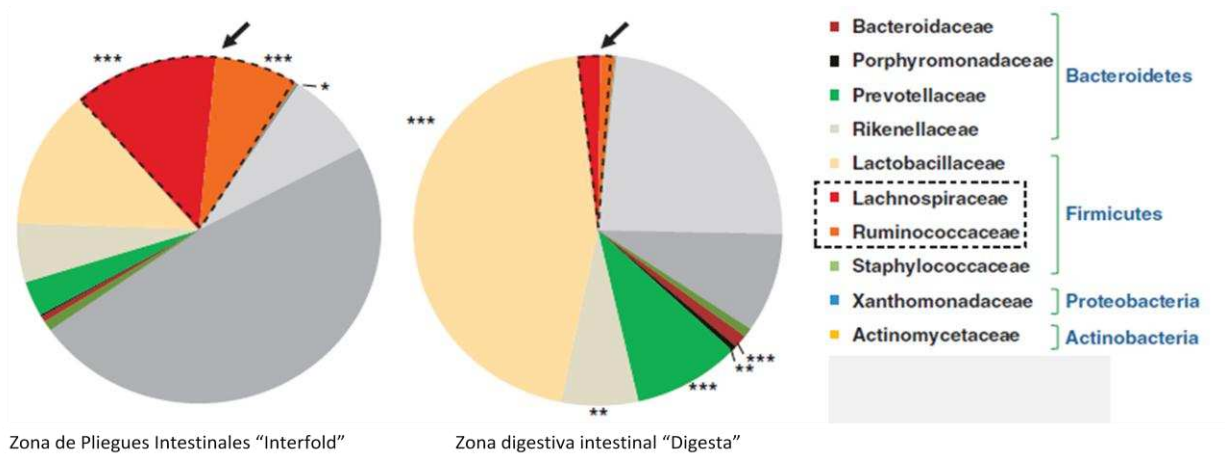


Figura 13. Comparación de la diversidad microbiana en la zona digestiva (Digesta) y de pliegues (Interfold) del intestino. (Nava *et. al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

El ajo es un producto hortícola que cada vez adquiere más demanda, y se ha reportado que necesita de bajas temperaturas para obtener un ajo completamente diferenciado. La escasa acumulación de horas frío altera la biosíntesis y la polimerización de los fructanos (carbohidratos de reserva del ajo) dando origen de bulbos no diferenciados o “acebollados”, que carecen de valor comercial representando para el productor de entre el 30 y el 50 % de pérdidas económicas. Los fructanos actualmente son utilizados como ingredientes en la industria agroalimentaria, y se les ha atribuido un efecto prebiótico debido a su composición química y estructura, por sus enlaces β que presentan no son digeribles por las enzimas del cuerpo humano, sin embargo las bacterias de la microbiota del intestino pueden hidrolizar este tipo de enlaces, en especial la bacteria de la familia *Lachnospiraceae* que tiene efectos benéficos a la salud.

Con el objetivo de proveer una alternativa para esos desperdicios y darles valor comercial, en este trabajo se evaluará las propiedades funcionales y el potencial prebiótico de los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado debido a que es posible que contengan fructanos con diferentes grados de polimerización.

IV. HIPÓTESIS

Los ajos no diferenciados pueden ser utilizados para la extracción de fructanos que poseen propiedades funcionales que estimulan el desarrollo de la familia bacteriana *Lachnospiraceae*.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado y evaluar su posible efecto como prebiótico.

5.2. Objetivos particulares

1. Extraer fructanos de ajo diferenciado, ajo no diferenciado y cebolla blanca, y evaluar el contenido de carbohidratos.
2. Determinar el grado de polimerización de los fructanos de ajo no diferenciado, ajo diferenciado, cebolla blanca e inulina comercial.
3. Evaluar el índice de absorción de agua y la capacidad de absorción de aceite de los fructanos extraídos.
4. Evaluar *in vivo* el efecto prebiótico de los fructanos.
5. Evaluar mediante qPCR el efecto del consumo de los fructanos de ajo no diferenciado y ajo diferenciado, sobre el crecimiento de bacterias de la familia *Lachnospiraceae*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y manejo previo a los experimentos

De la cosecha de ajo 2013-2014 en la zona productora de ajo localizada en Rincón de Romos, Aguascalientes, México se recuperaron las plantas de ajo que no se diferenciaron de la variedad “Coreano”; estas plantas presentaron un aspecto blando y al momento de realizar un corte transversal se observaron círculos concéntricos similares a una cebolla, de ahí el nombre coloquial de “ajo acebollado”. Una vez cosechadas se colocaron en hieleras para ser transportados al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro para su posterior procesamiento. De la misma parcela se colectaron plantas con bulbos de ajos bien diferenciados de la misma variedad “Coreano”. En un mercado local se adquirió cebolla blanca y la inulina comercial de agave marca Preventy® fue donada por la empresa “Inulina y miel de agave S.A. de C.V. Las muestras de bulbos de ajo diferenciado (FAD), bulbos de ajo no diferenciado (FBND) y cebolla blanca (FCB), se congelaron y se liofilizaron. Finalmente se molieron con ayuda de un molino para café marca Krups® modelo GX4100, hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Las muestras en polvo se colocaron en bolsas de celofán y se conservaron dentro de un desecador hasta su análisis. Los fructanos se extrajeron de las muestras de ajo y cebolla liofilizadas y una vez obtenidos fueron comparados entre ellos mediante los diferentes análisis y un estudio *in vivo*. Para el experimento *in vivo* se usaron ratas macho de la variedad Wistar de tres semanas de edad, las cuales fueron adquiridas del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, Campus Juriquilla.

6.2. Estrategia experimental

Los estudios desarrollados en el presente trabajo fueron divididos en dos etapas. La primera tuvo la finalidad de extraer los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado (BND), bulbos de ajo diferenciado (AD) y cebolla blanca (CB) y se compararon con la inulina comercial de agave (IC), además se realizaron pruebas fisicoquímicas de los fructanos extraídos como el índice de absorción del agua (IAA) y la capacidad de absorción de aceite (CAA). Estos análisis se realizaron por triplicado. (Figura 14).

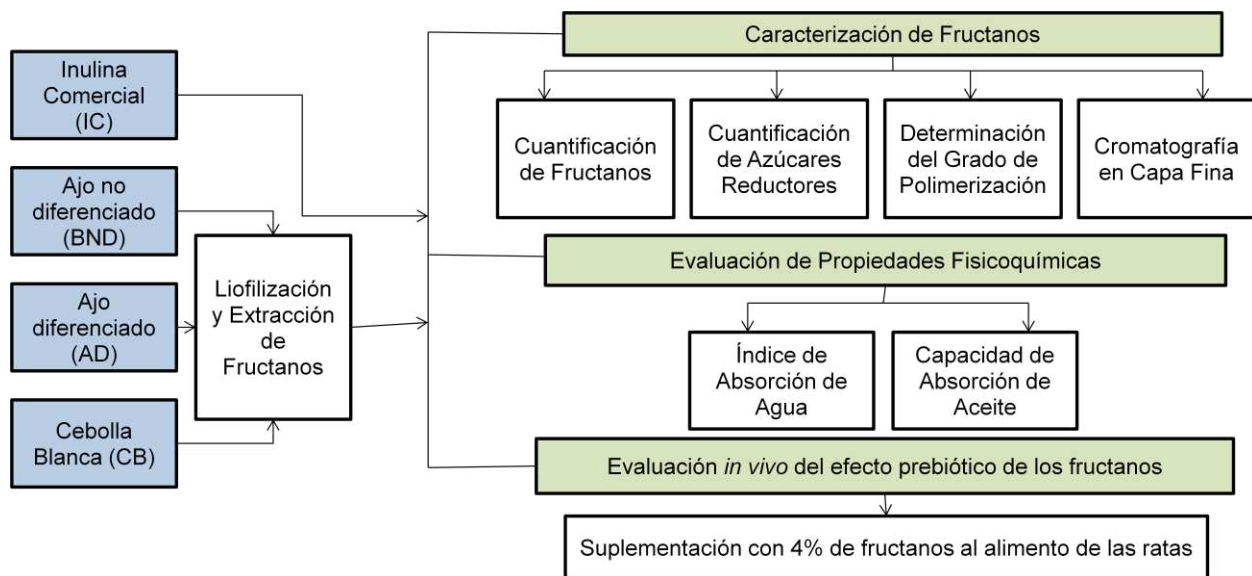


Figura 14. Estrategia experimental.

La segunda etapa fue un estudio *in vivo* con ratas Wistar a las cuales se les administró una dieta suplementada con 4 % de fructanos (Amaya *et al.*, 2015) de cada una de las fuentes estudiadas de manera independiente con la finalidad de observar su efecto prebiótico; esto mediante el análisis de qPCR rastreando el desarrollo de las bacterias de la familia *Lachnospiraceae*. La unidad experimental fue de tres ratas por triplicado para cada uno de las diferentes fuentes de fructanos.

6. 3. ETAPA 1:

6.3.1. Extracción de fructanos

Se realizó la extracción de fructanos de acuerdo a el método descrito por López, *et al.*, 2003, modificado por Vázquez-Barrios, 2005. Para cada material biológico, en un matraz EM de 250 mL, se colocó la muestra liofilizada y molida; se mezcló con etanol al 80% en relación 1:6, y se llevo a un baño de agua a 80°C con agitación constante, durante 1 hr, posteriormente se filtró a vacío a través de papel whatman No. 1; el residuo se mezcló con agua destilada y se llevo a una segunda extracción a 75°C durante 30 min más, este paso se repitió dos veces más; todas las extracciones se filtraron. Los filtrados se juntaron y se ajustó el pH a un valor de 7.0 con ayuda de NaOH 1M. Para favorecer la precipitación de los fructanos al extracto se le adicionó 30 mL de etanol absoluto a 4°C para lograr precipitar los fructanos, y se almacenaron en el congelador durante 1 hora a -20°C para favorecer una rápida precipitación. Posteriormente se centrifugó a 1400 rpm por 20 min a 4°C, cuidadosamente se decantó y el residuo fue liofilizado en un equipo Labconco® modelo LYPH-LOCK R12. Los fructanos extraídos y liofilizados fueron colocados en bolsas de celofán y se almacenaron en un desecador, hasta su análisis.

6.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina nos permite evidenciar de una manera general el perfil de fructanos presentes en una muestra. Para cada muestra liofilizada se preparó una solución acuosa de 1 mg/ml. Se utilizaron placas de TLC de sílica gel con soporte de aluminio (25DC Alufolien 20X20 cm Kieselgel 60. Alltech). Las placas se marcaron dejando 1 cm de espacio por cada lado, en la parte inferior se marcó cuidadosamente una línea recta donde se hicieron divisiones en segmentos de 0.7 cm de distancia para colocar las muestras de estudio así como los estándares de glucosa, fructosa, sacarosa, y 1-kestosa. Se colocaron alícuotas de 5 µL de cada muestra y de las

soluciones de estándares: Una vez cargada la placa se dejó secar a temperatura ambiente.

La fase móvil utilizada fue una mezcla de Propanol:Butanol:Agua (12:3:4) v/v/v (Kanaya, 1978) la cual se colocó en el fondo de una cámara para TLC; una vez saturado el ambiente de la cámara se introdujo la placa de forma vertical para permitir la separación de forma ascendente (cromatografía ascendente) el solvente ascendió por capilaridad hasta 0.5 cm antes del borde superior de la placa. La placa se dejó secar en una campana de extracción y posteriormente se regresó a la misma cámara para permitir otra corrida; esta operación se repitió en 4 ocasiones más. Una vez terminadas las corridas se dejó secar la placa y se reveló con una mezcla de difenilamina, anilina en acetona al 4%, y ácido fosfórico al 85% (Anderson *et al.*, 2000). Esta solución se aplicó por aspersion sobre la placa, posteriormente las placas se calentaron sobre una parrilla hasta la aparición de la coloración característica en la placa (aproximadamente 5 min). Una vez ubicadas las manchas desarrolladas en la placa se marco el centro de la misma y se determinó el valor Rf (ratio front) considerado el frente de solvente (eluyente) usando la siguiente ecuación.

$$Rf = \frac{\text{distancia de la muestra recorrida desde el origen}}{\text{distancia del eluyente recorrido desde el origen}}$$

El valor de Rf para cada muestra se comparo con el de cada uno de los estándares y se determinó el perfil de carbohidratos.

6.3.3. Determinación de azúcares reductores y de sacarosa

La determinación del contenido de azúcares reductores se llevó a cabo como reportaron Bello *et al.*, 2006, El principio en el cual se basa es la reducción del DNS (color amarillo) por la glucosa al ácido 3- amino-5-dinitrosalicílico de color rojo al calentamiento, La presencia del ácido 3- amino-5-dinitrosalicílico se detecta por la

lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Se utilizó una solución de fructosa determinada con diferentes concentraciones para establecer una curva patrón (Anexo A.3.1). En tubos de vidrio de 10 ml se adicionaron 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño de agua a 100 °C (punto de ebullición) por 5 min. Se enfriaron hasta temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de agua destilada. Los tubos se agitaron y se determinó el valor de la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS.

La sacarosa fue determinada por diferencia de los demás carbohidratos, restando de un 100% la cantidad de fructanos y de azúcares reductores.

6.3.4. Cuantificación de fructanos

El contenido de fructanos totales se realizó con ayuda de un kit comercial “Fructan HK Assay” de Megazyme®, siguiendo el método enzimático y espectrofotométrico 999.03 de la AOAC (McCleary y Murphy, 2000).

El principio del método se basa en que la sacarosa, maltosa, maltodextrinas y almidón presentes en la muestra son hidrolizados a D-glucosa y D-fructosa, por acción de las enzimas Sacarasa/Maltasa, los azúcares reductores formados en presencia de borohidruro de sodio se reducen a sus correspondientes alcoholes; D-sorbitol y D-manitol. Los fructanos nativos y los FOS son azúcares no reductores y no se ven afectados por esta reacción; de manera que la acción de la fructanasa (*exo*-inulinasa y *endo*-inulinasa) sobre los fructanos y FOS libera los residuos de D-fructosa y D-glucosa que son cuantificados por la reacción de reducción usando el método de PAHBAH (hidrazida del ácido *p*-hidroxibenzoico, Sigma cat. no. H-9882; Lever, 1973). El PAHBAH reacciona con los azúcares reductores presentes en las muestras evidenciándose por el desarrollo de color amarillo que puede determinarse su

absorbancia a 410 nm. Este método no requiere de realizar una curva estándar ya que el uso de varios reactivos los cuales se describen en el Anexo 1.

Extracción de fructanos: Para cada muestra se pesaron 0.05 g y se mezclaron con 40 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, la mezcla se mantuvo con agitación constante y en calentamiento (80 °C) durante 15 minutos. Una vez fría a temperatura ambiente, la mezcla se completó a un volumen de 100 mL.

Eliminación de sacarosa, almidón y azúcares reductores: En un tubo de ensaye se colocaron 200 µL de la enzima A (solución de sacarasa/amilasa) y 200 µL de la muestra en cuestión, se incubaron a 40°C durante 30 minutos, para lograr una completa hidrólisis enzimática del almidón y la sacarosa presentes en la muestra. Luego se agregaron 200 µL de borohidruro alcalino y se continuó con la incubación a 40°C durante 30 minutos más, esto se realizó con la finalidad de completar la reducción de los azúcares reductores a azúcares alcohol. Después se agregaron 500 µL de ácido acético 2.0 M y se ajustó el pH a 4.5, se agitó en vortex para remover el exceso de borohidruro.

Hidrólisis y medición: Una vez eliminado tanto el almidón, la sacarosa y los azúcares reductores, en la muestra solo quedaron los fructanos los cuales se hidrolizaron para poderlos cuantificar como azúcares reductores. Para cada muestra a analizar, se colocaron 200 µL de la solución anterior en 3 tubos, a los 2 primeros se les agregó 1 µL de la enzima B (fructanasa) para hidrolizar el fructano contenido en las muestras a azúcares reductores (glucosa y fructosa), y al tercero 200 µL de buffer 2 (buffer acetato de sodio 0.1 M), este tubo se consideró como el blanco de muestra; es decir sin la acción de la enzima fructanasa. Se usaron 5 tubos más; uno para el blanco de reactivos y 4 para la muestra estándar de fructosa. Para el blanco de reactivos se agregaron 300 µL de buffer 2 (buffer acetato de sodio 0.1 M). Se preparó el estándar de D-fructosa, primeramente se tomarán 200 µL de la solución estándar de D-fructosa que viene en el Kit (1.5 mg/ml) a los cuales se le añadió 900 mL de Buffer 2 (acetato de sodio 100 mM, pH 4,5), se mezcló perfectamente y se tomaron alícuotas de 200 µL de

esta solución (la concentración final en cada tubo fue de 54,5 g de D-fructosa) las cuales se colocaron por cuadruplicado en tubos de ensaye a los cuales se les adicionó 100 µL del buffer 2.

Desarrollo de la reacción para la cuantificación: A todos los tubos; tanto a las muestras, como blanco y estándar, se les agregaron 5 mL de PAHBAH, se incubaron en baño de agua a 100°C por 6 minutos y posteriormente se colocaron en agua a 18 - 20°C por 5 minutos. Al finalizar el tiempo, se midió la absorbancia a 410 nm en el espectrómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS (Norwalk, USA).

Cálculos: Para determinar el porcentaje del fructanos (contenido de fructanos) en la muestra se utilizó la siguiente fórmula.

$$\%fructanos(p/p) = \Delta_A \times F \times 5 \times V \times \frac{1.1}{0.2} \times \frac{100}{W} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180}$$

$$\%fructanos(p/p) = \Delta_A \times F \times \frac{V}{W} \times 2.48$$

Donde:

Δ_A = [promedio de la absorbancia de la muestra (tubos 1 y 2)] – [absorbancia del blanco (tubo 3)].

F = Factor para convertir valores de absorbancia a µg de D-fructosa (McCleary y Murphy, 2000).

F = (54.5 µg D – fructosa) / (absorbancia para 54.5 µg D – fructosa).

5 = Factor para convertir de 0.2 mL analizados a 1.0 mL.

V = volumen (mL) de extracto usado.

W = Peso (mg) de muestra extraída.

100/W = Factor para expresar los fructanos como porcentaje de peso de la muestra.

1/1000 = Factor de conversión de µg a mg.

162/180 = Factor para convertir de D-fructosa libre, como fue determinado, a anhidrofructosa e anhidroglucosa como ocurre en fructanos (McCleary y Murphy, 2000).

6.3.5. Determinación del grado de polimerización

El análisis del grado de polimerización (Degree Polimerization=DP) de los fructanos se midió usando una modificación del kit “Fructan HK Assay” de Megazyme®, siguiendo el método enzimático y espectrofotométrico 999.03 de la AOAC (McCleary y Murphy, 2000), en combinación con el kit “Sucrose/D-fructose/D-glucose kit” R-biopharm® (Muir *et al.*, 2007).

El principio del método se basa en la estimación de que los fructanos son unidades de fructosas unidas por una unidad de glucosa mediante enlaces β ; por lo tanto conocer el contenido total de fructosa (Fructan HK Assay) mas la cantidad total asociada a la glucosa (Sucrose/Fructose/Glucose Assay) pueden ser utilizados para calcular un promedio del grado de polimerización de los fructanos. La concentración de glucosa y fructosa fueron medidas usando las enzimas de Hexocinasa/glucosa 6-fosfato (HK) y fosfoglucosa isomerasa (PGI) respectivamente (Figura 15).

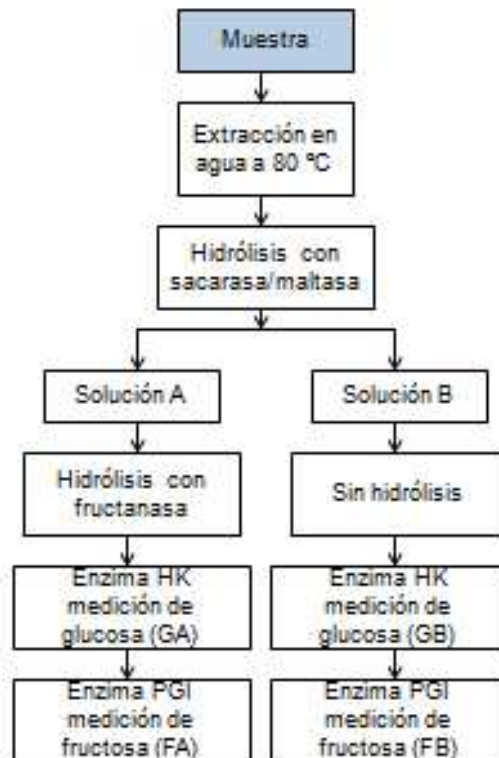


Figura 15. Diagrama para la estimación del DP.

Hidrólisis y medición: Una vez eliminado tanto el almidón, la sacarosa y los azúcares reductores, en la muestra solo quedaran los fructanos. Para cada muestra a analizar, se colocaron 200 µL de la solución anterior en 2 tubos, al primero se le agrega 0.1 mL de la enzima B (fructanasa) para hidrolizar el fructano, y al segundo 0.1 mL de buffer 2 (buffer acetato de sodio 0.1 M). Se incubaron durante 1 hr a 40 °C y al finalizar se les agregó a ambos tubos 1.7 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.6 con ayuda del buffer de Trietanolamina que contiene el kit y se dejó reposar por 5 min, para que las enzimas HK y PGI puedan reaccionar. Se agregaron 20 µL de la enzima HK y se dejó reposar por 3 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 340 nm. Luego se agregaron 20 µL de la enzima PGI y se dejó reposar durante 15 minutos y nuevamente se determinó la absorbancia a la misma longitud de onda. De igual manera se hicieron curvas de concentración con glucosa y fructosa; y se preparó un blanco de reacción solo con 1 mL del buffer de Trietanolamina y 2 mL de agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento. Las absorbancias fueron leídas en el espectrofotómetro Perkin Elmer Instruments Lambda 40 UV/VIS.

Cálculos: Para determinar el grado de polimerización (DP) del fructano contenido en la muestra se utilizó la siguiente fórmula.

$$DP = \frac{Fa - Fb}{Ga - Gb}$$

Donde:

Fa= Absorbancia de fructosa con hidrólisis de “fructanasa”.

Fb= Absorbancia de fructosa sin hidrólisis de “fructanasa”.

Ga= Absorbancia de glucosa con hidrólisis de “fructanasa”.

Gb= Absorbancia de glucosa sin hidrólisis de “fructanasa”.

6.3.6. Índice de absorción de agua (IAA)

Para este análisis se utilizó el método descrito por Anderson (1996). Se pesó 1 g de fructano liofilizado de las diferentes muestras dentro de un tubo de centrifuga y posteriormente se le añadió 5 mL de agua destilada, agitado mediante vortex durante un minuto, y centrifugado a 3000xg (4450rpm) durante 10 min. a 25 °C. Luego se descartó el sobrenadante y los tubos se drenaron sobre una toalla de papel durante un día para observar que no hubiera lixiviación, y se pesó la muestra. El IAA se expresó como el peso de “gel” obtenido sobre peso de gramo seco (g/g).

$$IAA = \frac{\text{gramos de peso humedo (gel)}}{\text{gramos de peso seco}}$$

6.3.7. Capacidad de absorción de aceite (CAA)

Se determinó la CAA por el método descrito por Beuchat (1977). Se pesó 1 g de fructano liofilizado dentro de un tubo de centrifuga y se adicionó 10 mL de aceite vegetal de canola (principalmente linoleico), agitando mediante vortex y centrifugado a 9000xg (9500rpm) durante 20 min. a 28 °C. Luego se descartó el sobrenadante y los tubos se drenan sobre una toalla de papel para quitar el exceso de las paredes del tubo y se dejó boca abajo durante un día para observar que no hubiera lixiviación, y posteriormente se pesó la muestra. La CAA fue expresada como el peso del aceite absorbido por gramo de muestra seca (g/g).

$$CAA = \frac{\text{gramos de aceite absorbido}}{\text{gramos de peso seco}}$$

6.4. ETAPA 2:

6.4.1. Evaluación in vivo del efecto prebiótico de los fructanos

Se trabajó con ratas Wistar machos, las cuales se sometieron a un periodo de adaptación de una semana en el bioterio del Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h cada uno, y con accesos libre a comida y agua.

Grupos experimentales: Se tuvieron ratas Wistar recién destetadas de aproximadamente de 3 semanas de edad con un peso de 30-50g para los experimentos.

Se tuvo una unidad experimental de un conjunto de tres ratas por triplicado, como se muestra en la tabla 6. El grupo uno “CSF” (control con dieta estándar sin fructanos), se le dio de comer el alimento habitual de las ratas el cual consta de una dieta estándar de 19.3% de proteína, 70% de carbohidratos, 3% de lípidos, con vitaminas y minerales. El consumo de alimento y agua fueron *ad libitum*.

Tabla 6. Grupos experimentales y tratamientos administrados a ratas Wistar

GRUPO	TRATAMIENTO
CSF	Control sin fructanos
FAD	Fructanos de ajo diferenciado
FBND	Fructanos de bulbos de ajo no diferenciado
FCB	Fructanos de cebolla blanca
IC	Inulina comercial

Al grupo dos, tres cuatro y cinco se les provino de una dieta con 4 % de fructanos. Para elaborar el alimento de la dieta rica en fructanos se preparó suplementando la dieta estándar del alimento común de las ratas con el 4% de los fructanos en cuestión. Se monitoreó la ingesta de alimento diariamente y el peso

corporal cada semana. Al final del experimento se sacrificaron a las ratas y se obtuvo el suero (a partir de sangre), el colon, el contenido colónico y el tejido adiposo. También se obtuvieron muestras de heces un día antes del ayuno y después del ayuno, antes de ser sacrificadas.

Sacrificio para obtener muestras de tejido: Las ratas se dejaron puestas en ayuno (12 hrs) y se sacrificaron utilizando éter etílico para anestesiadas. Se extrajo la sangre para obtener del suero y también se extrajo todo el tejido intestinal. Se puso cuidado especialmente en el corte del colon ascendente ya que es ahí donde se tienen poblaciones morfológicamente diferentes. Primeramente se obtuvo parte del contenido colónico y se colocó dentro un tubo eppendorf para congelarse con nitrógeno líquido. El tejido se fijó inmediatamente con buffer PBS (solución salina de fosfato), se procedió a hacer un exudado con ayuda de un escobillón (hisopo para exudado), el cual se colocó dentro un tubo eppendorf, y se congelaron con nitrógeno líquido; posteriormente se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Otra parte del colon y el tejido adiposo fueron lavados con solución salina 9% y se colocaron de manera independiente dentro de un tubo corning de 15 mL con solución de “formalina” (Formol 10%), finalmente se almacenaron a temperatura ambiente para posteriores análisis como se muestran en la Figura 16.

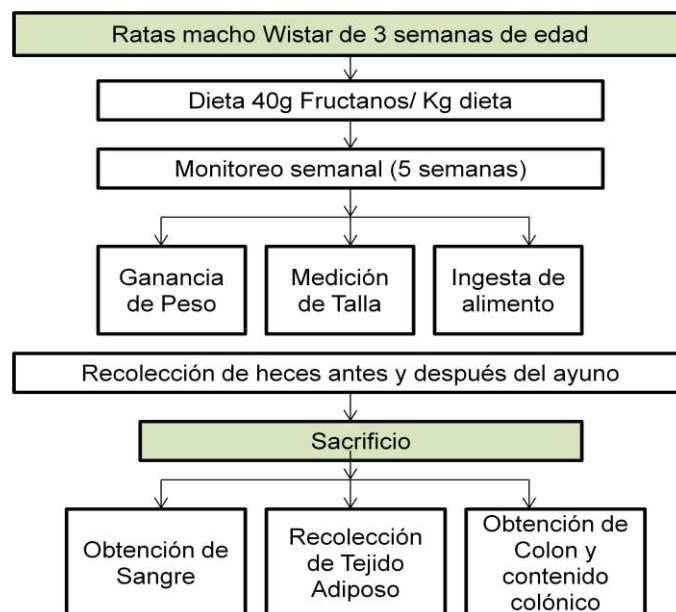


Figura 16. Esquema general de trabajo de los experimentos in vivo.

6.4.2. Determinación de la ganancia de peso

La ganancia de peso se determinó pesando las ratas cada semana, durante las cuatro semanas que se llevó a cabo el experimento. Cada rata era pesada individualmente en una balanza granataria. La ganancia de peso se reportó como la diferencia de peso ganado respecto al peso inicial de la rata en el experimento.

$$\textit{Ganancia de peso (g)} = \textit{Peso semana actual} - \textit{Peso semana inicial}$$

6.4.3. Monitoreo de la ingesta de alimento

El monitoreo de la ingesta de alimento se llevó a cabo diariamente. El alimento de las ratas se pesaba antes de colocar el recipiente en la jaula y al día siguiente se pesaba lo que restaba de alimento en el recipiente, sustrayendo los valores y dividiendo el resultado entre tres por la unidad experimental con la que se trabajó para obtener un dato aproximado del consumo individual de las ratas.

$$\textit{Consumo diario (g)} = \frac{\textit{peso inicial alimento} - \textit{peso final alimento}}{3}$$

6.4.4. Determinación de talla

La talla de las ratas se determinó hasta el final del experimento, midiendo su circunferencia (alrededor de la zona abdominal) y la longitud (de la base de la cola hasta la punta del hocico) con ayuda de una cinta métrica, para observar si hubo cambios en estos parámetros con respecto a los tratamientos.

6.4.5. Determinación de glucosa

Se determinó la glucosa presente en el suero obtenido de las muestras de sangre por medio del kit “Glucose-LQ” Spinreact®.

El principio se basa en la medición del peróxido de hidrógeno obtenido de la oxidación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa. En este ensayo a intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra analizada.

Reacción: En una placa del lector de Elisa se colocaron 2.5 µL de muestra de suero dentro de cada uno de los pozos de la placa, luego se colocaron 2.5 µL de la solución patrón (solución estándar de glucosa 100 mg/mL) en 3 pozos de la placa. Por último se agregaron 250 µL de la solución “R” (enzimas glucosa-oxidasa/peroxidasa) sobre todos los pozos que contienen al patrón y las muestras; el blanco fue solo agua (3 pozos mas). La placa se incubó durante 10 minutos a 37 °C, y se determinó la absorbancia a 505 nm en el lector de Elisa. LA concentración de glucosa se calculó con la siguiente ecuación:

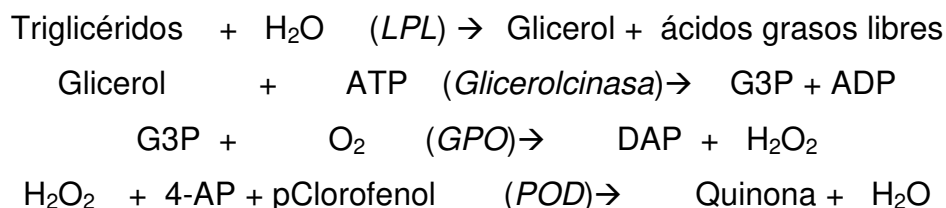
$$\text{Concentración (mg/dL Glu)} = \frac{\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco}}{\text{Abs. Estandar} - \text{Abs. Blanco}} \times 200$$

6.4.6. Determinación de triglicéridos

La presencia de triglicéridos en muestras de suero de la sangre se determinó por medio del kit “Triglycerides-LQ” Spinreact®.

Los triglicéridos de una muestra incubada con la enzima lipoproteinlipasa (LPL), libera glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol se convierte en glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP) por la acción de la enzima glicerol quinasa en presencia

de ATP. El glicerol-3-fosfato (G3P) es entonces convertido por la enzima fosfato deshidrogenasa de glicerol (GPO) a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En la última reacción, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AP) y *p*-clorofenol en presencia de la enzima peroxidasa (POD) para dar un tinte color rojo debido a la formación de quinona; la intensidad del color formado es proporcional a los triglicéridos presentes en la muestra. Las reacciones se muestran a continuación:



En una placa del lector de Elisa se colocaron 2.5 µL de muestra de suero dentro de cada uno de los pozos de la misma, luego se colocaron 2.5 µL de la solución patrón (solución acuosa de triglicéridos 200 mg/dL) en 3 pozos de la placa. Por último se agregaron 250 µL de la solución “R” (enzimas lipoproteinlipasa/ glicerolcinasa/glicerol fosfato deshidrogenasa) sobre todos los pozos que contienen al patrón y las muestras incluyendo 3 pozos mas para cálculo del blanco. La placa se incubó durante 5 minutos a 37 °C, y la absorbancia fue leída a 505 nm en el lector de Elisa. La concentración de los triglicéridos se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/dL TG)} = \frac{\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco}}{\text{Abs. Patrón}} \times 100$$

6.4.4. Extracción de ADN

El ADN se extrajo por medio del kit “PowerSoil® DNA Isolation kit”, de las muestras del exudado del colon.

El principio de este método se basa en la ruptura de las células para poder precipitar y purificar el ADN contenido en estas.

Para provocar la ruptura de las células se colocaron 0.25 g de muestra procedente de los hisopos en los tubos “PowerBead” y se agitaron en vortex durante 10 segundos para mezclar, luego se mezclaron con 60 μ L de SDS (solución C1) y se agitaron nuevamente en el vortex de manera vertical durante 10 minutos. Luego los tubos fueron centrifugados a 10,000xg (11,000 rpm) durante 30 segundos a temperatura ambiente y se recuperaron 400 μ L del sobrenadante. El sobrenadante se colocó en tubos eppendorf de 2 mL a los cuales se les agregó 250 μ L de Inhibidor (solución C2), se centrifugaron los tubos nuevamente a temperatura ambiente a 10,000xg (11,000 rpm), y luego se transfirieron 600 μ L del sobrenadante se transfirieron a un tubo de 2 mL. Los tubos se incubaron durante 5 minutos a 4 °C y se les agregaron 200 μ L de solución C3 y se incubaron nuevamente durante 5 minutos a 4 °C. Luego de la incubación se tomaron 750 μ L del sobrenadante y se colocaron en un tubo de 2 mL. Se agregaron 1.2 mL de la solución C4 y se mezclaron en vortex durante 5 segundos. Se cargaron 675 μ L en un “Filtro Spin” y se centrifugaron durante 1 minuto a 10,000xg (11,000 rpm) a temperatura ambiente. Se añadieron 675 μ L más de sobrenadante y se centrifugaron durante 1 minuto a 10,000xg (11,000 rpm) a temperatura ambiente; este último paso se repitió una vez más, para la obtención un total de tres cargas.

Para la purificación del ADN se añadieron 500 μ L de la solución C5 (etanol) a los tubos y se centrifugaron durante 30 segundos a 10,000xg (11,000 rpm) a temperatura ambiente, se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar durante 1 minuto a 10,000xg (11,000 rpm) a temperatura ambiente. Se transfirió el “filtro spin” a un tubo de 2 mL y

se agregaron 100 μ L de de la solución C6 en el centro del filtro de membrana blanca, centrifugar durante 30 segundos a 10,000xg (11,000 rpm) a temperatura ambiente, el “filtro spin” fue descartado y al final se obtuvieron 100 μ L de ADN, el cual se congeló a -70 °C para su posterior análisis.

La concentración de ADN fue cuantificada en NanoDrop, donde se tomaron 3 μ L de muestra y se colocaron sobre el lector del NanoDrop y se determinó la concentración de ADN presente en cada muestra. También se observó la integridad del ADN mediante un gel de integridad.

Para la preparación del gel se calentó hasta ebullición 0.35 g de agarosa en polvo y 350 mL de buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Se dejó enfriar hasta 60°C, esta solución se vertió sobre la placa previa colocación de un “peine” de teflón para generar los pocillos en el gel, el gel se dejó enfriar hasta que solidificó.

En cada pocillo, se colocaron 3 μ L de la muestra correspondiente (ADN) y se mezcló junto con 3 μ L de "buffer de carga 6x" (0.25% xilencianol, 0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol). De igual manera en el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular Thermo® de 10000 pb.

El gel se colocó el gel en la cámara de electroforesis, se adicionó el buffer TAE en la cámara hasta cubrir el gel. Las muestras se cargaron de forma individual en cada pocillo con una micropipeta en el orden de numeración de los tubos. Se colocaron los electrodos a la fuente de poder y se fijó el voltaje en 85 V. La electroforesis se dejó migrar aproximadamente 25 min; y finalmente se observó el gel sobre un transiluminador de luz UV usando la protección adecuada.

6.4.5. Determinación de la densidad microbiana de la familia *Lachnospiraceae* mediante tecnología PCR y qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*), es una técnica de biología molecular. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN y poder identificar con una muy alta probabilidad la presencia de ADN amplificado. Por otro lado la PCR cuantitativa (en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR) o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN (Barlett y Stirling, 2003).

La presencia de bacterias de la familia *Lachnospiraceae* en las muestras, se determinó a través de un ensayo de PCR para observar dicha presencia. El primer utilizado era específico para la región 16S rRNA de los genes de la familia *Lachnospiraceae*. Para la secuenciación de la mezcla de reactivos fue un master mix que consistía en: 1.7 µL de 10xBuffer, 0.34 µL de 10mM dNTP, 0.68 µL Primer F, 0.68 µL Primer R, 0.085 µL Taq, 1.36 25mM MgCl₂, 10.155 µL de H₂O y 2 µL de la muestra de ADN. El qPCR se realizó con equipo termociclador Rotor Gene de Qiagen.

- Primer F (forward): 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCAA-3'.
- Primer R (reverse): 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'.

El programa de amplificación consistió en una etapa de desnaturalización a 94 °C por 3 mins., seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 35 s., una hibridación de 55 °C por 30 s. y una extensión a 72 °C por 30 s, y finalmente una extensión final de 72 °C por 5 mins.

Para determinación la concentración de ADN de las muestras, se desarrolló un ensayo qPCR basado en la amplificación de la subunidad que codifica al gen para las bacterias de la familia *Lachnospiraceae*.

Se extrajo ADN genómico para ser usado como modelo para la amplificación y cuantificación (ng de ADN/ μL) de bacterias totales usando tecnología PCR SYBR green (Nava *et al.*, 2011). La mezcla de reactivos para qPCR fue un master mix que consistía en: 8.5 μL de SYBR green, 0.68 μL Primer F, 0.68 μL Primer R, 1.7 μL de BSA y 5.64 μL de Agua DPC; y se mezcló con 1.5 μL de ADN de las muestras. El programa de amplificación consistió en una etapa de desnaturalización a 94 °C por 3 mins., seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 35 s., una hibridación de 55 °C por 30 s. y una extensión a 72 °C por 30 s, y finalmente una extensión de 72 °C por 5 mins.

Primero se realizó una curva de calibración con ADN extraído del contenido colónico de las ratas, donde se partió de una concentración conocida de ADN y se diluyó para poder observar hasta que concentración se podía amplificar el gen de la familia *Lachnospiraceae*. Una vez hecha la curva de calibración todas las muestras se estandarizaron a una concentración 1 ng/ μL diluyendo las muestras en agua DPC.

6.5. Diseño y análisis estadístico

El experimento se estableció mediante un diseño unifactorial completamente al azar y el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la ayuda del programa estadístico JMP 10.0® haciendo un análisis de varianza y una comparación de medias por el método de Tukey ($p=0.05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. ETAPA 1:

7.1.1. Extracción de Fructanos

En un principio para la extracción de fructanos se realizó un experimento preliminar donde se observó que el rendimiento obtenido era bajo (17.62%) con lo reportado (80%) (Chandrashekar *et al.*, 2011), como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento en la extracción de fructanos de ajo diferenciado.

Extracción de Fructanos de Ajo	
Peso inicial (g)	10.00±0.01
Peso seco (g)	1.76±0.26
Rendimiento (%)	17.62±2.57

Además se cuantificaron los carbohidratos totales presentes en el residuo que queda de la extracción para observar si este aun contenía carbohidratos por extraer, por lo que se procedió a modificar el procedimiento descrito en la metodología.

Para obtener un mayor rendimiento en la extracción de fructanos el procedimiento se modifico ligeramente (Figura 17), se realizaron dos filtraciones más, disminuyendo el volumen de agua destilada utilizada en los calentamientos. Posteriormente aprovechando el bajo punto de fusión del etanol (-114 °C) una vez agregado a la solución, se almacenó el filtrado durante una noche (aproximadamente 12 hrs) en el congelador (-20 °C) para favorecer la precipitación de los fructanos.

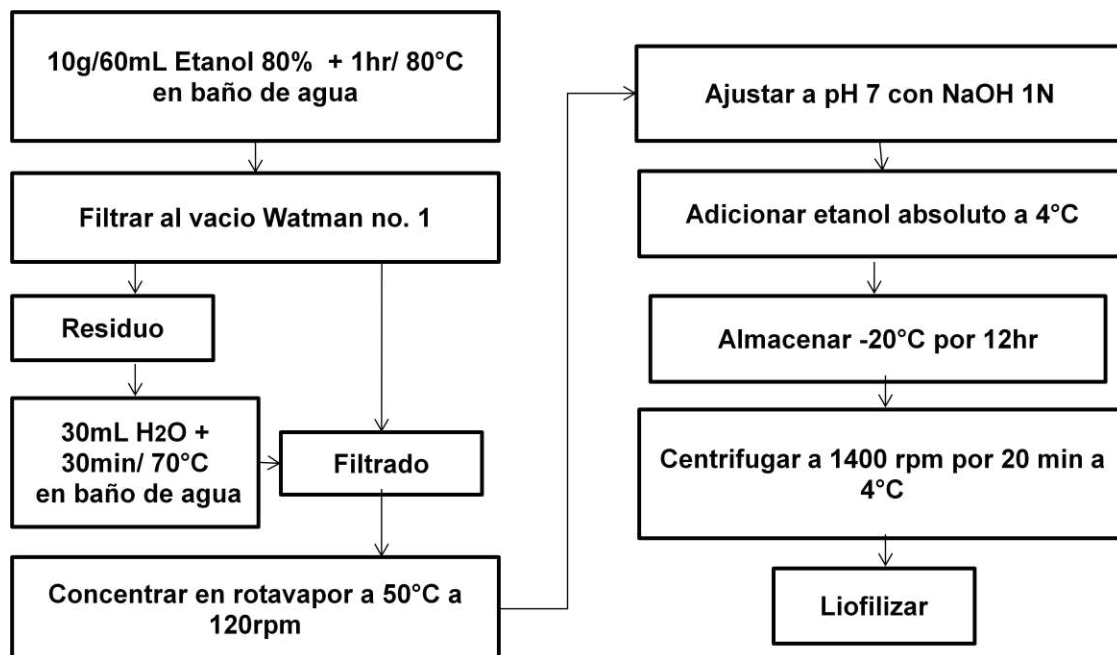


Figura 17. Esquema general de extracción de fructanos.

Los rendimientos que se obtuvieron de la extracción de fructanos de cada una de las muestras analizadas se detallan en la Tabla 8. El menor contenido de fructanos lo presenta la cebolla blanca con 25.86%, mientras que el mayor contenido lo presentaron los fructanos del ajo diferenciado con valores de 76.24%; los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado (FBND) presentaron 71.13%. Estos resultados coinciden con los reportados por Darbyshire y Henry en 1978, quienes indicaron que la cebolla contiene 25% de fructanos de bajo peso molecular. Por su parte Chandrashekar *et al.*, 2011 han reportado un contenido de más de 80% de fructanos en bulbos de ajo.

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento en la extracción de fructanos.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
Cebolla (FCB)	10.0	2.59±0.10 ^c	25.86±0.97 ^c
Ajo no diferenciado (FBND)	10.0	7.13±0.15 ^b	71.13±1.53 ^b
Ajo diferenciado (FAD)	10.0	7.64±0.15 ^a	76.24±1.43 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

A pesar de que los contenidos de fructanos en AD y BND son estadísticamente diferentes; los valores son muy similares (76.24 y 71.13, respectivamente); y sin embargo la forma de los bulbos es marcadamente diferente, como se muestra en la Figura 18.



Figura 18. Diferencia morfológica de bulbos de ajo no diferenciado (izquierda) y de ajo diferenciado (derecha) en la cosecha 2013-2014.

Mientras que los AD presentan bulbillos bien formados, los BND no presentan dientes solo una serie de hojas concéntricas que dan un aspecto de cebolla al bulbo. Esta fisiopatía es un caso muy interesante que va desde la formación de una cabeza, con aspecto de bulbo tunicado, sin dientes, por freno de la evolución de la dormancia de una sola yema que es la que origina el bulbillo o ajo cebolla; a la formación de una cabeza con 2, 3 o más dientes rudimentarios. Las hojas protectoras externas se cargan de las sustancias de reserva (carbohidratos) asemejándose a las túnicas de la cebolla. Se ha reportado diversas causas a esta fisiopatía, entre ellas un fotoperiodo inferior al que necesita una variedad para formar el bulbo en el periodo de bulbificación, suelos húmedos con exceso de nutrientes, la inhibición de yemas por períodos de calor o frío u otras causas en el inicio de la bulbificación o incluso la acción de los virus al reducir el crecimiento (Espinosa *et al*, 2003). Este problema representa entre el 30 y 50% de pérdidas poscosecha, lo cual se refleja en una enorme pérdida económica. El hecho de

que los BND tengan similar contenido de fructanos muestra que estos materiales sin valor comercial pueden aprovecharse para obtener fructanos con buenos rendimientos.

7.1.2 Cromatografía en capa fina (TLC)

Las estructuras de fructanos se han elucidado con técnicas analíticas que separan y/o identifican los diferentes isómeros. La cromatografía en papel y en capa fina (TLC), fueron las primeras técnicas usadas en la identificación de fructanos. Dependiendo de la fase estacionaria (generalmente sílica gel) y el sistema de eluyentes, pueden resolverse fructo-oligosacáridos (FOS) hasta de 14 unidades de monosacáridos. La técnica de TLC fue de las primeras usadas en la caracterización de fructanos y está aún en uso, pues aunque con menor resolución, da información cualitativa semejante a sistemas cromatográficos de alta resolución, además de ofrecer la ventaja de ser un método sencillo, barato y rápido.

Una vez que los fructanos se extrajeron, se preparó una solución de 1 g/10 mL de agua de cada uno de ellos, para ser analizados por TLC con la finalidad de visualizar sus diferencias en el perfil del grado de polimerización (DP) (Figura 18). Estas observaciones se basaron según la intensidad de la mancha desde el origen de la aplicación de la muestra hasta el frente del solvente. Para este ensayo se incluyó la inulina comercial (IC). En una primera aproximación el corrimiento en la TLC de la IC mostro una mayor proporción de fructanos con alto DP comparados con los fructanos de las otras especies. Los fructanos de AD y los de BND mostraron un DP intermedio siendo mayor para los AD; mientras que los fructanos de BND presentan un rango de DP muy amplio pero más pequeño que AD. Por su parte la CB presento el DP más bajo.

El valor de R_f es una manera de expresar la posición de un compuesto sobre la placa cromatográfica y mide la retención del componente en la fase estacionaria. Según la distancia en la que quede cada mancha, se determina la mitad de la misma y se obtiene el valor de R_f , relacionando la distancia recorrida por solvente y la distancia

en el centro de cada mancha. Los estándares usados; glucosa (G), fructosa (F) y sacarosa (S) presentaron un valor de R_f similares de 0.7; aunque presentan diferente coloración e intensidad de la mancha; kestosa al tener mayor peso que G, F y S presenta un R_f de 0.65. Las muestras de IC y FAD fueron los fructanos que presentaron una mayor retención ya que se situaron en la parte inferior de la placa teniendo un R_f promedio de 0.25, indicando que son componentes pesados por su alto DP; la muestra de FBND se situó en la parte intermedia de la placa con un R_f promedio de 0.35, demostrando que los fructanos de esta fuente tienen un DP más bajo que las muestras de IC y FAD; finalmente la muestra de CB que obtuvo un $R_f=0.68$, intermedio entre el estándar de sacarosa y kestosa, demostrando un bajo DP como se puede observar en la Figura 19. Análisis similares se han llevado a cabo para demostrar la retención de componentes como lo realizó Urias-Silvas, 2008, o el peso molecular de fructanos como lo realizaron Reiffová y Nemcová, 2006.

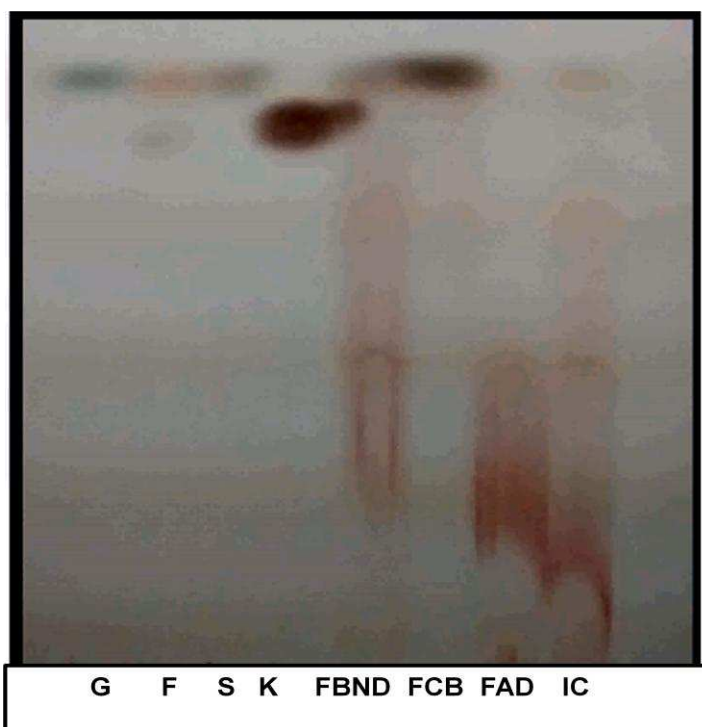


Figura 19. Cromatografía en Capa Fina de los fructanos de bulbos no diferenciados (FBND), de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB) e inulina comercial (IC) con estándares de Glucosa (Gluc), Fructosa (Fru), Sacarosa (Suc) y Kestosa (Kes).

A pesar de que el contenido de fructanos es similar entre los bulbos Ad y los BND se puede evidenciar en la TLC que los fructanos de AD corresponden a carbohidratos de mayor tamaño o con una mayor DP, mientras que los fructanos BND tienen un peso menor o menor DP que los de los ajos diferenciados.

7.1.3 Determinación de azúcares reductores y de sacarosa

Los resultados obtenidos de esta parte del experimento evidencian que las muestras provenientes de las diferentes fuentes de fructanos mostraron un contenido similar de azúcares reductores “AR” expresados como porcentaje fructosa, siendo FCB el que mostró un mayor contenido (4.82 ± 1.14 %). El porcentaje de azúcares reductores o sacarosa se obtuvo por la diferencia del total de carbohidratos “base 100” menos el porcentaje de fructanos y el porcentaje de AR. El mayor contenido de sacarosa fue FCB (75.79 ± 0.67 %); mientras que IC presentó el menor contenido (1.41 ± 0.5 %). La concentración de sacarosa en las muestras de ajo fueron estadísticamente diferentes en FAD se encontró 1.91 ± 3.15 % mientras que en FBND 12.85 ± 1.03 % (Figura 20). Guevara et al., 2015 reportó que la concentración de sacarosa está relacionada con la diferenciación de los bulbos, es decir, a mayor concentración de sacarosa menor es la diferenciación por la acumulación de carbohidratos, además el contenido de sacarosa de la cebolla puede sugerir el comportamiento en la morfología y formación del bulbo de ajo no diferenciado, sin embargo este mecanismo no es del todo claro (Pourtau *et al.*, 2006).

El contenido de los azúcares reductores (AR) puede estar asociado a la acción de la enzima Fructan exo-hidrolasa (FEH), que hacia el final del ciclo de desarrollo de la planta de ajo, comienza a hidrolizar los fructanos (Van den Ende *et al.*, 2002), dando como resultado moléculas de fructosas libres (AR), sin embargo, en este estudio, estos azúcares no presentaron tanta relevancia al no presentar una diferencia significativa entre el contenido de AD como en BND; tal como lo reportaron Guevara et al., 2015; para la sacarosa; estos autores no observaron cambios en el contenido de glucosa y

fructosa en bulbos durante el desarrollo de plantas de ajo pero si en sacarosa. El hecho de que no haya diferencias en el contenido de AR pero si en sacarosa indica que existe una interacción entre los azucares. Se puede observar que a mayor contenido de sacarosa la concentración de fructano es menor. La concentración de sacarosa en FCB es de 75.79 y de fructano de 22.32%; mientras que en FAD la sacarosa es de 1.91% y de fructanos de 96.65, por su parte en FBND es de 12.85% y sin embargo la concentración de fructanos es de 82.33%, lo cual sigue fructanos con un DP intermedio en estas muestras.

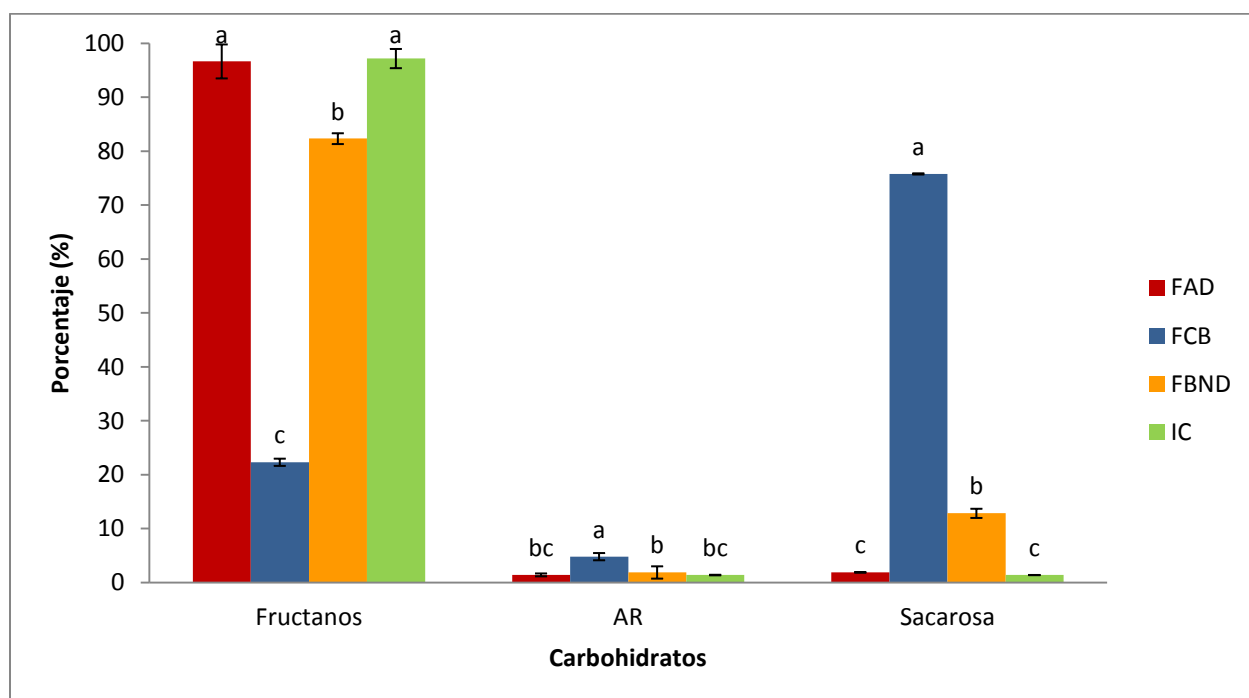


Figura 20. Gráfica de perfil de Carbohidratos en muestras de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB), ajo no diferenciado (FBND) e inulina comercial (IC). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

7.1.4. Cuantificación de fructanos

El contenido de fructanos en FAD es de 96.65 ± 3.15 % y fue similar al de IC con un valor de 97.18 ± 1.78 %; los FCB presentaron un contenido de 22.32 ± 0.67 % mientras que los FBND contenían un 82.33 ± 1.01 %; estos resultados se pueden observar en la Tabla 9. Las diferencias que se presentan entre las muestras de FAD y

FBND pueden estar relacionadas a la falta de horas frío durante su desarrollo que afecta la fotosíntesis y la capacidad de biosíntesis de fructanos, es decir, una menor disponibilidad del transporte de carbohidratos desde los pseudotallos a los órganos de reserva “bulbos” como lo reporta Dufoo *et al.*, 2013 y Guevara *et al.*, 2015. Por otro lado se sabe que la cebolla tiene una menor cantidad de fructanos, no mayor a 25% en peso seco, como lo reportó Darbyshire y Henry en 1978. Lorenzo-Manzanarez en el 2015 reportó que al final del desarrollo de la planta de ajo, los fructanos procedentes del bulbo de plantas con semilla almacenada a 5 °C presentaban un contenido de 91.95%.

Tabla 9. Perfil de carbohidratos.

Muestra	%Fructanos	%AR	%Sacarosa
FAD	96.65±3.15 ^a	1.44±0.27 ^{bc}	1.91±3.15 ^c
FBND	82.33±1.00 ^b	1.89±0.67 ^b	12.85±1.00 ^b
FCB	22.32±0.67 ^c	4.82±1.14 ^a	75.79±0.67 ^a
IC	97.18±1.75 ^a	1.41±0.5 ^{bc}	1.41±1.78 ^c

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05) por la prueba de Tukey.

Portela en 2005, indica que el fenómeno del ajo no diferenciado, puede estar sujeto al clima, esencialmente a las variaciones de temperatura que hay de año en año. Las horas frío por debajo de los 5 °C que se juntaron durante el ciclo de desarrollo que abarco la cosecha 2013-2014 fue de solo 358 hrs, las cuales fueron insuficientes para inducir la diferenciación como lo indicó López-Hernández, 2010; y por lo tanto hubo una mayor incidencia de este defecto. Por lo tanto, los fructanos al ser carbohidratos de reserva y sintetizados a partir del estrés por frío, la planta de ajo al no ser favorecida por las condiciones climática resulta en plantas de ajo no diferenciado con un menor contenido de fructanos. No obstante aun no se sabe porque este fenómeno solo afecta a ciertas plantas dentro del cultivo, ya que plantas dentro del mismo cultivo, logran formar bulbo y diferenciarse sin ningún tipo de inconveniente.

7.1.5. Grado de polimerización (DP)

El DP varió considerablemente desde 2 ± 0.20 para FCB hasta 23 ± 0.99 para IC; el DP para FBND fue significativamente menor con un valor promedio de 8 ± 0.74 que el de FAD con un valor de 13 ± 1.21 (Figura 21), estos resultados fueron visualizados en la placa de TLC (Figura 19). Aunque varios autores a través del tiempo han reportado distintos DP para el ajo; Baumgartner *et al.* en el 2000 reportó un grado máximo de polimerización de hasta 58 en la tercera etapa del cultivo, no obstante este grado decrece cuando el ciclo de cultivo llega a su fin, sin embargo el autor no reporta el DP de los fructanos del ajo cuando ya está curado, es decir apto para su consumo (Figura 12). Más adelante Muir *et al.* en el 2007 reportó un grado de polimerización de 10 en ajos listo para su consumo sin embargo no menciona la variedad del ajo. Finalmente el estudio reportado en el 2011 por Chandrashekar *et al.* indicó un DP de 38 para el ajo. Este grado de polimerización puede disminuir debido a la enzima FEH que depolimeriza el fructano. Por otra parte Guevara *et al.*, 2015 reportaron que en plantas provenientes de semillas almacenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hay una sobreexpresión del gen que codifica a la enzima 1-SST, esto podría sugerir el comportamiento del DP de los fructanos provenientes de BND en comparación de los AD, ya que las plantas que provenientes de semillas almacenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ al tener más horas de frío que no obtuvieron en campo, pudieron cubrir esa necesidad y no presentar la morfología de BND, por acción de la enzima 1-SST que interviene en la biosíntesis de fructanos que aumenta su DP

Darbyshire y Henry también reportaron grados de polimerización distintos en capas de cebolla, sin embargo estos no eran mayores a 5 y se hacían más grandes al llegar al centro de la cebolla. Por otro lado se sabe que los fructanos de provenientes de agave (inulina comercial) presentan un grado de polimerización de 25 como lo reporta Montañez *et al.*, 2011.

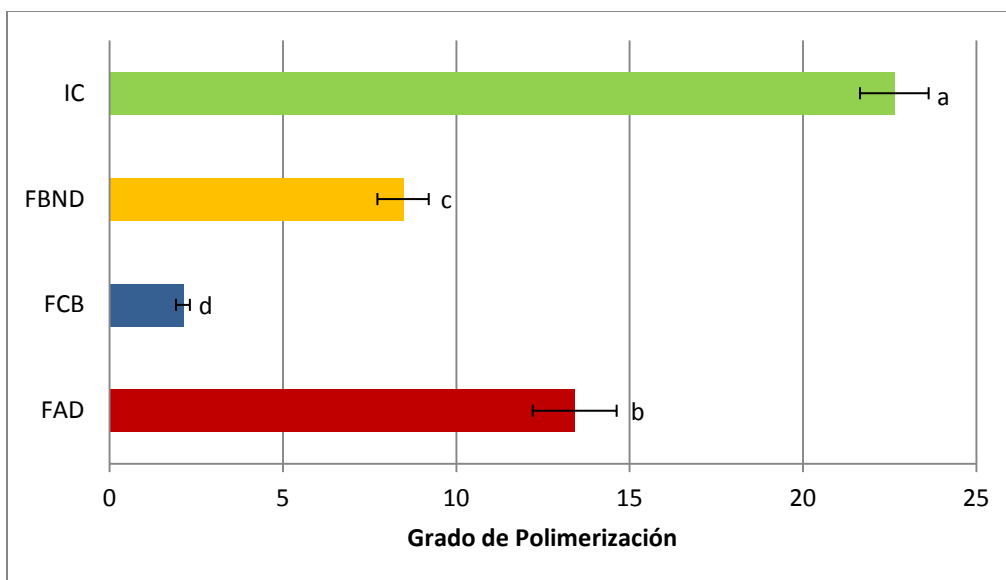


Figura 21. Gráfica de grado de polimerización de muestras de ajo diferenciado (FAD), cebolla blanca (FCB), ajo no diferenciado (FBND) e inulina comercial (IC). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Cabe resaltar que no hay estudios que hagan referencia a los ajos no diferenciados que nos permitan comparar los valores obtenidos en este estudio, no obstante Portela, 2005, elucidó una posible teoría que el clima (temperatura) afecta la biosíntesis de fructanos impidiendo la diferenciación; y se pudo corroborar esta teoría.

7.1.6. Índice de absorción de agua (IAA)

En la Tabla 10 se reportan los valores promedios de tres repeticiones del índice de absorción de agua (IAA) de las muestras de fructanos de ajo, de cebolla e inulina. Los fructanos provenientes de AD e IC tiene los mayores valores de IAA; 3.14 ± 0.87 y 3.13 ± 0.09 g/g respectivamente, si se comparan con los valores encontrados en los fructanos de FBND los cuales presentaron un valor de IAA de 2.42 ± 0.20 g de agua/g de muestra seca Cabe destacar que los FCB con un IAA de 1.30 ± 0.24 no pudieron formar un gel consistente como los otros fructanos. La diferencia entre los valores que presentan las muestras puede ser debido a la interacción de los grupos OH^- de las moléculas de fructosas de los fructanos con las moléculas de agua, entre mayor sea el

contenido de fructanos mas grupos OH⁻ y por ende mayor IAA como lo muestran los resultados. No hay reportes a cerca de estos valores en inulina y mucho menos para fructanos; sin embargo, hay otro tipo de carbohidratos como almidones que reportan IAA promedio de 3.14 g agua/ g de muestra (Reyes *et al.*, 2009). Estos almidones se dispersan fácilmente en agua fría para formar suspensiones moderadamente estables y pueden ser utilizados principalmente en purés de frutas y papas, alimentos infantiles, mezclas de sopas secas y como adhesivos en la industria textil (Bonazzi *et al.* 1996). La similitud entre los valores de fructanos de ajo e inulina con los reportados en los almidones sugiere que los fructanos de ajo pueden ser utilizados como sustitutos de almidón sin aportar calorías.

Tabla 10. Índice de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite.

Muestra	IAA (g/g)	CAA (g/g)
IC	3.13±0.09 ^a	3.19±0.04 ^a
FCB	1.30±0.24 ^c	1.65±0.09 ^c
FAD	3.14±0.87 ^a	2.54±0.15 ^b
FBND	2.42±0.20 ^b	2.50±0.07 ^b

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05) por la prueba de Tukey.

Se dejaron 24 hrs en posición invertida en los tubos donde se realizó la prueba de IAA para observar la posible lixiviación, esta se presentó solo en los FCB, mientras que los FAD, FBND e IC formaron geles con textura untuosa. Figura 22.

Para la producción industrial de alimentos bajos en grasas, el IAA es un factor importante para este tipo de ingredientes. La humedad de los ingredientes influye en las propiedades de la textura en productos elaborados. Se ha reportado que los carbohidratos y fibras que logran absorber agua por arriba del doble de su peso seco pueden formar geles, conferir textura y ser utilizados con sustitutos de grasa (Ballabriga y Carrascosa, 2011). Por lo que los valores de IAA de FAD y FBND sugieren que tienen una buena capacidad y pueden ser utilizados como ingredientes dentro de la industria alimentaria.



Figura 22. Geles de fructanos de FBND retenidos en tubos en posición invertida después de 24 hrs de reposo derivados del índice de absorción de agua (IAA) y capacidad de absorción de aceite (CAA).

7.1.7 Capacidad de absorción de aceite (CAA)

La capacidad de absorción de aceite es importante en la tecnología de alimentos para productos congelados pre-cocidos listos para freír, en galletas y en algunos alimentos a base de cereales, además pueden mejorar el sabor y textura de los alimentos (Ramírez y Pacheco, 2009). Los valores de CAA para FAD y FBND fue de 2.54 ± 0.15 y 2.50 ± 0.07 g de aceite/g de muestra seca respectivamente, mientras que el valor para IC fue mayor; 3.19 ± 0.04 g/g; por su parte, los fructanos de FCB presentaron el menor valor (1.65 ± 0.09) y no pudieron formar un gel con aceite. Los valores de CAA de los fructanos de ajo se encuentran por arriba de los reportados por Mbofung *et al.* (2006), (1.74 a 1.86 g aceite/g muestra) en harinas de seis variedades de malanga cultivadas en Camerún y por Tagodoe y Nip (1994), 1.9 g aceite /g muestra en harina de origen Hawaiano. Los tubos después de 24 hrs de reposo en posición invertida no presentaron lixiviación del aceite, Figura 22, a excepción de FCB. No hay reportes de la CAA en fructanos sin embargo en otro tipo de carbohidratos como en almidones

reportan valores de 1.9 g de aceite / g de muestra seca como lo reporta Ramirez *et al.*, 2014. Este fenómeno aunque se denomina absorción tiene que ver más con la adsorción ya que los lípidos no pueden interaccionar con los grupos *OH* de las fructosas de los fructanos, no obstante el DP de los fructanos puede ayudar a atrapar el aceite y lo podemos corroborar con los resultados de la Tabla 10 relacionando que entre un mayor DP hay una mayor valor de CAA.

Cuando los fructanos se combinan con el agua u otros agentes líquidos (>25%) tienen propiedades de formar geles que mejoran la estabilidad de emulsiones en diferentes productos alimentarios. (Franck, 2006).

7.2. ETAPA 2:

7.2.1. Evaluación *in vivo* del efecto prebiótico de los fructanos

Para evaluar el efecto prebiótico de los fructanos de ajo se trabajó con ratas macho Wistar. Se preparó una dieta alta en fructanos (fibra soluble) para las ratas, moliendo los pellets del alimento habitual de las ratas con ayuda de un molino de alimentos, luego se combinó, aumentando el porcentaje de fibra en la dieta adicionando 4 % de fructanos como lo reporta Amaya *et al.*, 2015, con cada una de las muestras de fructanos; FAD, FCB, FBND e IC de manera independiente. El perfil de nutrientes del alimento estándar se reporta en la Tabla 11, y este fue modificado para agregar los fructanos como parte de la fibra presente en el alimento, aumentando este contenido hasta un 10 %. Cabe resaltar que no se han generado reportes de estudios *in vivo* con fructanos de ajo.

Tabla 11. Composición nutrimental del alimento para rata

Nutrientes	Alimento estándar	Alimento modificado
	g/100g	g/100g
Proteína	23	22.08
Lípidos	4.5	4.32
Fibra	6	9.6
Cenizas	8	7.68
Minerales	2.5	2.4
Carbohidratos	56	53.6

7.2.2 Determinación de la ganancia de peso

Cada semana se midió el peso de las ratas individualmente, y se observó que la ganancia de peso fue mayor en las ratas que consumían la dieta del alimento estándar que en las ratas que consumieron el alimento modificado rico en fructanos (Figura 23). Las ratas que consumieron los tratamientos presentaron un peso con un rango de peso saludable según las gráficas de crecimiento de Harlan Lab, 2009.

Durante el mes que duró el experimento, las ratas presentaron un desarrollo y crecimiento normal, no presentaron ningún tipo de enfermedad o efecto negativo por efecto de la dieta, esto se podía observar gracias al pelo permanecía liso, ya que cuando se enferman su pelo se vuelve seco y comienza a caerse (Harlan Lab, 2012). De igual manera las heces en todos los tratamientos se observaban iguales en color, forma y cantidad.

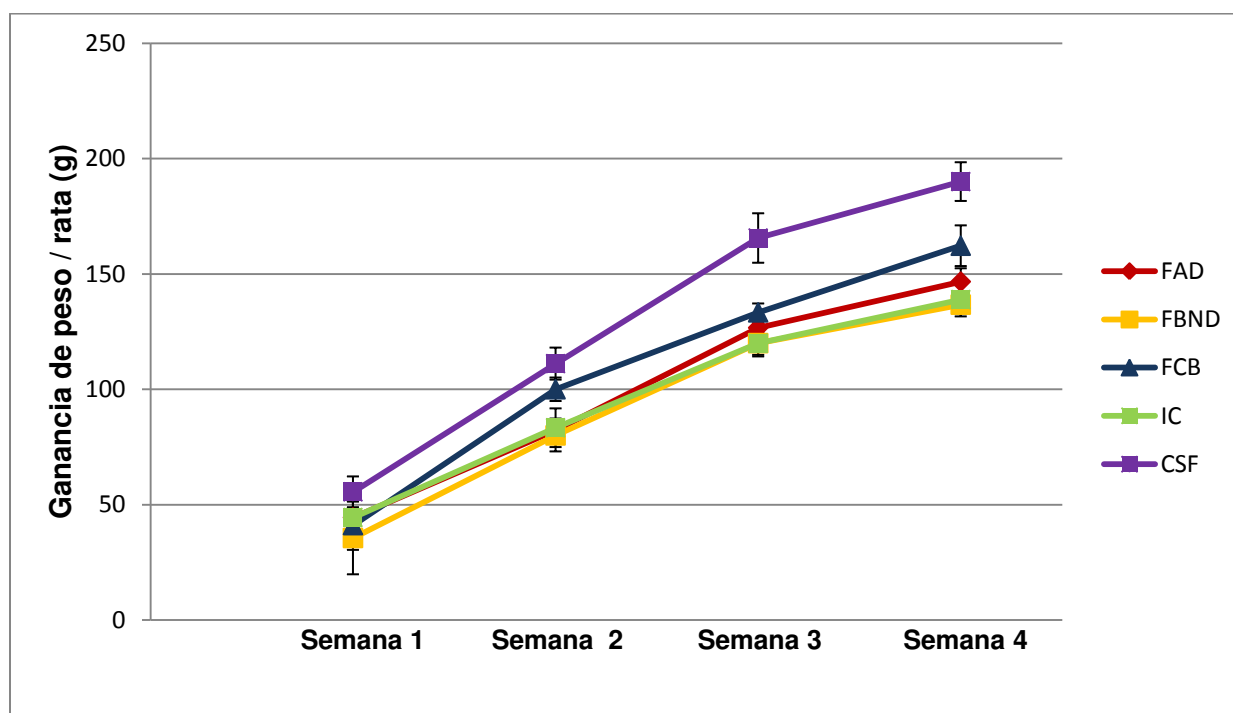


Figura 23. Gráfica de la ganancia de peso de los grupos experimentales de ratas con diferentes tratamientos, fructano de ajo diferenciado (FAD), fructano de cebolla blanca (FCB), fructano de ajo no diferenciado (FBND), inulina comercial (IC) y control sin fructanos (CSF).

En general, suplementar la dieta con fructanos disminuyó la ganancia de peso corporal de un 10-20 % al final del tratamiento, ya que las ratas control sin fructanos en su dieta (CSF) al final del experimento obtuvieron una ganancia de peso de 190.00 ± 8.82 g; en comparación con el grupo de ratas que consumió fructanos de cebolla CB ganó 162.22 ± 6.94 g, las ratas que consumieron fructanos FBND ganaron un peso de 136.67 ± 9.62 g, muy parecido al peso que ganaron las ratas con los

tratamientos de ajo FAD, 146.66 ± 6.67 g, e IC, 138.89 ± 1.92 g. Durante el experimento, cada semana, se observó que las ratas CSF siempre ganaban más peso que cualquiera de los otros tratamientos, solo habiendo diferencias entre los tratamientos hasta la última semana del experimento, como se muestra en la Tabla 12. Estos resultados indican que una dieta alta en fructanos ayuda a disminuir la ganancia de peso corporal como lo reportó Sáyago *et al.* en el 2014 con una dieta suplementada al 10% con fructanos de agave, disminuyendo la ganancia de peso en un 10% en ratas macho Wistar. Además podemos relacionar estos resultados con el DP y el contenido de fructanos en cada una de las muestras, entre mayor su DP y contenido de fructanos mayor es la disminución en la ganancia de peso.

Tabla 12. Ganancia de peso de los grupos experimentales

Ganancia de peso/ rata(g)				
Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
FAD	44.44 ± 5.09^b	82.22 ± 1.92^b	126.66 ± 5.77^b	146.66 ± 6.67^c
FBND	35.55 ± 6.94^b	80.00 ± 5.77^b	120.00 ± 5.09^b	136.67 ± 9.62^c
FCB	41.11 ± 5.09^b	100.00 ± 3.85^a	133.33 ± 8.82^b	162.22 ± 6.94^b
IC	44.44 ± 8.39^b	83.33 ± 5.09^b	120.00 ± 3.33^b	138.89 ± 1.92^c
CSF	55.55 ± 6.94^b	111.11 ± 10.72^a	165.55 ± 8.39^a	190.00 ± 8.82^a

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

La disminución en la ganancia de peso se puede atribuir al bajo nivel calórico que tienen los fructanos (1.5 kcal/g), así como también se reporta que la adición de fibras en la dieta disminuye la digestibilidad de los nutrientes como los lípidos (Kristensen *et al.*, 2013), que se puede asumir por la capacidad de absorción de aceite (CAA) que presentaron los fructanos. También está reportado que ralentiza la ingesta de nutrientes y estimula la hormona gastrointestinal Colecistoquinina (CKK) y el péptido YY que estimulan el organismo para suprimir el apetito y dar sensación de saciedad (Ye *et al.*, 2015); lo cual se pudo corroborar con el monitoreo de la ingesta de alimento, donde podemos atribuir que la disminución en la ganancia de peso puede ser a que las ratas consumieron menos alimento por acción de la adición de fructanos en su dieta.

7.2.3. Monitoreo de la ingesta de alimento

En cuanto a la ingesta del alimento esta fue disminuyendo en las ratas que consumieron una dieta alta en fructanos, mostrando una diferencia estadística significativa con la dieta CSF, no obstante no se observó diferencia entre los tratamientos (Figura 24).

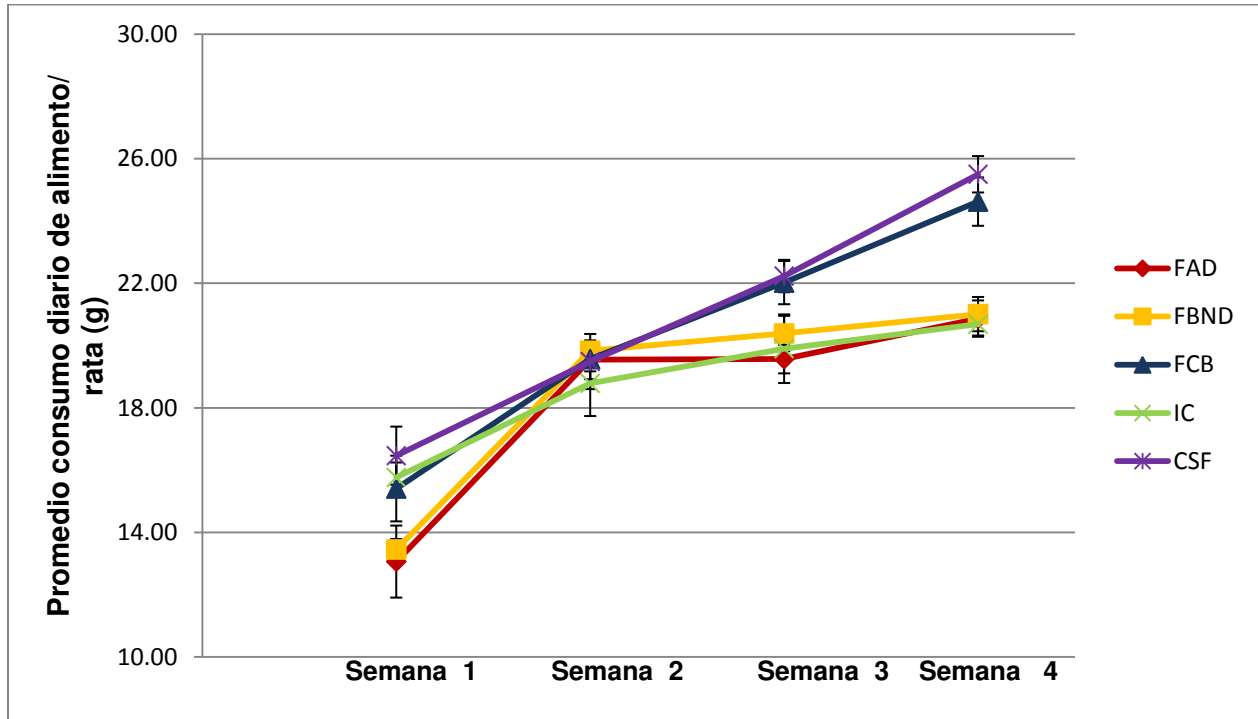


Figura 24. Gráfica Ingesta de alimento con diferentes tratamientos, fructanos de ajo diferenciado (FAD), fructanos de cebolla blanca (FCB), fructanos de ajo no diferenciado (FBND), inulina comercial (IC) y control sin fructanos (CSF).

A partir de los datos obtenidos, desde la primera semana que las ratas consumieron los tratamientos se observó que comían alrededor de un 10 % menos que las ratas que consumían su dieta libre de fructanos. Al finalizar el experimento las ratas del grupo control (CSF) consumían en promedio 25.59 ± 0.58 g de alimento por rata aproximadamente, mientras que las ratas del grupo FBND consumían 21.01 ± 0.55 g de alimento, muy parecido al grupo IC que consumían 20.69 ± 0.37 g de alimento. Desde el comienzo de la administración de la dieta al finalizar la primer semana se observó una

disminución en el consumo de las ratas con tratamiento a excepción del grupo FCB, y estos consumos se mantuvieron de igual manera a lo largo de las 4 semanas, aumentando el consumo de semana a semana al tratarse de ratas en crecimiento, pero sin diferencia entre los tratamientos, como lo podemos observar en la Tabla 13. Por lo que la teoría de que los fructanos al ser considerados parte de la fibra soluble estimulan la hormona CKK y el péptido YY, causando saciedad pudo evidenciarse ya que las ratas comieran menos, y por ende no aumentarían tanto de peso.

Tabla 13. Ingesta de alimentos de los grupos experimentales

Consumo diario aproximado (g de alimento) / rata				
Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
FAD	13.07±1.16 ^b	19.54±0.62 ^a	19.57±0.46 ^a	20.87±0.58 ^a
FBND	13.46±0.34 ^b	19.83±0.29 ^a	20.39±0.57 ^a	21.01±0.55 ^a
FCB	15.41±1.05 ^a	19.57±0.39 ^a	22.02±0.69 ^b	24.62±0.78 ^b
IC	15.77±0.48 ^a	18.79±1.05 ^b	19.90±1.10 ^a	20.69±0.37 ^a
CSF	16.47±0.93 ^a	19.49±0.89 ^a	22.23±0.52 ^b	25.59±0.58 ^b

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05) por la prueba de Tukey.

Trommer *et al.*, 2010, reportaron que en ratas macho Wistar al final de experimento (33d) hubo un menor consumo de alimento (432.5±32.7 g/33d) suplementado con raftilosa (DP=4) proveniente de la hidrólisis enzimática de los fructanos (inulina) de chicoria, que con su alimento habitual, 481.9±39.9 g/33d, que también presentaron una menor ganancia de peso; sin afectar la absorción de minerales que buscaban en el estudio no se vio afectado por el bajo consumo de alimento. Los carbohidratos una vez dentro del intestino aumenta la presión osmótica resultando un mayor flujo de agua en el intestino, causando un menor consumo de alimento como lo asoció Krueger *et al.*, 2003 donde observó que suplementando la dieta de ratas con fructanos provenientes de agave, el grado de polimerización (DP) influenciaba la ganancia de peso, es decir, un mayor DP de los fructanos disminuía la ganancia de peso de las ratas.

7.2.4. Determinación de talla

Al finalizar el experimento y previo al sacrificio de las ratas, se les tomo la talla a las ratas (circunferencia y longitud), con el propósito de observar el crecimiento y desarrollo de las mismas pese a su diferencia en la ganancia de peso y el cambio en su dieta habitual. Los resultados muestran que las ratas control CSF tenían la mayor talla circunferencia (17.44 ± 0.53 cm), seguido de las ratas que consumieron FCB (14.56 ± 1.01 cm); mientras que las ratas que consumieron FAD e IC presentaron la menor y similar circunferencia abdominal (14.89 ± 0.60 cm y 14.56 ± 1.01 cm, respectivamente). Las ratas que consumieron FBND presentaron una circunferencia abdominal intermedia en promedio de 15.00 ± 1.00 cm en comparación con los animales de los demás tratamientos, Tabla 14. Por otro lado, la longitud de las ratas vario desde 19.33 ± 1.32 cm para aquellas que consumieron FBND hasta 20.11 ± 0.78 cm para las ratas que consumieron FCB; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos. Cabe señalar que la longitud en las ratas control (CSF) fue de 19.89 ± 0.78 cm, los valores encontrados en las ratas que consumieron los fructanos de FAD, FBND e IC demuestran un crecimiento normal que no fue afectado por la dieta como se muestra en la Figura 25. Estos resultados evidencian que la ganancia en peso fue por la acumulación de tejido adiposo abdominal, cosa que pudimos corroborar al momento del sacrificio, ya que se observaba un mayor contenido de tejido adiposo en las ratas control y en aquellas que consumieron FCB que en los demás tratamientos

Tabla 14. Comparación de peso y talla de los grupos experimentales

Comparación de peso (dg) y talla (cm)			
Muestra	Peso (dg)	Long (cm)	Circ (cm)
FAD	22.33 ± 0.67^c	20.00 ± 1.12^a	14.89 ± 0.60^c
FBND	21.55 ± 0.69^c	19.33 ± 1.32^a	15.00 ± 1.00^{bc}
FCB	24.11 ± 1.07^b	20.11 ± 0.78^a	16.00 ± 0.71^b
IC	21.55 ± 0.84^c	19.56 ± 1.51^a	14.56 ± 1.01^c
CSF	26.66 ± 0.88^a	19.89 ± 0.78^a	17.44 ± 0.53^a

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey. Long=longitud, Circ=circunferencia.

La medida de cintura de las ratas fue mayor en las ratas FCB 16.00 ± 0.71 cm, similar a la de las ratas FBND 15.00 ± 1.00 cm, pero diferente de las ratas FAD 14.89 ± 0.60 cm, e IC 14.56 ± 1.01 cm.

No hay estudios reportados que reportaran este tipo de parámetros, sin embargo en este estudio al tratarse de ratas sanas y en desarrollo, se trata de observar que no hubiera un efecto negativo por consumo de los fructanos que pudieran afectar el desarrollo y crecimiento de las ratas.

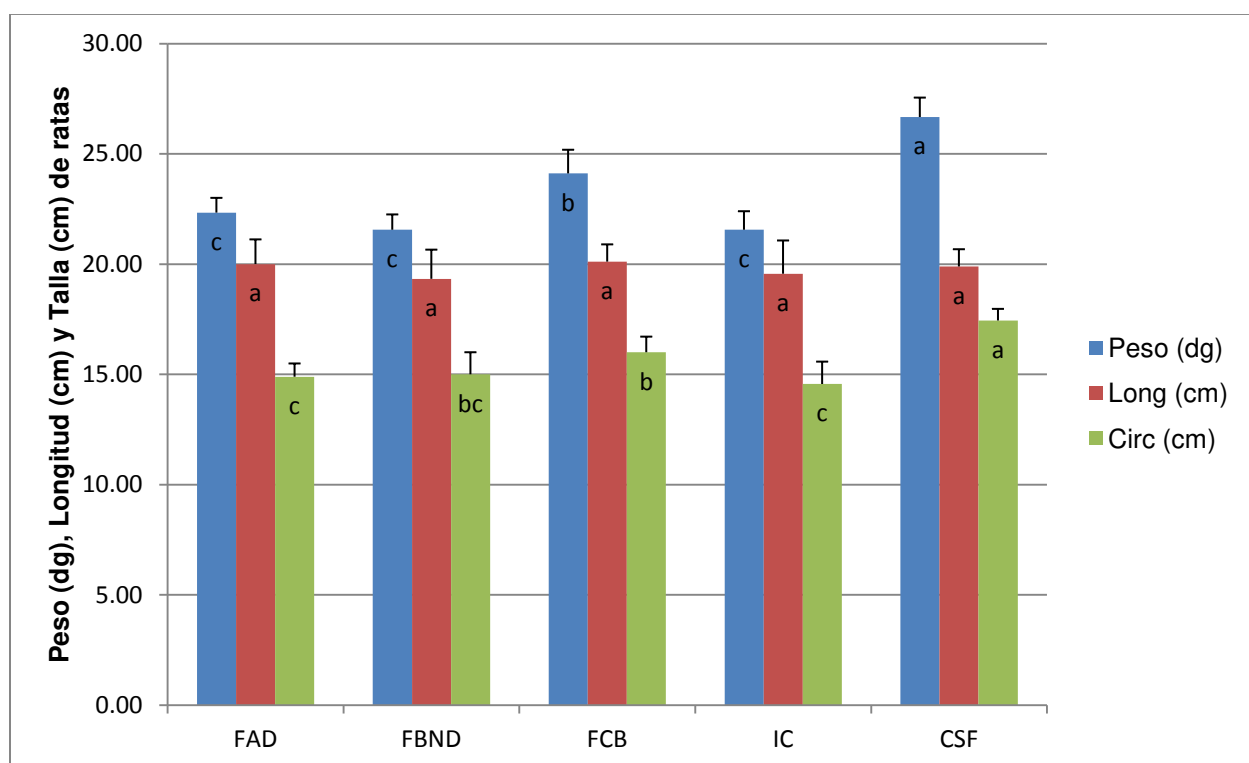


Figura 25. Gráfica de Comparación de peso y talla, en grupo experimentales; FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey. Lonh=longitud, Circ=circunferencia.

7.2.5. Determinación de glucosa

Los resultados obtenidos muestran una disminución en la concentración de glucosa en la sangre de las ratas que consumieron fructanos de ajo y cebolla e IC comparados con el grupo control (CSF); sin embargo, estadísticamente no hay diferencia entre los tratamientos, solamente entre el grupo control CFS (77.33 ± 4.31 mg/dL) y el grupo que consumió IC (59.97 ± 3.21 mg/dL), (Figura 26).

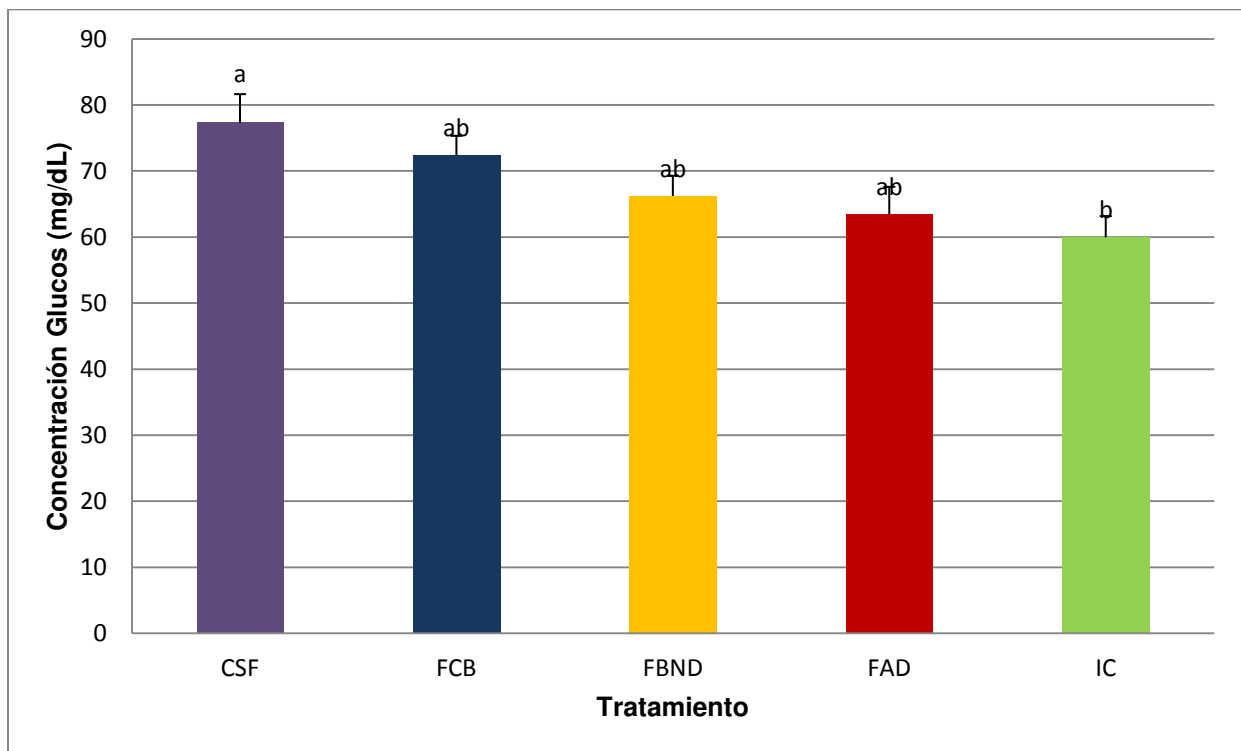


Figura 26. Gráfica niveles de glucosa en sangre en grupos FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Los valores de glucosa (Tabla 14) en sangre obtenidos en las ratas control y las tratadas con fructanos se encontraban dentro un rango de concentración de glucosa en sangre que no presentaba ni hiperglucemia (< 55 mg/dL) ni un estado de prediabetes (> 100 mg/dL) en ayuno como lo reporta Poveda *et al.*, 2008. Los valores encontrados en las ratas control (CSF) fueron de 77.33 ± 4.31 mg/dL, en las ratas que consumieron FCB de 72.39 ± 2.94 mg/dL, con FBND de 66.23 ± 3.05 mg/dL; mientras que con FAD de

63.45±4.16 mg/dL y el grupo que consumió IC de 59.97±3.21 mg/dL. Estos resultados muestran que a mayor DP el nivel de glucosa en sangre es menor. Se ha reportado que las fibras solubles incorporadas a la dieta mejoran el metabolismo de la glucosa al reducir la absorción de los macronutrientes y al estimular las hormonas intestinales que aumentan la sensación de saciedad y distensión gástrica (Satija *et al.*, 2012).

7.2.6. Determinación de triglicéridos

Al determinar la concentración de triglicéridos (TG) en la sangre de las ratas de los diferentes grupos también se observó una disminución en los animales que consumieron fructanos; en las ratas del grupo control se encontró una concentración de 128.85±24.82 mg/dL de TG la cual es casi el doble a la encontrada en las ratas que consumieron FCB con un valor de 74.16±11.35 mg/dL . El nivel de TG encontrados en el grupo que consumió FAD fue de 62.59±11.91 mg/dL, en los que consumieron FBND de 60.31±7.75 mg/dL; mientras que los que consumieron IC de 52.38±7.41 mg/dL, como se muestra en la Figura 27 y Tabla 15.

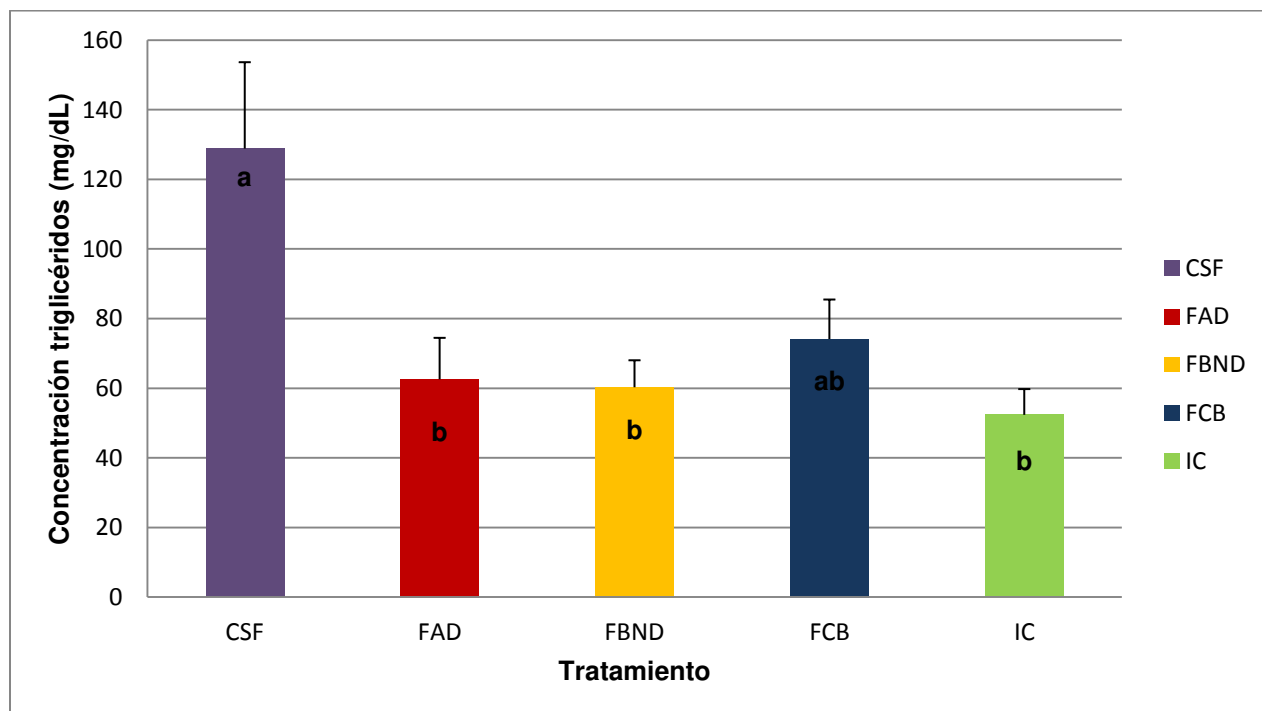


Figura 27. Gráfica niveles de triglicéridos en sangre en grupos FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Aunque no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos se puede observar que hay una tendencia al disminuir la concentración de triglicéridos en sangre que puede relacionarse con la capacidad de absorción de aceite (CAA) y que a su vez está relacionada con el DP de los fructanos de cada uno de las muestras, demostrando una vez más que entre menor sea el DP, menor es la absorción de lípidos, y esta propiedad se mantiene aun cuando se ingiere y está dentro del organismo. Está reportado que al consumir una dieta alta en fibra soluble disminuye la absorción de macronutrientes como los lípidos evitando que se metabolicen y se almacenen en forma de adipocitos en el organismo (Correa *et al.*, 2014). Así como también mostraron niveles en un rango saludable de triglicéridos en sangre, (max. 160 mg/dL; min. 60 mg/dL; Harlan Labs.. 2012).

Tabla 15. Niveles de Glucosa y Triglicéridos de los grupos experimentales

Tratamiento	Glu(mg/dL)	TG (mg/dL)
FAD	63.45±4.16 ^{ab}	62.59±11.91 ^b
FBND	66.23±3.05 ^{ab}	60.31±7.75 ^b
FCB	72.39±2.94 ^{ab}	74.16±11.35 ^{ab}
IC	59.97±3.21 ^b	52.38±7.41 ^b
CSF	77.33±4.31 ^a	128.85±24.82 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05) por la prueba de Tukey.

7.2.7. Determinación de la densidad microbiana de la familia *Lachnospira* mediante tecnología PCR y qPCR

Después de haber extraído el ADN de las muestras de colon de, se calculó la concentración del mismo cada una de las muestras mediante NanoDrop, donde se observó que al tratarse de muestras independientes, la concentración varió entre cada uno de las ratas de cada uno de los grupos, es por eso que posteriormente se corrió un gel de agarosa 1 % para verificar la integridad de ADN que presentaron las muestras, tomando las concentraciones más altas y más bajas que arrojaron los resultados del NanoDrop. Estos resultados se muestran a continuación en la Figura 28. Donde se

observa que las muestras de ADN genómico se encuentran en un rango de 10000bp comparados con el marcador Thermo® que se utilizó al correr el gel; lo cual nos indica que a pesar de la baja concentración este ADN se puede utilizar para los posteriores análisis de PCR y qPCR.

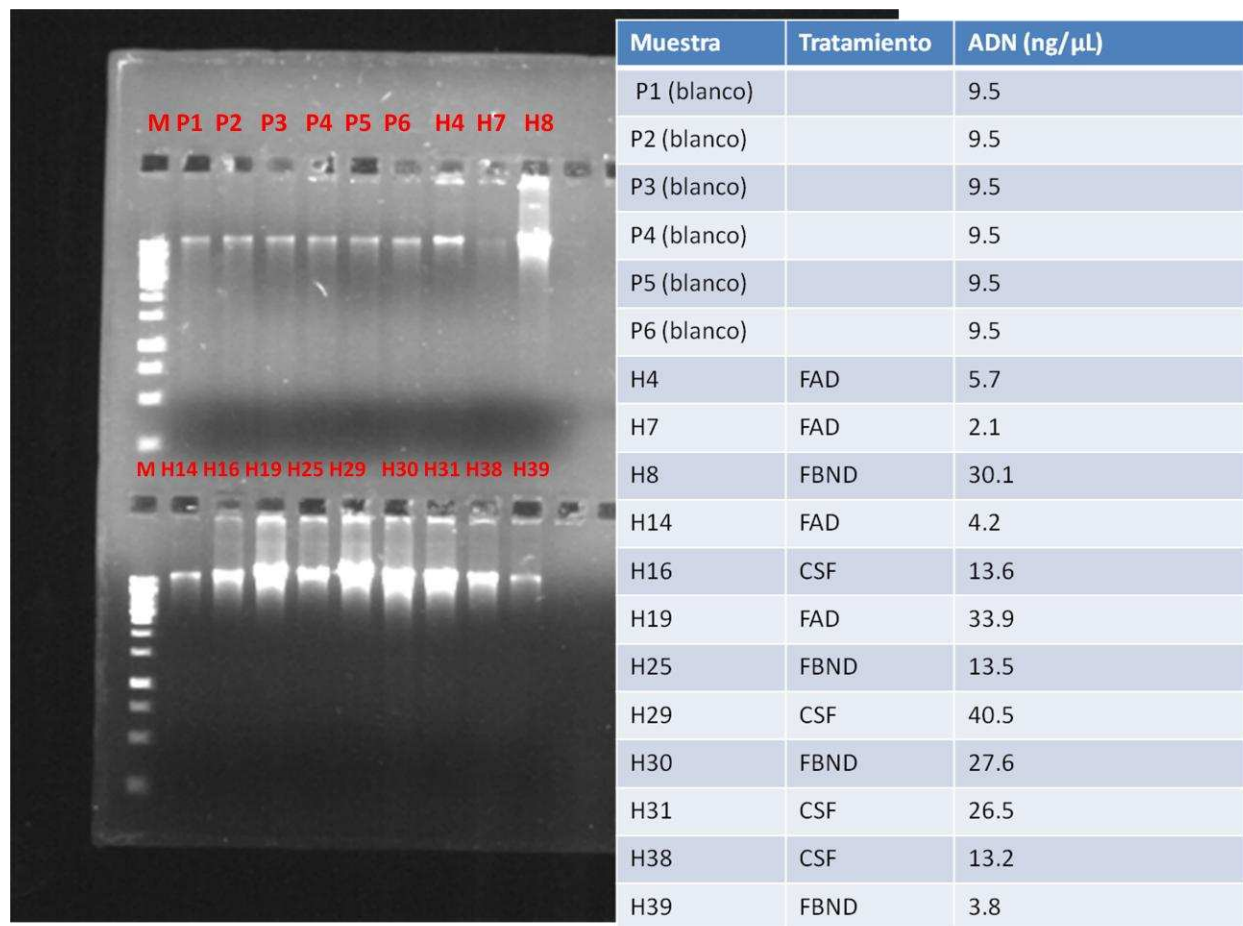


Figura 28. Gel de integridad de ADN y concentraciones de ADN de algunas muestras. H= hisopo (hisopado del colon)

Después se procedió a realizar el PCR punto final, donde todas las muestras fueron homogenizadas a una misma concentración (1 ng/μL), y se observó que las bacterias de la familia *Lachnospiraceae* estaban presentes en todas las muestras, ya que es una bacteria que se encuentra de manera natural en el tracto intestinal de todos los mamíferos (Nava *et al.*, 2011; Biddle *et. al.*, 2013). Los resultados se encuentran en la Figura 29, donde se agregó un control positivo y uno negativo para asegurar que no

hubiera contaminación ambiental, además del marcador de peso molecular para ver el peso (pb) de la bacteria.

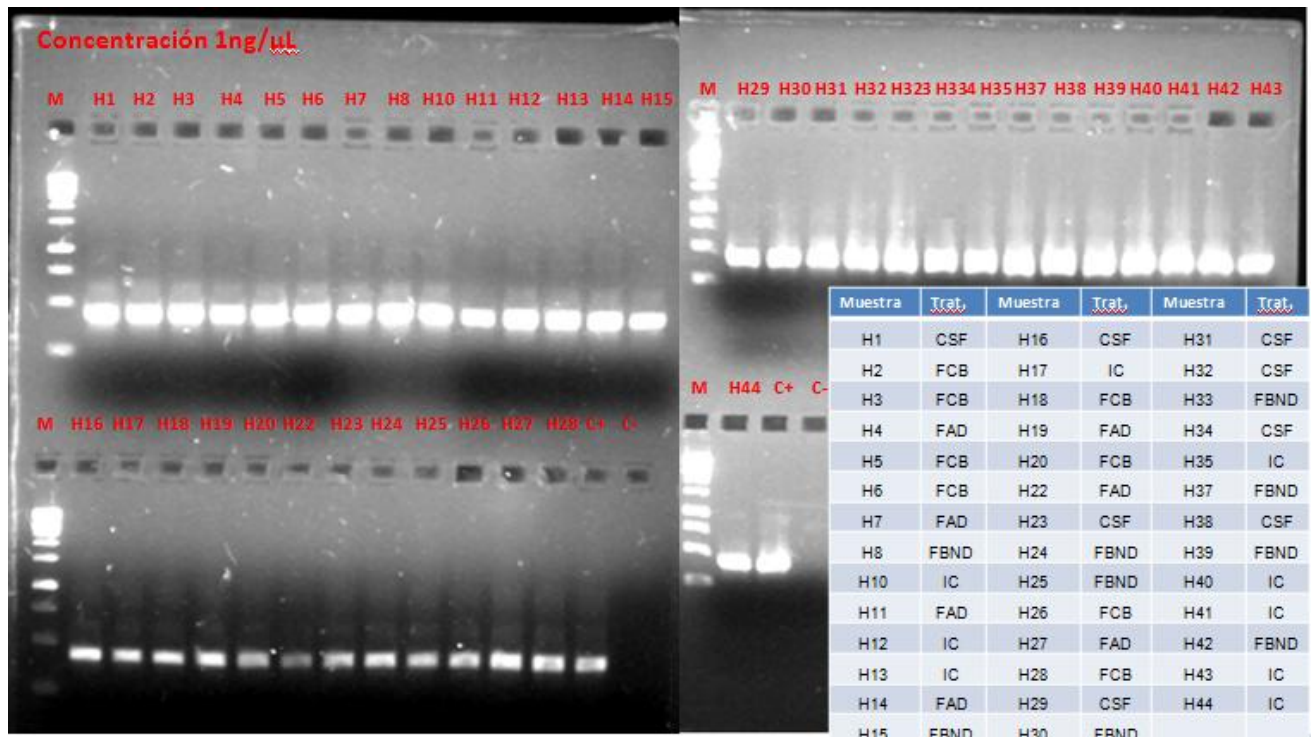


Figura 29. Resultados de PCR punto final para bacterias de la familia *Lachnospiraceae*. . H= hisopo (hisopado del colon), C+= (control positivo), C-= (control negativo).

Los carbohidratos no digeribles han sido recientemente demostrado ser de particular interés para la salud humana, especialmente los fructanos por poseer un efecto prebiótico, la mejora de la flora intestinal y protección de agentes patógenos (Roberfroid, 2002). Estudios *in vivo* como el de Urias-Silvas en el 2008 observó que fructanos provenientes de agave estimulan el desarrollo de bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, pero solo fue hecho *in vitro*. Van Craeyveld et al., 2008 también suplemento dietas de ratas con 4% de fructanos de diferentes y observó mediante la técnica de qPCR un desarrollo de las bacterias *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus brevis* aumentando de 1 a 1.5 logaritmos estas poblaciones en el colon de las ratas que consumieron fructanos en comparación con ratas control que tuvieron alimento normal.

Una vez obtenidos los resultados del PCR y ver que la bacteria estaba presente en todas las muestras; se procedió a realizar una curva de calibración mediante la técnica qPCR, en la cual a partir de diferentes concentraciones de ADN proveniente del contenido colónico.

Para la curva de calibración se hizo un pool con varias muestras tomando 6 μL de las muestras que tenían mayor concentración final de ADN en el equipo de NanoDrop, obteniendo una concentración de 27.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Posteriormente se hicieron ocho diluciones seriadas quíntuples como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Concentraciones de las diluciones utilizadas para curva de qPCR

Dilución	Conc. ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Dilución	Conc. ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
1	5.42	5	0.008672
2	1.084	6	0.0017344
3	0.2168	7	0.00034688
4	0.04336	8	0.000069376

Una vez obtenidas las diluciones se corrió el qPCR por triplicado y se obtuvo la siguiente curva patrón con un valor de R^2 de 0.9361 y una eficiencia de 0.99 (Figura 30), donde se obtuvieron los resultados del número de ciclos (CT) a la que fue amplificada la concentración de ADN (Anexo 1).

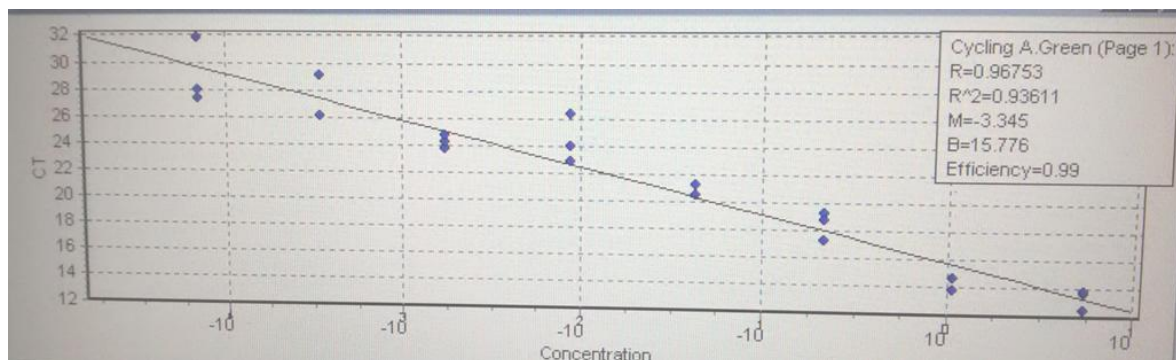


Figura 30. Curva de calibración de qPCR para el cálculo de la concentración de la familia bacteriana *Lachnospiraceae* en el colon de ratas sanas macho Wistar.

Con esta curva se obtuvo una ecuación de la recta con la cual se pudo calcular la concentración de ADN proveniente de las bacterias de la familia *Lachnospiraceae* presente en las muestras. Los resultados se muestran en la Figura 31 donde se observa la cantidad de ADN presente en las muestras provenientes de los diferentes tratamientos, mostrando diferencia estadística con el control.

Cabe resaltar que la mayoría de los estudios hechos para ver un efecto prebiótico o bifidogénico se concentran en bacterias de las familias de *Lactobacillus* o de *Bifidobacterium*; hasta el momento no hay estudios *in vivo* que reporten el desarrollo de la bacteria *Lachnospiraceae* utilizando la técnica de qPCR

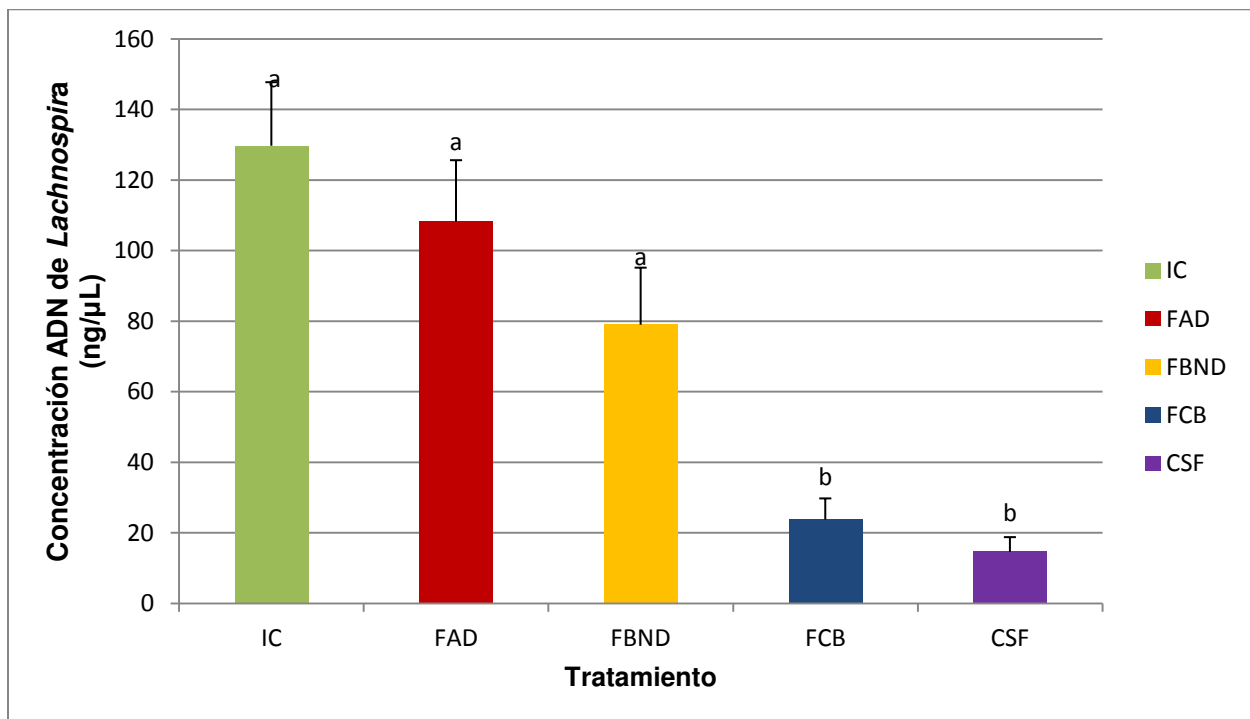


Figura 31. Gráfica de concentración de ADN de *Lachnospira* amplificada mediante qPCR en muestras de FAD, FCB, FBND, IC y CSF. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Es evidente que el efecto del consumo de fructanos estimula el desarrollo de la familia *Lachnospira*; mientras que en las ratas del grupo control (CSF) se encontró una concentración de 12.44 ± 4.15 ng/ μ L, en las ratas que consumieron IC (DP=23 \pm 0.99) se encontró un incremento de 10 veces la concentración; 129.71 ± 18.01 ng/ μ L. Por su parte los fructanos de ajo estimularon también el desarrollo de estas bacterias presentando un efecto según su DP; la concentración de ADN en el colon de las ratas que consumieron FAD (DP=13 \pm 1.21) fue de 108.22 ± 17.39 ng/ μ L mientras que las que consumieron FBND (DP=8 \pm 0.74) de 78.97 ± 16.18 ng/ μ L. Por su parte los FCB (DP=2 \pm 0.20) solo estimularon un ligero incremento 17.99 ± 6.01 ng/ μ L. Estos resultados muestran el efecto del DP de los fructanos sobre el desarrollo de *Lachnospira*. La familia *Lachnospiraceae* es una de las familias más abundantes del orden del género *Clostridia* que se encuentran en el tracto intestinal de los mamíferos y han sido asociadas en la conservación de la salud del intestino (Nava *et al.*, 2011; Biddle *et al.*, 2013); de manera que aquellos compuestos que estimulen su desarrollo tendrán un efecto significativo en la salud intestinal. Además, han sido asociadas con la producción de butirato necesario para la salud del tejido epitelial colónico y han mostrado tener un efecto positivo en la disminución de enfermedades inflamatorias intestinales (Nava *et al.*, 2011, Duncan *et al.*, 2012).

Tabla 17. Concentración de ADN de *Lachnospiraceae* en los tratamientos

Tratamiento	Concentración ADN de <i>Lachnospiraceae</i> (ng/ μ L)
FAD	108.22 ± 17.39^a
FBND	78.97 ± 16.18^a
FCB	17.99 ± 6.01^b
IC	129.71 ± 18.01^a
CSF	12.44 ± 4.15^b

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) por la prueba de Tukey.

Los resultados que se obtuvieron pueden relacionarse con el DP de los fructanos, ya que a un mayor DP hubo un mayor desarrollo de la bacteria *Lachnospira*. Esta reportado que la bacteria *Lachnospira multiparus* tienen enzimas que pueden

degradar carbohidratos complejos como las pectinas, ya que tienen enzimas que pueden hidrolizar los enlaces que presentan dichos carbohidratos (Cheng *et al.*, 1979). Una vez hidrolizados los carbohidratos utilizan como alimento las fructosas y glucosas libres, promoviendo su desarrollo (Cornick *et al.*, 1994).

Es por eso que al tener un mayor que los fructanos con mayor DP, FAD, FBND e IC estimulan el desarrollo de este tipo de bacterias, mientras que los FCB al tener un DP bajo no logran el mismo efecto.

Es importante destacar que los FBND estimulan hasta 6.34 veces más el desarrollo de *Lachnospira* que el control. Esto es de particular relevancia ya que los bulbos de ajo no diferenciados no tienen ningún valor comercial y llegan a representar del 30 al 50% de pérdidas postcosecha. Una alternativa muy viable a estos materiales es usarlos como materia prima para la extracción de fructanos con un DP intermedio pero con propiedades funcionales para la industria de alimentos con excelentes propiedades prebióticas.

VII. CONCLUSIONES

Los bulbos de ajo no diferenciados presentan en su composición un menor contenido de fructanos y con un grado de polimerización también menor a los bulbos de ajos diferenciados, no obstante presentan propiedades fisicoquímicas similares como la capacidad de absorción de aceite y el índice de absorción de agua.

Las ratas que consumieron una dieta rica en fructanos presentaron una disminución en su ganancia de peso respecto las ratas con una dieta normal, presentando a su vez una baja concentración de glucosa y de triglicéridos en sangre sin presentar algún tipo de desnutrición o de hiperglicemia.

Los fructanos de bulbos de ajo no diferenciado pueden ser utilizados como agentes prebióticos ya que estimulan el desarrollo de la familia bacteriana *Lachnospiraceae* que se encuentra en las zonas de pliegues del colon de los mamíferos.

Los resultados demuestran que los fructanos de bulbos de ajo no diferenciados tienen un potencial para ser utilizados en la industria alimentaria por las propiedades funcionales y el efecto prebiótico que presentan.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Adekambi T., Shinnick, T., Raoult D., Drancourt, M. 2008. Complete rpoB gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol* 58. 1807–1814.

Amaya, D., Rodríguez, S. Pérez, I., Loarca, G., Amaya, S., Gallegos, M., Reynoso, R. 2015. Juice by-products as a source of dietary fiber and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of functional foods* 17. 93-102.

Ballabriga, A., Carrascosa, A. 2011. Sustitutos de grasa y edulcorantes. Cap. 11. En, nutrición en la infancia y adolescencia (2da ed.) Ergon. 192-198.

Baumgartner, S., Dax, T. G., Praznik, W., and Falk, H. 2000. Characterization of the High-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research*, 328. 177-183.

Bartlett & Stirling, 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol*. 226:3-6.

Bello, D., Carrera, E., Díaz, Y. 2006. Determinación de azúcares totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA*. 2. 45- 50.

Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., Leschine, S. 2013. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, 5. 627-640.

Bonazzi, C., E. Dumoulin, A. Raoult-Wack, Z. Berk, J. J. Bimbenet, F. Courtois, G. Trystram, and J. Vasseur. 1996. Food drying and dewatering. *Drying Technol.* 14: 2135-2170

Bosscher, D., 2009. Fructan Prebiotics derived from inulin. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology.* 1. 163-205.

Brewster, J.L. 1994. Onions and other vegetable alliums. Ed. CAB International. 236 p.

Burba, J.L. 1994. Adaptación de cultivares de ajo. La Consulta, Mendoza. EEA La Consulta INTA. 17 p (PROAJÓ/INTA. DOCUMENTO 049/94).

Chacón, A. 2006. Perspectivas Agroindustriales Actuales de los Oligofructosacáridos. *Agronomía Mesoamericana.* 17(2). 265-286.

Chandrashekar, P. Prashanth, K. Velantesh, P. 2011. Isolation, structural elucidation and immunology activity of fructans from aged garlic. *Phytochemistry.* 72. 255-264.
Collins, M., Rastall R. 2008. Oligosaccharides in Food and Agriculture. *Glycoscience.* 5. 1185-1204.

Chandrashekar P. y Velantesh P. 2012. Fructans from aged garlic extract produce a delayed immunoadjuvant response to ovalbumin antigen in BALB/c mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34. 174-180.

Cheng, K., Dinsdale, D., Stewart., 1979. Maceration of Clover and Grass Leaves by *Lachnospira multiparus*. *Applied and environmental microbiology.* 28-4. 723-729.

Collins, M. y Rastall, R. 2008. Oligosaccharides in food and agriculture. In : *Glycoscience; Chemistry and Chemical Biology.* Springer. 1185-1204.

Cornick, N., Jensen, n., Stahl, D., Hartaman, P., Allison, M. 1994. *Lachnospira pectinochiza* sp. Nov., an anerobic pectinophile from the pig intestine. International journal of systematic bacteriology. 44-1. 87-93.

Corradini, C., Lantano C. and Cavazza, A. 2013. Innovative analytical tool to characterize carbohydrates of functional food interest. Anal Bioanal Chem. 405. 4591-4605. New Phytologist, 81. 29-34.

Correa, E., Medina, L., Barros, J., Valle, N., Sales, R., Magalães, A., Souza, F., Carvalho, T., Lemos, J., Lira, E., Lima, E., Galeno, D., Morales, L., Ortiz, C., Carvalho, R. 2014. The intake of fiber mesocarp passionfruit (*Pasiflora edulis*) lowers levels of triglycerides and cholesterol decreasing principally insulin and leptin. Clinical Practice, 2. 31-35.

Darbyshire, B. & Henry, R. 1978. The distribution of fructans in onions. New Phytologist 81. 29-34.

Dufoo, M., Zavala, G., Cao, C., Cisneros, L., Guevara, R., Torres, I., Vázquez, M., Rivera, D., Mercado, E. 2013. Low Temperature Conditionin of “seed” cloves enhances expression of phenolic metabolism related genes and anthocyanin content in “Coreano” garlic (*Allium sativum*) during plant development. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61. 10439-10446.

Duncan, S.H.; Barcenilla, A.; Stewart, C.S.; Pryde, S.E.; Flint, H.J. 2002. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5186–5190.

Espinoza, M. 2003. Informe sobre la cadena productiva de ajo. Fundación produce Querétaro plan estratégico e investigación y transferencia de tecnología.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Reference. Consulta: Agosto 2015. URL: [http:// faostat3.fao.org /home/index_es..](http://faostat3.fao.org/home/index_es..)

Franck. A. 2006. Food Polysaccharides and their applications. Taylor and Francis (2 ed). 335-346.

Guevara, T., López, L., López, M., Dufoo, M., Vázquez, M. Guevara, L., Guevara, R., Rivera, D., Torres, H., Mercado, E. 2015. Conditioning garlic “seed” cloves at low temperature modifies plant growth, sugar, fructan content and sucrose sucrose fructosyl transferase (1-SST) expression. *Scientia Horticulturae*. 189: 150-158.

Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution and History. En H. D. Rabinowitch, Onions and allied crops I. Ed. CRC Press. pp. 1-26. Florida. EUA.

Harlan Lab. 2009. Wistar Growth Curve. Harlan Laboratories Inc.

Kanaya K., Chiba S. and Shimomura T. 1978. Thin-layer Chromatography of Linear Oligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* 42 (10): 1947-1948.

Kaur, N. and Gupta, A., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Indian Academy of Sciences*. 27. 703-714.

Kays, S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. 16ed. AVI. Nueva York, Estados Unidos. . 36-37.

Kristensen, M., Bach, K., Jorgensen, H., Oomah, D., Bugel, S., Toubro, S., Tetens, I., Astrup, A. 2013. Linseed dietary fibers reduce apparent digestibility of energy and fat and weigh gain in growing rats. *Nutrients*, 5. 3287-3298.

Kruger, M., Levrat, M., Lobo, A., 2003. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Biology Med.* 228. 683-688.

Lawson, L. 2005. Allicin and Allicin Derived Garlic Compounds Increase Breath Acetone through Allyl Methyl sulfide: Use in Measuring Allicin Bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53. 1974-1983.

López Hernández, L. E. 2010. Efecto del almacenamiento a baja temperatura y aplicación de paclobutrazol a bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' en su crecimiento, calidad de cosecha y perfil de fructanos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Lorenzo-Manzanares, J. L., 2015. Efecto de la baja temperatura en la expresión de genes y actividad enzimática asociado a la síntesis de compuestos fenólicos y fructanos durante el desarrollo de ajo (*Allium sativum* L) variedad coreano. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Macias, L. 2009. Guía para Cultivar Ajo en Aguascalientes. <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/21.html>

Mann, L. y Lewis, D. 1956. Rest and Dormancy in Garlic. *Hilgardia*. 3 (3). 161-189.

Martens D. A., and Frankenberger W.T. Jr. 1990. Determination of saccharides by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Chromatographia* 29(2):7-12.

Mbofung, C.M.F., Aboubakar, Y.N., Njintag, A., Abdou, B. & Balam, F. 2006. Physicochemical and functional properties of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flour. *Journal of Food Technology*, 4(2); 135-142.

McCleary V.B. and Murphy A. 2000. Measurement of total fructan in foods by enzymatic/spectrophotometric method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 83(2): 356:364

Meehan, C. y Beiko, R. 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract associated bacteria. *GBE*. 03-27.

Montanez, J., Venegas, J., Vivar, M., Ramos, E. 2011. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber AZUL. Bioagro 23(3). 199-206.

Muir, J. Shepherd, S., Rosella, O. Rose, R., Barrett, J. y Gibson, P. 2007. Fructan and Free Fructose Content of Common Australian Vegetables and Fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55. 6619-6627.

Murphy, O. 2001. Non pol low digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. British Journal of Nutrition 85(1). 47-53.

Nava, G., Carbonero, F., Croix, J., Greenberg, E. y Gaskins, H. 2012. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. The ISME Journal 6. 57-50.

Nava, G. Friedrichsen, H. y Stappenbeck, T. 2011. Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. The ISME Journal 5. 627-638.

OPS, Organización Panamericana de la Salud. 2012. Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica/INCAP. Menchú MT. (Ed). Mendez H. (Ed)

Park, J., Park, Y. Park, E. 2009. Antioxidative and Antigenotoxic Effects of Garlic (*Allium sativum* L.) Prepared by Different Processing Methods. Plants Food for human Nutrition. 64 (4). 244-249.

Portela, J. A. 2005. “Ajo cebollon”, una anomalía en la bulbificación que comienza a ser importante. IX Curso Taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo. 105-108.

Portela, J. A. 1997. Anormalidades fisiogenéticas en el cultivo de ajo: malformaciones. In: 50 temas sobre producción de ajo. 3: 294 - 311.

Portela, J. A. 1996. El ambiente como regulador del desarrollo de las plantas. Su efecto sobre el ajo (*Allium sativum* L.). Avances en Horticultura. 1(l): 19-40

Poveda, E., Trujillo, P., Ruiz, F., López, E. 2008. Glucemia y concentraciones de insulina en sangre de ratas Wistar sometidas a dieta alta en grasa y a tratamiento con péptidos miméticos de leptina. *Biomédica* 28. 50-63.

Purseglove J., W. 1985. *Tropical crops: Monocotyledons I.* Ed. Longman. New York pp. 607.

Ramírez, A. and Pacheco, D.E. 2009. Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34(4): 293-298.

Ramírez, A., Reynoso, R., Mendoza, G. Loarca, M. 2014. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry*. 161. 254-260.

Reiffová, K. Nemcová, R. 2006. Thin layer chromatography analysis of fructooligosacharides in biological samples. *Journal of Chromatography*. 34. 18-26.

Reyes, C. Milán, J., Gutiérrez, R., Paredes, O., Cuevas, E., Garzón, J. 2009. Instant flour from quality protein maize (*Zea mays* L.) Optimization of extrusion process. 36. 685-695.

Ritsema, T. y Smeekens, S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*. 6 (3). 223-230.

Roberfroid, M. 2002. Functional Foods: concepts and application to inulin an oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87(2). 139-143.

Rodriguez, Lerma. G.K. 2013. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Efecto de la aplicación de paclobutrazol y metil jasmonato en la bulbificación y diferenciación de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano', UAQ.

Rosado, J. y Ordanza, M. 2003. Prebioticos y Probioticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición. *Food technology*. 55 (11). 46-53.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Consultado Agosto .2015. <http://www.sagarpa.gob.mx/>

Saluzzo, J. Villafane, N., Figuerola, P. 2009. Bulbificación de cuatro tipos comerciales de ajo (*Allium sativum* L.) en las condiciones ambientales de la Rioja, Argentina. Horticultura. 5. 10-19.

Santosha, S. G., Jamuna, P. Prabhavathi. S. N. 2013. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: a review. Food Bioscience. 2. 59-74.

Satija, A., Hu, F. 2012. Cardiovascular Benefits of Dietary Fiber. Nutrition: Curr Atheroscler Rep 14. 505-514.

Sáyago, S. Mateos, R., Ortiz, R., Lago, C., Serrano, J., Granado, A., Sarriá, B., Bravo, L., Taberner, M. 2014. Effects of consuming diets containing *Agave tequilana* dietary fiber and Jamaica calyces on body weight gain and redox status in hypercholesteremic rats. Food Chemistry, 149. 54-59.

Tagodoe, A. & Nip, W. 1994. Functional properties of raw and precooked taro (*Colocasia esculenta*) flours. International Journal of Food Science and Technology, 29, 457-462.

Tap, J.; Mondot, S.; Levenez, F.; Pelletier, E.; Caron, C.; Furet, J.; Ugarte, E.; Muñoz-Tamayo, R.; Paslier, D.L.E; Nalin, R. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11. 2574–2584

Trommer, R. Rodrigues, A. Cocato, M. Colli, C. 2010. Effects of inulin-type fructans consumption on mineral intestinal absorption and balance in rats fed control and iron deficient diets. Alim Nutr. 21. 7-13.

Ulloa, J., Espinosa, H., Cruz, K., Rosas, P., Ulloa, B., Ramírez, J. 2010. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. Revista Fuente 2(5). 57-62.

Urías S. y López M. (2004). Efecto prebiótico de los fructanos de agave. Memorias 1er Encuentro Participación de la mujer en la ciencia. 9-12.

USDA. National Nutrient Database for Standar Reference. Consultas Mayo 2015. <http://www.ams.usda.gov>.

Van Arkel, J., Sevenier, R., Hakkert, J., Bouwmeester, H., Koops, A., Van der Meer, I. 2013. Tailor-made fructan synthesis in plants: A review. *Carbohydrate Polymers*. 93. 48-56.

Van Caraeyveld, V. Swennen, K., Dornez, E., Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Delaerdt, Y., Onagbesan, O., Decuypere, E., Buyse, J., Ketelaere, B. Broekaert, W., Delcour, J., Courtin, C. 2008. Structurally Different Wheat-Derived Arabinoxylooligosaccharides Have Different Prebiotic and Fermentation Properties in Rats. *The Journal of Nutrition*. 138. 2348-2355.

Van den Ende, W. 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Plant Science*. 4. 247-256.

Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., & Van Laere, A. 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal*, 2(5). 1281–1295.

Van Laere, A. and Van Den Ende, W. 2002. Inulin Metabolism in Dicots: Chicory as a Model System. *Plant, Cell and Enviroment*. 25. 803-813.

Vázquez, M., López, G., Mercado, E., Castaño, e., León, F. 2006. Study and prediction of quality changes in garlic cv Perla (*Allium sativum* L.) stored at different temperatures. *Scientia Horticulturae*. 108. 127-132.

Vázquez-Barríos. M. A. 2005. Efecto de diferentes ambientes de conservación sobre la ruptura del letargo de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Taiwán y Chino'. Tesis de Doctorado en Ciencia de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Vázquez Mandujano, D. G. 2009. Actividad de la Sacarosa-Sacarosa-1-Fructosil Transferasa y su Relación con la Acumulación de Fructanos durante el Desarrollo del Ajo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Villagomez, A. y Mercado, E. 2009. Cuantificación de Fructanos en bulbo de ajo pardillo. UAQ. 1-4.

Villalobos, V.D.; Peral, P.D.; Carrasco, R. Ma.C. 2008. Las Especies del Género Allium con Interés Medicinal en Extremadura. Medicina Naturista. 2. 1: 2-6

Wittouck, D., Boone, K., Bulcke, S., Debosschere, S., Vandaele, A., Demeulemeester, M. 2002. Industriële cichorei. In Rumbek: Onderzoeks- en voorlichtingscentrum voor land- en tuinbouw. 79–84.

Ye, Z. Arumugam, V., Haugabrooks, E., Williamson, P., Hendrich, S. 2015. Soluble fiber decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal. Nutrition research, 35, 393-400.

VIII. ANEXOS

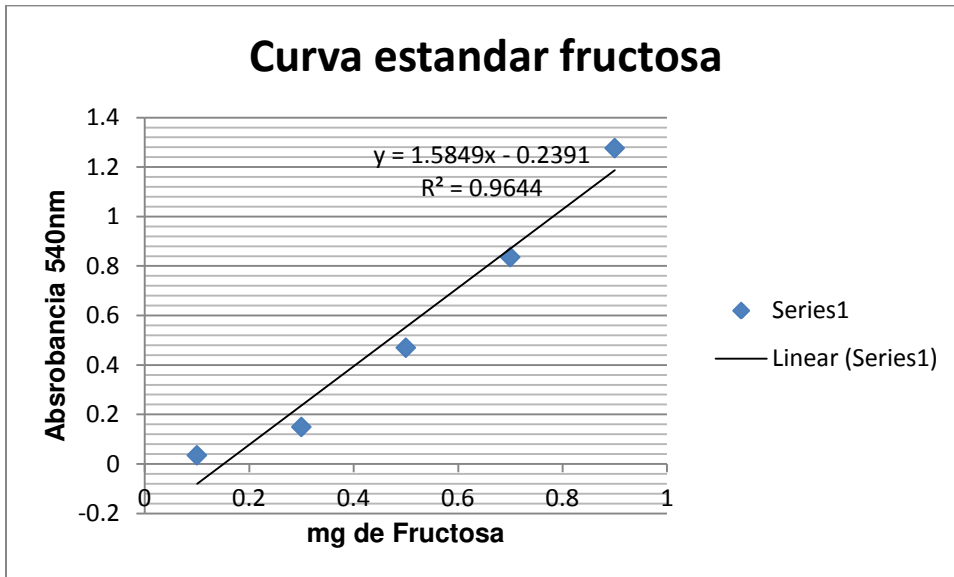
1. Preparación de reactivos para cuantificación de fructanos:

- Buffer 1: 11.6 g ácido maleico + 900 mL agua destilada. Ajusta pH a 6.5 con hidróxido de sodio 2M.
- Buffer 2: 5.8 mL ácido glacial + 900mL agua destilada. Ajusta pH a 4.5 con hidróxido de sodio. (Ambos aforar a 1L y refrigerar a 4°C).
- Enzima A: contenido vial del Kit + 22 mL Buffer 1. Enzima B. contenido vial del Kit + 22 mL de Buffer 2. (Ambas se dividieron en alícuotas y refrigeraron a -20°C).
- Solución A: 10 g de ácido hidrozibenzoico hidrazida + 60mL de agua destilada + 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Aforar a 200 mL.
- Solución B: 24.9 citrato trisódico dihidratado + 500mL de agua destilada + 2.2g cloruro de calcio dihidratado. Aforar a 2 L.
- PAHBAH: Agregar 20 mL de la solución A en 180 mL de la solución B, mantener en hielo.
- Hidróxido de sodio (50 mM): 2 g de hidróxido de sodio + 900mL de agua destilada. Aforar a 1 L
- Borohidro alcalino: 20 mg borohidro + 2 mL de hidróxido de sodio
- Acido acético (2M): 116 mL + 600 mL de agua destilada. Aforar a 1 L
- Metanol 80% y Etanol 100%

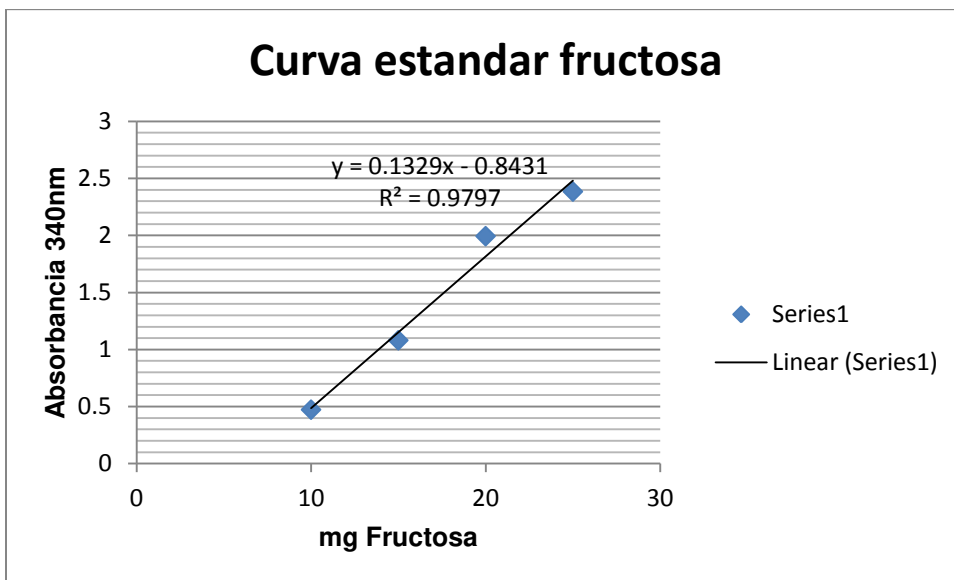
2. Preparación de reactivo DNS:

- Acido 3,5-dinitrosalicílico al 0,1 % (p/v), al 30 % (p/v) en NaOH 0.4 M. Disolver 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 300 g de tartrato sódico potásico en 200 ml de hidróxido sódico 2 M (16 g de NaOH en 200 ml de agua destilada) y diluir hasta 1000 ml con agua destilada. El reactivo debe guardarse en bote oscuro (color topacio), siendo estable durante 8 semanas.

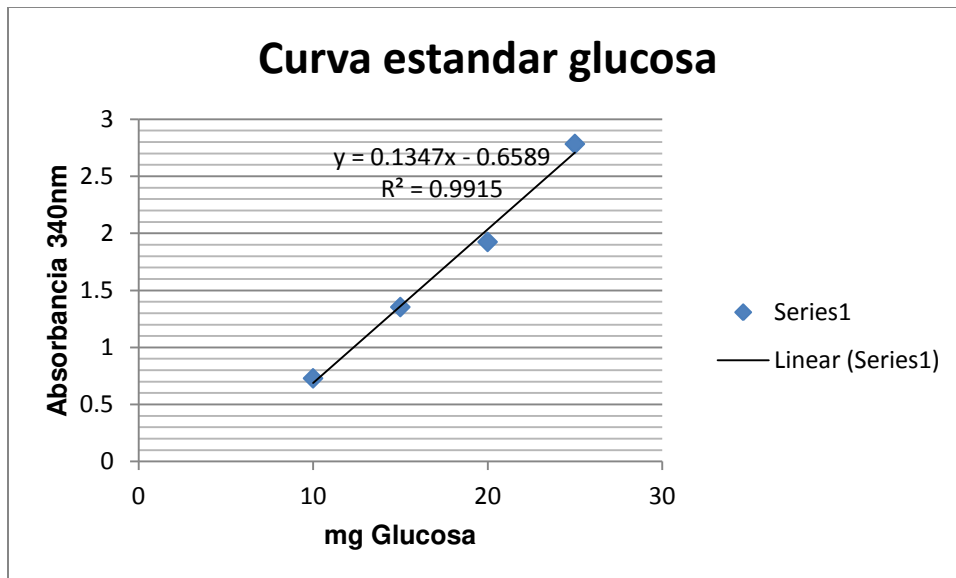
3. Curvas de calibración:



A3.1 Curva de calibración para azúcares reductores (DNS) con Fructosa.

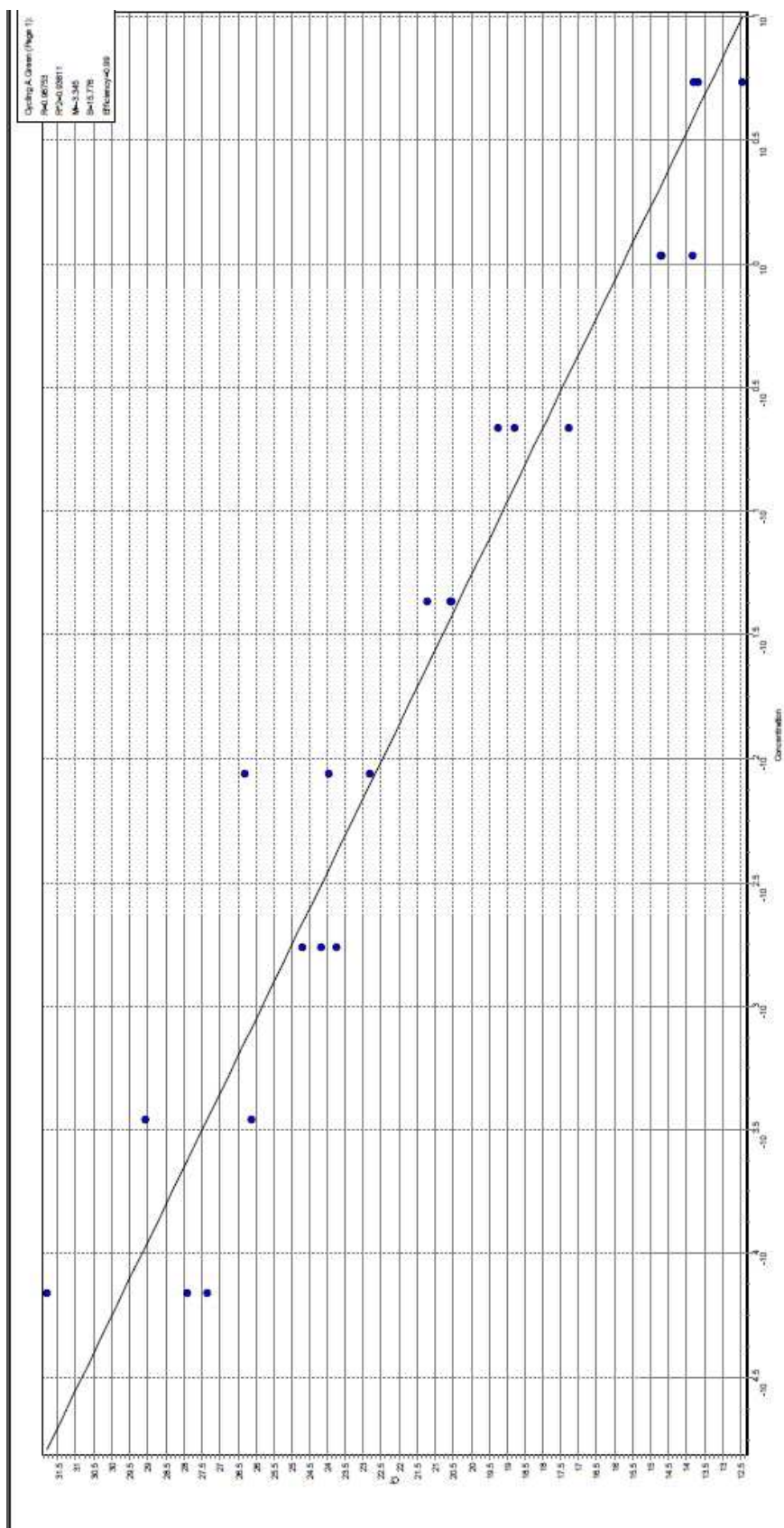


A3.2 Curva de calibración para grado de polimerización con fructosa.

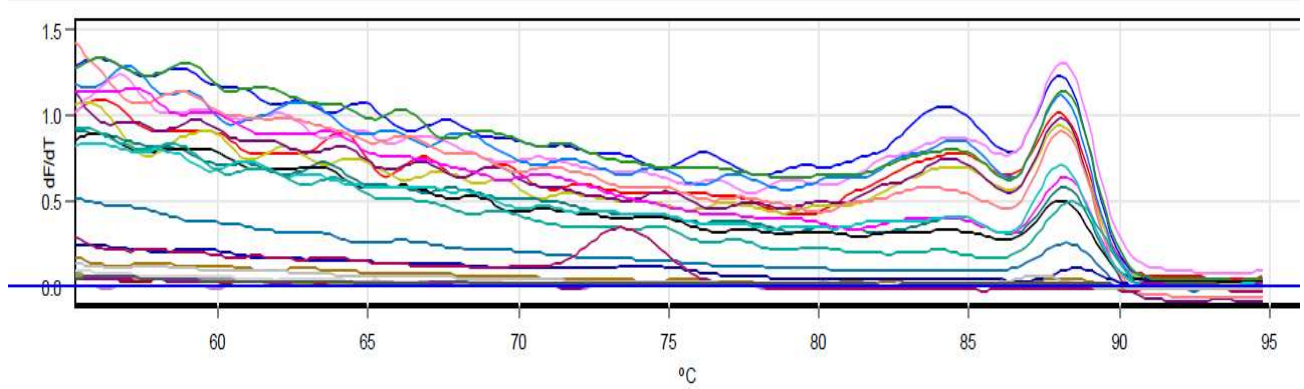


A3.3 Curva de calibración para grado de polimerización con glucosa.

4. Curva de Calibración qPCR



5. Curvas de fusión de la curva de calibración de qPCR



6. Ciclos de amplificación de la curva de calibración de qPCR

