

# VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES Y SAPONINAS DURANTE LA COCCIÓN DEL MAGUEY MEZCALERO POTOSINO

## VARIATION OF THE CONCENTRATION OF SUGAR AND SAPONINS DURING THE COOKING OF MAGUEY MEZCALERO POTOSINO

Cynthia Zamora P.<sup>1</sup>, Bertha I. Juárez F.<sup>2</sup>, Juan R. Aguirre R.<sup>2</sup>, Deogracias Ortiz P.<sup>3</sup>, Cesar I. Godínez H.<sup>1</sup> y Gregorio Álvarez F.<sup>2</sup>.

[czamorapedraza@yahoo.com.mx](mailto:czamorapedraza@yahoo.com.mx)/[berthajf@uaslp.mx](mailto:berthajf@uaslp.mx)/[iizd@uaslp.mx](mailto:iizd@uaslp.mx)/[mdortiz@uaslp.mx](mailto:mdortiz@uaslp.mx)/[navingod@hotmail.com](mailto:navingod@hotmail.com)/[gregorio.alvarez@uaslp.mx](mailto:gregorio.alvarez@uaslp.mx)

Recibido: abril 27, 2010 / Aceptado: noviembre 25, 2010 / Publicado: diciembre 2, 2010

**Resumen.** El 75 % de las especies del género *Agave* se encuentran distribuidas en el territorio mexicano. *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick es la más abundante en el altiplano potosino - zacatecano y se utiliza principalmente para la elaboración de mezcal. En la región potosina el proceso tradicional de producción de mezcal se realiza en cinco etapas: selección de la materia prima, cocción, molienda, fermentación y destilación. Durante la cocción con vapor se genera gran cantidad de efluvios ricos en carbohidratos fermentables que regularmente son desechados por la presencia de saponinas, ya que pueden influir de manera negativa en la fermentación. Se obtuvieron muestras de efluvios cada 3 h durante el tiempo de cocción de las cabezas enteras de maguey, y se les midió el pH, temperatura, sólidos totales y abundancia de saponinas por la espuma durante agitación. La concentración de azúcares reductores se obtuvo por método de Fehling-Soxhlet y por CLAR. La cuantificación de saponinas se realizó por el método descrito por Baccou. Se registró una disminución gradual del pH y la concentración de saponinas, y un incremento en los azúcares reductores. Hubo una tendencia similar entre las dos técnicas para saponinas. No hubo diferencias significativas entre las técnicas de Fehling-Soxhlet y CLAR.

**Palabras clave** Mezcal potosino, *Agave salmiana*, saponinas y azúcares reductores.

**Abstract.** The 75 % of the species of the genus *Agave* are distributed the Mexican territory. *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick, the most abundant in the highlands of San Luis Potosi and Zacatecas, is primarily used for making mezcal. In this region the traditional process of mezcal production has five steps: selection of raw material, cooking, squeezing, fermentation and distillation. During steam cooking, a great amount of fermentable carbohydrate rich effluents and regularly discarded because its saponins, may produce a negative effect on fermentation. In effluents samples collected every 3 h during the cooking of heads of maguey, we measured pH, temperature, total solids and the abundance of saponins by the column of foam formed by agitation. Reducing sugar concentration was obtained by Fehling-Soxhlet method and by HPLC. Quantification of saponins was performed by the method described by Baccou. The results show a gradual decrease in pH, concentration of saponins and an increase in reducing sugars during cooking time. There were no significant differences between Fehling and HPLC techniques.

<sup>1</sup> Programa Multidisciplinario de Posgrado de Ciencias Ambientales, UASLP. Av. Manuel Nava 201, 2do piso Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México. <http://ambiental.uaslp.mx/pmpca>

<sup>2</sup> Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, UASLP. Altair 200, El llano, 78377, San Luis Potosí, S.L.P., México. <http://www.uaslp.mx/Spanish/Investigacion/institutos/IIZD>

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, UASLP IIZD-UASLP. Av. Venustiano Carranza 2405, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México. <http://www.uaslp.mx/Spanish/Academicas/FM/Medicina>



**Keywords:** Mezcal potosino, *Agave salmiana*, saponins reducing carbohydrates.

## Introducción

Maguey es el nombre común aplicado a las especies del género *Agave* (familia Agavaceae, endémica de América). El género comprende alrededor de 200 especies de las cuales la mayor parte se encuentran en México, territorio considerado como su centro de origen y domesticación [1-4]. Las especies mexicanas de maguey pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 3400 m de altitud y son especialmente abundantes en las comunidades vegetales xerofíticas [3].

En el altiplano potosino crece en forma silvestre *Agave salmiana* (maguey mezcalero), y por su abundancia en la región representa un elemento importante de la vegetación natural [5,6]. Su aprovechamiento es diverso y ha jugado un papel importante en la vida de los ancestros y de los actuales pobladores de la región; actualmente, en el área de estudio su principal aprovechamiento es para la elaboración de mezcal [6]. El mezcal es una bebida alcohólica que se obtiene de la fermentación y destilación de los jugos extraídos de piñas o cabezas (tallos y bases de pencas) de maguey maduro previamente cocidas [6]. Se carece de información detallada del proceso de cocción en la elaboración del mezcal en esta zona. Sin embargo, Aguirre *et al.* [6] estimaron indirectamente una ineficiencia global de 50% en el proceso, el cual podría mejorarse al menos en un 100 % al corregir limitaciones de cada una de sus etapas.

El proceso de elaboración de mezcal en la región potosina es tradicional y se realiza en cinco etapas [7]. 1) Se inicia en el campo con la recolección de plantas quietillas, castradas o quietadas, de las cuales las primeras presentan mayor concentración de fructanos (polisacáridos de reserva del maguey) [6, 8]. Una vez seleccionadas las plantas, se desviran (eliminación de las hojas desde su base, con mayor concentración de saponinas) y finalmente se tumban [6, 9]. 2) Posteriormente se realiza la cocción para hidrolizar los fructanos en fructosa y glucosa (monosacáridos fermentables), y posiblemente generar compuestos organolépticos que le confieren el aroma característico al mezcal [7, 10]. Las piñas enteras se cuecen en hornos elevados de mampostería ordinaria (20 t aproximadamente), con techos de bóveda, una abertura mayor al frente (donde se inicia la carga) y otra menor en la bóveda (donde se termina la carga); el piso está cubierto con una tarima ranurada para la recolección de efluvios. Los hornos son calentados de manera intermitente desde abajo de la tarima con vapor proveniente de una caldera (2 kg/cm<sup>2</sup>) durante 27 a 36 h, alcanzando una temperatura máxima de 119 °C. Durante las primeras 16 h se generan cerca de 2000 L de efluvios que son desechados por la presencia de saponinas. Después de este tiempo (17-36 h) se produce otra cantidad igual, que en algunas épocas del año es recuperada, condensada y adicionada al jugo extraído de las cabezas cocidas. En época de lluvia el total de efluvios se desecha. Las saponinas son metabolitos secundarios presentes en varias especies vegetales; por sus propiedades químicas, forma soluciones espumantes, aumenta la permeabilidad celular y destruye las membranas celulares [11,12]. En el maguey se ha reconocido la presencia de saponinas esteriodales [13,14]. 3) La extracción de jugos se realiza durante la molienda, mediante un molino de piedra con forma circular, el cual se hace girar sobre un piso de sillar con drenaje para los jugos [15]. El subproducto generado (bagazo) se lava con agua caliente en una pila de lavado y luego se exprime en una prensa de tornillo; esta solución azucarada se incorpora a los jugos de molienda. 4) La fermentación de azúcares y formación implícita de alcoholes forma parte del metabolismo de microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, y otros como *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus* como levaduras, y algunas bacterias *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* y *Z. mobilis subsp. pomaceae*, *Weisella cibaria*, *W. paramesenteroides*, *Lactobacillus kefir*, *L. plantarum* *L. pontis* y *L. farraginis* encontrados en el inóculo para la producción de mezcal de *A. salmiana*. [16,17,18]. Sin embargo, la presencia de saponinas en los jugos de maguey, incrementa el tiempo de fermentación, produce mal sabor y genera un rendimiento pobre del mezcal. Estos efectos probablemente se deben a que la propiedad histolítica de las saponinas destruye las levaduras [19]. La fermentación se

realiza en pilas de mampostería ordinaria con una capacidad aproximada de 8000 a 12000 L a 35 °C durante 36 h, y es inducida por una cepa nativa reciclada [7]. 5) La destilación del vino se realiza por etapas en alambiques de cobre, para lo cual la temperatura se controla de manera rudimentaria a través de la presión de vapor de un serpentín interior. En la primera etapa se separan las “cabezas”, compuestas principalmente por metanol (55 a 80 °GL). Posteriormente se condensa el “corazón” o mezcal, compuesto principalmente por etanol (45 °GL) y por último se obtienen las “colas” (< 25 °GL) compuestas por alcoholes superiores y agua [7].

El estado de San Luis Potosí cuenta con la Denominación de Origen para la producción de mezcal, por ello el uso racional del recurso es de vital importancia, así como la implementación de mejoras en el proceso actual de producción del mezcal en sus diferentes fases, principalmente en la de cocción. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer la variación de la concentración de azúcares y saponinas en los efluvios generados durante la cocción del maguey mezcalero potosino en la empresa Laguna Seca, con la finalidad de fundamentar su aprovechamiento para mejorar el rendimiento de mezcal por unidad de materia prima.

## **Materiales y Métodos**

El estudio se realizó en 2009, durante las épocas seca y lluviosa en la empresa mezcalera “Laguna Seca” ubicada en el municipio de Charcas, San Luis Potosí (23° 17' 44" de Latitud Norte, 100° 55' 49" de Latitud Oeste y 1962 msnm). Los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

### **Obtención de la muestra**

Durante la cocción se tomaron muestras de efluvios por triplicado de dos cargas completas (unas 20 t cada una), en dos diferentes épocas del año, seca (marzo-junio) y lluviosa (julio-octubre). Al tomar las muestras en el registro del drenaje de efluvios, se les midió la temperatura (Termómetro Brannan, Termolab, México) y el pH (Potenciómetro HANNA instruments, 98127). Las muestras obtenidas se filtraron y se les registró el contenido de sólidos suspendidos (Refractómetro Leica AR200) y la altura de la espuma que se formaba. Posteriormente las muestras fueron congeladas y trasladadas al IIZD para cuantificar los azúcares fermentables y las saponinas.

### **Abundancia de saponinas por el método de cantidad de espuma**

Inmediatamente después de recolectar los efluvios, 1 mL de ellos se colocó en un tubo de ensaye con rosca, se agitó vigorosamente durante 30 seg y se dejó reposar por 15 min, posteriormente se midió el grosor de la capa de espuma persistente [20].

### **Extracción de sapogeninas**

#### **Hidrólisis**

En un tubo de ensaye se colocaron 5 mL del efluvio y 2 mL de ácido sulfúrico 2 N, posteriormente, se calentaron a 110 °C durante 1.5 h en un baño seco. Luego, se llevaron a temperatura ambiente y se realizó la extracción con acetato de etilo. Para ello, se agregaron 5 mL del disolvente, se sonicaron durante 1 min y se separó la capa orgánica en otro tubo de ensaye para posteriormente medir la concentración de las sapogeninas. Este procedimiento se realizó por duplicado.

### **Concentración de sapogeninas**

La medición de la concentración de sapogeninas se realizó con el método descrito por Baccou *et al.* [21], para lo cual se utilizó una curva estándar de 5, 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{g/mL}$  de diosgenina (Sigma, St. Louis Mo) y 430 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro (Agilent HP 8453 UV visible Deutschland, Alemania).

### **Concentración de azúcares reductores (AR) por Fehling-Soxhlet**

La concentración de azúcares reductores se obtuvo por el método de Fehling, mezclando volúmenes iguales (2 mL) de los reactivos “A” y “B”, en presencia del indicador azul de metileno y 60 mL de agua. El título se midió con las muestras.

### **Concentración de azúcares reductores por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Los AR (glucosa y fructosa) se cuantificaron por CLAR, en un cromatógrafo Agilent HP serie 1100 (Waldbronn, Alemania); para ello en fase reversa se utilizó una columna no polar Zorbax C<sub>8</sub> específica para carbohidratos (4.6 mm i.d. x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), y acetonitrilo agua 75:25 (v/v) como fase móvil polar [8]. La identificación y cuantificación de la glucosa y fructosa en los efluvios se efectuó comparando los tiempos de retención con los obtenidos por los estándares de referencia (Sigma, St. Louis Mo). Se construyó una curva de calibración lineal de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 % de glucosa y fructosa. Las muestras fueron pasadas a través de filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro y aforadas a 500  $\mu\text{L}$  con una solución de 50:50 acetonitrilo:agua [8].

### **Diseño experimental**

El diseño experimental fue completamente al azar, con un arreglo factorial de tratamientos (2 x 2 x 10) y mediciones repetidas en el tiempo; donde el factor A es la época funcional (seca y lluviosa), B son los lotes (uno y dos) y C el tiempo de muestreo cada 3 h. Los datos fueron analizados con el procedimiento PROC GLM de SAS [22] y las medias se compararon con la prueba de Tukey. Se consideró la  $p \leq 0.01$  como el nivel de significación estadística.

### **Resultados y discusión**

En la empresa Laguna Seca se utilizan como combustible principalmente restos de magueyes e izotes (*Yucca spp.*) muertos, recolectados en los agostaderos circundantes. Con este material se alimenta la caldera que provee de vapor al horno donde se cuecen las cabezas de maguey. Si no se cuenta con suficiente combustible o si está húmedo, la presión de la caldera es insuficiente y el tiempo de cocción es mayor, porque el flujo del calor no es constante y el proceso de cocción es discontinuo. Esta puede ser una de las causas del bajo rendimiento (hidrólisis incompleta) señalado por Aguirre *et al.* [6].

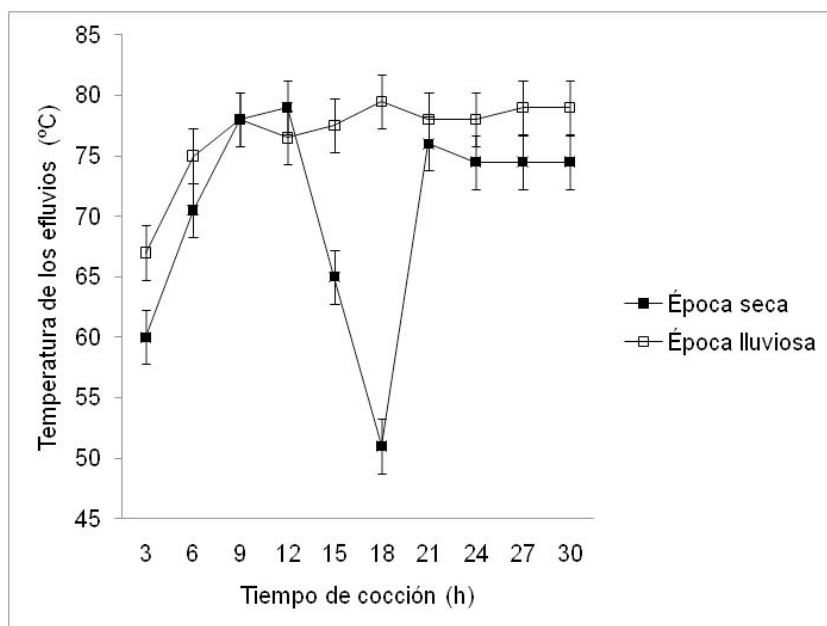
**Tabla 1.** Cuadrados medios del análisis de varianza y prueba de F para pH, temperatura (°C), columna de espuma (cm) concentración de saponinas (mg/mL de efluvio) y azúcares reductores (%) en los efluvios provenientes de la cocción de maguey.

F.V.	GL	Temperatura	pH	Columna de espuma	Concentración de saponinas	AR Fehling	AR CLAR
Lote	1	48.0500	0.0004	0.0151	88599.9661	0.3386	0.7857
Época	1	832.0500**	0.0806**	57.2911**	472.0208**	0.00004	0.9453
Tiempo	9	224.8277**	0.1879**	1.9911**	860.3076*	9.2243**	8.9254**
Época x tiempo	9	152.1611**	0.0204**	0.6136**	196.5940**	0.6558**	0.1345**
Error	59	18.4906	0.0029	0.1705	162.7225	0.03878	0.1086
C.V. %		5.8484	1.0606	14.3956	20.82	8.4872	15.1127

\*\*Altamente significativo en los niveles de probabilidad de 0.01, G.L.=Grados de libertad; CV=Coefficiente de variación

## Temperatura

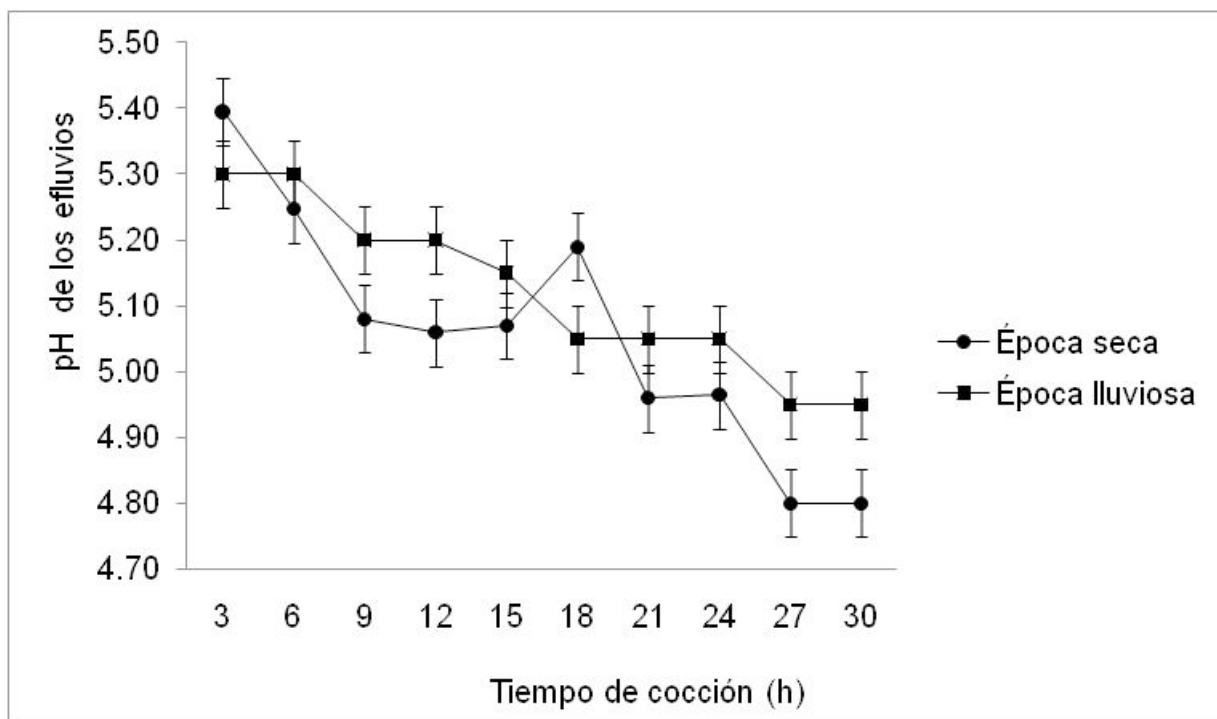
Las temperaturas registradas entre épocas en los efluvios de salida fueron diferentes estadísticamente (Tabla 1). En la hora 15 y 18 se observó una caída brusca de temperatura en los lotes de la temporada seca (55 y 51 °C, respectivamente). Esta disminución se debió a una insuficiencia de combustible para la caldera sin embargo, en las horas subsiguientes la temperatura se recuperó y se mantuvo constante (75 a 79 °C) hasta el final de la cocción. En las temperaturas del lote de la temporada lluviosa no se observaron cambios tan marcados (Figura 1). La mayor temperatura registrada en este periodo probablemente se debió a la mayor temperatura ambiental prevaleciente en esta época del año.



**Figura 1.** Efecto del tiempo de cocción y la época del año en la temperatura de salida de los efluvios de maguey.

## pH

En los valores de pH se registraron diferencias significativas (Tabla 1) entre las dos épocas. El pH tendió a disminuir con el tiempo de cocción, pues comenzó en 5.3 y terminó en 4.8, solamente se presentó un incremento en la época de seca, a las 18 h (Figura 2), posiblemente debido a la disminución de vapor de la caldera, con la caída consecuente de la temperatura de los efluvios a la misma hora. Esta tendencia registrada en la disminución del pH (5.3 a 4.8), concuerda con lo obtenido por Mancilla-Margalli y López, M. G [10] y Waleckx *et al.* [23], al monitorizar la cocción de *A. tequilana*. De acuerdo con Mancilla-Margalli y López, M. G [10], la disminución de pH puede deberse a la formación de ácidos orgánicos, o a la incapacidad de los grupos amino para actuar como bases en el proceso de hidrólisis, cuando los compuestos amino si han reaccionado. Cedeño y Álvarez-Jacobs [24], mencionan que uno de los resultados favorables de la cocción es la reducción del pH a 4.5 ya que junto con la temperatura ello influyen positivamente en la hidrólisis de los fructanos. Por lo tanto es posible que el valor mínimo de pH observado en esta investigación (4.8), se deba al propio proceso de la cocción.



**Figura 2.** Efecto del tiempo de cocción y la época del año en el pH de salida en efluvios de maguero.

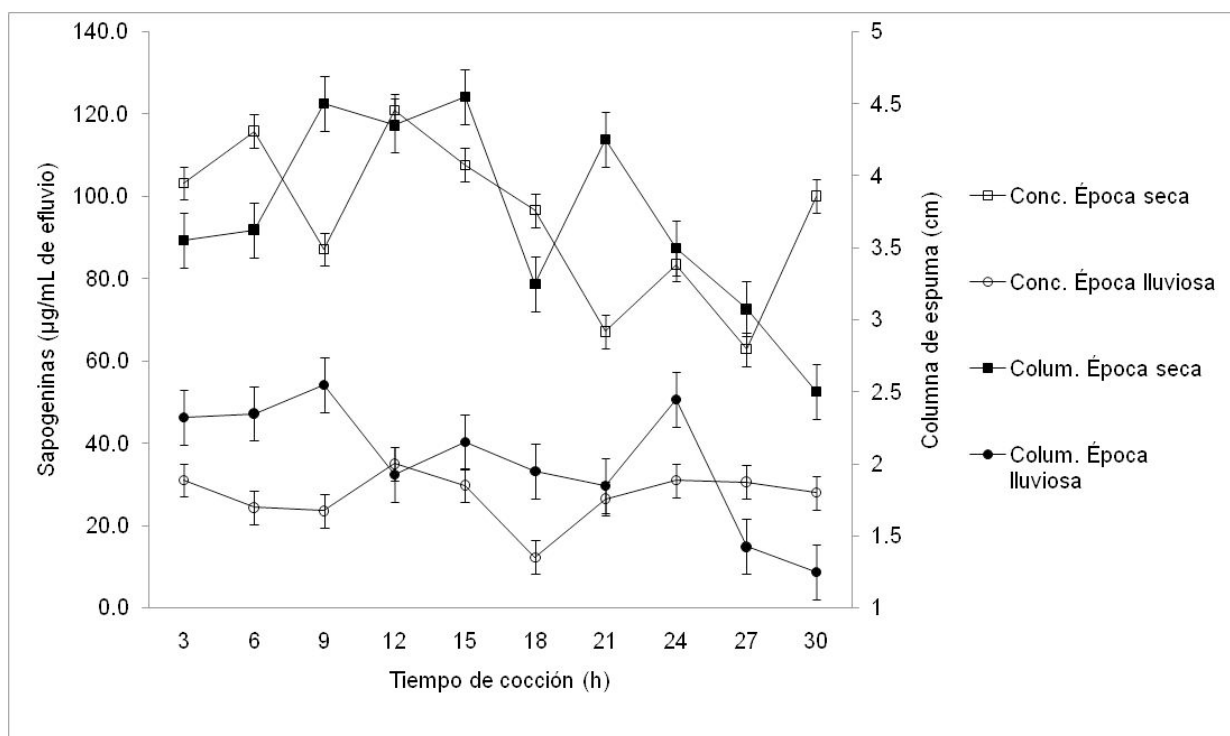
## °Brix

Las mediciones registradas de sólidos totales en los efluvios, mostraron un incremento conforme avanzó el tiempo de la cocción en las dos épocas analizadas.

## Cuantificación de saponinas

La persistencia de espuma en los efluvios por más de 15 min después de agitarlos indica la presencia de saponinas. A pesar de que el calor puede hidrolizarlas, la cocción actual resulta insuficiente, pues las

muestras de efluvios aún formaron espuma. Durante las primeras horas del proceso de cocción las piñas se lavan con el vapor inyectado, lo cual permite liberarlas de las saponinas y toda clase de partículas libres (suelo y materia orgánica) contenidas en su superficie. En la Figura 3 se observa que la longitud persistente de la columna de espuma en los efluvios iniciales fue de 3.5 y 2.35 cm en la época húmeda y seca, respectivamente, pero estos valores se incrementaron a partir de las seis horas. Esto se debe probablemente a que en las primeras horas los efluvios contienen diversos materiales que estaban adheridos a las piñas, los cuales son los primeros en ser arrastrados por el agua. A partir de la hora nueve se alcanzó el valor máximo en la longitud de la columna de espuma en ambas estaciones (4.5 y 2.5 cm, respectivamente). Luego, en dicha longitud tendió a disminuir, hasta 2.5 y 1.25 cm respectivamente. En las muestras de la época seca, en la hora 18, la longitud de la columna de espuma presentó una marcada disminución, debido a la deficiencia de vapor por la falta de combustible anteriormente mencionada. El hecho de que la concentración se incremente a partir de las 9 h y hasta las 15 h, se debe a que en la base de pencas la concentración de saponinas es mayor que en el tallo [6, 25] y éstas están más expuestas al contacto con el vapor.

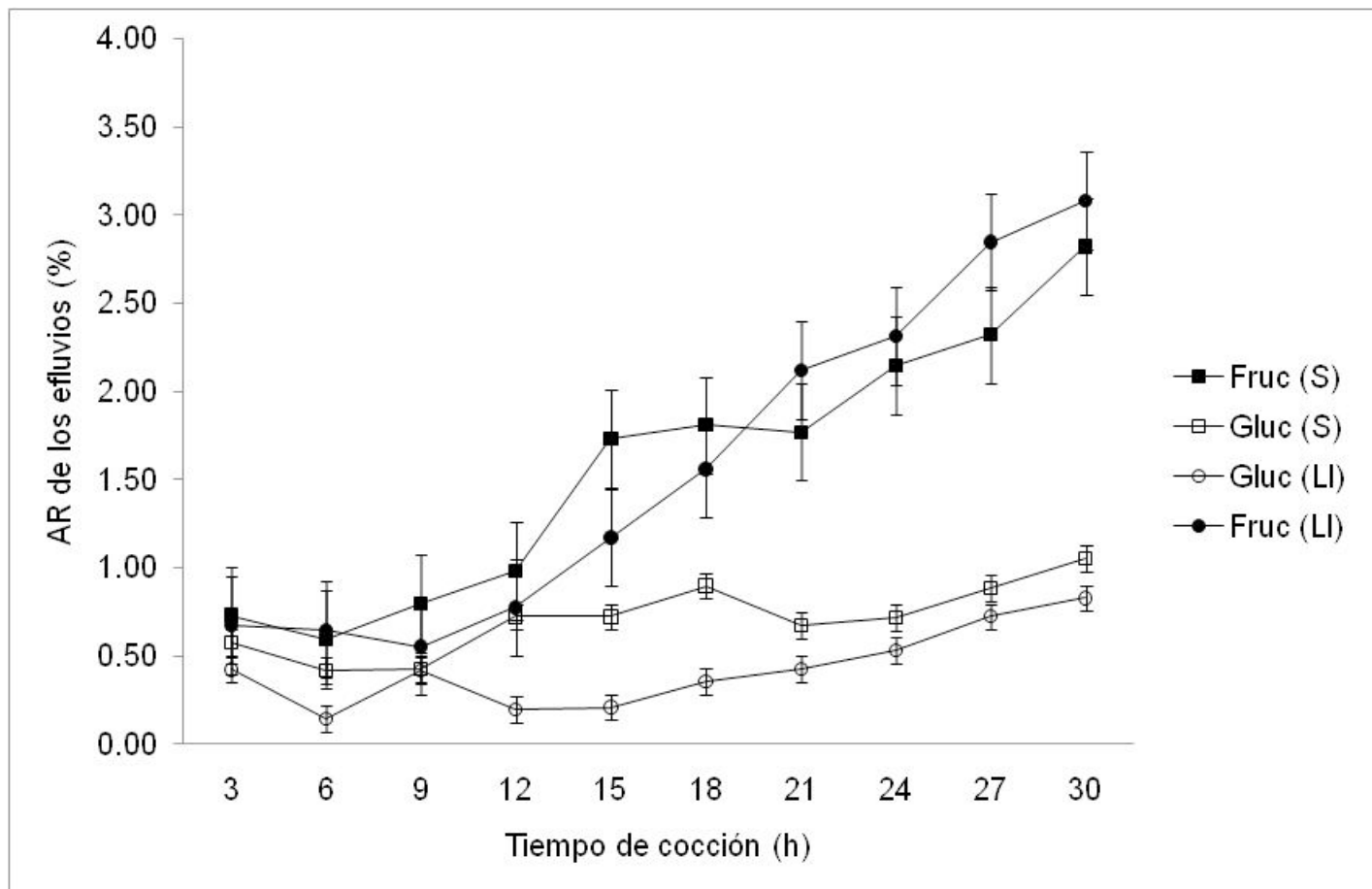


**Figura 3.** Efecto del tiempo de cocción y la época del año en la concentración de saponinas en los efluvios de maguey.

En la Figura 3 se presentan las concentraciones de saponinas obtenidas por el método de Baccou [21]. Se observa una reducción en la concentración de saponinas de los efluvios conforme avanza el proceso de cocción en la época seca; sin embargo, en la época lluviosa las concentraciones fueron más estables. En la época seca las concentraciones fueron más altas, lo cual puede ser una reacción de la planta al estrés hídrico, y posiblemente pérdida de agua en dicha época [26]. En la Figura 3 se aprecia que las tendencias de los datos obtenidos con las dos técnicas (Baccou y longitud de la columna de espuma persistente) fueron similares en las dos épocas. La técnica de la espuma indirecta, representa una opción viable para estimar *in situ* la cantidad de saponinas en los efluvios, y así decidir a partir de qué momento utilizarlos en la fermentación y evitar el desperdicio de azúcares.

## Azúcares reductores

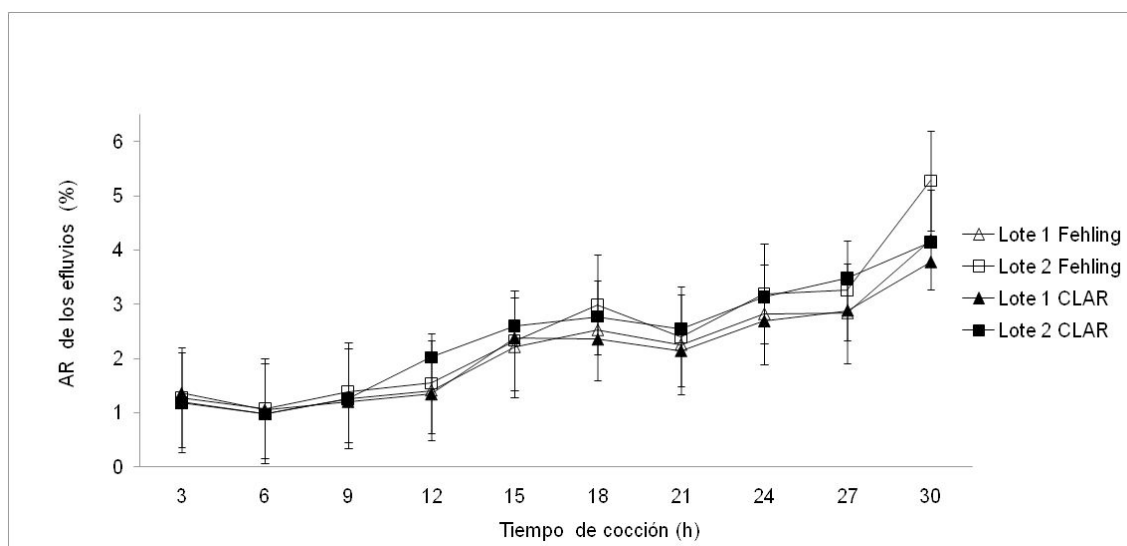
Con base en los resultados de los análisis por CLAR, se observó una diferencia significativa (Tabla 1) en la concentración de fructosa y glucosa en los efluvios conforme avanzó la cocción, aunque fue mucho mayor el incremento registrado en la fructosa, lo cual evidenció, la hidrólisis térmica de los fructanos [27]. En la época seca la concentración de los carbohidratos fermentables en los efluvios se incrementó (Figura 4), lo cual coincide con lo registrado por Aguirre *et al.* [6], ya que la pérdida de agua en esta época concentra los componentes químicos de la planta [26]. En época de lluvias dichos componentes se diluyen debido al incremento en la succulencia del maguey.



**Figura 4.** Efecto del tiempo de cocción y la época del año en la concentración de fructosa y glucosa en efluvios de maguey.

Para la cuantificación de AR se utilizaron dos técnicas, una semicuantitativa, sin necesidad de equipo sofisticado (Fehling-Soxhlet), y otra cuantitativa en donde se requiere de un equipo costoso y sofisticado (CLAR). No se observó diferencia significativa ( $p > 0.01$ ) en los resultados generados con ambos métodos (Figura 5), por lo que el método de Fehling-Soxhlet resultó ser una prueba práctica y confiable con fines de control en diferentes etapas del proceso.





**Figura 5.** Porcentaje de azúcares reductores estimados con la técnica de Fehling-Soxhlet y por CLAR, en los efluvios generados durante la cocción de maguey.

## Conclusiones

El proceso de cocción en la empresa Laguna Seca es tradicional, para lo cual utiliza combustibles orgánicos de la región (restos secos de maguey e izotes). La temperatura de los hornos es variable durante el proceso, depende de la presión de la caldera y esto a su vez de la disposición de combustible. Los valores de pH de los efluvios tienden a bajar durante la cocción. Los azúcares reductores aumentan conforme avanza el tiempo de cocción; las dos técnicas empleadas para estimar su concentración (Fehling-Soxhlet y CLAR) generaron resultados similares. La concentración de saponinas en los efluvios disminuyó hacia el final de la cocción. La técnica de la espuma representa una técnica confiable para la cuantificación de saponinas. Por lo anterior, consideramos la utilización de los efluvios a partir de las 15 h de cocción.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero C07-FAI-11-42.78. CZP agradece al Centro Nacional de ciencia y Tecnología por la beca (162971) para estudios de doctorado.

## Referencias Bibliográficas

1. Gentry H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. 267-269. The University of Arizona, Tucson Arizona USA.
2. García M. A. (1998). *Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM*. 114. Artes de México y el mundo UNAM, México.
3. García M. A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*. (87): 14-23
4. Eguiarte L. E., Souza V. (2007). Historia natural del Agave y sus parientes: evolución y ecología. *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*. Colunga-García Marín P., Larqué A. S., Eguiarte L. E., Zizumbo-Villareal D. (Eds.), Primera Edición, 3-21. CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT, INE. Mérida, Yucatán.
5. Tello-Balderas J. J., García M. E. (1985). The Mezcal Industry in the Altiplano Potosino-Zacatecano of North-Central Mexico. *Desert Plants*. 7 (2):81-87.
6. Aguirre R. J. R., Charcas S. H., Flores F. J. L. (2001). *El Maguey Mezcalero Potosino*. 78. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, S. L. P. México.
7. Pérez Z. M. R. (1997). El mezcal en el altiplano potosino zacatecano. *Bebidas Mexicanas*. Febrero-marzo. 91-97.
8. Michel-Cuello C., Juárez-Flores B. I., Aguirre-Rivera J. R., Pinos-Rodríguez J. M. (2008). Quantitative characterization of non-structural carbohydrates of mezcal Agave (*Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 56(14): 5753-5760.
9. Pinos-Rodríguez J. M., Zamudio M., González S. S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African journal of animal Science*. 38(1): 43-50.
10. Mancilla-Margalli, López M. G., (2002). Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 50(4): 806-812
11. Bruneton J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. 305-306. ACRIBIA, S. A. España.
12. Vincken J. P., Heng L., Groot A., Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68(3): 275-297.
13. Jian-Ming J., Ying-Jun Z., Chong-Ren Y. (2004). Four new steriod constituents from the waste residue of fibre separation from *Agave americana* leaves. *Chemical Pharmaceutycal* 52(6): 654-658.
14. Yokosuka A., Mimaki Y. (2009) Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 70(6):807-815.
15. Durán M. H., Pulido J. L. (2007). Análisis de la molienda en el proceso de elaboración de mezcal. *Información Tecnológica*. 18(1): 47-52.
16. Vine R. P., Harkness E. M., T. Browning, C. Wagner. (1997). *Winemaking from Grape Growing to Marketplace*. 73-88. Chapman & Hall. New York.
17. Walker, M. G. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. 204-264. John Wiley & Sons. England
18. Escalante-Minakata P., Blaschek H. P., Barba De la R. A. P., Santos L., De León R. A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 626-630.
19. Hopkins W. G. (1999). *Introduction to Plant Physiology*. 2a ed. 512. John Wiley. New York.
20. Rossi C. A., De León M., González G. L., Pereyra M. A. (2007). Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del chaco árido Argentino. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (7): 133-143.
21. Baccou, J. C., Lambert F., Sauvaire Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *The Analyst*. 102: 448-465.

22. Littell, R. C., Henry P. R., Ammerman C.B. (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedure. *Journal Animal Science*. (76): 1216-1231
23. Waleckx E., Gschaedler A., Colonna-Ceccaldi B., Monsan P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*. **108**(1): 40-48.
24. Cedeño C. M., Jacobs-Alvarez J. (1999). Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. *The Alcohol Textbook*. Jacques K., Lyons T. P., Kelsall D. R. (Eds.). 3<sup>rd</sup> ed. 225-241. Nottingham University. Inglaterra.
25. Nobel P. S., (1998). *Los incomparables agaves y cactus*. 56-58. Primera edición. Trillas. México.
26. Livingston D. P., Hinch D. K., Heyer G. A. (2007). The relationship of fructan to abiotic stress tolerance in plants. *Recent Advances in Fructooligosaccharides*. Norio S., Boureddine, Shuichi O. (Eds.). 181-199. Research Signpost. Kerala, India.
27. López G. M., Mancilla-Margalli N. A., Mendoza-Díaz G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(27): 7835-7840.