



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVOLUCIÓN DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE DEL AGUAMIEL DURANTE LA
VIDA PRODUCTIVA DEL AGAVE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBETH PERALTA GARCIA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. J. ADELFO ESCALANTE LOZADA
Instituto de Biotecnología, UNAM
DRA. ERIKA MELLADO MOJICA
CINVESTAV-IPN Irapuato

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica del T.L. Fernando Gonzáles.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 464290.

MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTE: DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ

SECRETARIO: DRA. SVETLANA SHISHKOVA

VOCAL: DR. FRANCISCO RUÍZTERÁN

VOCAL: DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS

VOCAL: DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

DEDICATORIA

A Carlos Manuel, el amor de mi vida y a mi madre, mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Agustín López-Munguía**, por su invaluable apoyo. Por guiarme en cada momento durante la realización de este proyecto, por ser siempre una persona tan sencilla, amable y humilde. Agradezco a él por mostrarme que las personas más grandes son aquellas que tienen un gran corazón.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)**, por el apoyo económico otorgado para asistir a una estancia.

A la **Dra. Erika Mellado** y al **Dr. Adelfo Escalante**, miembros de mi comité tutor, por sus valiosos comentarios y aportaciones para el enriquecimiento de este proyecto.

A los miembros del jurado de mi examen: **Dra. Gladys I. Cassab**, **Dra. Svetlana Shishkova**, **Dr. Francisco Ruíz**, **Dra. Patricia E. Lappe** y a la **Dra. Alejandra A. Covarrubias** por el tiempo brindado para la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones.

Al **T.L. Fernando Gonzáles**, por todo el apoyo y los conocimientos brindados en el uso y manejo del HPLC y HPAEC-PAD, por acompañarme en cada toma de muestra y hacerlo siempre con la mejor actitud. Agradezco a él por brindarme su valiosa amistad y confianza.

Al **Dr. Abisaí J. García**, por su apoyo en la clasificación de los agaves utilizados en esta investigación.

A **M. C. María Elena Rodríguez**, **Aurelia Campo** y **Judith Uribe**, por el apoyo técnico para la realización del proyecto. Agradezco por su amabilidad y disposición.

A la **M.C. Cristina Vallejo** y al **Dr. Jaime Porras**, por la orientación en la realización de cromatografía en capa fina y determinación de grado de polimerización y por mostrarse siempre amables cuando me surgían dudas.

A **Diana Oaxaca** y **Alejandra De Los Santos**, por todo el apoyo moral, por todas las discusiones que permitieron el enriquecimiento de mi trabajo y por todos esos momentos que hicieron sin lugar a dudas una mejor estancia en el IBT.

Al **Sr. Salvador Cueto**, por la disposición y amabilidad brindada en cada toma de muestra. Agradezco a él y a su esposa por la calidez con la que siempre fuimos tratados durante nuestras visitas.

Al **Ing. Agustín Barrios**, por su apoyo en el diseño del esquema de la piña control.

A mi madre, **Juliana García**, por ser un ejemplo de lucha y entrega, por llenar mi vida de amor y estar siempre a mi lado apoyándome.

A **Carlos Manuel**, por su comprensión y apoyo incondicional, por alentarme y acompañarme en cada paso que doy. Agradezco a él por hacer de mi mundo un lugar mejor.

A mi hermano **Daniel**, por ampliar mi visión y siempre tener palabras de aliento en momentos de dificultad.

A mi padre **Javier**, por confiar en mí y estar constantemente interesado en mi proyecto.

A mis amigos en especial a **Nashieli** por brindarme su amistad, por confiar siempre en mí y acompañarme en cada etapa sin importar la distancia.

A **Dios**, por rodearme de personas maravillosas y darme la oportunidad de compartir mis logros con quienes amo.

INDICE

RESUMEN	21
1.0 INTRODUCCIÓN	13
2.0 MARCO TEÓRICO	15
2.1 Agave	15
2.2 Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM).....	17
2.3 Transporte de agua y carbohidratos en el agave	19
2.4 Carbohidratos presentes en la planta de agave	22
2.4.1 Función de los fructanos en el agave	24
2.4.1.1 Estructura de los fructanos	25
2.4.1.2 Síntesis e hidrólisis de fructanos	27
2.5 Aguamiel y pulque	29
2.5.1 Proceso de producción de Pulque.....	30
2.5.2 Composición del aguamiel	31
2.6. Fructanos como compuesto funcional	32
3.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
3.1 Hipótesis.....	34
3.2 Objetivo General:	34
3.2.1 Objetivos particulares:	34
4.0 METODOLOGÍA.....	35
4.1 Toma y almacenamiento de muestras.	35
4.1.1 Evolución del contenido de sacarosa y fructanos en el aguamiel a través del día.....	37
4.1.3 Comparación de la concentración de azúcares simples y el perfil de fructanos entre aguamiel fresco y el aguamiel acumulado	38
4.1.4 Seccionamiento y toma de muestra de la piña del agave control.....	38
4.2 Preparación de las muestras.....	40
4.3 Determinación del contenido de humedad de las muestras del metzal y de la piña control.....	41
4.4 Determinación de la concentración de azúcares simples y caracterización de los fructanos de las muestras de aguamiel, metzal y piña control	41

4.4.1 TLC.....	42
4.4.2 HPLC.....	42
4.4.3 HPAEC-PAD	43
4.4.4 Determinación del grado de polimerización.....	44
4.5 Estabilidad de aguamiel y metzal	45
4.6 Determinación de dextranas en aguamiel acumulado.....	45
4.7 Determinación de fructanos en aguamiel acumulado.....	45
5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
5.1 Distribución de azúcares en la piña de agave	46
5.1.1 Distribución de azúcares simples y fructanos en la base del cogollo	46
5.1.1.2. Perfil de fructanos.....	48
5.1.1.3 Grado de polimerización.....	50
5.1.2 Distribución de azúcares simples y fructanos en el tallo	51
5.1.2.1 Concentración de azúcares simples.....	51
5.1.2.2 Perfil de azúcares.....	54
5.1.2.3 Grado de polimerización.....	56
5.2 Evolución de los carbohidratos durante la vida productiva del agave	58
5.2.1 Azúcares simples	59
5.2.1.1 Aguamiel	59
5.2.1.2 Metzal.....	62
5.2.2 Fructanos	64
5.2.2.1 Aguamiel	64
5.2.2.2 Metzal.....	71
5.3 Evolución de carbohidratos en aguamiel durante el día.....	80
5.4 Cambios en los carbohidratos del aguamiel al acumularse en el cajete	86
5.4.1 Actividad enzimática.....	100
5.4.1.1 Aguamiel	100
5.4.1.2 Metzal.....	102
5.5 Determinación global de la cantidad de azúcares obtenidos mediante el proceso de producción de aguamiel	109

5.5.1 Volumen de aguamiel a través del tiempo de vida productivo del agave ...	109
5.5.2 Determinación global de la cantidad de azúcares	111
6.0 CONCLUSIONES.....	113
7.0 PERSPECTIVAS.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de una planta de agave. Modificado de Narváez, (2016).....	15
Figura 2. Metabolismo ácido de las crasuláceas (Villalobos-Rodríguez, 2002)....	18
Figura 3. Síntesis de fructanos (Vijn, 1999).....	18
Figura 4. Disposición espacial de tejidos de agave en cortes transversales de a) <i>A. angustifolia</i> Haw y b) <i>A. tequilana</i> Weber; cortes radiales de c) <i>A. angustifolia</i> Haw y d) <i>A. tequilana</i> Weber. HV: Haces Vasculares. P: Parénquima. (Sánchez, 2010).....	20
Figura 5. Cortes de tallo de agave:	21
Figura 6. Estructuras de los diferentes tipos de fructanos:.....	27
Figura 7. Extracción de aguamiel por el Sr. Salvador Cueto, productor de la zona de Huitzilac, Morelos.	31
Figura 8. Imágenes de las plantas que fueron utilizadas para el estudio: a) Planta 1 (<i>A. mapisaga</i>), b) Planta 2 (<i>A. mapisaga</i>), c) Planta 3 (<i>A. salmiana</i>) y d) Planta control (<i>A. salmiana</i>).	36
Figura 9. Secciones obtenidas de la piña control (<i>A. salmiana</i>), para el análisis de la distribución y concentración de los fructanos y azúcares simples.....	39
Figura 10. Secciones de la piña control (<i>A. salmiana</i>) y toma de muestra.....	40
Figura 11. Hueco realizado durante la castración de agave:	46
Figura 12. Perfil de fructanos detectados en los extractos de las muestras de las diferentes zonas ubicadas en las secciones 1 y 2 de la base del cogollo por TLC: Controles 1) FG, 2) Agavina; Muestras 3) S1 A, 4) S1 B, 5) S1 C, 6) S1 D, 7) S2 A, 8) S2 B y 9) S2 C y 10) S2 D.....	48
Figura 13. Perfil de fructanos presentes en los extractos de las diferentes zonas de la sección 2 de la base del cogollo (S2 A, S2 B, S2 C y S2 D), detectado por HPAEC-PAD.....	49
Figura 14. Perfil de fructanos presentes en los extractos de la zona central de las diferentes secciones de la base del cogollo	49
Figura 15. Distribución del peso molecular de los fructanos presentes en los extractos de las secciones inicial y final (S1 A y S3.1) de la base del cogollo de la planta control (<i>A. salmiana</i>) analizado por GPC.....	50
Figura 16. Perfil de fructanos detectados en los extractos de las muestras centrales de las diferentes secciones de la base del cogollo por TLC.....	54

Figura 17. Perfil de los fructanos presentes en los extractos de la zona central de las diferentes secciones del tallo (S3.2 A, S4 A, S5 A y S6 A), detectado por HPAEC-PAD.....	54
Figura 18. Perfil de los fructanos presentes en los extractos de la sección 4 por TLC:.....	55
Figura 19. Perfil de fructanos presentes en los extractos de las diferentes zonas de la sección 5 del tallo y de la zona exterior al tallo (S5 A1, S5 B1, S5 C1 y EXT), detectado por HPAEC-PAD.....	55
Figura 20. Distribución del peso molecular de los fructanos presentes en los extractos de las secciones inicial y final (S1 A y S3.1) del tallo de la planta control (<i>A. salmiana</i>), analizado por GPC.	56
Figura 21. Esquema de la distribución de azúcares simples y fructanos en de la piña del agave control (<i>A. salmiana</i>).	57
Figura 22. Concentración de sacarosa en el aguamiel fresco durante la vida productiva del agave: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>); b) P2 (<i>A. mapisaga</i>) y c) P3 (<i>A. salmiana</i>).....	61
Figura 23. Imagen de la P1 (<i>A. mapisaga</i>), durante su vida productiva desde el inicio hasta el final de la producción de aguamiel: a) Semana 1, b) Semana 25 y c) Semana 31.....	62
Figura 24. Concentración de azúcares F, G y S en el metzal durante la vida productiva del agave: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>); b) P2 (<i>A. mapisaga</i>) y c) P3 (<i>A. salmiana</i>).....	63
Figura 25. Concentración de los fructanos en el aguamiel fresco, durante la vida productiva del agave: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>), b) P2 (<i>A. mapisaga</i>) y c) P3 (<i>A. salmiana</i>).....	64
Figura 26. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P1 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.	65
Figura 27. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P2 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.	66
Figura 28. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P3 (<i>A. salmiana</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.	66
Figura 29. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P1 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	67

Figura 30. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P2 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	68
Figura 31. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P3 (<i>A. salmiana</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	68
Figura 32. Concentración de los fructanos en el metzal, durante la vida productiva del agave: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>), b) P2 (<i>A. mapisaga</i>) y c) P3 (<i>A. salmiana</i>)..	72
Figura 33. Perfil de fructanos en los extractos del metzal provenientes de P1 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.	73
Figura 34. Perfil de fructanos en los extractos del metzal provenientes de P2 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.	73
Figura 35. Perfil de fructanos en los extractos del metzal provenientes de P3 (<i>A. salmiana</i>) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.....	74
Figura 36. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P1 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	75
Figura 37. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P2 (<i>A. mapisaga</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	75
Figura 38. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P3 (<i>A. salmiana</i>) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.	76
Figura 39. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P1 (<i>A. mapisaga</i>) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas. Semana 1 Semana 39.....	79
Figura 40. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P2 (<i>A. mapisaga</i>) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas.....	79
Figura 41. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P3 (<i>A. salmiana</i>) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas	80
Figura 42. Concentración de sacarosa en aguamiel fresco y fresco sin raspar recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas	

en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (<i>A. mapisaga</i>), 3a semana; P2 (<i>A. mapisaga</i>), 13a semana y P3 (<i>A. salmiana</i>), 7a semana.	81
Figura 43. Perfil de fructanos en aguamiel fresco y fresco sin raspar recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (<i>A. mapisaga</i>), 3a semana; P2 (<i>A. mapisaga</i>), 13a semana y P3 (<i>A. salmiana</i>), 7a semana; detectado por HPAEC-PAD.	81
Figura 44. Concentración de sacarosa en aguamiel fresco recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (<i>A. mapisaga</i>), 31a semana; P2 (<i>A. mapisaga</i>), 19a semana y P3 (<i>A. salmiana</i>), 13a semana.	82
Figura 45. Perfil de fructanos en aguamiel fresco recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva.	83
Figura 46. Perfil de fructanos en muestras de aguamiel tomadas de dos plantas de agave, cada 20 minutos y durante 3 horas, después del raspado.	84
Figura 47. Perfil de azúcares en aguamiel fresco y en aguamiel acumulado (12 h) obtenidos de la P1 (<i>A. mapisaga</i>) en diferentes semanas de la vida productiva del agave, analizado por TLC (con revelador de anilina).	86
Figura 48. Perfil de azúcares en aguamiel fresco y en aguamiel acumulado (12 h) obtenidos de la P2 en diferentes semanas de la vida productiva del agave, analizado por TLC (con revelador de naftol).	87
Figura 49. Comparación del perfil de aguamiel fresco y acumulado de la P1 (<i>A. mapisaga</i>) en diferentes semanas de su vida productiva.	89
Figura 50. Agave A. (<i>A. salmiana</i>). Tipo 1. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	92
Figura 51. Agave B (<i>A. americana</i>). Tipo 3. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	93
Figura 52. Agave B*. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	93
Figura 53. Agave C (<i>A. mapisaga</i>). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	94
Figura 54. Agave D. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	94
Figura 55. Agave E (<i>A. salmiana</i>). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	95

Figura 56. Agave F. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.....	95
Figura 57. Agave G. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.....	96
Figura 58. Agave H. (<i>A. salmiana</i>). Tipo 1. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	96
Figura 59. Agave I (<i>A. americana</i>). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.	97
Figura 60. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel obtenido en tres zonas geográficas diferentes. Morelia, Michoacán; Santa Catarina, Tlaxcala: Tenango del Aire, Estado de México, detectado por HPAEC-PAD.....	99
Figura 61. Evolución de la concentración de sacarosa en aguamiel fresco microfiltrado incubado a temperatura ambiente: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>), 7 semanas b) P1 (<i>A. mapisaga</i>), 11 semanas y c) P2 (<i>A. salmiana</i>), 5 semanas.....	101
Figura 62. Perfil comparativo de fructanos en el aguamiel fresco microfiltrado a las 24 h de ser incubado a temperatura ambiente	102
Figura 63. Cinética de reacción de hidrólisis de sacarosa en el extracto de metzal de P1 (<i>A. mapisaga</i>), en la semana 15 de su vida productiva. La gráfica se reporta en peso húmedo.....	103
Figura 64. Cinética de la reacción de hidrólisis de la sacarosa en el extracto de metzal de la planta P3 (<i>A. salmiana</i>) en la semana 17 de su vida productiva. La gráfica se reporta en peso húmedo.....	103
Figura 65. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P1 (<i>A. mapisaga</i>), de la semana 5 de su vida productiva, antes y después de ser tratado con dextranasa, detectado por HPAEC-PAD.	105
Figura 66. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P2 (<i>A. mapisaga</i>), de la semana 2 de su vida productiva, antes y después de tratar con dextranasa, detectado por HPAEC-PAD.....	105
Figura 67. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P3 (<i>A. salmiana</i>), de la semana 3 de su vida productiva, antes y después de tratar con dextranasa.....	106
Figura 68. Perfil de oligosacáridos de diferentes muestras de aguamiel acumulado, de diferentes semanas de producción, provenientes de la P2 (<i>A. mapisaga</i>), hidrolizados con Fructozyme.....	107

Figura 69. Comparación del perfil de oligosacáridos de una muestra de aguamiel acumulado proveniente de la P2 (<i>A. mapisaga</i>) tratada con Fructozyme y un estándar de maltodextrinas, detectado por HPAEC-PAD.	107
Figura 70. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P2 (<i>A. mapisaga</i>) de la semana 7, al T0 y después de 15 horas de tratar con Fructozyme, detectado por HPAEC-PAD.	108
Figura 71. Volumen de aguamiel acumulado a las 24 h a lo largo de la vida productiva del agave: a) P1 (<i>A. mapisaga</i>) b) P2 (<i>A. mapisaga</i>) y c) P3 (<i>A. salmiana</i>).....	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad enzimática detectada en varias regiones de hojas maduras de <i>A. deserti</i>	22
Tabla 2. Composición de los carbohidratos presentes en plantas de <i>A. tequilana</i> de diferentes edades, provenientes del estado de Jalisco.	23
Tabla 3. Grado de polimerización de los fructanos presentes en diferentes especies de agave distribuidos en distintos estados de México.....	23
Tabla 4. Composición de aguamiel proveniente de <i>A. mapisaga</i> y <i>A. atrovirens</i> . .	32
Tabla 5. Recolección de muestras de aguamiel y metzal a partir del inicio hasta el final de la producción de aguamiel, de acuerdo con los criterios del productor. ...	36
Tabla 6. Concentración de los azúcares simples y fructanos presentes en las diferentes secciones de la base del cogollo (S1, S2 y S3.1), del agave control (<i>A. salmiana</i>).	47
Tabla 7. Grado de polimerización de los fructanos presentes en el extracto del tejido, de la zona central de las diferentes secciones de la base del cogollo (S1, S2, S3.1), del agave control (<i>A. salmiana</i>).	51
Tabla 8. Concentración de los azúcares simples y fructanos presentes en las diferentes secciones del tallo (S3.2, S4, S5, S6), del agave control (<i>A. salmiana</i>).	52
Tabla 9. Grado de polimerización de los fructanos presentes en el extracto del tejido de la zona central de las diferentes secciones del tallo (S3.2, S4, S5, S6), del agave control (<i>A. salmiana</i>).	57
Tabla 10. Datos climatológicos registrados durante el periodo de muestreo de las plantas P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>), y P3 (<i>A. salmiana</i>).	59
Tabla 11. Grado de polimerización de los fructanos del aguamiel obtenidos de las plantas P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>) y P3 (<i>A. salmiana</i>) durante su vida productiva.....	70
Tabla 12. Grado de polimerización de los fructanos en los extractos de metzal obtenidos de las plantas P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>) y P3 (<i>A. salmiana</i>) durante su vida productiva.	77
Tabla 13. Concentración de fructanos en muestras de aguamiel obtenidas de dos agaves (P α y P β) cada 20 minutos y durante 3 h, posteriores al raspado.	85

Tabla 14. Concentración de azúcares F, G y S en muestras de aguamiel fresco y aguamiel acumulado obtenido de las plantas P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>), y P3 (<i>A. salmiana</i>) en diferentes tiempos de su vida productiva.	90
Tabla 15. Clasificación de muestras de aguamiel acumulado provenientes de 10 agaves de diferentes especies y en diferente etapa productiva ubicados en la zona de Huitzilac, Morelos.	92
Tabla 16. Concentración de F, G y S en muestras de aguamiel fresco y aguamiel acumulado obtenidas de las 10 plantas de agave de diferentes especies y con diferente tiempo de vida productiva.....	98
Tabla 17. Volumen de aguamiel durante la vida productiva de los agaves. P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>) y P3 (<i>A. salmiana</i>).....	110
Tabla 18. Cantidad de azúcares provenientes del aguamiel y metzal durante la vida productiva de los agaves: P1 (<i>A. mapisaga</i>), P2 (<i>A. mapisaga</i>), P3 (<i>A. salmiana</i>) y del tallo del agave control: P4 (<i>A. salmiana</i>).	112

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance Análisis de variancia
CAM	Crassulacean Acidic Metabolism Metabolismo ácido de las crasuláceas
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns Patrones moleculares asociados al daño
DP	Degree polymerization Grado de polimerización
DPn	Degree polymerization average number Grado de polimerización número promedio
DPw:	Degree of average mass polymerization Grado de polimerización masa promedio
F	Fructosa
FAZY	Fructan Active enzymes Enzimas activas en fructanos
FEH	Fructano exohidrolasas
1-FEH	1-fructano-exohidrolasa
6-FEH	6-fructano-exohidrolasa
FT	Fructosiltransferasa
1-FFT	1-fructano:fructano-fructosiltransferassa
6-FFT	6-fructano:fructano-fructosiltransferassa
FOS	Fructooligosacáridos
FN	Fructofuranosil nistosa
G	Glucosa
6G-FFT	Fructano:fructano 6G-fructosil transferassa

GP	Grado de polimerización
GPC	Gel permeation chromatography Cromatografía por permeación en gel
h	Horas
HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico
HPLC	High performance liquid chromatography Cromatografía de líquidos de alta resolución
Inv	Invertasa
6-KEH	6-Kestosa exohidrolasa
IP	Índice de polidispersión
1-K	1-Kestosa
6-K	6-Kestosa
L	Litros
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns Patrones moleculares asociados a microorganismos
mg	Miligramos
Mn	Molar mass average number Número de masa molar promedio
Mw	Mass molar average weight Masa molar promedio en peso
N	Nistosa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NK	Neokestosa

PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PH	Process Hardiness Proceso de resistencia
P1	Planta 1
P2	Planta 2
P3	Planta 3
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
S	Sacarosa
6-SFT	6-sacarosa:fructano -fructosiltransferasa
1-SST	1-sacarosa:sacarosa-fructosiltransferasa
6-SST	6-sacarosa:sacarosa -fructosiltransferasa
TLC	Thin layer chromatography Cromatografía en capa fina

RESUMEN

Los fructanos de agave son polímeros de fructosa de gran importancia por su capacidad prebiótica, cuya influencia en la microbiota intestinal se ha empezado a estudiar en los últimos años. A diferencia del tequila y otras bebidas clásicas obtenidas a partir de agave, el pulque es el único producto en el cual no se destruye térmicamente a los fructanos. Sin embargo, poco se sabe sobre la variación de la composición de fructanos en el aguamiel, la materia prima en la elaboración de pulque, y su variación durante el proceso de recolección. Por lo anterior, en esta investigación se dio seguimiento a diversas plantas de agave pulquero durante su vida productiva analizando el aguamiel producido en sus diferentes etapas.

Se estudiaron 3 plantas de agave, dos de *A. mapisaga* y una de *A. salmiana*, a lo largo de varios meses, el volumen total de aguamiel producido en cada una de las plantas fue de aproximadamente 676.6, 662.3 y 334.8 L respectivamente. Se llevó a cabo la cuantificación y análisis del perfil de los azúcares simples y fructanos presentes en el aguamiel fresco y el aguamiel acumulado en el cajete, así como en el *metzal* (el tejido proveniente del raspado del cajete, oquedad hecha en el tallo de la planta), encontrando que existen diferencias significativas de concentración de azúcares simples y fructanos a lo largo de la vida productiva de las plantas.

Se encontró que, después del raspado del cajete, el aguamiel fresco contenía una alta concentración de sacarosa, misma que permaneció constante durante las primeras 7 horas de recolección (7:00 a 14:00 h). Destaca el hecho de que el aguamiel fresco no contenía azúcar invertido. Sorprendentemente, se observó que los fructanos fueron liberados al raspar el cajete y arrastrados por los primeros mililitros de savia, pero que una vez agotados estos, el aguamiel que se iba exudando solo contenía sacarosa. Así, los fructanos que se extraían al raspar las paredes del cajete, es decir del tallo, se diluían en el aguamiel que se acumulaba.

Se analizaron los cambios que sufren los carbohidratos del aguamiel al acumularse en el cajete, siendo la aparición de fructosa y glucosa, por hidrólisis de sacarosa, el principal cambio. Se encontró que, en ciertos casos, hubo un cambio en el perfil de oligosacáridos, derivado del consumo de los fructanos y la síntesis de otros azúcares, por parte de los microorganismos presentes en la planta. Se estableció una clasificación del aguamiel acumulado con base en la modificación o permanencia del perfil de oligosacáridos que presentó el aguamiel fresco, en diferentes etapas de la vida productiva de las 3 plantas estudiadas (P1, P2 y P3). Este comportamiento se verificó mediante el análisis comparativo de aguamiel fresco y acumulado tomado de 10 plantas seleccionadas al azar dentro de la zona de Huitzilac, Morelos.

Además, se realizó la cuantificación global de azúcares durante la vida de las plantas P1, P2 y P3, encontrando que, hay una pérdida considerable de fructanos como consecuencia del raspado, ya que su contenido en el metzal, que se desecha, representa hasta el 50 % de la cantidad de fructanos detectados en el aguamiel. Se estimó que la cantidad de sacarosa y fructanos en el aguamiel durante la vida productiva de las plantas P1, P2 y P3, fue de 70.6, 61.5 y 36.7 Kg y 3, 1.7 y 2 Kg, respectivamente.

Palabras clave: Aguamiel fresco, aguamiel acumulado, metzal, fructanos, oligosacáridos sacarosa, fructosa y glucosa.

1.0 INTRODUCCIÓN

Desde la época prehispánica, los agaves han sido de suma importancia económica y cultural para numerosos pueblos (Escalante y col., 2016). En Mesoamérica eran utilizados como alimento, medicina, construcción de vivienda, entre otros. Hoy en día son plantas con un valor agregado para varias industrias, sobre todo la alimentaria, debido a su riqueza en sustancias con diferentes actividades biológicas, principalmente los polímeros de fructosa que sirven para la elaboración de jarabes, alcohol y prebióticos (Olvera y col., 2015).

Los agaves para la industria alimentaria son aprovechables antes de la floración, cuando la planta ha acumulado sustancias de reserva para llevar a cabo esta función. Una vez que se acerca a esta etapa, se evita que el agave se reproduzca sexualmente mediante el surgimiento de su inflorescencia. Por ello se corta el primordio floral, tallo floral o quiote, lo que permite extraer los azúcares de reserva acumulados en el tallo, tal como se realiza con la obtención del aguamiel, materia prima para la producción de pulque (García-Mendoza, 1992)

El pulque es una bebida alcohólica de gran tradición en México. Es el producto resultante de la fermentación del aguamiel proveniente principalmente de varias especies de agave endémicas de México como *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. hookerii*, *A. inaequidens*, *A. marmorata* (García-Mendoza, 1992). En las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto el importante papel que juegan los fructanos de agave (polisacáridos de fructosa) en el carácter prebiótico atribuido a la bebida, motivo por el cual describir los cambios que sufren los polisacáridos en la planta y en el aguamiel durante la etapa de vida productiva del agave es de particular interés. Para ello, es de esperar que la participación de las enzimas hidrolíticas endógenas del agave tenga una contribución relevante, esto sin dejar de considerar la complejidad que implica la participación de microorganismos tanto endófitos como los introducidos durante la extracción y acumulación del aguamiel.

Si bien se ha reportado en la literatura la composición de azúcares en el aguamiel, no existe ningún reporte en el que se describa la historia de su acumulación en el cajete a partir del raspado de la piña, ni durante el tiempo de vida productiva de la planta. En este estudio se llevó a cabo el monitoreo de 3 agaves pulqueros, se analizaron los cambios que sufren los carbohidratos en el aguamiel al acumularse en el cajete, así como los cambios del aguamiel fresco y del metzal durante la vida productiva del agave (Perfil de los fructanos, grado de polimerización y concentración).

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 Agave

El agave pertenece a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida, familia Asparagacea. El género *Agave* es endémico de América y aproximadamente el 75% de sus especies se encuentran distribuidas en México (García-Mendoza, 2007). Los agaves se consideran plantas perennes, pues su ciclo de crecimiento y floración toma más de una estación de crecimiento. Sus hojas pueden ser duras, rígidas o laxas, y tienen diferentes tipos de espinas y dientes los cuales son usados como referencia para su clasificación.

La inflorescencia emerge del tallo cuando la planta llega a la madurez (Figura 1). Este proceso requiere, dependiendo de la especie, de entre 8 a 15 años. Pueden reproducirse de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos nectarívoros y, en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (García-Mendoza, 2007), mientras que la reproducción asexual es a través de la generación de rizomas o hijuelos. Sin embargo, la edad y frecuencia con que los agaves comienzan a producir hijuelos también es variable.

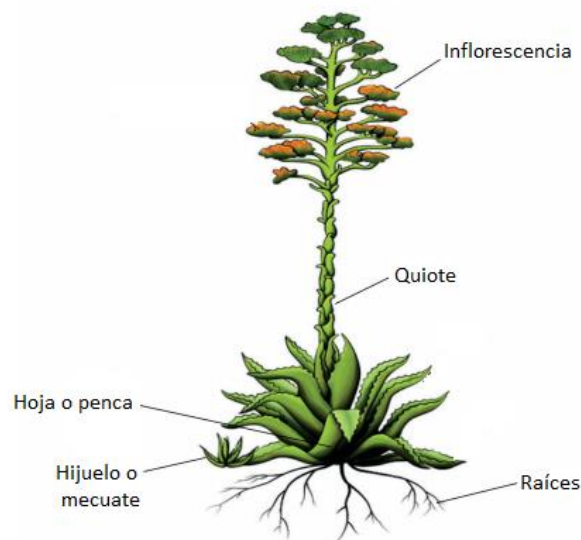


Figura 1. Esquema general de una planta de agave. Modificado de Narváez, (2016).

Los agaves son organismos que dependiendo la especie pueden ser diploides o poliploides. Los poliploides en agave originan nuevos fenotipos con una mayor capacidad de adaptación y respuesta a ambientes extremos, lo que puede contribuir a su éxito como especie en la naturaleza o en su selección y uso en la agricultura (García-Mendoza, 2007). Los agaves poliploides son plantas que a lo largo del tiempo han sido domesticadas y modificadas de tal forma que en un campo en el que han sido sembradas y polinizadas diversas especies pulqueras (*A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana* y *A. atrovirens*), con frecuencia se encuentran cruza entre distintas especies, lo cual puede causar confusiones en su clasificación morfológica.

Un ejemplo de ello se muestra en un estudio de Alfaro y col. (2007) sobre poblaciones de agave pulquero “Manso”, “Ayoteco”, “Verde” “Xilometl”, “Negro” y “Carrizo”, en el que se reportó que las especies *A. mapisaga* y *A. salmiana* eran muy parecidas morfológicamente a pesar de ser diferentes genéticamente. Sin embargo, se encontró que el porcentaje de *loci* polimórficos entre las poblaciones fue de 73.2 %, mostrando con ello que presentan alta variabilidad genética.

A través de su metabolismo secundario, los agaves sintetizan productos bioactivos con diversas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, ejemplo de ello son las sapogeninas esteroidales con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, anticancerígenas y antimicrobianas; flavonas y flavonoides con actividad inmunosupresora, entre otros (Chen P. y col., 2009; Yokosuka 2009; Misra, 2018).

2.2 Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM)

Los agaves están clasificados como plantas xerófilas, debido a que se adaptan a vivir en condiciones climáticas hostiles como altas temperaturas y largos periodos de sequía; poseen estrategias como su metabolismo CAM (Metabolismo ácido de las crasuláceas), que les permite su sobrevivencia. Las plantas con metabolismo CAM realizan la apertura de sus estomas por las noches para la captación de CO₂, mientras que durante el día permanecen cerrados, evitando así que la planta se deshidrate.

El metabolismo CAM consta de dos fases: Durante la noche el CO₂ es fijado en el citosol por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). A través de la glicólisis de carbohidratos de almacenamiento o azúcares solubles formados en días anteriores, se produce fosfoenolpiruvato (PEP), este compuesto se carboxila por la PEPC usando bicarbonato como sustrato para generar oxaloacetato (Dood y col., 2002). El oxaloacetato formado de esta reacción, se reduce rápidamente a malato por una NAD (P)-malato deshidrogenasa, el malato formado se mueve hacia la vacuola y ahí se almacena como ion (Andrade y col., 2007).

Durante el día se lleva a cabo la liberación del malato de la vacuola hacia el citosol, seguido de su descarboxilación y de la formación de compuestos de tres carbonos (piruvato o PEP). Posteriormente el CO₂ liberado es incorporado por la enzima RuBisCO al ciclo de Calvin-Benson en el cloroplasto, generando como producto una triosa fosfato (Figura 2).

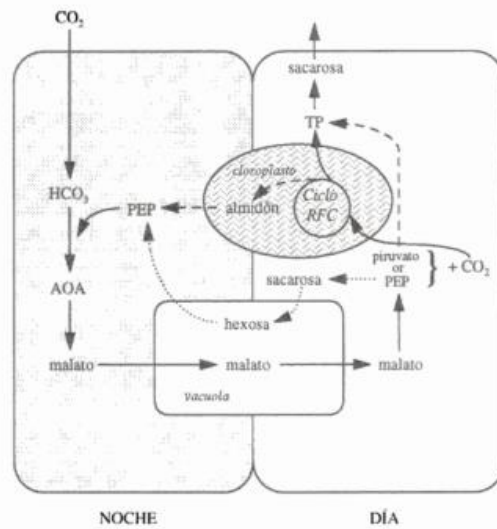


Figura 2. Metabolismo ácido de las crasuláceas (Villalobos-Rodríguez, 2002).

La triosa fosfato puede quedarse en el cloroplasto y ser transformada a almidón, o salir al citoplasma y ser transformada en sacarosa donde puede salir al apoplasto o ser ingresada a la vacuola, donde constituye el sustrato esencial para la formación de fructanos (Figura 3).

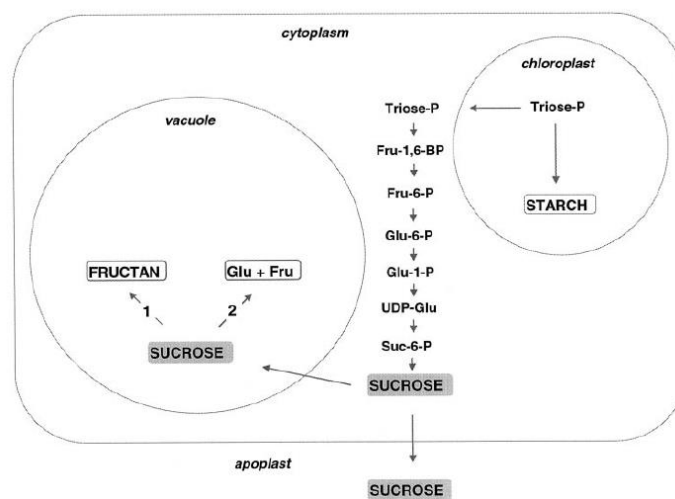


Figura 3. Síntesis de fructanos (Vijn, 1999).

Por lo menos 17 especies de agave abren sus estomas por la noche, mientras que otras, son hasta cierto punto, facultativas. Tal es el caso de *A. mapisaga* que bajo condiciones de riego llega a abrir sus estomas durante el día (García-Mendoza, 2007). Dentro de las especies de agave pulqueras, la especie *A. mapisaga* capta mayor CO₂ que *A. salmiana*, siendo la cantidad de CO₂ que captan durante la noche alrededor de 5 veces mayor que durante el día, incrementándose la captación durante el verano (Nobel y col., 1992).

2.3 Transporte de agua y carbohidratos en el agave

El tejido vascular es un tejido vegetal complejo, formado por varias clases de células y componentes que se encuentran en las plantas vasculares, como es el caso del agave. Los componentes primarios del tejido vascular son el xilema y el floema. Los vasos del xilema forman una red de conductos que se extiende por todas las regiones de la planta, llevando a todas las células vivas un suministro de agua y sales minerales (Esau, 1976).

El floema es un sistema conductor continuo estrechamente interconectado, constituido por células que se extienden por todos los órganos de la planta transportando principalmente azúcares. Estudios de exudados del floema han demostrado que la sacarosa es por mucho, el azúcar transportado predominante. Sin embargo, además de la sacarosa (S), algunas especies transportan otros oligosacáridos como la rafinosa, la estaquiosa y la verbacosa (Devlin, 1982) u otras moléculas como el manitol. La savia del floema también puede contener minerales, aminoácidos y hormonas (Campbell y col., 2005).

El movimiento de azúcares por el floema depende de la producción y el consumo de azúcar. La fuente, son aquellas estructuras de síntesis activa de carbohidratos, mientras que los sumideros son los órganos que requieren azúcar, ya sea que la consuman o la conviertan a algún carbohidrato de reserva. La descarga del floema

a los órganos sumideros puede ocurrir por dos rutas: simplástica o apoplástica, es decir por el interior de la célula o a través de la pared celular.

El apoplasto es el sistema continuo de paredes celulares y de espacios aéreos intercelulares en los tejidos vegetales (Lincoln y col., 2006). En la ruta del apoplasto el agua y los solutos se mueven exclusivamente a través de la pared celular sin atravesar ninguna membrana. Además de la presencia de sacarosa, fructosa y glucosa en el apoplasto, existen reportes de presencia de fructanos en plantas sometidas a bajas temperaturas (Livingston y col., 1998)

El parénquima es un tejido vegetal característico de las hojas de las plantas superiores, forma parte de la corteza, tallo, raíces, en la pulpa de los frutos y el endospermo de las semillas. Está implicado en una gran variedad de funciones como la fotosíntesis, el almacenamiento y la elaboración de sustancias orgánicas. Se encuentra en tallos, raíces, hojas, en la pulpa de los frutos y en las semillas. Las células del parénquima también pueden aparecer asociadas al xilema y floema, formando parte integral de los mismos (Figura 4).

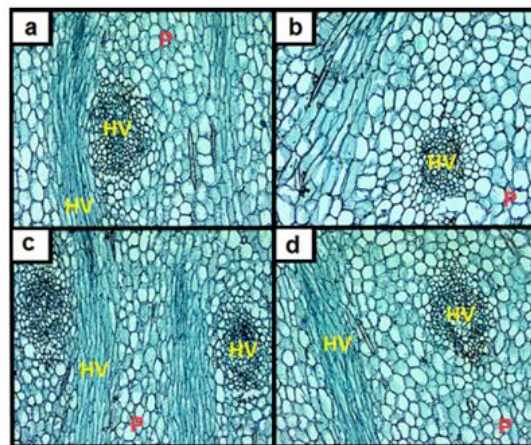


Figura 4. Disposición espacial de tejidos de agave en cortes transversales de a) *A. angustifolia* Haw y b) *A. tequilana* Weber; cortes radiales de c) *A. angustifolia* Haw y d) *A. tequilana* Weber. HV: Haces Vasculares. P: Parénquima. (Sánchez, 2010).

Las células de colénquima del tallo de agave, son células estrechas con paredes no lignificadas, constituidas principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectinas y agua, y tienen la función de dar soporte al tejido vascular de la planta (Hopking, 1999).

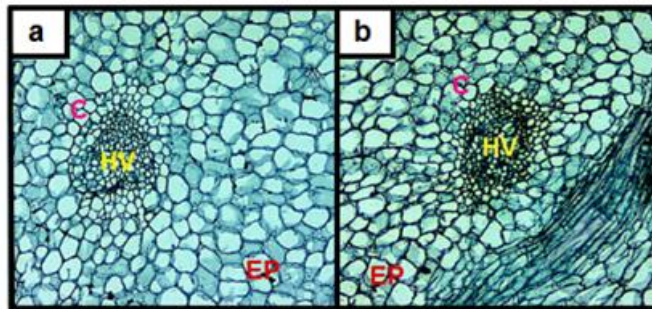


Figura 5. Cortes de tallo de agave: a) *A. angustifolia* Haw y b) *A. tequilana* Weber. C: Colénquima. EP: Epidermis. HV: Haces vasculares (Sánchez, 2010).

Se ha comprobado que algunos oligofruktanos como la neokestosa (NK), 1-kestosa (1-K), nistosa (N) y fructofuranosil nistosa (fN), son sintetizados y transportados en el floema de hojas maduras de *A. deserti* (Wang y col., 1998). Debido a las concentraciones de oligofruktanos y la actividad de fructosiltransferasas en el floema, ausentes en el colénquima (Tabla 1), en el estudio de Wang y col, se sugiere que la biosíntesis de fructanos en las hojas está restringida a los tejidos vasculares, y que su difusión de los tejidos vasculares a las células fotosintéticas es extremadamente baja a pesar de que existe un gradiente de concentración sustancial.

Tabla 1. Actividad enzimática detectada en varias regiones de hojas maduras de *A. deserti*.

Enzima	Muestra	Actividad (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹)
Fructosiltransferasas	Colénquima	Nd*
	Tejido vascular	14.6 ± 2.0
Fructosil hidrolasas	Savia del floema	260 ± 27
Sacarosa sintetasa	Colénquima	14.1 ± 1.5
Invertasa ácida	Colénquima	3.0 ± 3.0
	Savia del floema	Nd*
Invertasa alcalina	Colénquima	1.1 ± 1.0
	Savia del floema	Nd*

Fuente: Wang y col., 1998. *Nd: No detectado.

2.4 Carbohidratos presentes en la planta de agave

Los azúcares encontrados en la planta de agave son principalmente F, G y S, en lo que a carbohidratos simples se refiere, y como carbohidratos complejos se encuentran mayoritariamente fructanos (Mancilla-Margalli y col., 2006), aunque se ha reportado almidón en bajas cantidades (García-Curbelo y col., 2009).

El contenido de carbohidratos simples y complejos, así como su grado de polimerización (GP), está correlacionado con la edad de la planta (Tabla 2). A medida que se acerca la edad de floración, la cantidad y GP de fructanos aumenta (Mellado-Mojica y col., 2012).

Tabla 2. Composición de los carbohidratos presentes en plantas de *A. tequilana* de diferentes edades, provenientes del estado de Jalisco.

Edad (años)	Azúcares totales	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Fructanos	Almidón	GP mayoritario
2	406.8	19.7	20.8	39.3	328.7	4.9	6
4	593.8	17.5	10.4	29.7	533.8	2.5	8
6	714.7	12.2	4.7	17.3	679.4	1.2	16
7	741.6	11.7	4.3	14.1	710.9	0.6	23

Fuente: Mellado-Mojica y col., 2012. Los datos se reportan en mg/g peso seco.

Según el estudio de Mancilla-Margalli y col. (2006), otros factores que influyen en el perfil de carbohidratos son el tipo de suelo, la temperatura y la humedad, habiendo demostrado además que el GP de los fructanos agaves de la misma especie y con la misma edad, puede ser variable si se ubican en diferentes zonas geográficas (Tabla 3).

Tabla 3. Grado de polimerización de los fructanos presentes en diferentes especies de agave distribuidos en distintos estados de México.

Estado	Especie de agave	GP mayoritario
Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	32
	<i>A. potatorum</i>	15
	<i>A. cantala</i>	11
Jalisco	<i>A. tequilana</i>	18
Sonora	<i>A. angustifolia</i>	13
Guanajuato	<i>A. tequilana</i>	7
Yucatán	<i>A. fourcroydes</i>	6

Fuente: Mancilla-Margalli y col., 2006.

2.4.1 Función de los fructanos en el agave

En plantas resistentes al frío, la reducción de temperatura induce un proceso de resistencia esencial para la supervivencia, definido como “process hardiness” (PH) (Livingston y col., 1998). En los estudios de Livingston y col. (1998), mediante el sometimiento de avena a diferentes etapas de frío, se observó que a temperaturas superiores a 0°C y en presencia de luz, había una inducción de la actividad de las enzimas 1-sacarosa:sacarosa-fructosiltransferasa (1-SST) y 6- sacarosa:fructano-fructosiltransferasa (6-SFT), dando lugar a una acumulación de fructanos y sacarosa. Por otro lado, al someter el tejido a temperaturas inferiores (- 3 °C) y en presencia de oscuridad, los fructanos eran hidrolizados por fructano exohidrolasas (FEH) e invertasas (Inv), dando como resultado la acumulación de fructooligosacáridos (FOS). La acumulación de FOS en el apoplasto en condiciones extremas de estrés, puede ser resultado de daño celular lo que sugiere que su presencia es determinante para la resistencia a frío.

Los fructanos pueden, entre otras cosas, estabilizar las membranas plasmáticas en procesos de desecación, prevenir la adhesión de hielo y/o actuar como osmoprotectores evitando la deshidratación de los tejidos (Van Laere, 2002; Orthen, 2004). Algunos autores plantean que la acumulación de fructanos en respuesta a estrés, podría ser el resultado de un aumento en su síntesis ya que se ha observado que en estrés abiótico hay un incremento en la expresión y actividad de fructosiltransferasas (FT) (Versluys, 2017a) o a una disminución en la utilización de los productos obtenidos mediante la fotosíntesis.

La estabilización de la membrana se lleva a cabo cuando los fructanos interactúan con las cabezas lipídicas de ésta, desplazando moléculas de agua y provocando rigidez en las cabezas y mayor movilidad en las colas (acilos). Dicha interacción se favorece cuando los lípidos son pequeños y los fructanos son de alto GP (Hincha y col., 2002). Se ha observado que el tipo de enlace de los fructanos tiene una influencia en la interacción, ya que, una levana de ~125 GP es equivalente a una

inulina de ~15 GP, diferencia atribuida a menor flexibilidad conformacional de la molécula de levana, en la que los anillos furanosa son parte del esqueleto molecular (Vereyken y col., 2003).

EL concepto de “Sweet immunity”, postula que el metabolismo y señalización de los azúcares, sacarosa y algunos oligosacáridos como los FOS, influyen en las respuestas de inmunidad innata (Bolouri y col., 2013). Se plantea que los fructanos en las plantas pueden actuar como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), esto debido a su presencia en el apoplasto en condiciones de estrés. Además, cree que los fructanos de origen bacteriano podrían intervenir como patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) al ser hidrolizados en el apoplasto por enzimas FEH de la planta y ser reconocidos por algunos receptores (Versluys y col., 2017b)

2.4.1.1 Estructura de los fructanos

Los fructanos son polímeros de fructosa que presentan diferentes estructuras con uniones β -furanosilfructosa, principalmente, algunos de ellos con una molécula de glucosa interna o en un extremo. El tamaño de estos polímeros dependerá de su fuente de origen, los fructanos provenientes de microorganismos suelen ser de GP alto, el cual puede alcanzar 100,000 unidades de fructosa; mientras que los provenientes de plantas son de GP bajo, alrededor de 30 a 50 unidades, aunque existen algunos casos en los que pueden exceder las 200 unidades (Vijin y col., 1999).

Las unidades estructurales básicas de los fructanos se forman por la transferencia de una fructosa a uno de los hidroxilos presentes en la sacarosa. Dependiendo de cómo se dé la polimerización de estas unidades básicas se pueden clasificar como:

- Inulina (Figura 6 a): polímero lineal de unidades de fructosa con enlaces β (2-1), unidos a una unidad de glucosa. Este polímero se encuentra principalmente en dicotiledóneas y ha sido más estudiada en achicoria y

alcachofa (van Laere y col., 2002). La molécula más pequeña de inulina es la 1-kestosa, también llamado isokestosa.

- Levano (Figura 6 b): polímero lineal de unidades de fructosa con enlaces β (2-6), unidos a una unidad de glucosa. Este tipo de polímero es encontrado en especies pertenecientes al orden Poales, como el trigo (Carpita y col., 1989).
- Graminana: fructano que contiene ambos tipos de enlace. Generalmente son estructuras ramificadas con bifurcosa como unidad básica. Se encuentran en plantas como trigo y cebada.
- Neofructanos: fructanos ramificados caracterizados por tener una unidad de glucosa entre dos moléculas de fructosa. Se pueden clasificar en:
 - a) Inulina neoserie, estructuralmente basada en la neokestosa. Es un polímero formado por adiciones de Fru a uno o ambos extremos mediante enlaces β (2-1). Este tipo de fructanos se encuentra en las familias Asparagaceae como el espárrago (Ritsema y col., 2004), y Liliácea como la cebolla (Shiomi, 1989).
 - b) Levano neoserie, polímero similar a las neoserias de inulina, pero con enlaces de tipo β (2-6). Este es el fructano menos común y se presenta sólo en algunas especies pertenecientes al orden Poales (Livingstone, 1993),

Estudios de Mancilla-Margalli y col. (2006), sugieren que, en el caso del agave, los polímeros predominantes son graminanas y neofructanos con diferentes tipos de arreglos basados en su GP (Figuras 6 c y 6 d).

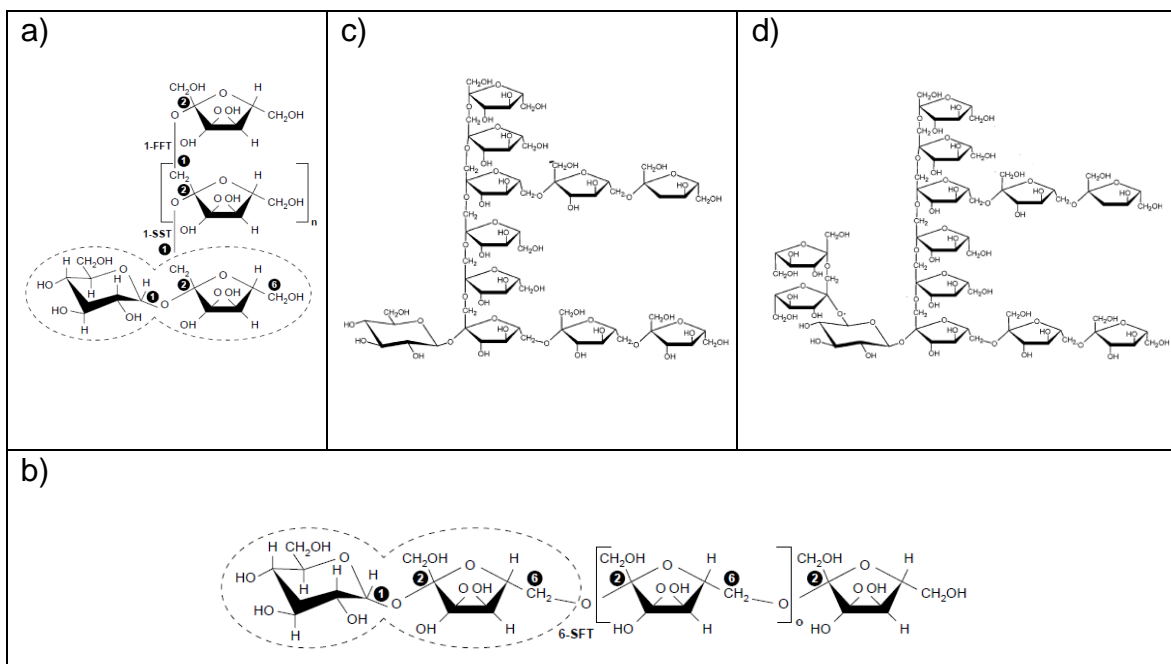


Figura 6. Estructuras de los diferentes tipos de fructanos: a) inulina y b) levano, descritos por Ritsema y col. (2003); c) graminana y d) neofructanos presentes en el agave propuestos por Mancilla-Margalli y col. (2006).

2.4.1.2 Síntesis e hidrólisis de fructanos

Los fructanos se sintetizan y almacenan en las células del tallo de los agaves (Aspinall y col., 1957). Las reacciones de síntesis sólo se llevan a cabo en la vacuola, y hasta el momento no existen reportes de algún otro lugar donde se puedan realizar (Valluru y col., 2008).

La síntesis e hidrólisis de los fructanos en los agaves se lleva a cabo por un grupo de enzimas agrupadas como FAZY (fructan active enzymes): FT y FEH cuya actividad está relacionada con la edad de la planta (Mellado-Mojica y col., 2017). El proceso de síntesis comienza con la enzima 1-SST, la cual transfiere fructosa de una molécula de sacarosa a otra sacarosa. La 1-kestotriosa o 1-kestosa así formada (GF₂), es el metabolito central utilizado por el resto de las FT en la síntesis de

fructanos de mayor peso molecular (Ávila y col., 2007). La 1-fructano:fructano-fructosiltransferasa (1-FFT) elonga el polímero mediante enlaces $\beta(2-1)$ generando inulina, mientras que la 6-fructano:fructano-fructosiltransferasa (6-FFT) elonga polímero mediante enlaces $\beta(2-6)$ formando levana (Mellado-Mojica y col., 2017).

La hidrólisis de fructanos es llevada a cabo por enzimas FEH, las cuales se encuentran en la vacuola y en el apoplasto (Valluru y col., 2008). Las FEH hidrolizan por el extremo no reductor de la cadena del fructano en función del tipo de enlace. La 1-fructano-exohidrolasa (1-FEH) es responsable de la degradación de los fructanos de tipo inulina, con mayor especificidad para los enlaces $\beta(2-1)$, mientras que la 6-fructano-exohidrolasa (6-FEH) degrada los fructanos tipo levana que exhiben enlaces $\beta(2-6)$. Los fructanos de tipo inulina y levana, así como los fructanos ramificados con enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$, pueden ser hidrolizados por la fructano 1,6-fructano-exohidrolasa (1,6-FEH) exhibiendo una mayor especificidad por la bifurcosa (Mellado-Mojica y col., 2017). Recientemente se han descrito un cuarto tipo de fructano exohidrolasa denominada 6-kestosa-exohidrolasa (6-KEH) una enzima altamente específica de la 6-kestosa (6-K) y que a diferencia de las demás FEH no es inhibida por la sacarosa (Valluru y col., 2008). Finalmente, una vez que los fructanos han sido reducidos, interviene la enzima invertasa (Inv), cuya función es la hidrólisis de la sacarosa y FOS pequeños, su presencia es abundante en tejidos de monocotiledóneas.

2.5 Aguamiel y pulque

El pulque es la bebida alcohólica de mayor historia en México. El consumo de esta bebida desde la antigüedad ha atravesado por diversos estratos sociales, siendo considerada como: bebida-alimento base de la alimentación tradicional y completa del mexicano; bebida inmunda propia de los sectores empobrecidos del campo y de la ciudad; bebida ritual o de los dioses consumida por los sacerdotes, altos dirigentes y guerreros y bebida exclusiva para hacendados (Ramírez-Rancaño, 2012).

Actualmente el consumo de pulque se ha mantenido principalmente en las zonas rurales de los estados productores, aunque también se ha incrementado entre los jóvenes de las ciudades debido a: la popularización de los llamados "curados", pulque mezclado con diversos ingredientes; la revaluación que ha tenido la bebida dentro de la culinaria mexicana; así como por los avances sobre el conocimiento científico de algunas de sus propiedades nutrimentales.

La importancia del pulque dentro de la cultura mexicana, conocida también como la cultura del pulque, fue tal que lo deificaron en la Diosa Mayahuel, la que también fue conocida como la diosa del maguey, por todas las bondades que esta planta les brindaba. Mayahuel está representada en códices, pinturas y murales provenientes de esta y otras culturas indígenas del centro de México.

Según los códices mexicanos, los aztecas durante su migración al Valle de México, extrajeron el aguamiel y elaboraron el pulque entre 1172 y 1291 d.C (Escobar, 2009). De acuerdo con la historia y tradición, el pulque tiene propiedades terapéuticas o medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades como: padecimientos gastrointestinales, pérdida de apetito y debilidad. Las mujeres de la cultura mazahua y otras etnias acostumbran beberlo para aumentar su producción de leche y elevar la calidad de la misma ya que el pulque tiene propiedades como

galactogogo. En el estado de Hidalgo, las mujeres acostumbran destetar a sus hijos mojando un dedo en pulque y dándoselo en vez del seno (Escalante y col., 2012).

Por otro lado, el aguamiel, a partir del cual se obtiene el pulque, es considerado una bebida rica en nutrientes debido a su contenido de, proteína, minerales, FOS y compuestos antioxidantes (Santos-Zea y col., 2016), por lo que se ha utilizado como un alimento alternativo en localidades donde el consumo de alimentos es limitado o como un sustituto de agua donde es escasa o de mala calidad (Granados-Sánchez, 1993).

2.5.1 Proceso de producción de Pulque

El proceso de producción del pulque comienza con la “castración” o “capado” del agave, lo cual se realiza previa a su floración, a una edad que varía entre los 8 y los 10 años. Este proceso consiste en retirar las hojas centrales y realizar una cavidad en el tallo, retirando el meristemo central, que se convertirá en la inflorescencia del agave. Al retirar el cogollo queda un hueco en el centro del tallo de la planta o mezontete, que posteriormente al rasparlo se convertirá en el “cajete”. El proceso de castración varía entre las regiones productoras; en Huitzilac, Morelos, se perfora la cavidad y se retira la base del cogollo “corazón” sin eliminar las hojas centrales ni el cogollo (Escalante y col., 2016).

Posterior al castrado, el agave se deja madurando de 1 a 3 meses o de 6 a 12 meses, según el productor y la región productora. El productor con el que se trabajó en el presente proyecto dejó madurando el agave por 5 semanas. Una vez terminada la maduración se inicia el raspado y la recolección diaria de aguamiel durante 3-10 meses hasta que la planta muere. El proceso de recolección se realiza una vez que se ha acumulado el aguamiel, 12 a 14 h después del raspado de las paredes de la cavidad, que se realiza con una cuchara metálica llamada “raspador”

u “*ocaxtle*”, induciendo el flujo de savia hacia el cajete. El raspado y la recolección del aguamiel acumulado se lleva a cabo 2 veces por día.

Para la extracción del aguamiel (Figura 7) se usa una calabaza seca denominada “*acocote*” aunque en ciertos ámbitos empiezan a usarse bombas. El aguamiel es transportado en contenedores de plástico, madera u otro material hacia el cuarto de fermentación (*tinacal*) y es depositado en los fermentadores. Comúnmente la fermentación se lleva a cabo en recipientes de piel de vacuno, fibra de vidrio, madera o plástico. La fermentación se realiza adicionando el aguamiel al pulque almacenado de la producción anterior (Escalante y col., 2012).



Figura 7. Extracción de aguamiel por el Sr. Salvador Cueto, productor de la zona de Huitzilac, Morelos.

2.5.2 Composición del aguamiel

El aguamiel es un líquido dulce, incoloro, ácido o ligeramente alcalino dependiendo del tiempo que haya permanecido en la planta. La composición química del aguamiel se ve influenciada por el periodo de producción, la especie de agave, las condiciones de siembra de la planta, la humedad y las propiedades de la tierra de cultivo. En la Tabla 4 se muestra la composición de aguamiel de dos especies

diferentes de agaves pulqueros, lo que permite tener una idea sobre la diversa composición del aguamiel.

Tabla 4. Composición de aguamiel proveniente de *A. mapisaga* y *A. atrovirens*.

Componente	% p/p en peso seco <i>A. mapisaga</i>¹	% p/p en peso seco <i>A. atrovirens</i>²
Fructosa	32.4	32.6
Glucosa	26.5	28.7
Sacarosa	8.8	12.9
Fructooligosacáridos	10.2	15.5
Aminoácidos libres	0.3	ND
Proteínas	3.0	3.5
Cenizas	3.3	3.1

Fuente: ¹Ortiz-Basurto y col., 2008 & ²Romero-López y col., 2015.

2.6. Fructanos como compuesto funcional

Debido a los desfavorables desordenes provocados por la mala alimentación, actualmente hay un incremento en el interés por los alimentos funcionales, entendiéndose por estos aquellos que proveen beneficios físicos o metabólicos y contrarrestan enfermedades o desordenes degenerativos (Delgado y col., 2010).

Las fibras solubles así como sus compuestos de descomposición son carbohidratos no digeribles por el humano que promueven el crecimiento de microorganismos benéficos denominados probióticos, que pueden resistir las condiciones adversas del tracto digestivo, adherirse al intestino, colonizarlo, y producir algunos compuestos (exopolisacáridos, compuestos antimicrobianos, ácidos orgánicos de cadena corta, entre otros) que pueden ejercer un efecto positivo en la salud y bienestar del huésped (De Vrese y col., 2008).

Por favorecer el desarrollo de los probióticos las fibras solubles son consideradas ingredientes funcionales o prebióticos. Entre ellos están polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina, gomas y mucílagos) y oligosacáridos tales como fructooligosacáridos (FOS, con un grado de polimerización menor o igual a diez) galactooligosacáridos (GOS, con un grado de polimerización entre dos y ocho) y xilooligosacáridos (XOS con un grado de polimerización entre dos y diez) que estimulan selectivamente a diversos grupos de probióticos como bifidobacterias o lactobacilos (De Preter y col., 2007).

El papel que juegan los fructanos provenientes de achicoria en la salud humana va más allá de ser un prebiótico, ya que se ha encontrado que ayudan a reducir las especies reactivas de oxígeno (como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos), promueven la reabsorción de calcio, y una dieta alta en fructanos reduce los niveles de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en el suero (Scholz-Ahrenz y col., 2001). En cuanto a los fructanos de agave específicamente, estudios en ratones han demostrado que reducen el daño o deterioro cerebral y que pueden ser usados como antioxidantes (Franco-Robles, 2016; Franco-Robles 2018). Además, se ha comprobado que una dieta suplementada con fructanos de agave cumple la función de restaurar la microbiota en animales favoreciendo el crecimiento de bacterias pertenecientes al filo firmicutes, encontrando una relación de su consumo con la pérdida de peso (Huazano y col., 2017)

3.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La estructura de los fructanos de agave se modifica durante la vida productiva del agave, lo que repercute en la concentración y perfil de los fructooligosacáridos del aguamiel.

3.2 Objetivo General:

Determinar los cambios de concentración, perfil y grado de polimerización de los fructanos y azúcares simples del aguamiel y del agave durante la vida productiva de la planta.

3.2.1 Objetivos particulares:

- Determinar los cambios en la concentración, grado de polimerización y perfil de los azúcares en el agave y aguamiel a lo largo de la vida productiva de la planta.
- Definir los cambios en los carbohidratos que presenta el aguamiel al acumularse en el cajete.
- Evaluar el efecto de las enzimas invertasas y fructano exohidrolasas de la planta en el proceso de producción de aguamiel.
- Hacer un estudio comparativo del perfil, concentración y distribución de azúcares de un agave a lo largo del proceso de producción de aguamiel con los de una piña lista para ser castrada.

4.0 METODOLOGÍA

4.1 Toma y almacenamiento de muestras.

Las muestras de cuatro agaves y el aguamiel estudiado se obtuvieron en el predio del Sr. Salvador Cueto, localizado en el municipio de Huitzilac, Morelos. Se utilizaron agaves de especies *A. mapisaga* y *A. salmiana* (caracterizadas por el Dr. Abisaí J. García, del jardín Botánico de la UNAM), con una edad aproximada de 10 años. Las muestras que se recolectaron fueron de una planta de *A. mapisaga* (P1) que de acuerdo con el productor llevaba cinco semanas de haber sido castrada (madurada) y de otros dos agaves (P2 *A. mapisaga* y P3 probablemente *A. salmiana*) que se monitorearon desde su castración y cuyas muestras se tomaron a partir de las 5 semanas de maduración, hasta el final de su vida productiva.

Se incluyó en el estudio una cuarta planta que fue identificada como *A. salmiana* y que se utilizó como control, para evaluar la distribución de los azúcares en la base del cogollo y el tallo. Para ello se esperó a que el productor indicara que estaba lista para ser castrada, se retiraron las pencas y se transportó al laboratorio, donde fue seccionada y congelada a -20 °C hasta su análisis.

Se tomaron muestras de aguamiel y se colectó el material del agave que se obtiene del raspado, al que nos referiremos como *metzal*. Ambas muestras, las de aguamiel y las de *metzal* se congelaron en hielo seco y se transportaron al laboratorio, donde se almacenó el aguamiel a -20 °C y el metzal a -80 °C hasta su análisis.

Las muestras de aguamiel se tomaron de distintas formas para los diferentes tipos de estudios, y fueron denominadas como: aguamiel “fresco”, definido como los primeros mililitros exudados posteriores al raspado; aguamiel “fresco sin raspar”, definido como los primeros mililitros de aguamiel exudados al retirar el aguamiel acumulado, sin raspar el cajete; y aguamiel acumulado, que se define como el aguamiel acumulado de 12-14 h.



Figura 8. Imágenes de las plantas que fueron utilizadas para el estudio: a) Planta 1 (*A. mapisaga*), b) Planta 2 (*A. mapisaga*), c) Planta 3 (*A. salmiana*) y d) Planta control (*A. salmiana*).

Tabla 5. Recolección de muestras de aguamiel y metzal a partir del inicio hasta el final de la producción de aguamiel, de acuerdo con los criterios del productor.

Número de recolección	Semanas de producción	P1 (<i>A. mapisaga</i>)	P2 (<i>A. mapisaga</i>)	P3 (<i>A. salmiana</i>)
1	1	09ago2017	10nov2017	21dic2017
2	2	16ago2017	17nov2017	28dic2017
3	3	23ago2017	28nov2017	05ene2018
4	5	08sep2017	08dic2017	22ene2018
5	7	27sep2017	21dic2017	02feb2018
6	9	13oct2017	05ene2018	16feb2018
7	11	27oct2017	22ene2018	02mar2018
8	13	10nov2017	02feb2018	21mar2018
9	15	28nov2017	16feb2018	04abr2018
10	17	08dic2017	02mar2018	13abr2018
11	19	21dic2017	21mar2018	27abr2018
12	21	05ene2018	04abr2018	14may2018
13	23	22ene2018	13abr2018	25may2018
14	25	02feb2018	27abr2018	
15	27	16feb2018	14may2018	
16	29	02mar2018		
17	31	21mar2018		
18	33	04abr2018		
19	35	13abr2018		
20	37	27abr2018		
21	39	14may2018		

La toma de muestra del aguamiel fue cuidadosa, evitando tomar del fondo del aguamiel acumulado ya que en algunos casos quedaban residuos de metzal y eso interfería en la medición. Para el seguimiento de los cambios en el aguamiel durante la vida productiva del agave se tomaron muestras de aguamiel fresco. Los agaves se monitorearon durante las semanas que se indican en la Tabla 5.

4.1.1 Evolución del contenido de sacarosa y fructanos en el aguamiel a través del día

Se tomaron los primeros mililitros de aguamiel exudado, a diferentes horas de la mañana (7:00, 10:30 y 14:00 h), la muestra de las 7am se colectó de aguamiel *fresco*. Las muestras de las 10:30 y 14:00 h se tomaron de aguamiel *fresco sin raspar*, retirando antes el aguamiel acumulado.

A partir de los resultados de este experimento, se decidió que en todos los análisis de seguimiento de la concentración y perfil de los azúcares a lo largo del tiempo de producción de aguamiel se realizarían en aguamiel fresco.

En un segundo experimento, se analizó el aguamiel a diferentes horas de la mañana (7:00, 10:30 y 14:00 h), pero en todos los casos tomando muestras de aguamiel fresco.

4.1.2 Evaluación de la dilución de fructanos en el aguamiel

Para evaluar la dilución de los fructanos se utilizaron 2 plantas distintas a las 3 ya mencionadas. Las plantas fueron nombradas como α y β , llevaban un tiempo productivo de 3 semanas y se desconoce su especie. De ambas plantas se tomaron muestras cada 20 min durante 3 h, se midió el volumen de aguamiel acumulado en ese tiempo, las muestras fueron congeladas y ya en el laboratorio se analizó el perfil de los fructanos y se determinó la concentración de azúcares simples y fructanos.

4.1.3 Comparación de la concentración de azúcares simples y el perfil de fructanos entre aguamiel fresco y el aguamiel acumulado

Para realizar la comparación del perfil entre el aguamiel fresco y acumulado, se recolectaron muestras de aguamiel acumulado durante la tarde-noche, con un tiempo de acumulación aproximado de 12-14 h posteriores al raspado. Una vez tomada la muestra, el aguamiel acumulado fue retirado, el cajete fue raspado y se tomaron muestras del aguamiel fresco. Se tomaron 5 muestras de aguamiel fresco y acumulado para cada planta (P1, P2 y P3) en diferentes tiempos de vida productiva.

Adicionalmente se tomó aguamiel acumulado y aguamiel fresco, como se describió, de 10 plantas de distintas especies y con diferente tiempo de producción, ubicadas en la zona de Huitzilac (nombradas de A, B, B*, C-I) y 3 muestras de aguamiel de tiempos de extracción desconocido y provenientes de diferentes estados (Michoacán, Tlaxcala y Estado de México).

4.1.4 Seccionamiento y toma de muestra de la piña del agave control

Para evaluar la distribución de azúcares en la piña de agave que sirvió de referencia y control de este trabajo, se tomó una planta de *A. salmiana* que según el productor estaba lista para iniciar la producción de aguamiel. La piña se transportó a la planta piloto del IBT-UNAM donde fue seccionada. Se realizaron 6 cortes transversales, de un espesor aproximado de 4.5 cm (Figura 9). Las primeras 2 secciones abarcaron la base del cogollo del agave, que consta de una zona central y de una serie de estructuras bien definidas semejantes a “gajos”. Dichas estructuras son las hojas jóvenes que van creciendo y que rodean al meristemo vegetativo el cuál posteriormente originará la inflorescencia (Figura 10 a).

La tercera sección abarcó tanto estructura del cogollo como del tallo (Figura 10 d). A esta sección se le realizó un corte transversal a la mitad, para tomar la última muestra central del cogollo (sección numerada como 3.1) y las primeras muestras del tallo (sección numerada como 3.2). Las secciones 4, 5 y 6 abarcaron el tallo llegando hasta la base, muy cercana al área de madera.

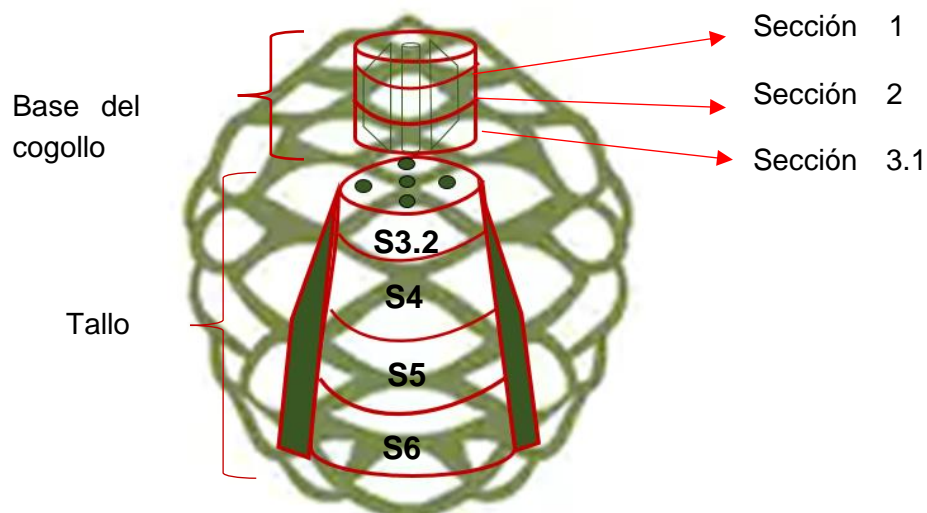


Figura 9. Secciones obtenidas de la piña control (*A. salmiana*), para el análisis de la distribución y concentración de los fructanos y azúcares simples.

Las muestras se tomaron como se describe a continuación:

- 1) Secciones correspondientes al cogollo (S1 y S2): Se tomó la muestra central y un “gajo” por cada capa externa; tomando un total de 4 muestras por sección y nombradas de la A a la D del interior hacia el exterior (Figura 10 a).
- 2) Sección 3: Del lado correspondiente al cogollo, se tomó solo la muestra central nombrada como S3.1 A y del lado del tallo se tomó una muestra central (S3.2 A) y una hacia cada lado, derecha (S3.2 B1), abajo (S3.2 B2), izquierda (S3.2 B3) y abajo (S3.2 B4).
- 3) Secciones 4 y 5: Se tomaron para cada sección una muestra central S4 A y S5 A respectivamente, 2 hacia cada lado derecha (B1 y C1), abajo (B2 y C2), izquierda (B3 y C3) y arriba (B4 y C4) y dos bases de penca (EXT).

4) Sección 6: Se tomaron sólo 3 muestras, una central (S6 A) y 2 hacia el exterior (S6 B y S6 C).

Todas las muestras se tomaron proporcionalmente, es decir tomando la misma distancia entre ellas y con el mismo diámetro (Figura 10 e). Adicionalmente para las secciones 4 y 5 se tomó una muestra de la zona que rodea al tallo, es decir la base de una penca.

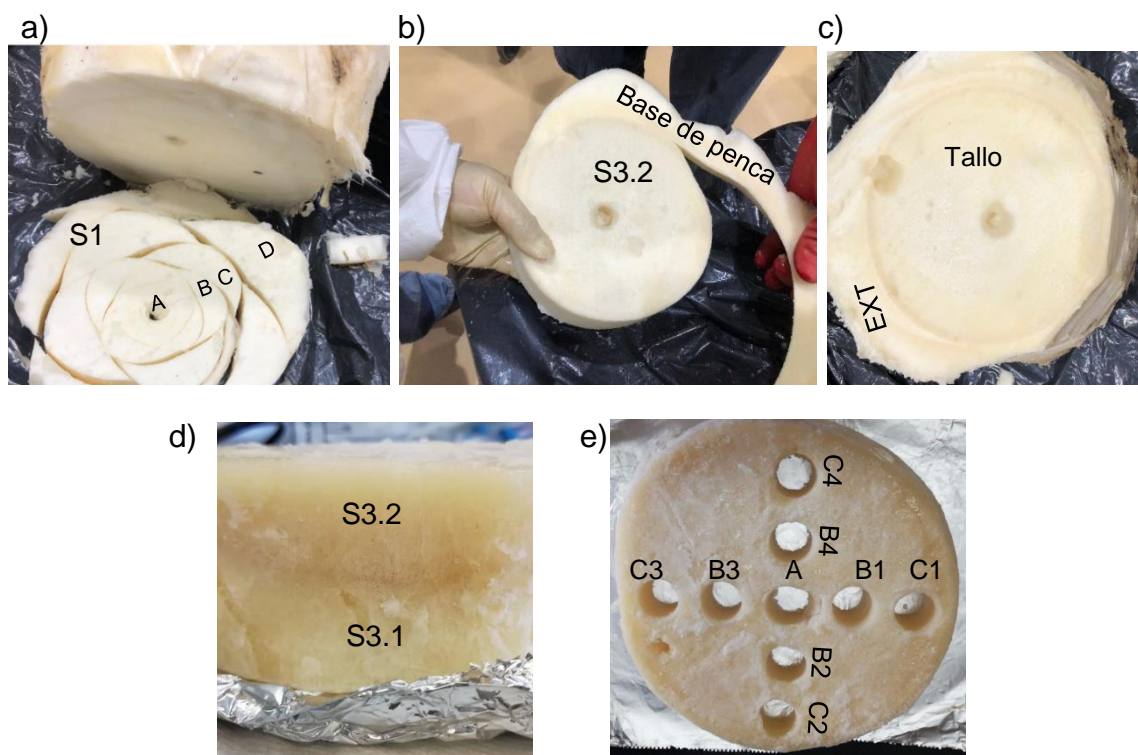


Figura 10. Secciones de la piña control (*A. salmiana*) y toma de muestra: a) 1° sección, correspondiente al cogollo, b) 4° sección, correspondiente al tallo, c) piña con tallo expuesto, d) 3° sección, diferenciación de tejido entre el cogollo y el tallo y e) toma de muestra de la 4° sección.

4.2 Preparación de las muestras

Análisis de azúcares en aguamiel. Las muestras de aguamiel se descongelaron a 4 °C, se centrifugaron a 13 000 rpm con una centrifuga marca Sorvall® (Alemania), por 15 min y se microfiltraron con jeringa con filtros con membrana de nylon de 0.2 µm (Titan3, 17mm; Thermo Scientific, USA). En el aguamiel filtrado se cuantificaron

G, F, S y fructanos. La medición de pH se realizó *in situ* con tiras reactivas (Merck, Alemania).

Extracción de los azúcares de las muestras de metzal y del tejido de las diferentes secciones de la piña control: Para analizar los azúcares de las muestras de metzal y del tejido de las diferentes secciones de la piña control, se pesaron 5 g de tejido, se cortaron en pedazos de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm, a los que se agregaron 10 mL de agua y se “molieron” en una batidora de inmersión marca Hamilton Beach por 1 min (30 segundos en velocidad alta y baja). El batido se centrifugó dos veces la primera a 4°C a 15 000 rpm (Centrifuga Beckman Coulter, USA), y la segunda a 13 000 rpm (Sorvall®) ambas por 15 minutos, el sobrenadante se microfiltró con filtro de nylon de 0.2 µm acoplado a una jeringa.

4.3 Determinación del contenido de humedad de las muestras del metzal y de la piña control

La determinación de humedad se llevó acabo utilizando 2 g de metzal y de tejido de las diferentes secciones de la piña control. Las muestras se sometieron a 60 °C, hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de humedad de la muestra se calculó por diferencia entre el peso inicial y el peso final.

4.4 Determinación de la concentración de azúcares simples y caracterización de los fructanos de las muestras de aguamiel, metzal y piña control

Se llevó a cabo la caracterización (tamaño y perfil) y la determinación de la concentración de los fructanos, así como la determinación de la concentración de los azúcares fermentables, mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

4.4.1 TLC

Se emplearon distintas fases móviles y distintos reveladores, descritos a continuación:

- 1) Fase móvil: Etanol, butanol, agua (15:9:6), en placas de silica gel 60 F₂₅₄ de 10 cm (Merck) aplicando 1 μ L de cada muestra diluida 10 veces. El revelado se realizó con α -naftol aplicado por aspersion y activado con calor (80°C).
- 2) Fase móvil: Propanol, butanol, agua (12:3:4), en placas de silica gel 60 F₂₅₄ de 10 cm aplicando 1 μ L de cada muestra diluida (Aguamiel 1:2, extracto de metzal 1:5 y extracto de piña 1:10). El revelado se realizó con difenilamina aplicada por aspersion y activada con calor (120°C).

4.4.2 HPLC

Dependiendo del tipo de carbohidratos la determinación de la concentración se llevó a cabo de la siguiente forma:

- a) Determinación de la concentración de carbohidratos simples (F, G y S) en aguamiel: Se empleó un equipo de cromatografía marca Ultimate™ 3000 con detección por índice de refracción (Shodex) con las columnas Prevail Carbohydrate ES 5 μ m y Gold Amino (Thermo Scientific, USA) a un flujo isocrático de 1 mL/min y 1.2 mL/min respectivamente, con una fase móvil de acetonitrilo (J.T. Baker®)/ agua 75:25 v/v y una temperatura de columna de 30°C.
Una columna Aminex (Bio-Rad, USA) a un flujo isocrático de 0.6 mL/min, empleando como fase móvil agua miliQ y una temperatura de columna de 85 °C. Empleando como estándar una solución de los tres azúcares marca Sigma Aldrich a una concentración de 10 g/L cada uno.

b) Determinación de la concentración de carbohidratos simples (F, G y S) en el raspado de agave: Se empleó una columna Aminex a un flujo isocrático de 0.6 mL/min, utilizando como fase móvil agua miliQ y una temperatura de columna de 85 °C.

Una columna luna omega a un flujo isocrático de 1 mL/min, empleando como fase móvil acetonitrilo, agua 75:25 v/v y una temperatura de columna a 35°C. Se empleó como estándar una solución de los tres azúcares a una concentración de 10 g/L cada uno. Se utilizaron distintas columnas que en el aguamiel debido a que el metzal contenía azúcares que interferían con la separación y determinación de la concentración de sacarosa.

c) Determinación de la concentración global de fructanos: Se llevó a cabo por cromatografía por permeación en gel (GPC), mediante HPLC, con una columna Ultrahydrogel linear (Waters, Japan) a un flujo isocrático de 0.8 mL/min con una fase móvil de NaNO₃ 0.1 M y una temperatura de columna de 35°C. Empleando como estándar una solución Agavina comercial marca Preventy (México).

La determinación de la concentración de F, G y S se determinó mediante el área de los picos con excepción de las muestras de metzal que fueron cuantificadas con la columna Aminex-C, se llevó a cabo por altura del pico.

4.4.3 HPAEC-PAD

La caracterización específica de las principales estructuras que conforman los fructanos se llevó a cabo por HPAEC-PAD, empleando un detector electroquímico ED50 (Dionex, USA) y una columna para análisis de carbohidratos CarboPac® PA200 (Thermo Scientific, USA) con un flujo con gradiente de 0.5 mL/min, utilizando como fase al 99% de hidróxido de sodio 0.1 M y al 1 % una mezcla 1:1 de acetato

de sodio 0.5M / hidróxido de sodio 0.1 M a 30°C. Se utilizó como estándar una solución de FOS de Orafti a concentración de 10 g/L.

4.4.4 Determinación del grado de polimerización

La distribución de pesos moleculares para cada muestra se determinó mediante los parámetros **Mn** (Masa molecular promedio en número), **Mw** (Masa molecular promedio en masa) e **IP** (índice de polidispersión), aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{Mn} = \frac{\sum niMi}{\sum ni} \qquad \mathbf{Mw} = \frac{\sum ni Mi^2}{\sum niMi} \qquad \mathbf{IP} = \frac{Mw}{Mn}$$

El grado de polimerización se determinó mediante una curva de regresión lineal en la cual se consideraron estándares de glucosa, sacarosa, 1-kestosa, nistosa, fructosil-nistosa, así como dextranas de peso molecular 5.2 KDa, 11.6 KDa, 23.8KDa y 48.6 KDa (PSS, USA) y mediante las siguientes fórmulas:

$$\mathbf{DPn} \text{ (grado de polimerización promedio en número)} = \frac{Mn-18}{162.1}$$

$$\mathbf{DPw} \text{ (grado de polimerización promedio en masa)} = \frac{Mw-18}{162.1}$$

Los datos obtenidos a partir del sistema de análisis de HPLC, fueron analizados muestra por muestra tomando la intensidad de respuesta del detector de IR como equivalente al parámetro n, mientras que el peso molecular correspondiente a cada tiempo de retención se obtuvo a partir de la ecuación de una curva elaborada con los estándares de los diferentes pesos moleculares como se presenta en la sección de anexos.

4.5 Estabilidad de aguamiel y metzal

Las mediciones de la posible actividad de enzimas presentes en el aguamiel y en el extracto se midieron sin adicionar ningún sustrato. Para ello se tomaron 3 muestras de aguamiel y extracto de metzal microfiltrado provenientes de diversas recolecciones y plantas, las cuales se incubaron a temperatura ambiente, tomándose muestras en la campana de flujo laminar cada hora y desactivándolas por tratamiento térmico por 7 min a ebullición. A las muestras se les cuantificó F, G y S y se observó el perfil de los fructanos.

4.6 Determinación de dextranas en aguamiel acumulado

La presencia de dextranas se determinó utilizando 300 U de enzima dextranasa “L Amano”, buffer de acetatos 50 mM pH 5.5, a temperatura de 60 °C y 350 rpm. Se tomó como blanco dextrana 5200 Da al 2% y la reacción se llevó a cabo por 4 h. Esta metodología se utilizó para evaluar la naturaleza de los oligosacáridos sintetizados por los microorganismos en el aguamiel acumulado.

4.7 Determinación de fructanos en aguamiel acumulado

La presencia de fructano se determinó utilizando 300 U/mL de enzima Fructozyme (Novozymes Corp.), a concentraciones de 5% v/v en buffer de acetatos 50 mM pH 5.5, a temperatura de 40 °C y 350 rpm. Se tomó como blanco agavina Preventy al 1 % y la reacción se llevó a cabo por 15 h. Esta metodología se utilizó para evaluar la naturaleza de los oligosacáridos sintetizados por los microorganismos en el aguamiel acumulado.

5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Distribución de azúcares en la piña de agave

5.1.1 Distribución de azúcares simples y fructanos en la base del cogollo

La base del cogollo, llamado por los productores “corazón” no es utilizado en la producción de aguamiel, de hecho, este es eliminado durante la castración con el fin de evitar que el agave florezca y que las sustancias de reserva de la planta se consuman durante dicho proceso. Cuando la planta es castrada (Figura 11), se hace un hueco, se retira el meristemo vegetativo y el tejido que lo rodea (hojas jóvenes que están en desarrollo).

Para que el agave alcance el grado de maduración requerido, el orificio que queda en la base del cogollo se tapa con parte del tejido que se cortó al castrar. El agave se deja reposar por un período de 1-12 meses (dependiendo el productor) hasta que sus hojas centrales alcanzan su madurez y se incrementa el contenido de azúcares del aguamiel. Una vez que ha pasado el tiempo de maduración, el tejido de cicatrización que se formó en la herida, resultado de la eliminación de la base del cogollo, es removido dejando un hueco denominado cajete. A partir de entonces se inicia el raspado de las paredes del cajete y la producción de aguamiel.

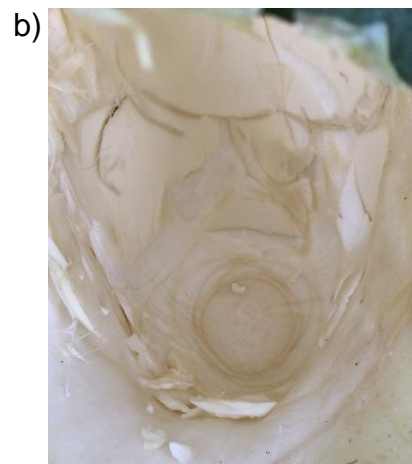
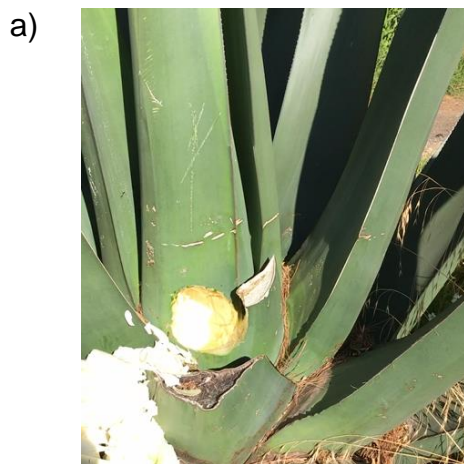


Figura 11. Hueco realizado durante la castración de agave: a) vista exterior, b) vista interior.

En los análisis realizados, se encontró que el área correspondiente a la base del cogollo contiene F, G y S y que la suma de las concentraciones de estos azúcares se encuentra en una proporción de alrededor del 30 % con respecto a la concentración de fructanos (Tabla 6). En relación con la concentración de azúcares de las muestras tomadas en la misma sección, se observó que es distinta entre un punto y otro. La cantidad de F, G y S aumenta del centro hacia el exterior, mientras que la concentración de fructanos disminuye (Tabla 6).

La comparación entre zonas centrales de las diferentes secciones de la base del cogollo, muestra que la concentración de F, G y S disminuye conforme se acercan al tallo (S3.1), mientras que la cantidad de fructanos en las primeras dos secciones (S1 y S2) es semejante, pero en la muestra más cercana al tallo, aumenta.

Tabla 6. Concentración de los azúcares simples y fructanos presentes en las diferentes secciones de la base del cogollo (S1, S2 y S3.1), del agave control (*A. salmiana*).

Sección	Muestra	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	F,G y S	Fructanos
S1	A (centro)	14.1	46.0	58.0	118.1	268.5
	B	18.1	57.8	50.7	126.6	234.2
	C	19.1	58.7	54.0	131.7	233.0
	D	15.4	66.1	68.6	150.1	214.0
S2	A (centro)	4.8	17.2	45.9	67.9	260.3
	B	7.2	59.0	63.3	129.6	242.4
	C	9.0	62.3	66.9	138.3	218.2
	D	9.0	59.5	58.2	126.7	64.7
S3.1	A (centro)	Nd	20.5	46.9	67.8	380.6

Concentración reportada en mg/g de biomasa seca; Nd: No detectado.

5.1.1.2. Perfil de fructanos

El perfil de fructanos se analizó mediante TLC, se encontró que, a excepción de las muestras centrales de cada sección, la base del cogollo fue una región rica en fructanos de bajo grado de polimerización (Figura 12). En el perfil cromatográfico se observó de forma clara la presencia de fructanos de mayor peso molecular en la zona central con respecto a la periferia (Figura 13), observado en el aumento de señales de mayor tiempo de retención, lo que concuerda con lo observado en la TLC. Este resultado sugiere que el meristemo vegetativo (zona central de la base del cogollo) contiene más fructanos y de mayor grado de polimerización, lo cual tiene sentido ya que estamos hablando del órgano que va a dar lugar a la inflorescencia y que requiere de gran suministro de energía para que se lleve a cabo.

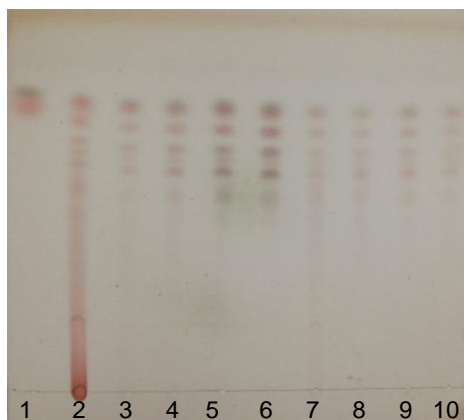


Figura 12. Perfil de fructanos detectados en los extractos de las muestras de las diferentes zonas ubicadas en las secciones 1 y 2 de la base del cogollo por TLC: Controles 1) FG, 2) Agavina; Muestras 3) S1 A, 4) S1 B, 5) S1 C, 6) S1 D, 7) S2 A, 8) S2 B y 9) S2 C y 10) S2 D.

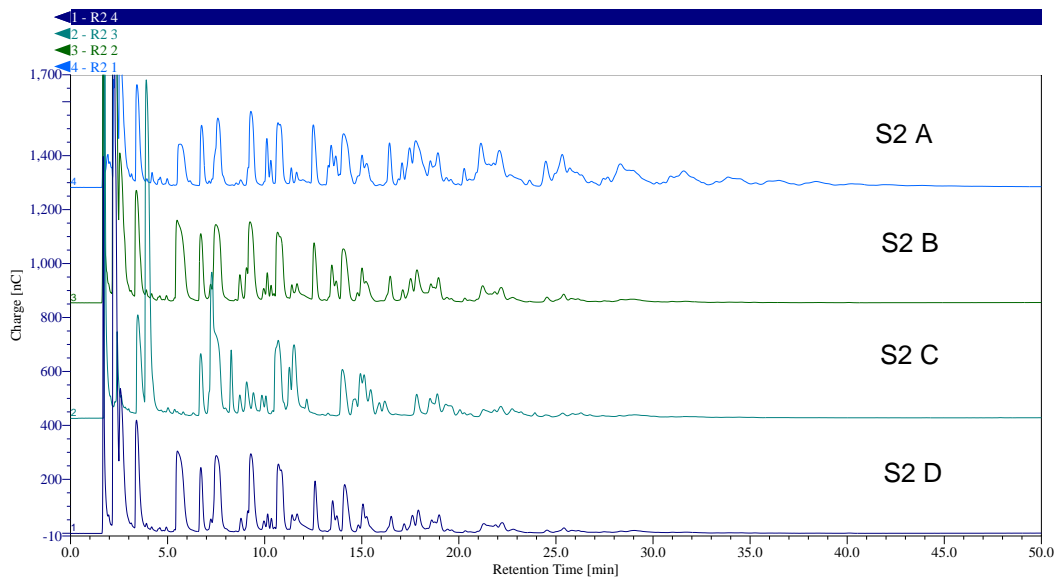


Figura 13. Perfil de fructanos presentes en los extractos de las diferentes zonas de la sección 2 de la base del cogollo (S2 A, S2 B, S2 C y S2 D), detectado por HPAEC-PAD.

El cromatograma de la Figura 14 ilustra las diferencias del perfil de oligosacáridos en las diferentes secciones (S1A, S2A y S3.1). En él se aprecia una mayor riqueza de fructanos de mayor peso molecular en la sección S3.1, que es la más cercana al tallo, lo que no se detecta de forma clara en la TLC.

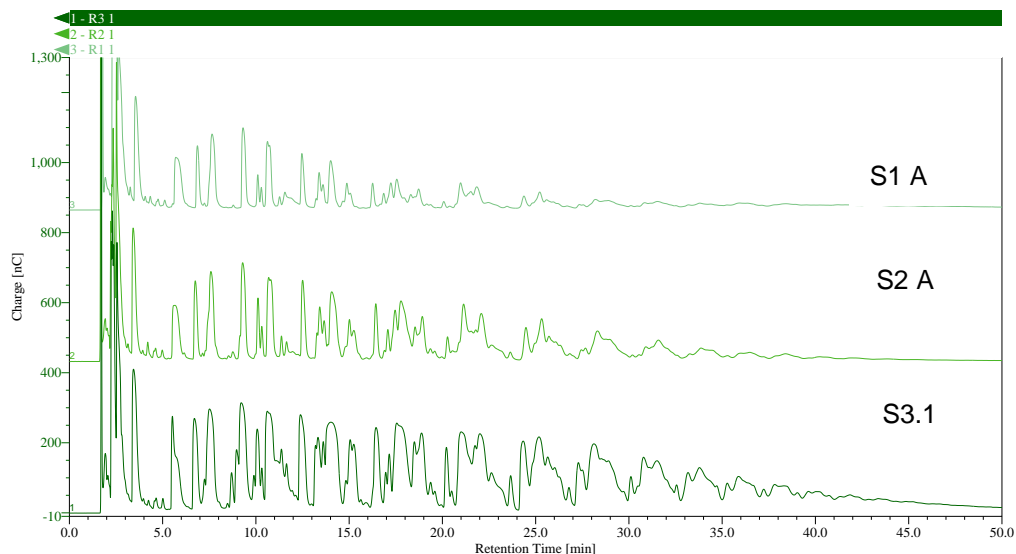


Figura 14. Perfil de fructanos presentes en los extractos de la zona central de las diferentes secciones de la base del cogollo (S1 A, S2 A y S3.1), detectado por HPAEC-PAD.

5.1.1.3 Grado de polimerización

En cuanto a la distribución de peso molecular de los fructanos, se puede observar que en la zona más alejada del tallo (S1) hay una distribución bimodal, mientras que en las subsecuentes secciones, la distribución es normal con un índice de polidispersión (IP) de 1.7 y 1.6, que nos indica que es un polímero disperso (Figura 15).

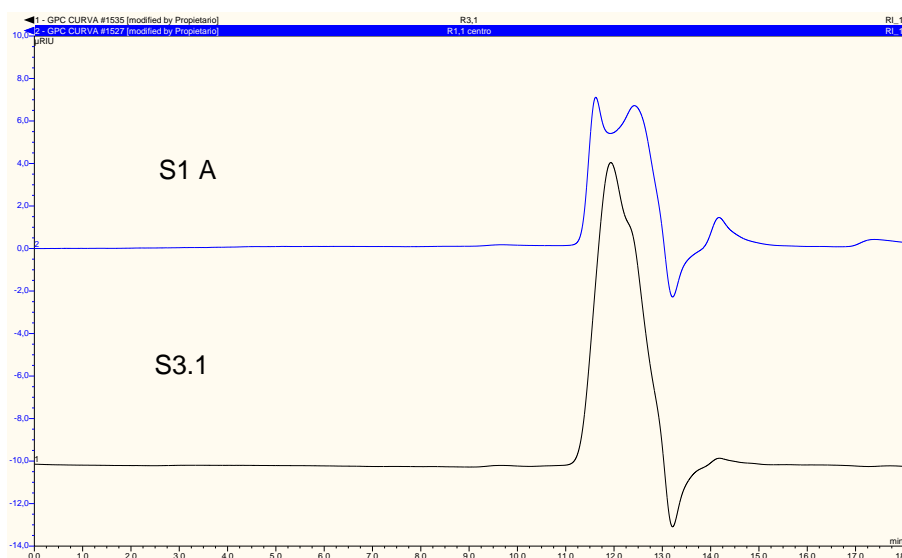


Figura 15. Distribución del peso molecular de los fructanos presentes en los extractos de las secciones inicial y final (S1 A y S3.1) de la base del cogollo de la planta control (*A. salmiana*) analizado por GPC.

El grado de polimerización promedio en número (Dpn) y el grado de polimerización promedio en masa (Dpw) es de 7.9- 13.7 en las zonas del cogollo cercanas al tallo (S2 y S3.1), mientras que en la zona más alejada (S1) debido a su comportamiento bimodal se calcularon ambos parámetros para cada pico. Mostrando así un DPN de 16.6 y un Dpw de 19.4 para la distribución de mayor grado de polimerización y un DPN de 3.4 y Dpw de 4.5 para los más pequeños (Tabla 7).

El hecho de que la zona apical tenga un comportamiento bimodal, lo podemos asociar a que probablemente en esa zona los fructanos intermedios entre los grados de polimerización señalados están siendo hidrolizados para suministrar la energía

requerida en el proceso de floración. Esta explicación que concuerda con la presencia de F, que es más abundante en esta sección que las subsecuentes (Tabla 6). Debido a la presencia de G y F, es de esperarse que también haya una actividad invertasa. La abundancia de G podría también ser indicativa de un proceso de inhibición de su reincorporación al metabolismo primario de la célula (Mancilla-Margalli y col., 2006) probablemente debido a la preparación de la floración.

Tabla 7. Grado de polimerización de los fructanos presentes en el extracto del tejido, de la zona central de las diferentes secciones de la base del cogollo (S1, S2, S3.1), del agave control (*A. salmiana*).

	Sección	IP	Mn_I	Mw_I	Dpn_I	Dpw_I	Mn_{II}	Mw_{II}	DPn_{II}	DPw_{II}
Base del cogollo	S1	NA*	2705.6	3177.0	16.6	19.4	575.4	759	3.4	4.5
	S2	1.7	1303.0	2238.7	7.9	13.7	--	--	--	--
	S3.1	1.6	1305.7	2131.5	7.9	13.1	--	--	--	--

*NA: No Aplica.

5.1.2 Distribución de azúcares simples y fructanos en el tallo

5.1.2.1 Concentración de azúcares simples

La concentración de azúcares simples (F, G y S) del tallo, fue distinta a la de la base del cogollo ya que en él no se encontró fructosa, y en las secciones más cercanas a la base (S5 y S6) tampoco se encontró glucosa. Se puede observar que en promedio la concentración de F, G y S se encuentra alrededor del 11 % con respecto a la concentración de fructanos (Tabla 8), datos que son razonable si consideramos que el tallo es un órgano de reserva.

La concentración de F, G y S disminuyó conforme la sección se acercaba a la base del tallo, mientras que la de fructanos incrementó. Las concentraciones del tallo se asemejan a las reportadas por García-Curbelo y col., 2009.

Tabla 8. Concentración de los azúcares simples y fructanos presentes en las diferentes secciones del tallo (S3.2, S4, S5, S6), del agave control (*A. salmiana*).

Sección	Muestra	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	F, G y S	Fructanos
S3.2	A	Nd	11.4	28.1	39.9	307.8
	B1	Nd	13.8	31.0	45.1	314.1
	B2	Nd	14.2	33.9	48.4	365.4
	B3	Nd	10.8	33.1	44.3	310.5
	B4	Nd	10.5	27.4	38.2	353.7
S4	A (centro)	Nd	16.2	33.2	49.8	397.9
	B1	Nd	14.9	36.1	51.5	461.7
	B2	Nd	11.1	33.4	44.9	457.7
	B3	Nd	9.4	27.2	36.9	381.6
	B4	Nd	12.2	33.7	46.3	420.4
	C1	Nd	10.4	36.1	46.9	428.0
	C2	Nd	9.5	35.9	45.8	535.3
	C3	Nd	11.5	41.5	53.4	528.8
	C4	Nd	11.1	35.2	46.8	352.9
	EXT	21.8	58.5	72.5	152.8	229.2
S5	A (centro)	Nd	Nd	27.4	28.5	531.6
	B1	Nd	Nd	27.1	28.2	537.5
	B2	Nd	Nd	24.3	25.4	560.2
	B3	Nd	5.1	24.9	32.4	524.9
	B4	Nd	8.2	28.4	39.4	465.7
	C1	Nd	Nd	25.1	26.2	457.4
	C2	Nd	Nd	20.9	21.9	577.8
	C3	Nd	Nd	20.3	23.5	531.0
	C4	Nd	Nd	32.4	33.6	522.5

	EXT	5.9	67.0	66.5	139.4	264.7
S6	A (centro)	Nd	Nd	17.6	18.5	565.9
	B	Nd	Nd	16.4	17.4	658.2
	C	Nd	Nd	17.7	18.6	522.1

Nd: No detectado; (mg/g de biomasa seca).

La presencia de los tipos de azúcares en el tallo de la planta nos indica su estado al momento de ser jimada. La existencia de S, la ausencia de F y las bajas o nulas concentraciones de G, señalan que las células del tallo probablemente estaban sintetizando fructanos, ya que al haber S se induce la enzima fructosil-transferasa y se inhiben las enzimas fructano exohidrolasas (García-Curbelo y col., 2009).

La zona exterior que rodea el tallo (base de penca) es una zona rica en azúcares simples y también presenta fructanos, sus concentraciones son más parecidas a las de los “gajos” de la base del cogollo que a las del tallo (Tablas 6 y 8). Esta semejanza de concentración y perfil de azúcares tiene sentido debido a que ambas zonas forman parte de las hojas, recordando que en la base del cogollo los “gajos” corresponden a pencas en desarrollo.

5.1.2.2 Perfil de azúcares

Al analizar el perfil de fructanos en las diferentes secciones del tallo, se observó que la concentración y el grado de polimerización aumentaron al acercarse a la base del tallo (Figuras 16 y 17).

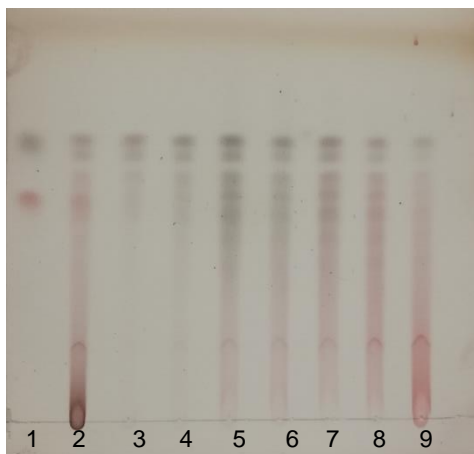


Figura 16. Perfil de fructanos detectados en los extractos de las muestras centrales de las diferentes secciones de la base del cogollo por TLC: Controles 1) FG, 2) Agavina; Muestras 3) S1, 4) S2, 5) S3.1, 6) S3.2, 7) S4, 8) S5 y 9) S6.

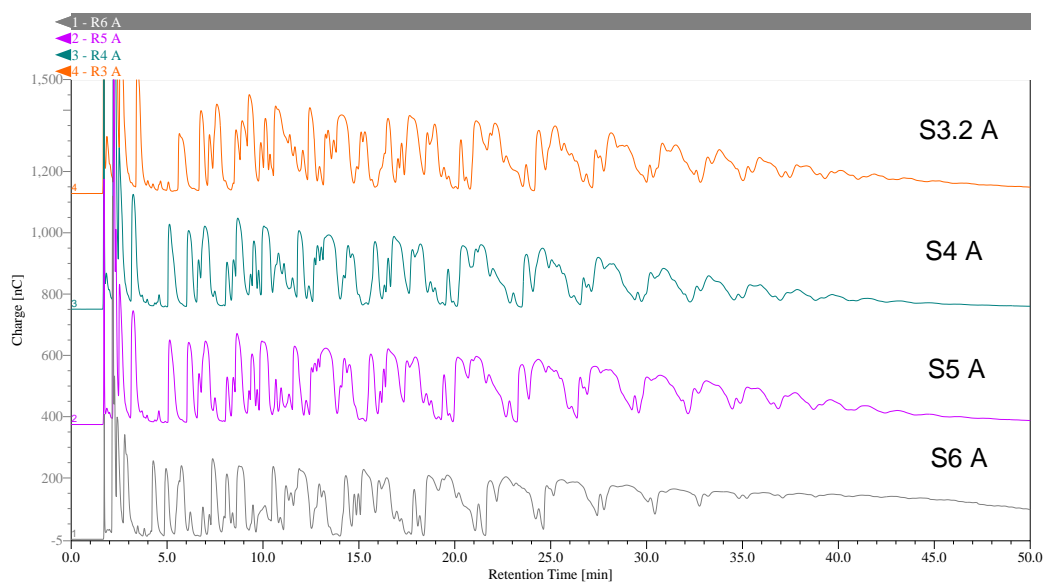


Figura 17. Perfil de los fructanos presentes en los extractos de la zona central de las diferentes secciones del tallo (S3.2 A, S4 A, S5 A y S6 A), detectado por HPAEC-PAD.

El análisis comparativo de la zona central de cada sección y del exterior mostró que no hay diferencia aparente en el perfil y estructura de los fructanos dato que concuerda con la concentración (Figuras 18 y 19). Sin embargo, la zona exterior al tallo (base de la penca) mostró una concentración menor y un perfil más pobre de fructanos.



Figura 18. Perfil de los fructanos presentes en los extractos de la sección 4 por TLC: 1) FG, 2) agavina preventy, 3) S4 A, 4) S4 B1 y 5) S4 C1.

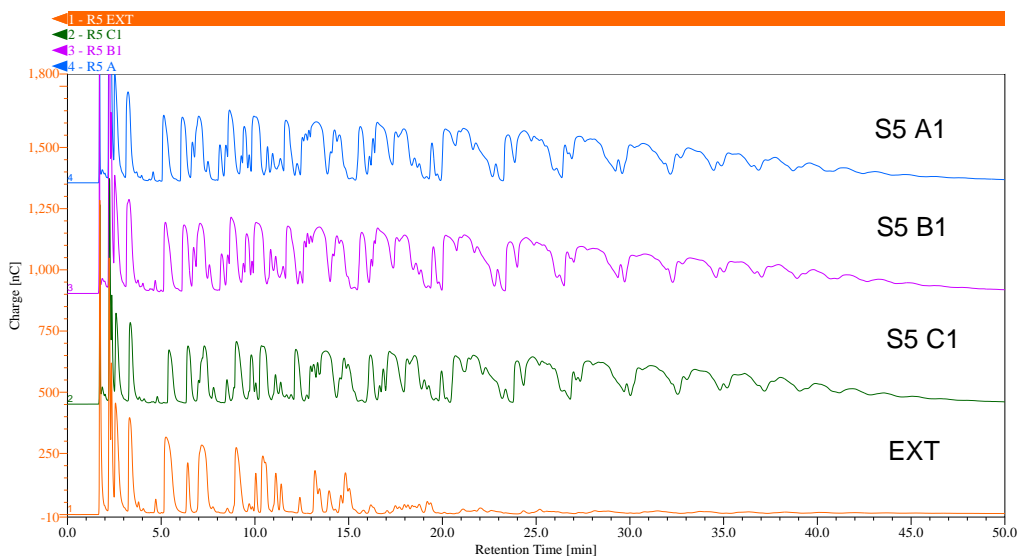


Figura 19. Perfil de fructanos presentes en los extractos de las diferentes zonas de la sección 5 del tallo y de la zona exterior al tallo (S5 A1, S5 B1, S5 C1 y EXT), detectado por HPAEC-PAD.

5.1.2.3 Grado de polimerización

La distribución del grado de polimerización de los fructanos varió en cada una de las secciones del tallo estudiadas. Se observó que en la sección 3.2 los polímeros eran más pequeños (mayor tiempo de retención), mientras que en la sección de la base (S6) fueron de mayor tamaño (Figura 20). Esta observación se corroboró mediante la determinación del DPn y DPw (Tabla 9).

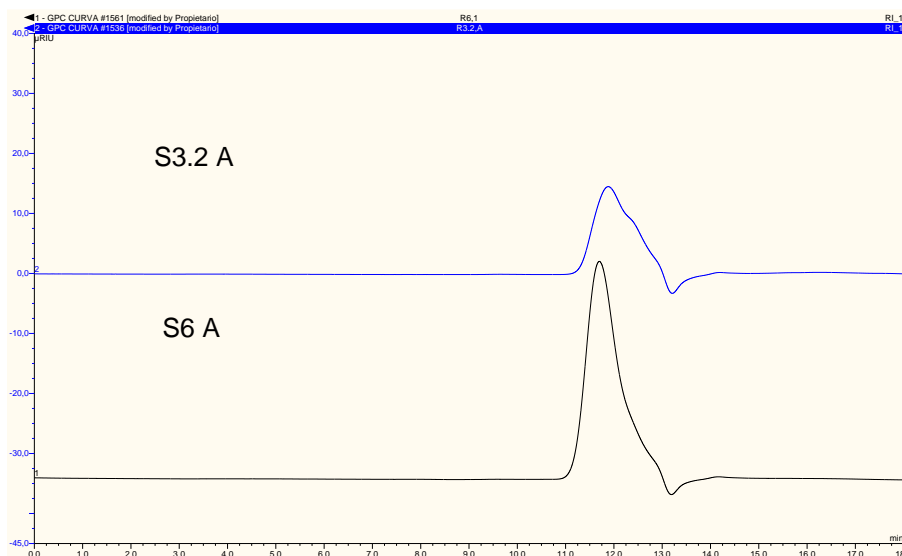


Figura 20. Distribución del peso molecular de los fructanos presentes en los extractos de las secciones inicial y final (S1 A y S3.1) del tallo de la planta control (*A. salmiana*), analizado por GPC.

El grado de polimerización promedio del tallo de agave observado, se encuentra dentro del estimado por Mellado-Mojica, (2012) para *A. tequilana* con una edad de 5 y 7 años y dentro del rango de GP encontrado en algunas agavinas comerciales (Moreno-Vilet y col., 2016). El grado de polimerización de los fructanos de agave fue mayor en el tallo que en la base del cogollo y las pencas, este dato concuerda con lo reportado por Praznik y col., (2013) en donde se reportaron estructuras de 3-8 unidades en las pencas y de 3-70 unidades en el tallo de *A. tequilana*.

Tabla 9. Grado de polimerización de los fructanos presentes en el extracto del tejido de la zona central de las diferentes secciones del tallo (S3.2, S4, S5, S6), del agave control (*A. salmiana*).

	Sección	Mn	Mw	IP	DPn	DPw
Tallo	S3.2	1453.2	2285.4	1.6	8.9	13.9
	S4	1366.9	2078.8	1.5	8.3	12.7
	S5	1583.1	2299.4	1.5	9.6	14.1
	S6	2187.4	3236.6	1.5	13.4	19.8

La distribución de los azúcares simples y fructanos cuantificados en las diferentes secciones de la piña de la planta control se pueden resumir en la Figura 21. Los resultados mostraron que la concentración y el grado de polimerización de los fructanos, aumentan al acercarse a la base del tallo.

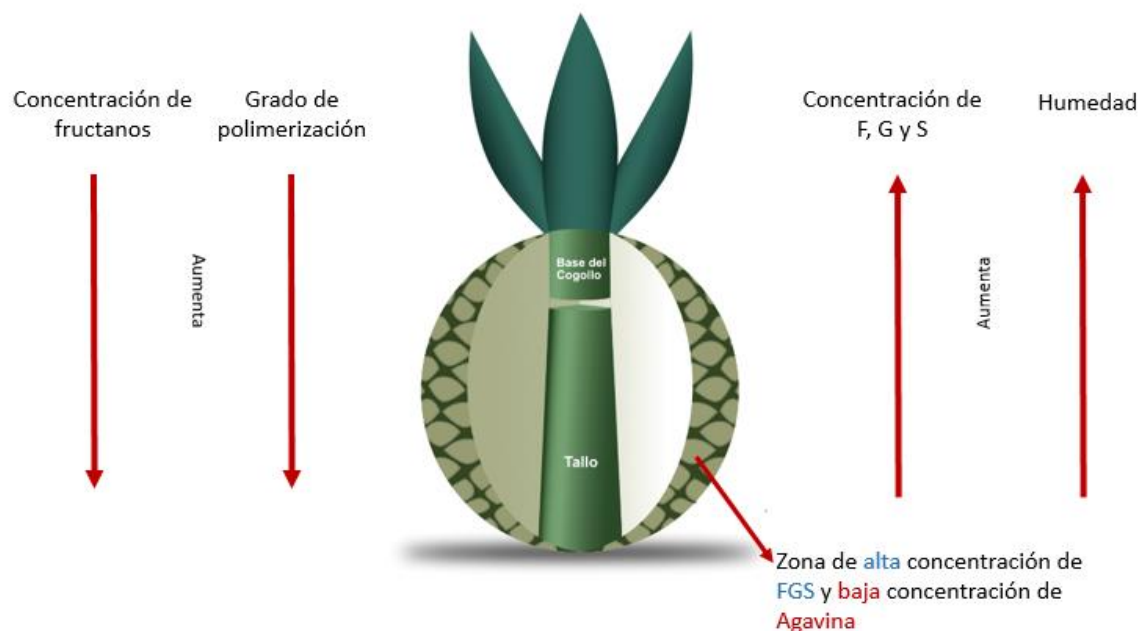


Figura 21. Esquema de la distribución de azúcares simples y fructanos en de la piña del agave control (*A. salmiana*).

5.2 Evolución de los carbohidratos durante la vida productiva del agave

A continuación, se presentan los períodos de producción de aguamiel de cada una de las plantas analizadas. Es importante señalar que a lo largo de la etapa productiva las plantas estuvieron expuestas a diversos factores ambientales tanto abióticos (Temperatura, humedad, lluvia, irradiación solar, aire, tipo de suelo, clima, entre otros) y bióticos (Animales, hongos, bacterias y otros microorganismos).

Como se observa en la Tabla 10 el período de producción de aguamiel en cada una de las plantas se inició en diferentes fechas; el de la planta P1 inició en agosto de 2017, mientras que el de las plantas P2 y P3 en noviembre y diciembre del mismo año, respectivamente. No obstante, el periodo de producción de las tres plantas finalizó en el mes de mayo de 2018, aunque no en la misma semana. Podría considerarse que el efecto de factores abióticos sobre las plantas en estado de producción de aguamiel fue el mismo con excepción de la planta 1 en el periodo de agosto a octubre. En estos meses el promedio de temperatura máxima y precipitación fue distinto al registrado para los otros meses en los que los agaves P2 y P3 fueron estudiados, por lo que se esperaría que fuese en ese período en el que se observaran diferencias con respecto a dichas plantas.

Tabla 10. Datos climatológicos registrados durante el periodo de muestreo de las plantas P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*), y P3 (*A. salmiana*).

	2017					2018				
Meses de producción	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
Planta 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Planta 2				X	X	X	X	X	X	X
Planta 3					X	X	X	X	X	X
Temperatura Máxima* (°C)	17.5	17.8	21.1	22.3	21.6	20.8	23.7	26.8	22.4	21.0
Temperatura Mínima* (°C)	8.9	8.2	8.3	4.1	3.8	3.6	6.2	7.3	7.1	8.5
Precipitación* (mm)	12.7	7.2	0.9	0.0	0.0	1.0	0.0	0.1	2.3	1.8

Fuente: CONAGUA, 2019. * Dato promedio por día durante el mes analizado.

5.2.1 Azúcares simples

5.2.1.1 Aguamiel

Se midió y comparó la concentración de azúcares en el aguamiel fresco a lo largo de la vida productiva de las tres plantas de agave. Una primera observación fue que, en aguamiel fresco, sólo se encontró S, a pesar de que en todos los reportes de composición del aguamiel se encuentra abundantemente G y F (Ortiz-Basurto, 2008; Romero-López, 2015), lo que indica que los resultados reportados en dichos estudios fueron obtenidos a partir de aguamiel acumulado y no aguamiel fresco.

En la Figura 22 se presenta la evolución de la concentración de sacarosa en el aguamiel fresco a lo largo de la etapa productiva del agave. Se observó, de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA), que hubo diferencia significativa en la concentración de sacarosa durante la vida productiva del agave (Ver sección de Anexos).

El hecho de que el aguamiel fresco fuera rico en sacarosa y no en F y G, se puede explicar adentrándonos en el sistema vascular encargado de transportar glucósidos, el floema, el cual según reportes de Curtis y col. (2006), de carbohidratos simples transporta solo sacarosa. Así, al realizar el raspado, se causa la ruptura de los tubos cribosos del floema y la sacarosa que contenía en su interior, se incorpora a la savia que fluye y da lugar al aguamiel.

En cuanto a la variación de la concentración de sacarosa en el aguamiel, se observó que con el paso de las semanas después de inicio de la recolección, la concentración de sacarosa se incrementó hasta llegar a un punto máximo, aproximadamente a las 7 semanas de producción, a partir del cual disminuyó (Figura 22). Existe diferencia en la tendencia de concentración de sacarosa en las primeras semanas de la P1 con las P2 y P3, la cual se asoció, como ya se mencionó, a que en el tiempo en el que se comenzó el raspado y producción de aguamiel, esta planta estuvo expuesta a diferentes temperaturas y precipitación.

Es posible que esta tendencia se deba a que, en un inicio, como respuesta al estrés por el daño físico ocasionado por el castrado y el raspado continuo, la planta haya realizado fotosíntesis con mayor intensidad o haya movilizado los azúcares de las pencas, para proveer de sacarosa a aquellos órganos que por el daño recibido no estaban siendo bien abastecidos. Conforme avanzó el tiempo de producción y el productor cortó las hojas cercanas al cajete (con el fin de poder hacerlo más grande y accesible) la concentración de sacarosa disminuyó ya que se estaba privando a la planta de sus órganos fotosintéticos.

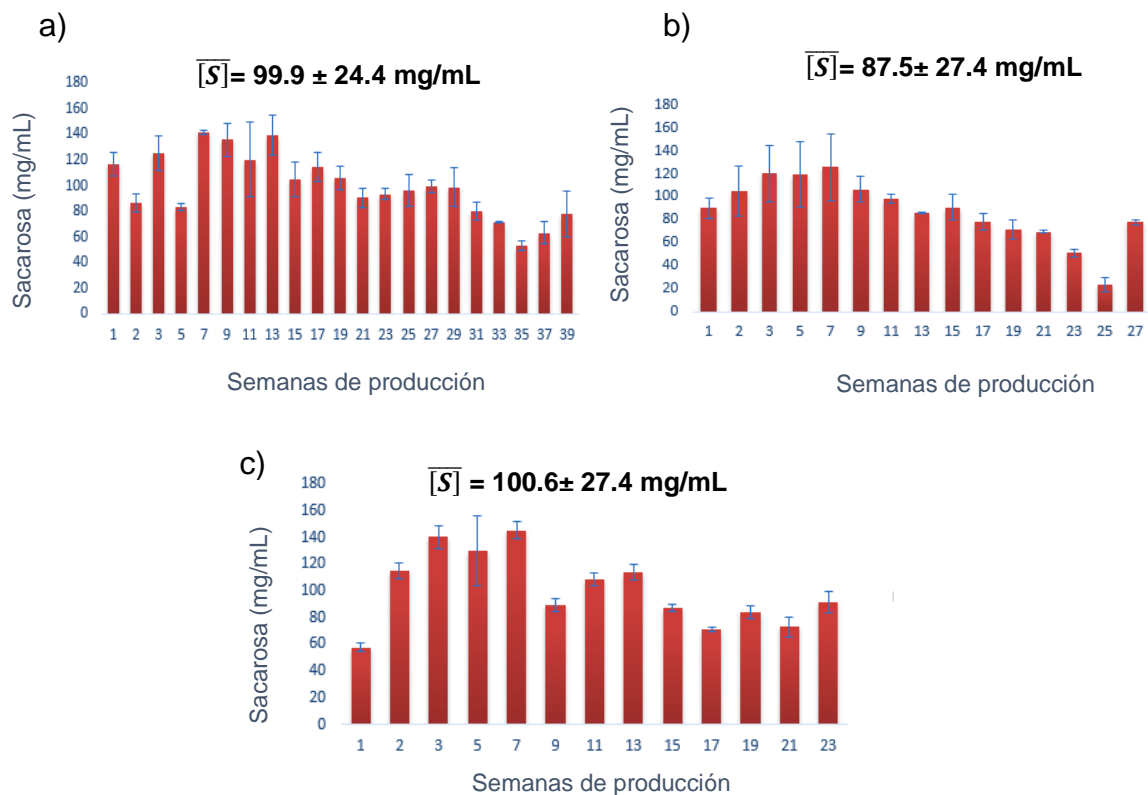


Figura 22. Concentración de sacarosa en el aguamiel fresco durante la vida productiva del agave: a) P1 (*A. mapisaga*); b) P2 (*A. mapisaga*) y c) P3 (*A. salmiana*). El valor presentado en las gráficas es el promedio de dos determinaciones por cada semana de producción y las barras indican la desviación estándar. El valor indicado para cada gráfica corresponde al valor promedio de sacarosa durante la vida productiva de cada agave \pm la desviación estándar.

Además de las posibles causas antes expuestas, se observó que al realizar un daño sistemático en la planta y la sacarosa se drenaba continuamente, se llegó a un punto en el que el daño fue más grande que la resistencia y las hojas llegaron a la senescencia (Figura 23). Este proceso comenzó por las hojas externas, tomando como referencia el cogollo, las cuales se fueron secando hasta que murieron. Conforme pasó el tiempo las demás hojas fueron perdiendo rigidez hasta llegar al punto en el que todas las hojas se doblaron.



Figura 23. Imagen de la P1 (*A. mapisaga*), durante su vida productiva desde el inicio hasta el final de la producción de aguamiel: a) Semana 1, b) Semana 25 y c) Semana 31.

5.2.1.2 Metzal

La concentración total de azúcares simples (F, G y S) en el metzal, mostró un comportamiento similar en las tres plantas, se observó, de acuerdo con la ANOVA, que hay diferencia significativa en la concentración de azúcares simples en el metzal durante la vida productiva del agave con un patrón particular con respecto al tiempo de producción (Ver sección de Anexos).

Los resultados mostraron que conforme avanza el tiempo hay una disminución en la sacarosa con relación a la concentración de fructosa y glucosa, sugiriendo actividad Inv, de las cuales la fructosa predomina, sugiriendo actividad FEH (Figura 24).

Entre la semana 5 y 7 se obtuvo la mayor cantidad de azúcares simples. Posteriormente, se observó una fluctuación seguida de un incremento, sin embargo, la semana en la que incrementó varió en cada una de las 3 plantas analizadas. Este resultado sugiere que al recibir menor concentración de sacarosa debido a la ruptura de los conductos que la transportan, se induce la hidrólisis de fructanos y sacarosa en las células para restablecer la homeostasis energética. Este proceso dependerá del estado de cada planta, incluido el tiempo y número de las hojas que le son

retiradas. La idea se ve reforzada al comparar las concentraciones de F, G y S del metzal con las concentraciones de la piña control, observando un gran incremento de F y G en el metzal como consecuencia del raspado.

No hay que perder de vista que el extracto de metzal contiene F, G y S provenientes tanto del interior de la célula como del apoplasto. Caso contrario a la savia (que da lugar al aguamiel) que proviene del floema y sólo contiene sacarosa (Devlin, 1982).

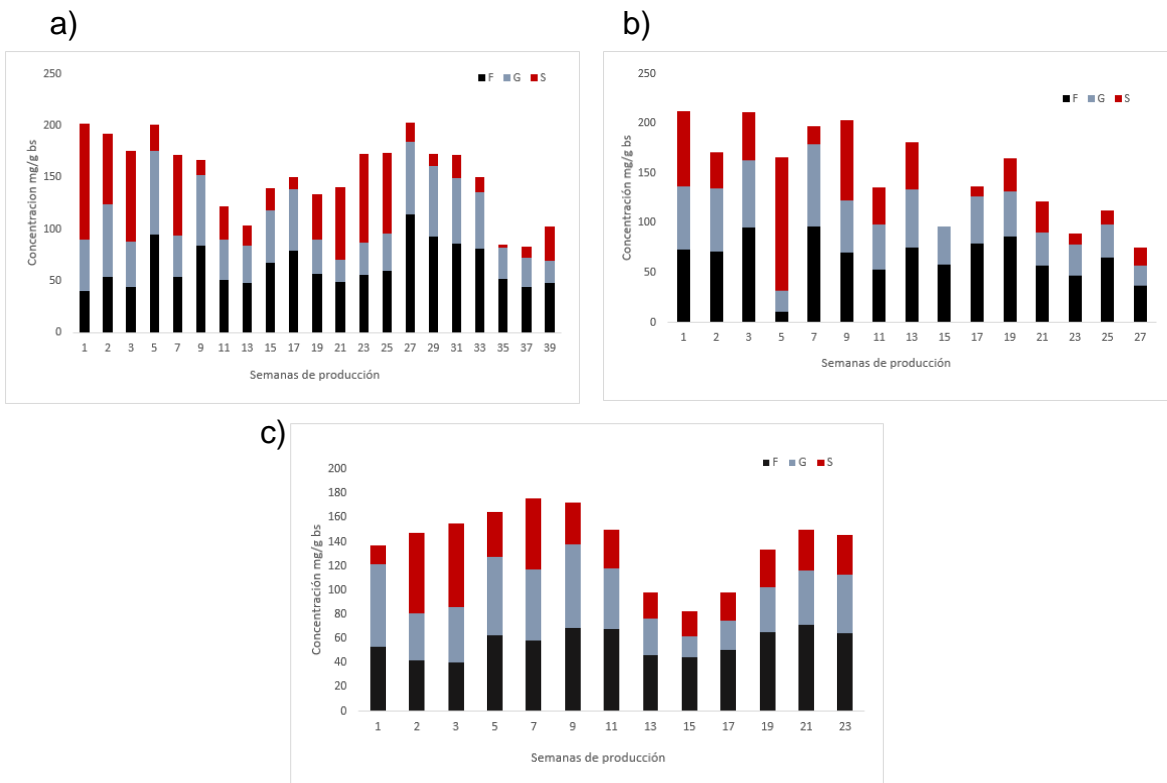


Figura 24. Concentración de azúcares F, G y S en el metzal durante la vida productiva del agave: a) P1 (*A. mapisaga*); b) P2 (*A. mapisaga*) y c) P3 (*A. salmiana*). El valor presentado es el promedio de dos determinaciones.

5.2.2 Fructanos

5.2.2.1 Aguamiel

Concentración de fructanos en aguamiel fresco.

Se midió la concentración de fructanos en el aguamiel fresco a través de la vida productiva del agave. Se observó que, en las tres plantas, la concentración fue variable entre cada recolección, mostrando diferencia significativa durante la vida productiva del agave. La mayor cantidad de fructanos se presentó en la P1 a las semanas 5 y 15; en la P2 a la semana 13 y en la P3 en las semanas 1 y 9 (Figura 25). Un resultado importante de esta sección, es el hecho de que la calidad del aguamiel medida en términos de la presencia de fructanos, depende de cada planta.

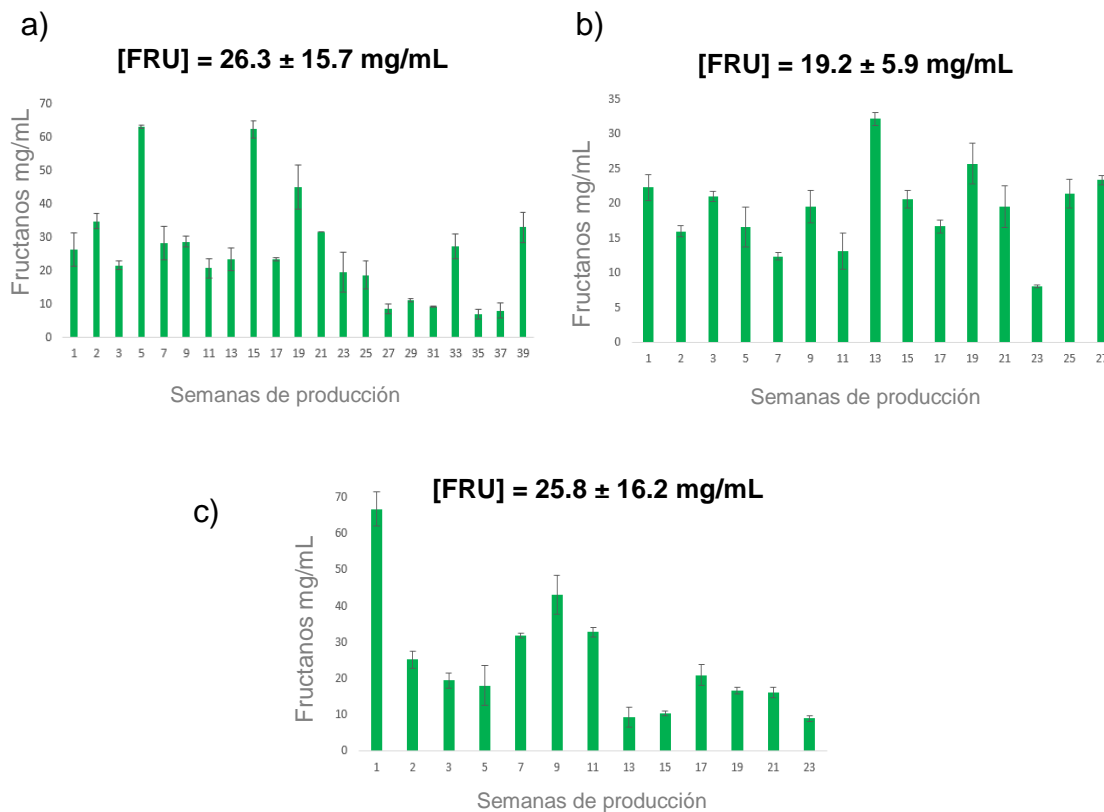


Figura 25. Concentración de los fructanos en el aguamiel fresco, durante la vida productiva del agave: a) P1 (*A. mapisaga*), b) P2 (*A. mapisaga*) y c) P3 (*A. salmiana*). El valor presentado en las gráficas es el promedio de dos determinaciones por semana de producción y las barras indican la desviación estándar. El valor indicado arriba de las gráficas corresponde al valor promedio de fructanos durante la vida productiva de cada agave ± la desviación estándar.

Perfil de fructanos en aguamiel fresco

Se comparó el perfil de fructanos en el aguamiel a lo largo de la vida productiva del agave (Figuras 26-28), llegándose a la conclusión de que el perfil de fructanos sufre cambios considerables que dependen de diversos factores. En general, la concentración de fructanos se incrementa conforme transcurre el tiempo de producción, llegando a un punto máximo, entre las 9-15 semanas después de la maduración, a partir del cual, la concentración comienza a decrecer y el perfil de fructanos se empobrece. Al comparar este resultado con la concentración de fructanos en la sección anterior, encontramos una correlación de la concentración con la riqueza.

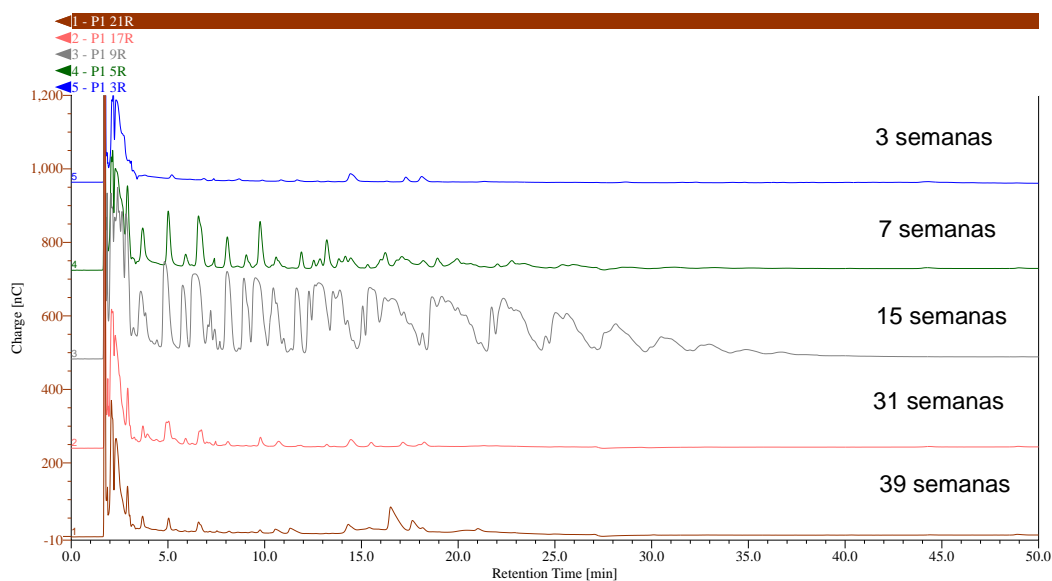


Figura 26. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P1 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

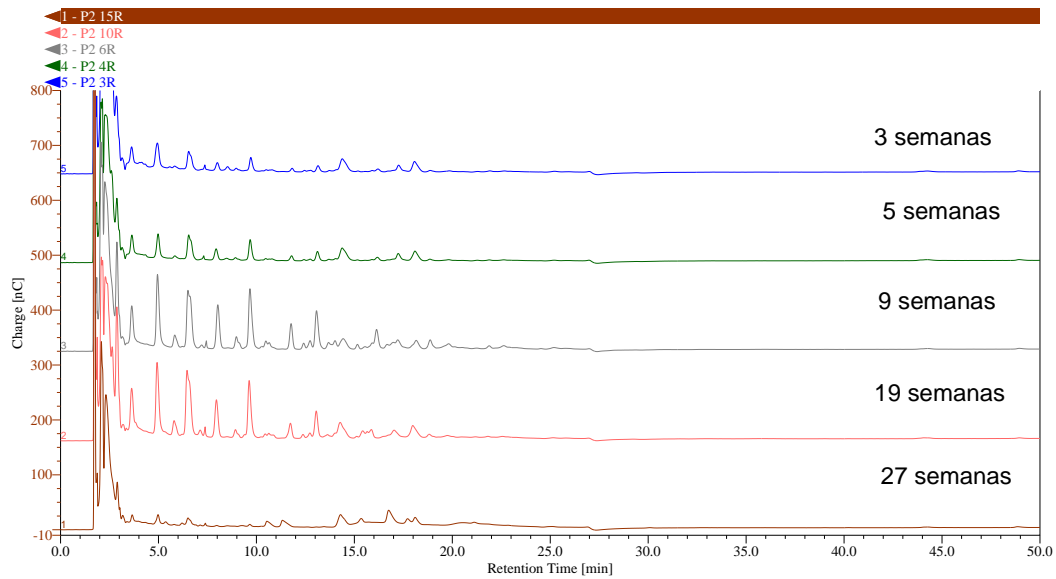


Figura 27. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P2 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

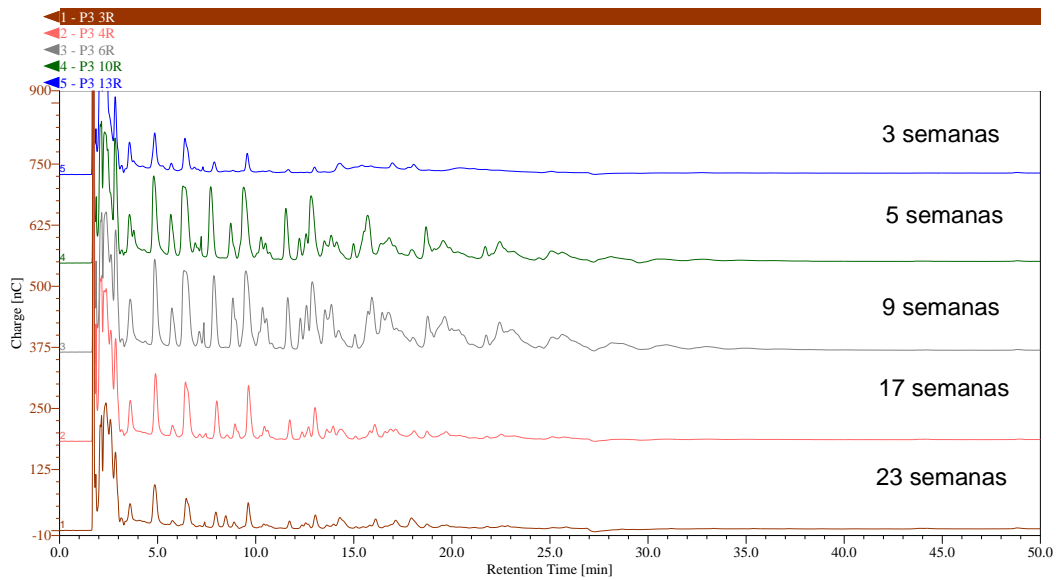


Figura 28. Perfil de fructanos en aguamiel fresco proveniente de P3 (*A. salmiana*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

Grado de polimerización

Se descubrió que los fructanos del aguamiel fresco, extraído de las diferentes plantas, tuvieron una distribución de pesos moleculares normal que varió en función de la vida productiva del agave, como se puede observar en los cromatogramas por permeación en gel de las Figuras 29-31.

Al analizar dichas distribuciones con referencia a los estándares, se construyó la Tabla 11 en la que se resumen para el aguamiel de cada planta, y a lo largo de las semanas de producción, el M_w , el M_n y el índice de polidispersión.

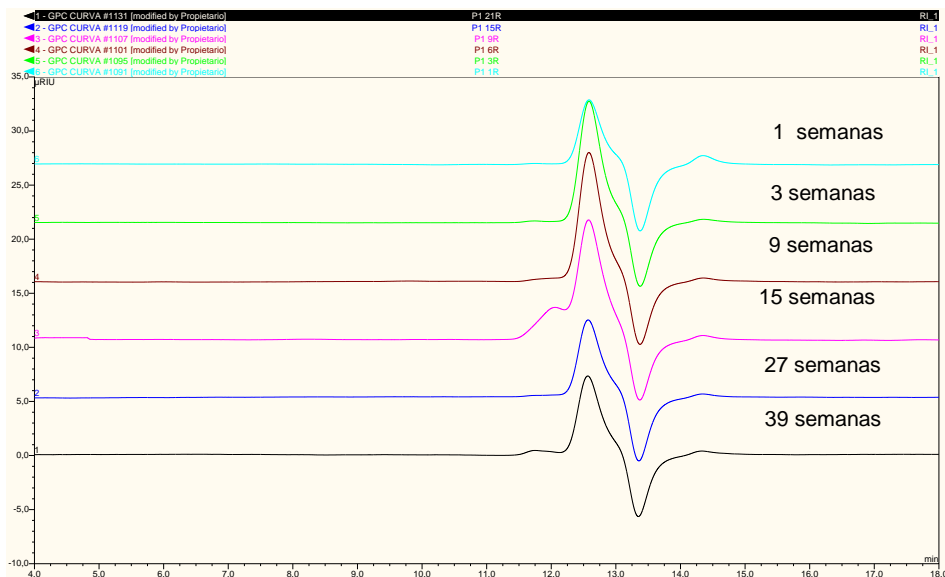


Figura 29. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P1 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.

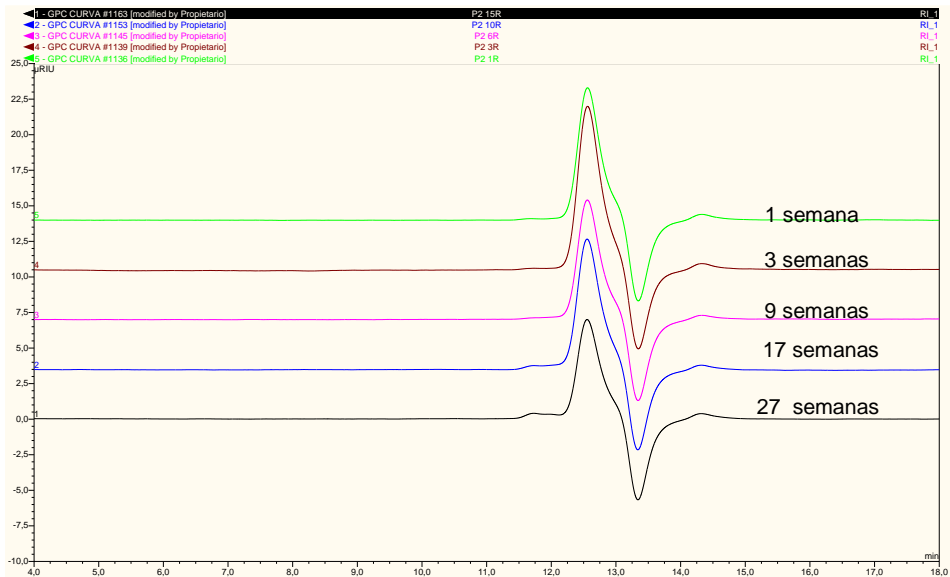


Figura 30. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P2 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.



Figura 31. Distribución del peso molecular de los fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P3 (*A. salmiana*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.

Para la P1 se observó que el Mn y el Mw fueron más grandes en la semana 15, mientras que en la P2 los valores más altos se observaron en semana 25 y para la P3 en la semana 17. Esto nos dice que el tiempo en el que se alcanza el valor más alto dependió de cada planta. La comparación de los dos parámetros nos permite concluir que la composición de fructanos del aguamiel proveniente de las tres plantas fue heterogénea ($IP > 1$), cuya dispersión del grado de polimerización dependió del tiempo de producción, es decir, al inicio de la vida productiva del agave el índice de polidispersión fue el más bajo y así se mantuvo hasta alcanzar un tercio de vida del agave, tiempo a partir del cual hubo mayor variación de pesos moleculares.

El mayor grado de polimerización promedio en masa y en número (DPw y DPn) para los aguamieles de las diferentes plantas se encontró en diferentes tiempos de producción. Para P1 se alcanzó a las 15 semanas con un DPn de 3.3 y un DPw de 6.1, para la P2 a las 25 semanas con un DPn de 3.3 y un DPw de 7.3, mientras que para la planta 3 fue a las 17 semanas con un DPn de 2.6 y DPw de 4.6. De lo anterior se puede concluir que los fructanos predominantes en el aguamiel por su grado de polimerización, son FOS.

Tabla 11. Grado de polimerización de los fructanos del aguamiel obtenidos de las plantas P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*) y P3 (*A. salmiana*) durante su vida productiva.

	Semana	Mn	Mw	IP	DPn	DPw
P1	1	321.9	361.7	1.1	1.9	2.1
	3	321.9	366.3	1.1	1.9	2.2
	7	323.8	367.3	1.1	1.9	2.2
	15	547.8	1014.1	1.8	3.3	6.1
	31	414.8	822.5	2	2.4	5.0
	37	341.0	388.5	1.1	1.9	2.1
	39	428.4	818.1	1.9	2.5	4.9
P2	1	334.8	382.0	1.1	2	2.2
	3	337.5	382.3	1.1	2	2.2
	9	341.7	388.5	1.1	2	2.3
	17	381.4	553.8	1.5	2.2	3.3
	25	556.9	1205.1	2.1	3.3	7.3
	27	438.9	841.8	1.9	2.6	5.1
P3	3	344	390.7	1.1	2.0	2.3
	5	343.2	390.1	1.1	2	2.3
	9	388.0	568.2	1.5	2.3	3.5
	17	434.6	761.9	1.8	2.6	4.6
	21	326.7	374.7	1.1	1.9	2.2
	23	365.8	580.1	1.6	2.1	3.5

5.2.2.2 Metzal

Concentración de fructanos en metzal.

En el caso de metzal se empleará el término fructanos debido a que son el tipo de carbohidratos de reserva predominantes, sin embargo, es importante mencionar que en el tejido de agave existen oligosacáridos como estaquiosa que contribuyen en la determinación que se realizó, y que debido a su estructura no se clasifican como fructanos.

En términos de la concentración de azúcares durante la vida productiva del agave para el caso del metzal, se observó, la concentración máxima de fructanos se presentó, al igual que en el aguamiel, en la planta P1 a las semanas 2 y 11, en P2 en las semanas 13 y 15 y en la P3 en las semanas 1 y 7 (Figura 32).

En las primeras semanas del raspado la riqueza de fructanos en el metzal fue baja debido a que se comenzó en parte de la base del cogollo que no se retiró en la castración y en el ápice del tallo (zona con menor concentración). Sin embargo, como el raspado no es homogéneo en todas las plantas, en el caso de la P3 el primer metzal fue más rico en oligosacáridos, lo cual se debe a que probablemente para ampliar la cavidad éste se obtuvo sólo del tallo.

Como se observó en el Capítulo 5.1.2.3 (Figura 21), en una piña sin ser castrada y raspada, la concentración y GP de fructanos va incrementando en las diferentes secciones del tejido conforme se aproximan a la base del tallo. En el metzal no se observó lo mismo, de hecho, las concentraciones más bajas se encontraron al final de la vida productiva del agave, en la zona más cercana a la base del tallo. Este resultado nos sugiere la presencia y actividad de enzimas FEH.

Es de esperar que el agave, como respuesta al estrés hidrolíse los fructanos. Las bajas concentraciones de fructanos en la base del tallo sugieren que la mayor actividad hidrolítica se llevó a cabo en esta zona. Es probable que los fructanos

resultantes de la hidrólisis hayan sido movilizados hacia las paredes del cajete donde se estaba llevando a cabo el daño, para protegerse de él. Muy probablemente la hidrólisis y/o movilización de fructanos haya comenzado desde la castración y se llevó a cabo para cubrir la demanda energética y evitar la sequía basándonos según lo reportado por Livingston y col., (1998), o bien para inducir procesos de inmunidad (Bolouri Moghaggam y col., 2013).

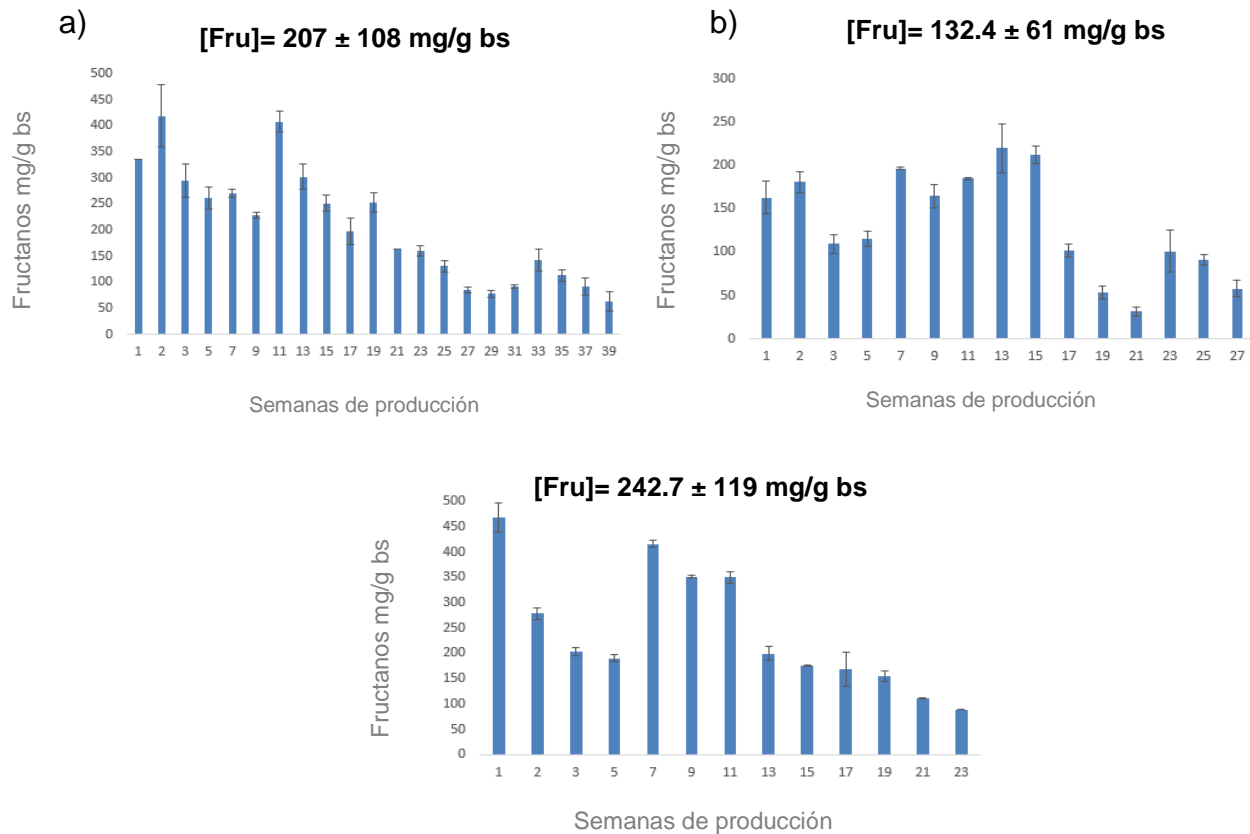


Figura 32. Concentración de los fructanos en el metzal, durante la vida productiva del agave: a) P1 (*A. mapisaga*), b) P2 (*A. mapisaga*) y c) P3 (*A. salmiana*). El valor presentado en las gráficas es el promedio de dos determinaciones por semana de producción y las barras indican la desviación estándar. El valor indicado arriba de las gráficas corresponde al valor promedio de fructanos durante la vida productiva de cada agave \pm la desviación estándar.

Perfil de fructanos en el metzal.

El perfil de fructanos en el metzal, al igual que en el aguamiel, mostró un incremento continuo entre cada recolección hasta llegar a un punto máximo a partir del cual

comenzó a decrecer. Las Figuras 33-35 muestran como ese aumento fue gradual, hasta llegar a un cambio significativo con respecto al inicio.

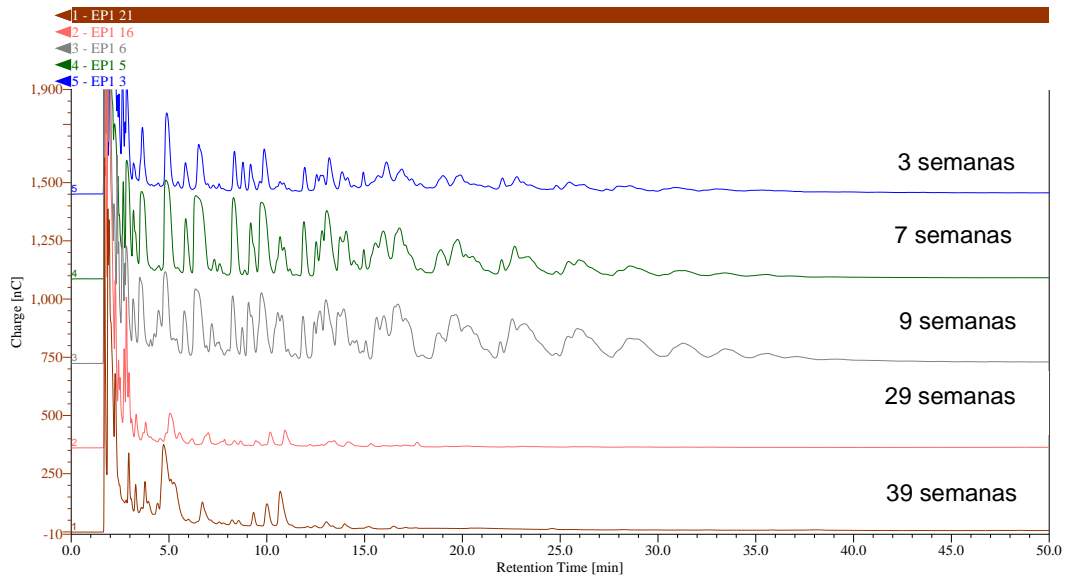


Figura 33. Perfil de fructanos en los extractos del metzal provenientes de P1 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

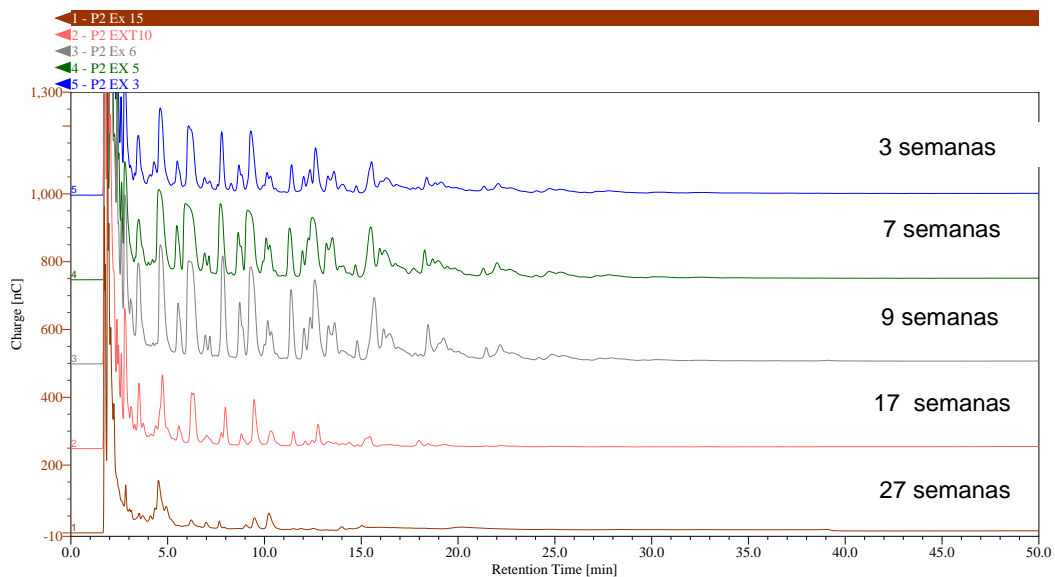


Figura 34. Perfil de fructanos en los extractos del metzal provenientes de P2 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

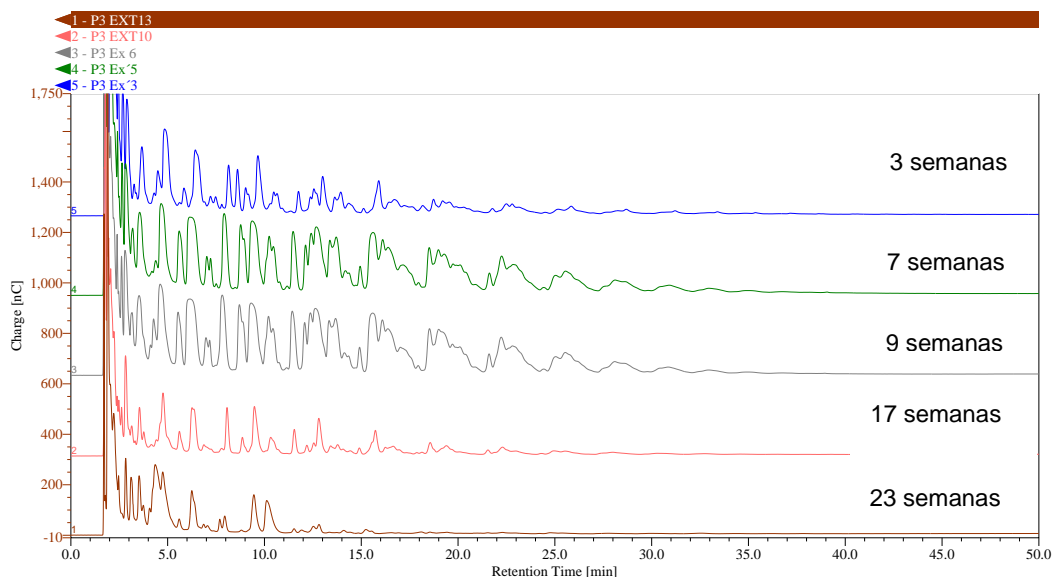


Figura 35. Perfil de fructanos en los extractos del metzcal provenientes de P3 (*A. salmiana*) durante la vida productiva del agave, detectado por HPAEC-PAD.

Grado de polimerización

En el caso del extracto de metzcal, se encontró que los polímeros de fructosa presentes en las muestras, en algunos casos tuvieron una distribución bimodal que se modificó con el tiempo de producción de aguamiel. Este comportamiento se puede observar en las Figuras 36-38 en las que se muestra la cromatografía por permeación en gel de los fructanos del extracto de metzcal para las 3 plantas analizadas a lo largo de su vida productiva. Esto marcó una diferencia importante en relación con los fructanos del aguamiel cuya distribución fue normal.

A partir de estas distribuciones se calcularon los parámetros M_w , M_n , D_{pn} , DP_w y el índice de polidispersión para cada una de las dos distribuciones que se observaron en cada caso. Los resultados se reportan en la Tabla 12.

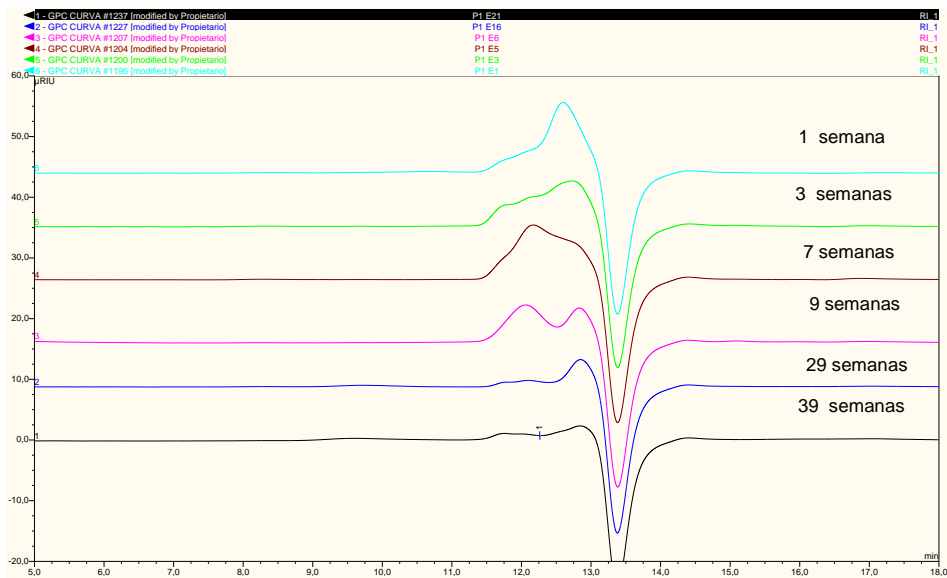


Figura 36. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P1 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.

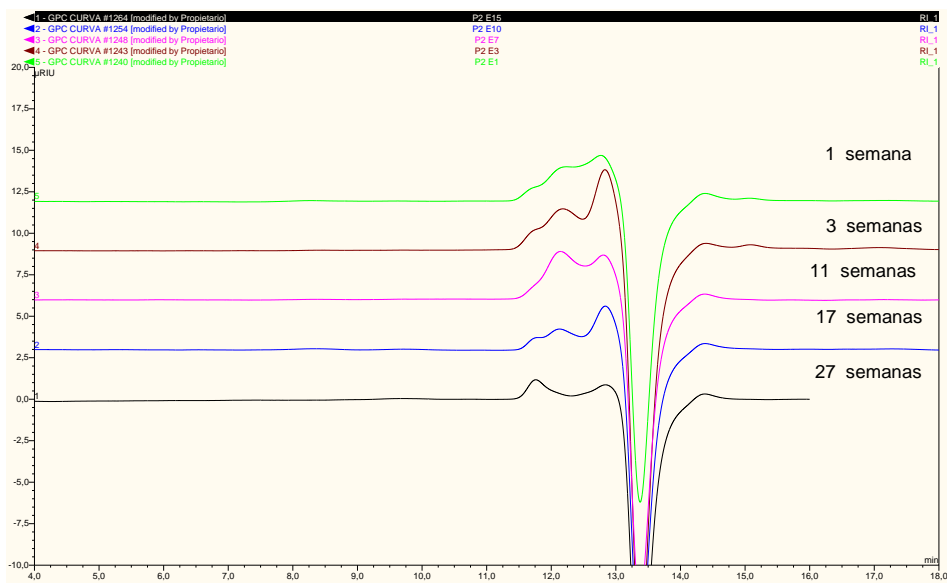


Figura 37. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P2 (*A. mapisaga*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.

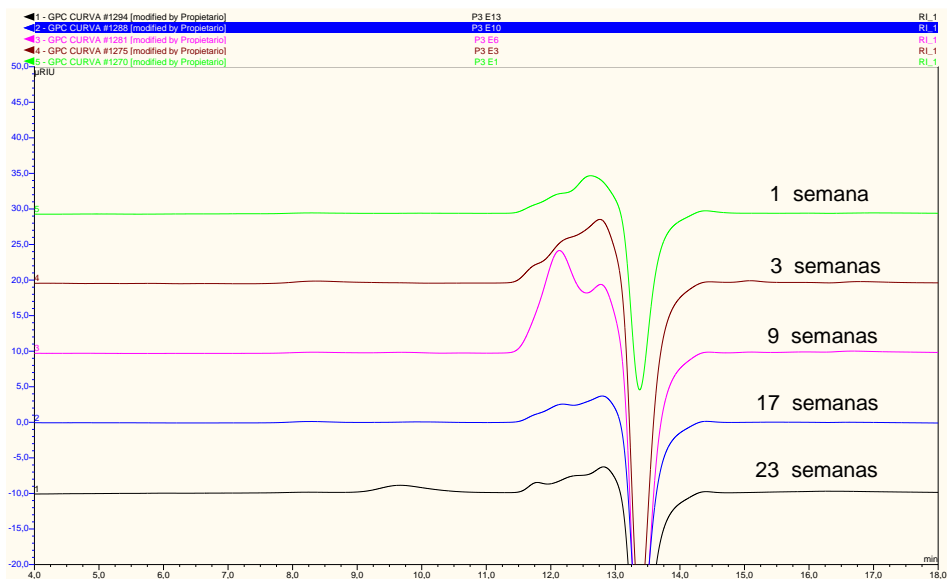


Figura 38. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzal provenientes de la P3 (*A. salmiana*) durante la vida productiva del agave, analizado por GPC.

En la P1 se observó que los valores más altos de Mn y Mw fueron en la semana 39, mientras que en la P2 el Mn más alto se encontró en la semana 5 y el Mw en la semana 27, y en la P3 el Mn y el Mw más grandes se encontraron en la semana 21. Es importante señalar que en la última muestra el productor dejó de raspar los agaves días antes debido a que, según su criterio, por el volumen tan escaso que exudaban las plantas, éstas habían llegado al final de su vida productiva. Por lo que para evitar la interferencia de este factor no se tomaron en cuenta los valores de la última semana para el análisis de GP, dicho esto para la P1 se considera el valor más alto de Mn y Mw fue en la semana 37.

Los máximos valores de DPn y DPw fueron variables en el extracto de metzal de cada planta, observándose el máximo para P1 a las 29 semanas con un DPn de 7.9 y DPw de 9.8; para la P2 a las 5 semanas con un DPn de 8.6 y un DPw de 10.6, y para la P3 a las 21 semanas con un DPn de 6.8 un DPw de 8.6.

Se puede observar claramente que los fructanos fueron en general de mayor peso molecular que en el aguamiel. Los más grandes en el extracto de metzal tuvieron hasta un Dpn de 7 y un Dpw de 11, mientras que en el aguamiel un Dpn de 3 y Dpw de 7.

Tabla 12. Grado de polimerización de los fructanos en los extractos de metzal obtenidos de las plantas P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*) y P3 (*A. salmiana*) durante su vida productiva.

	Semana	IP	Mn_I	Mw_I	Dpn_I	Dpw_I	Mn_{II}	Mw_{II}	DPn_{II}	DPw_{II}
P1	3	1.9	741	1432	4.5	8.7	--	--	--	--
	7	1.5	772	1183.1	4.6	7.2	--	--	--	--
	9	NA	1202	1522.6	7.3	9.3	217.8	239.6	1.2	1.4
	29	NA	1295.5	1605.5	7.9	9.8	218.0	247.8	1.2	1.4
	37	NA	1040.4	1313.1	6.3	8.0	221.3	242.1	1.2	1.4
	39	NA	1660.0	1970.0	10.1	12	278.5	341.6	1.6	2.0
P2	3	NA	1138.7	1542	6.9	9.4	217.5	239.8	1.2	1.4
	5	NA	1414.2	1734.3	8.6	10.6	312.4	362.9	1.8	2.1
	9	NA	1072.1	1428.4	6.5	8.7	229.6	253.7	1.3	1.4
	17	NA	1188.8	1548.0	7.2	9.4	219.1	241.8	1.2	1.4
	25	NA	1363.4	1637.1	8.3	10.0	218.2	238.1	1.2	1.3
	27	NA	1316.9	1916.3	8.01	11.7	161.2	162.99	0.9	0.9
P3	3	1.9	641.0	1208.0	3.8	7.3	--	--	--	--
	5	1.8	705.0	1301.0	4.2	7.9	--	--	--	--
	9	NA	913.2	1308.0	5.5	7.9	172.7	177.4	1	1
	17	1.9	647.0	1222.0	3.9	7.4	--	--	--	--
	21	NA	1119.4	1421.3	6.8	8.6	223.6	246.6	1.3	1.4
	23	1.9	629.0	1218.0	3.8	7.4	--	--	--	--

*NA: No aplica

La distribución de los fructanos en el extracto de metzal, fue distinta a la de los fructanos del extracto de la piña control, en algunos casos dependiendo del tiempo de producción y/o de la planta. La distribución bimodal de los fructanos en el extracto de metzal permitió confirmar que su estructura estaba cambiando debido al proceso de producción de aguamiel y que se estaba llevando a cabo una hidrólisis puesto que el grado de polimerización en número y en masa fue considerablemente menor en el extracto de metzal que en el extracto de la piña control.

Como se puede observar en las Figuras 39, 40 y 41 la última muestra del extracto de metzal obtenido de las tres plantas mostró acumulación de un polímero de alto peso molecular (148 000 Da) equivalente a un GP de 913. No existen reportes de que el agave pueda acumular un polímero de tal magnitud. Es muy probable que se haya tratado de una contaminación con una bacteria láctica productora de polímeros. Sin embargo, recordando que el productor dejó de raspar el agave días antes debido a que, según su criterio, éstas habían llegado al final de su vida productiva, es posible que al dejar de ser dañadas almacenaran de nuevo fuentes de energía sintetizando polímeros más grandes. Esta idea tiene sentido ya que como sugiere Livingston (1998) en respuesta a estrés hay un incremento de actividad FT, mientras que en respuesta a estrés severo hay un aumento en la actividad FEH.



Figura 39. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzcal provenientes de la P1 (*A. mapisaga*) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas. ■ Semana 1 ■ Semana 39.

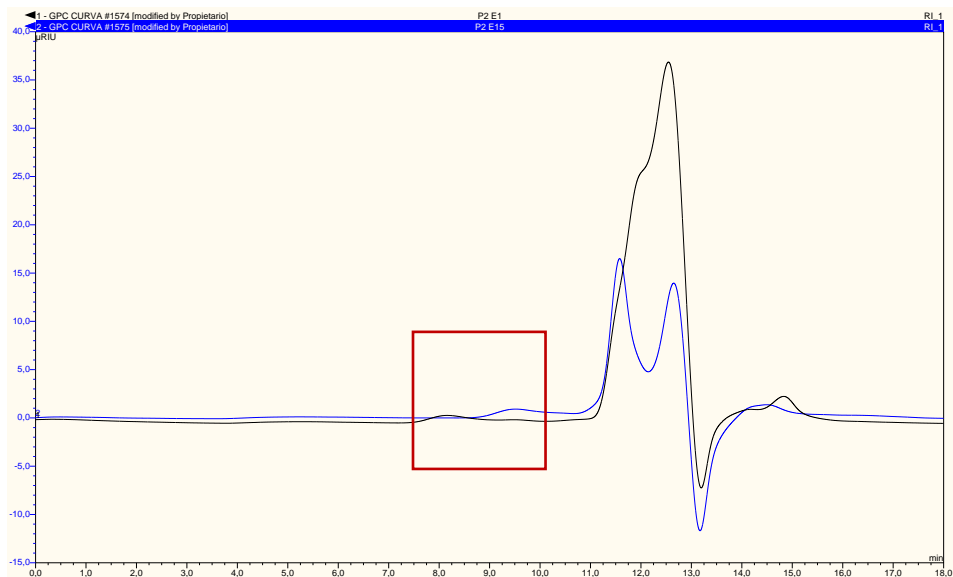


Figura 40. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzcal provenientes de la P2 (*A. mapisaga*) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas. ■ Semana 1 ■ Semana 27.

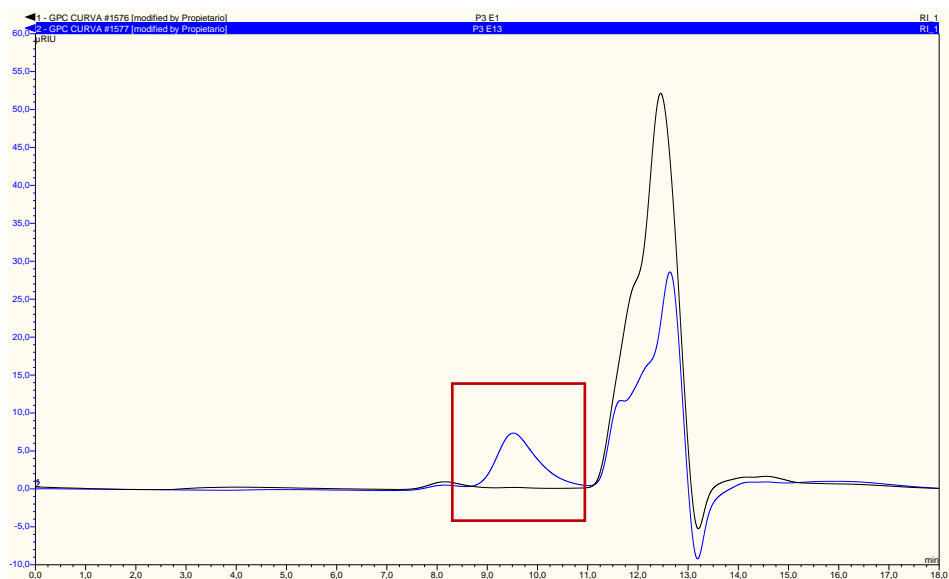


Figura 41. Distribución del peso molecular de los fructanos en los extractos de metzcal provenientes de la P3 (*A. salmiana*) en diferentes tiempos de vida productiva del agave, analizado por GPC. Las muestras inyectadas no fueron diluidas. ■ Semana 1 ■ semana 23.

5.3 Evolución de carbohidratos en aguamiel durante el día

Una de las preguntas más importantes que dieron origen a este proyecto fue si la concentración de carbohidratos y el perfil de fructanos en el aguamiel que emana de la planta se modificaban conforme transcurría el día y se iba acumulando en el cajete de la planta. Para contestarla, en un primer experimento se tomaron muestras de aguamiel fresco, después de raspar el cajete, a las 7:00 de la mañana, y posteriormente a las 10:30 y 14:00 h, lo que correspondió a las 0, 3.5 y 7 h de producción de aguamiel. Para cumplir con el objetivo de la determinación, se retiró el aguamiel que se había acumulado en el cajete hasta el momento de coleccionar la nueva muestra de aguamiel fresco.

Las Figuras 42 y 43, muestran la evolución de la concentración de sacarosa y del perfil de fructanos en aguamiel fresco, respectivamente. Se observó que la concentración de sacarosa se mantuvo constante en el aguamiel fresco a las

diferentes horas del día, pero no así la cantidad de fructanos, que para las 3 plantas fue mayor después del raspado y disminuyó conforme fluyó el aguamiel.

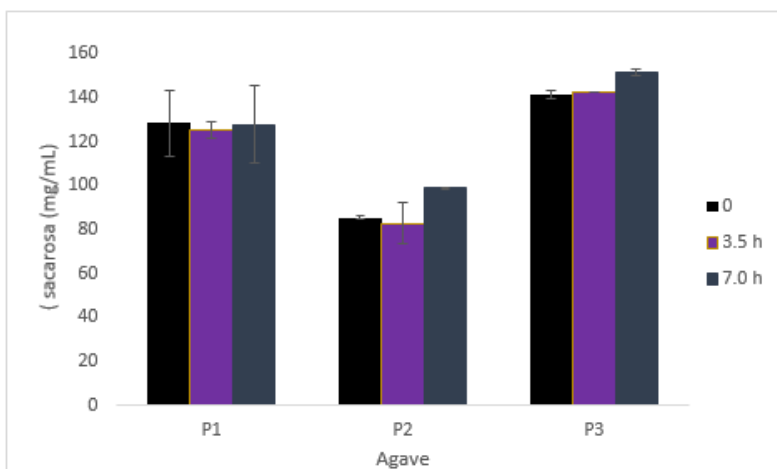


Figura 42. Concentración de sacarosa en aguamiel fresco y fresco sin raspar recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (*A. mapisaga*), 3a semana; P2 (*A. mapisaga*), 13a semana y P3 (*A. salmiana*), 7a semana.

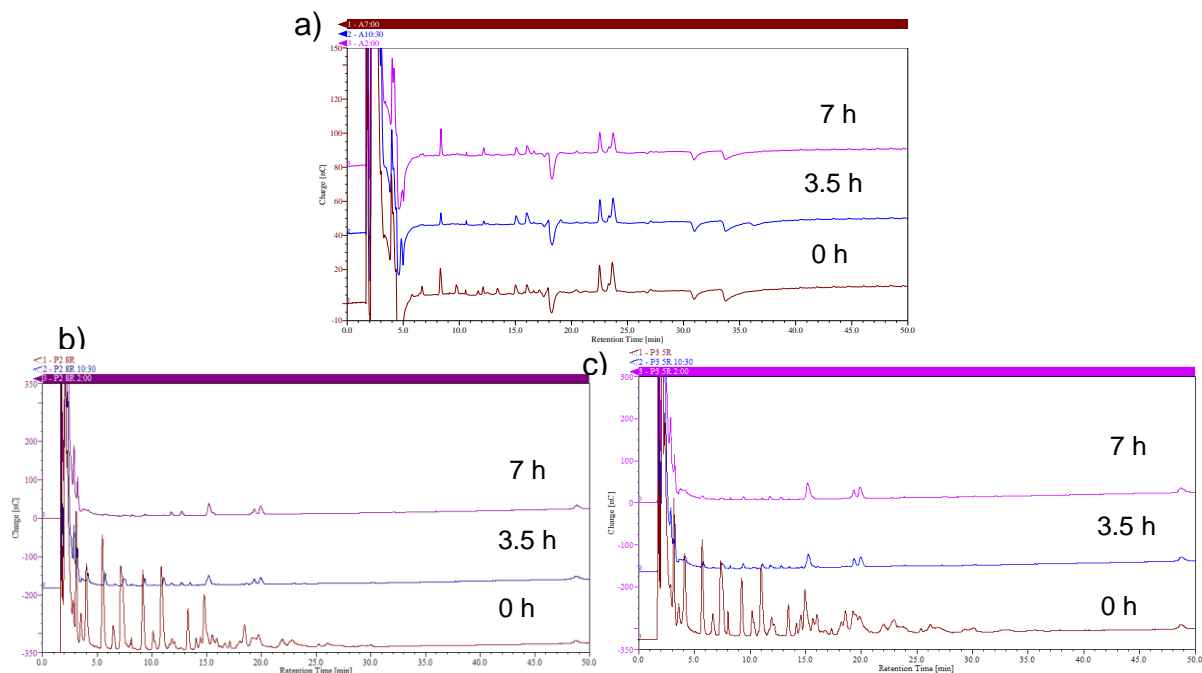


Figura 43. Perfil de fructanos en aguamiel fresco y fresco sin raspar recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (*A. mapisaga*), 3a semana; P2 (*A. mapisaga*), 13a semana y P3 (*A. salmiana*), 7a semana; detectado por HPAEC-PAD.

Para confirmar que la riqueza de fructanos en el aguamiel provenía del raspado del cajete, se realizaron los mismos experimentos a diferentes horas del proceso de acumulación de aguamiel, pero esta vez raspando el cajete antes de tomar cada muestra. Los resultados mostraron que, como ya se había demostrado, la concentración de sacarosa se mantuvo constante (Figura 44), es decir que el raspado no fue un factor que influyó sobre la concentración de sacarosa, mientras que el perfil de fructanos mantuvo su riqueza, comprobando que el raspado es la acción que permite el enriquecimiento de fructanos en el aguamiel (Figura 45).

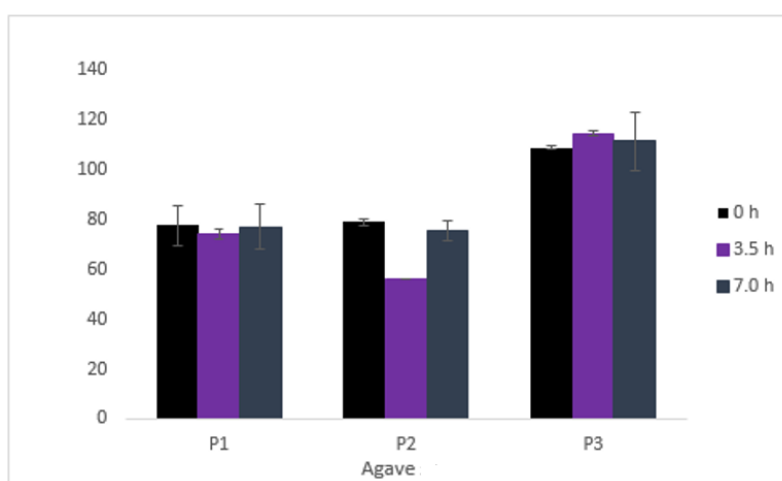


Figura 44. Concentración de sacarosa en aguamiel fresco recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (*A. mapisaga*), 31a semana; P2 (*A. mapisaga*), 19a semana y P3 (*A. salmiana*), 13a semana.

Si recordamos que los fructanos, además de localizarse en la vacuola se encuentran también en el apoplasto (Valluru, y col., 2008), podemos suponer que los fructanos en el aguamiel fresco que emana de la planta recién raspada, provienen del apoplasto y no de la vacuola, ya que en dicho organelo se encuentran protegidas por la membrana plasmática y por el tonoplasto, lo que dificulta su salida. Por lo anterior, es congruente encontrar un grado de polimerización más bajo en los fructanos del aguamiel que en los del metzal (mostrado en el capítulo 5.2), ya que, en el metzal, el procedimiento de extracción en el laboratorio permitió recuperar los fructanos presentes en todos los organelos.

De acuerdo con la hipótesis propuesta por Valluru y col., (2008) los fructanos se transportan al apoplasto mediante vesículas. Tomando esto como base, tiene sentido pensar que los polímeros transportados son de bajo grado de polimerización, puesto que es difícil suponer que las vesículas de transporte lleven polímeros muy grandes al exterior de la célula, aunado al hecho de que en el apoplasto no hay enzimas FT y si FEH.

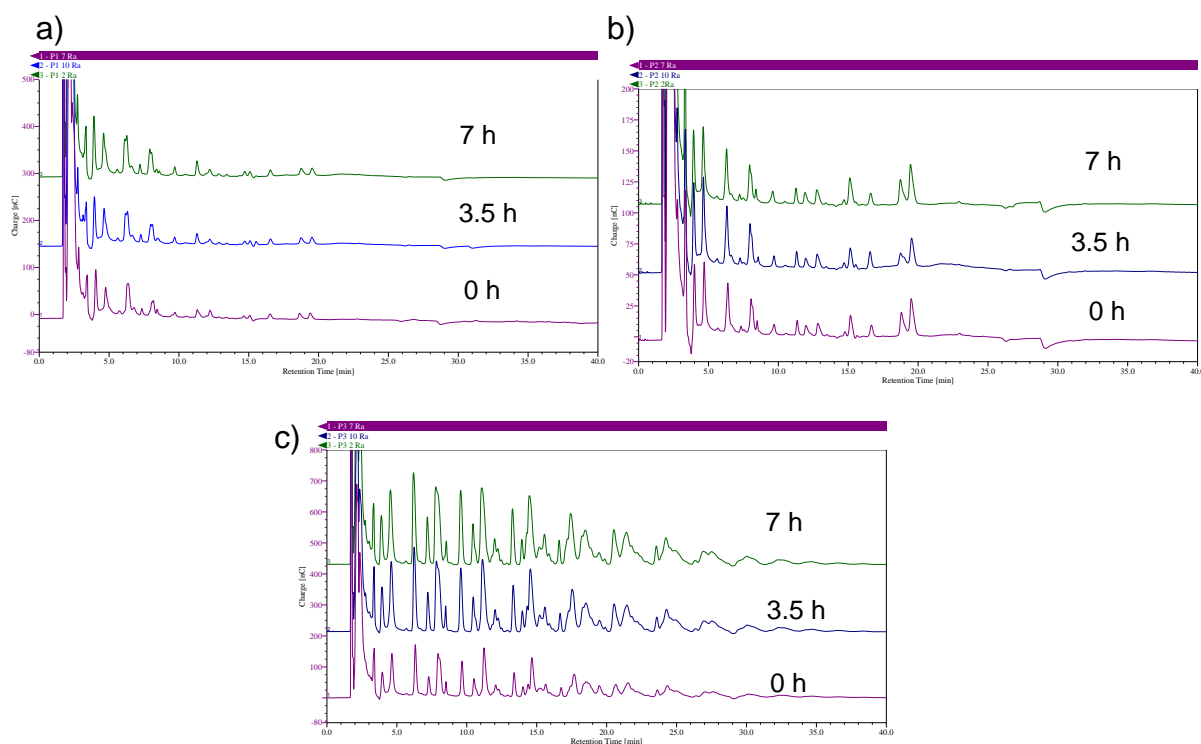


Figura 45. Perfil de fructanos en aguamiel fresco recolectado a las 0, 3.5 y 7 h de la producción diaria de aguamiel en las tres plantas en diferentes semanas de su vida productiva: P1 (*A. mapisaga*), 31a semana; P2 (*A. mapisaga*), 19a semana y P3 (*A. salmiana*), 13a semana; detectado por HPAEC-PAD.

Dilución de fructanos

Tomando como base que al raspar son liberados los fructanos y que se diluyen conforme el aguamiel fluye, se procedió a medir cada 20 min el volumen y la concentración de fructanos y de sacarosa durante las primeras 3h de producción de aguamiel. Este experimento se realizó con el fin de evaluar cuál es el volumen en el que los fructanos son acarreados, posterior al raspado. Los resultados mostraron que, como ya se había demostrado, la concentración de sacarosa permaneció constante y que la concentración de fructanos disminuyó conforme fluía el aguamiel (Figura 46).

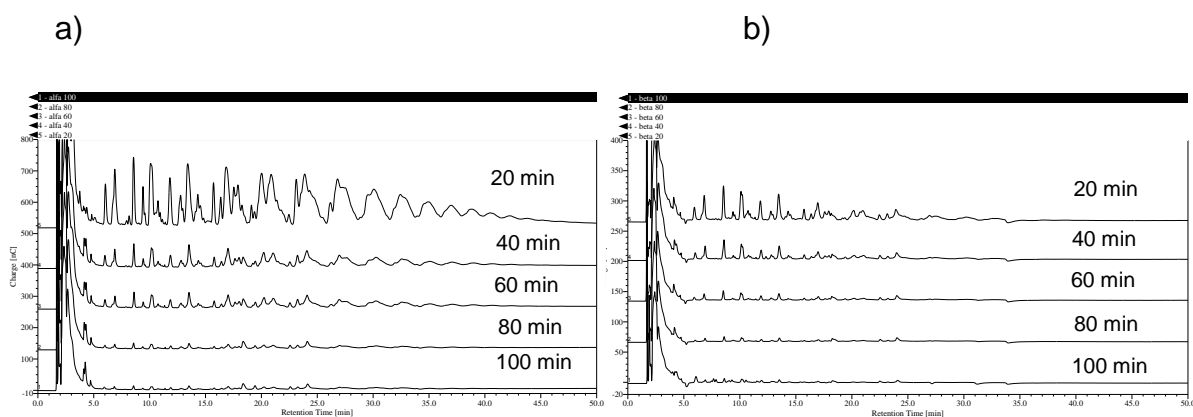


Figura 46. Perfil de fructanos en muestras de aguamiel tomadas de dos plantas de agave, cada 20 minutos y durante 3 horas, después del raspado: a) Planta α y b) Planta β , detectado por HPAEC-PAD.

Como se observa en la Tabla 13, la concentración de fructanos que son arrastrados parece estar en función del volumen, ya que, aunque ambas plantas se encontraban en la misma etapa productiva el volumen de aguamiel producido y la concentración de fructanos en cada muestra con respecto al tiempo fueron distintos. El volumen de aguamiel de la planta α fue de casi el 50 % del volumen de la planta β (Tabla 13).

La concentración de fructanos dejó de ser cuantificable en un volumen promedio de 206 ± 9.5 mL. En ambos casos se observó la misma tendencia del flujo de savia, encontrando una mayor velocidad de flujo posterior al raspado (en los primeros 20 min), misma que a partir de los 60 min permaneció constante hasta los 180 min.

Tabla 13. Concentración de fructanos en muestras de aguamiel obtenidas de dos agaves (P α y P β) cada 20 minutos y durante 3 h, posteriores al raspado.

Tiempo (min)	<i>Planta α</i>			<i>Planta β</i>		
	Volumen (mL)	Sacarosa	Fructanos	Volumen (mL)	Sacarosa	Fructanos
20	57	107.6 \pm 5.2	38.1 \pm 2.3	146	152.3 \pm 8.3	12.8 \pm 1.08
40	42.5	132.9 \pm 7.9	7.3 \pm 1.7	53.5	157.9 \pm 2.3	4.9 \pm 4.09
60	38.5	126.7 \pm 2.2	9.8 \pm 1.3	75	151.3 \pm 8.3	Nd
80	37.5	117.0 \pm 21.2	9.0 \pm 1.6	75	153.1 \pm 3.4	Nd
100	37.5	117.8 \pm 8.3	8.5 \pm 3.2	75	158.7 \pm 5.1	Nd
120	37.5	123.8 \pm 12.5	Nd	75	147.9 \pm 8.6	Nd
140	37.5	116.5 \pm 8.3	Nd	75	156.2 \pm 19.2	Nd
160	41.5	121.5 \pm 15.6	Nd	65.5	149.9 \pm 3.0	Nd
180	36	127.4 \pm 0.1	Nd	72.5	154.3 \pm 10.1	Nd

Nd: No detectado; la concentración se expresa como mg/mL; los valores se presentan como el promedio \pm desviación estándar.

5.4 Cambios en los carbohidratos del aguamiel al acumularse en el cajete

La siguiente pregunta que se abordó en el proyecto, tiene que ver con los cambios en los carbohidratos que pueden suceder en el cajete durante la acumulación del aguamiel. Para responderla, se analizó y comparó el perfil de carbohidratos en aguamiel fresco con el aguamiel acumulado en la misma planta, con resultados sorprendentes en cuanto a lo esperado.

En las Figuras 47 y 48 se muestran placas de TLC en las que puede constatarse primeramente que un comportamiento en común fue la hidrólisis de la sacarosa, como también se reporta en la Tabla 14. Posteriormente se pudo observar que el perfil característico de los fructanos de agave (observado como un barrido) cambió en el aguamiel acumulado, mostrando diferente perfil de oligosacáridos dependiendo la muestra.

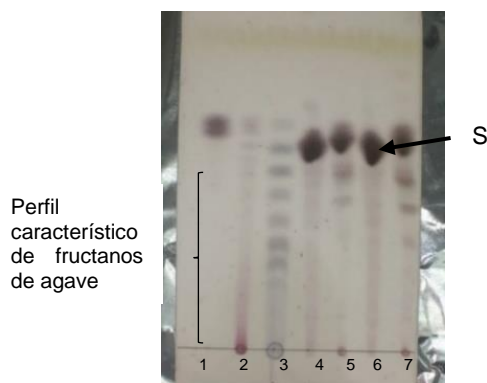


Figura 47. Perfil de azúcares en aguamiel fresco y en aguamiel acumulado (12 h) obtenidos de la P1 (*A. mapisaga*) en diferentes semanas de la vida productiva del agave, analizado por TLC (con revelador de anilina). Estándares: 1) FGS, 2) Agavina, 3) Maltodextrina. Muestras: 4) Aguamiel fresco y 5) Aguamiel acumulado, ambos de la 7a semana; 6) Aguamiel fresco, y 7) Aguamiel acumulado, ambos de la 9a semana.

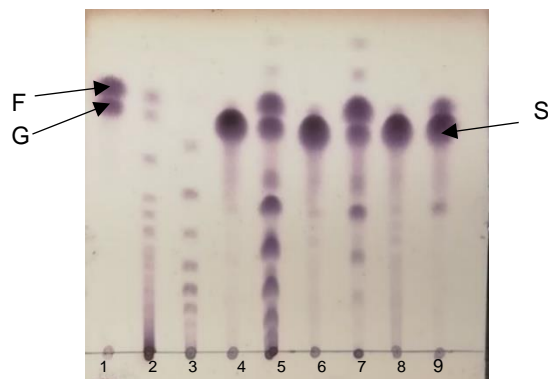


Figura 48. Perfil de azúcares en aguamiel fresco y en aguamiel acumulado (12 h) obtenidos de la P2 en diferentes semanas de la vida productiva del agave, analizado por TLC (con revelador de naftol). Estándares: 1) FGS, 2) Agavina, 3) Maltodextrina. Muestras: 4) Aguamiel fresco y 5) Aguamiel acumulado, ambos de la 2a semana; 6) Aguamiel fresco, y 7) Aguamiel acumulado ambos de la 5a semana; 8) Aguamiel fresco y 9) Aguamiel acumulado, ambos de la 7a semana.

En la Figura 49 se muestra una selección de cromatogramas para ilustrar el análisis comparativo del perfil de oligosacáridos presentes en el aguamiel fresco y el aguamiel acumulado obtenidos de la planta P1 en diferentes semanas de su vida productiva. Los cromatogramas de las plantas P2 y P3 se encuentran en la sección de anexos. Se observaron 3 principales cambios de perfil de oligosacáridos, que permiten clasificar al aguamiel acumulado de la siguiente forma:

Aguamiel Tipo 1) Síntesis de una serie de nuevos oligosacáridos claramente definidos en el aguamiel, y sintetizados por enzimas del tipo glicosiltransferasas provenientes de microorganismos presentes en el cajete. Este tipo de cambios se observó principalmente en etapas tempranas de producción. El perfil de estos oligosacáridos es diferente al de los fructanos de agave, por lo que es de suponer que de forma parcial y en algunos casos de forma total, fueron hidrolizados/consumidos.

Aguamiel Tipo 2) Perfil de oligosacáridos complejo, de los que es difícil establecer conclusiones concretas. En estos aguamieles se observa un aumento en la señal de ciertos compuestos, pero no puede discernirse si resultan de la hidrólisis de los

fructanos de agave o de síntesis microbiana. Dos de ellos fueron identificados con estándares del laboratorio (1-kestosa y 6-kestosa).

Es un hecho que se observan también la aparición de nuevas señales, y que se mantiene también un perfil general parecido al de los fructanos de agave presente en el aguamiel fresco. Por lo general, observamos estos cambios en el aguamiel obtenido en etapas de producción intermedia y finales.

Aguamiel Tipo 3) Un tercer perfil de fructanos en aguamiel, observado por lo general en tiempos de producción intermedios y finales, corresponde a una dilución de los fructanos del aguamiel fresco, es decir, se observa el mismo perfil de los fructanos de agave, sólo con a una concentración menor por el efecto de dilución.

Es un hecho que la manipulación de la planta desde que se inicia el proceso productivo (castrado) conlleva a la contaminación del cajete con microorganismos del medio ambiente, del instrumental que usa el productor tanto para el raspado como para la extracción, así como de las costumbres del mismo. A esto se debe agregar la presencia de bacterias endófitas que son abundantes según se lo reportado por Martínez-Rodríguez y col. (2014).

Las muestras de aguamiel acumulado con mayores cambios están relacionadas con un pH más ácido y por tanto a mayor actividad microbiana (Tabla 14). Se observó que aún en el caso de los aguamieles donde no hubo cambio de la estructura de fructanos (tipo 3), si hubo un cambio de pH y en la hidrólisis de sacarosa, lo que sugiere que hay actividad microbiana, pero en menor grado y que quizá los microorganismos sólo están utilizando la sacarosa como fuente de carbono.

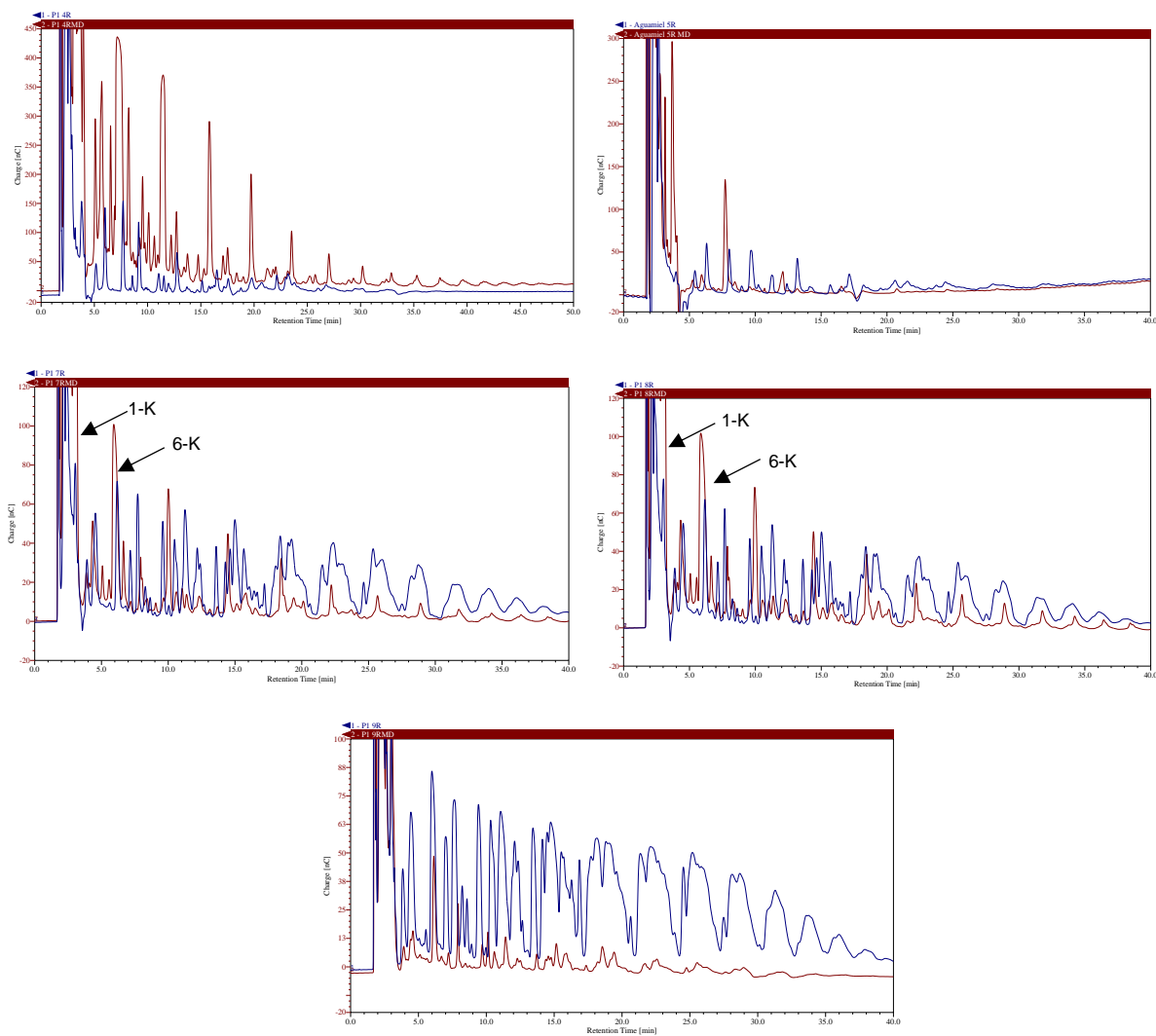


Figura 49. Comparación del perfil de aguamiel fresco y acumulado de la P1 (*A. mapisaga*) en diferentes semanas de su vida productiva: a) 5° semana (Aguamiel tipo 1), b) 7° semana (Aguamiel tipo 2), c) 9° semana (Aguamiel tipo 2), d) 11° semana (Aguamiel tipo 2) y e) 13° semana (Aguamiel tipo 3). Aguamiel acumulado ■ Aguamiel fresco ■ Los cromatogramas de las plantas P2 y P3 se muestran en la sección de Anexos.

Tabla 14. Concentración de azúcares F, G y S en muestras de aguamiel fresco y aguamiel acumulado obtenido de las plantas P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*), y P3 (*A. salmiana*) en diferentes tiempos de su vida productiva.

	Semanas	Aguamiel	pH	Fructosa (mg/mL)	Glucosa (mg/mL)	Sacarosa (mg/mL)
P1	5	Fresco	9	Nd	Nd	85.2±14.5
		Acumulado	3.5	34.31±0.4	25.67±0.1	9.64±0.1
	7	Fresco	8.5	Nd	Nd	141.1±21.1
		Acumulado	ND	9.15±0.2	6.72±0.6	69.32±3.7
	9	Fresco	7	Nd	Nd	116.2±10.8
		Acumulado	ND	10.03±0.02	8.35±0.02	114±0.1
	11	Fresco	7	Nd	Nd	99.8±3.3
		Acumulado	ND	10.1±0.1	8.35±0.04	114±0.04
	13	Fresco	10	Nd	Nd	127.8±3.1
		Acumulado	ND	5.2±0.1	4.3±0.04	126.1±0.04
P2	2	Fresco	7	Nd	Nd	138.6±4
		Acumulado	5	12.9±0.1	26.6±0.01	18.9±0.01
	3	Fresco	7	Nd	Nd	163.5 ± 1.1
		Acumulado	5	57.5 ± 0.6	40.1 ± 0.4	49.5 ± 4.7
	5	Fresco	7	Nd	Nd	120.1±4.6
		Acumulado	5	18.05±0.13	63.5±0.10	78.8±2.1
	7	Fresco	7	Nd	Nd	119.6± 4.6
		Acumulado	5	41.67 ± 0.1	63 ±0.87	60.1±2.9
	9	Fresco	8	Nd	Nd	98.8±5.2
		Acumulado	ND	8.79±0.2	6.71±0.3	88.18±2.5
		Fresco	7.5	Nd	Nd	134.4±6
3	Acumulado	4.5	14.1±0.1	13.2±0.02	87.7±0.01	

P3	5	Fresco	7.5	Nd	Nd	130.1±9.2
		Acumulado	4.5	18.7±1	16.3±0.01	53.9±0.03
	7	Fresco	7	Nd	Nd	126.8±10.5
		Acumulado	5	17.1±0.09	14.8±0.2	89.13±2.1
	9	Fresco	7	Nd	Nd	86.2±9.5
		Acumulado	5	18±0.04	13.8±0.1	88.1±0.1
	11	Fresco	7	Nd	Nd	108.9±5.0
		Acumulado	5	10.2±0.03	6.6±0.001	94.26±0.05

ND: No determinado; Nd: No detectado

Aguamiel acumulado en la zona productiva de Huitzilac.

Para confirmar que los cambios que sufre el aguamiel al acumularse en el cajete no es exclusivo de las tres plantas de agave muestreadas, se tomaron muestras de aguamiel fresco y acumulado de 10 agaves (A, B, B*, C-I) de la zona de Huitzilac, con diferentes tiempos de producción y de diferentes especies. En dichas muestras se determinó y comparó el perfil de fructanos así como la concentración de F, G y S.

Los resultados mostraron que, en general el perfil de oligosacáridos es heterogéneo, existiendo una gran diferencia entre el perfil de azúcares del aguamiel fresco y del aguamiel acumulado (Figuras 50-59). Las muestras de aguamiel de los 10 agaves coincidieron con alguno de los 3 tipos mencionados anteriormente, como se muestra en la Tabla 15.

Con el fin de hacer más fácil la comparación a la que se refiere el punto anterior, el perfil cromatográfico del aguamiel de cada planta se mantuvo en la misma escala. En todos los casos el perfil de fructanos del aguamiel fresco se presenta en color verde y el del acumulado en morado.

Tabla 15. Clasificación de muestras de aguamiel acumulado provenientes de 10 agaves de diferentes especies y en diferente etapa productiva ubicados en la zona de Huitzilac, Morelos.

Agave	Etapa de vida productiva	Especie	Tipo de aguamiel
A	Inicial	<i>A. salmiana</i>	Tipo 1
B	Intermedia	<i>A. americana</i>	Tipo 3
B*	Intermedia	ND	Tipo 2
C	Final	<i>A. mapisaga</i>	Tipo 2
D	Intermedia	ND	Tipo 2
E	Intermedia	<i>A. salmiana</i>	Tipo 2
F	Final	ND	Tipo 2
G	Final	ND	Tipo 2
H	Inicial	<i>A. salmiana</i>	Tipo 1
I	Intermedia	<i>A. americana</i>	Tipo 2

ND: No determinado

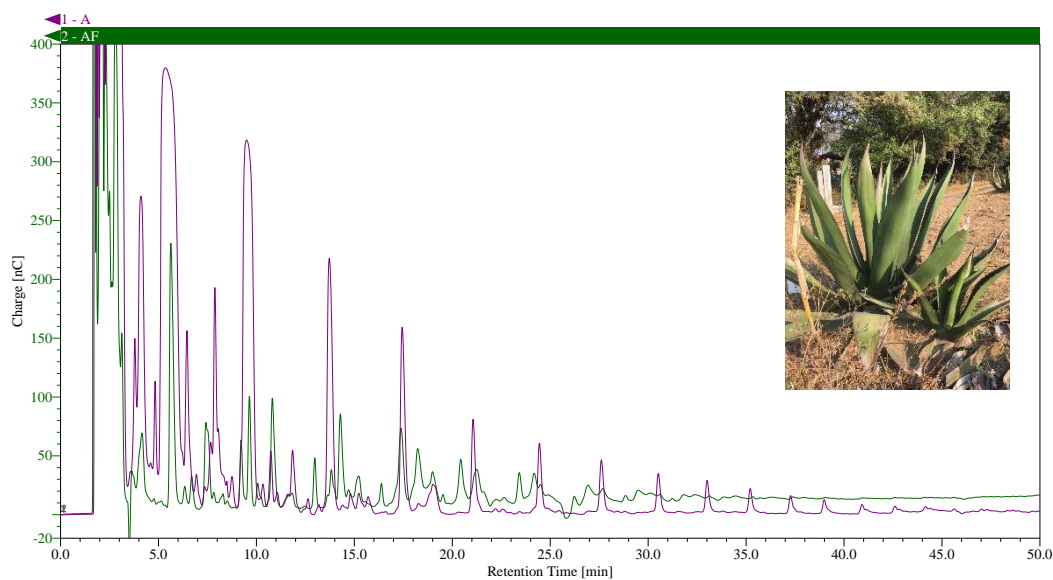


Figura 50. Agave A. (*A. salmiana*). Tipo 1. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

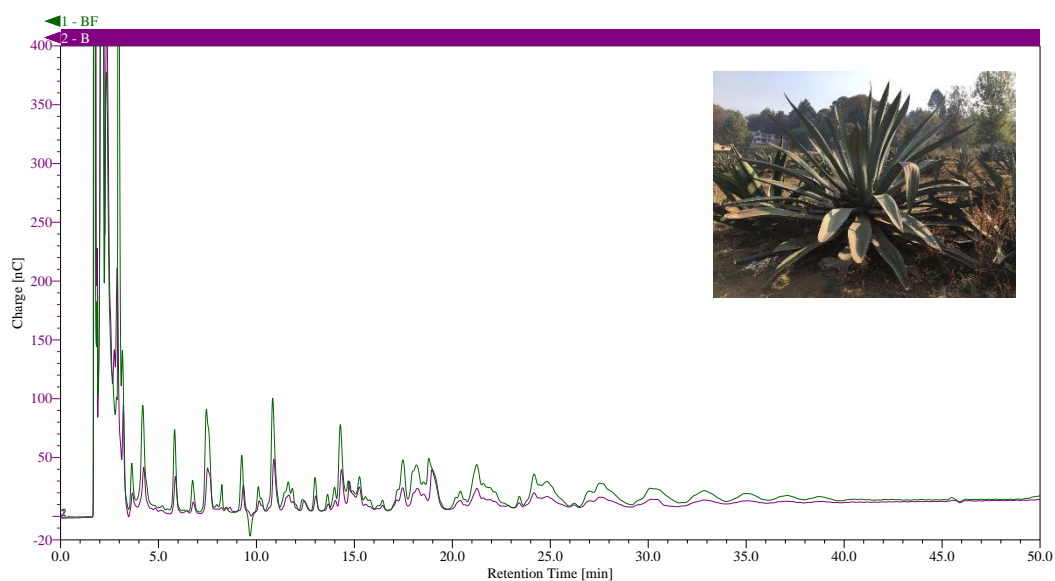


Figura 51. Agave B (*A. americana*). Tipo 3. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

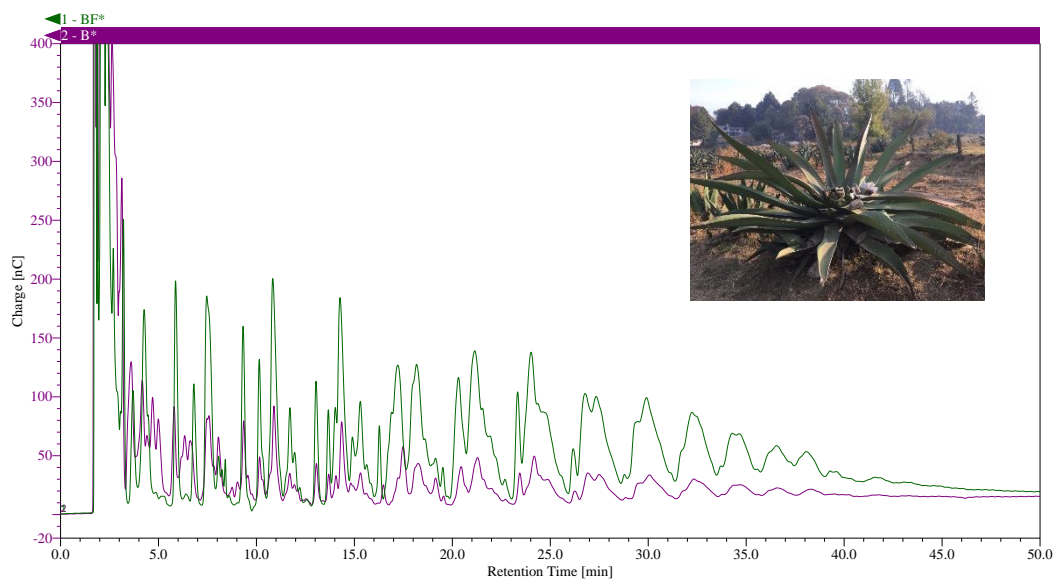


Figura 52. Agave B*. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

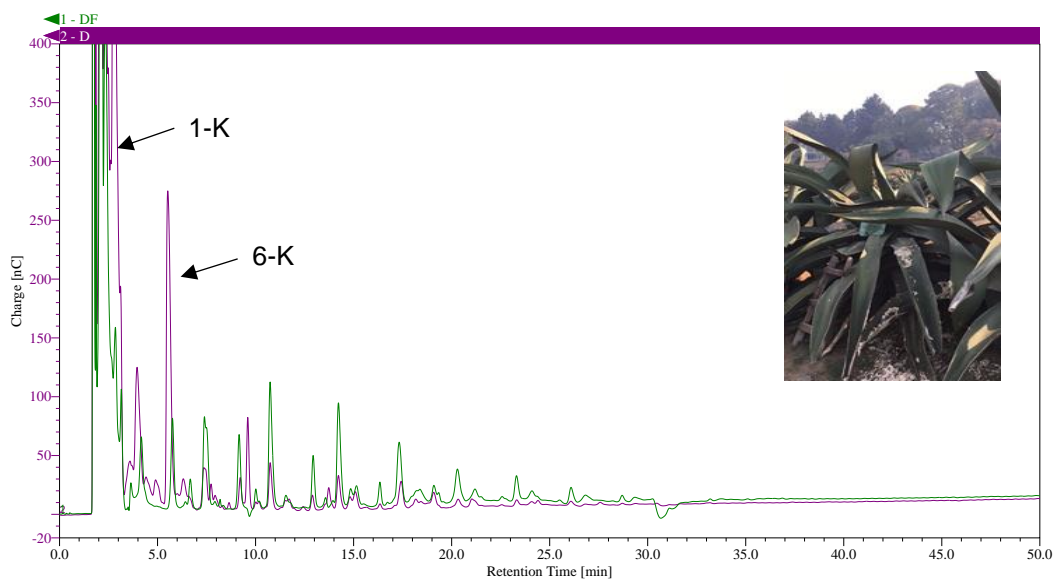


Figura 53. Agave C (*A. mapisaga*). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

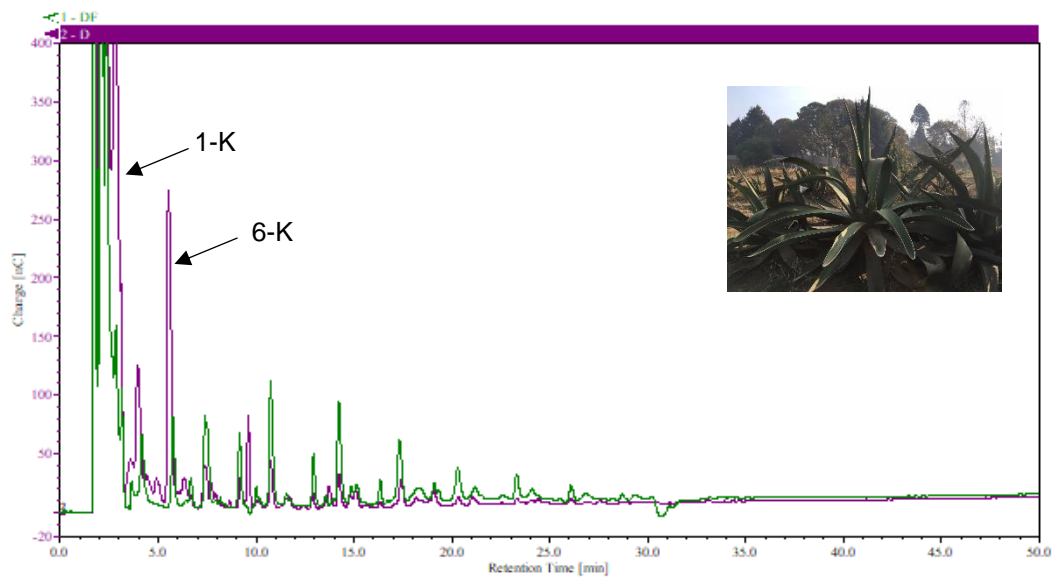


Figura 54. Agave D. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

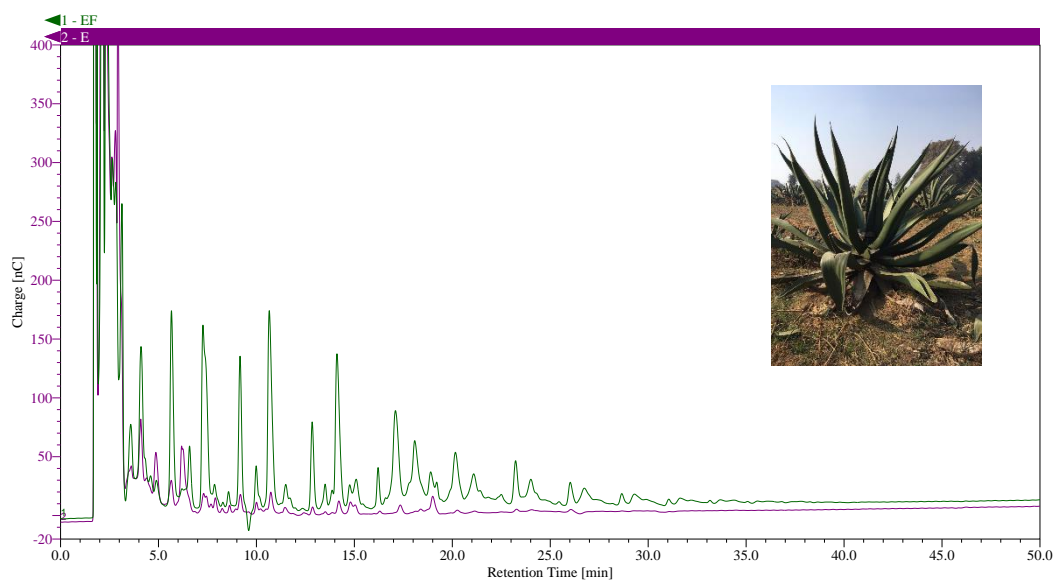


Figura 55. Agave E (*A. salmiana*). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

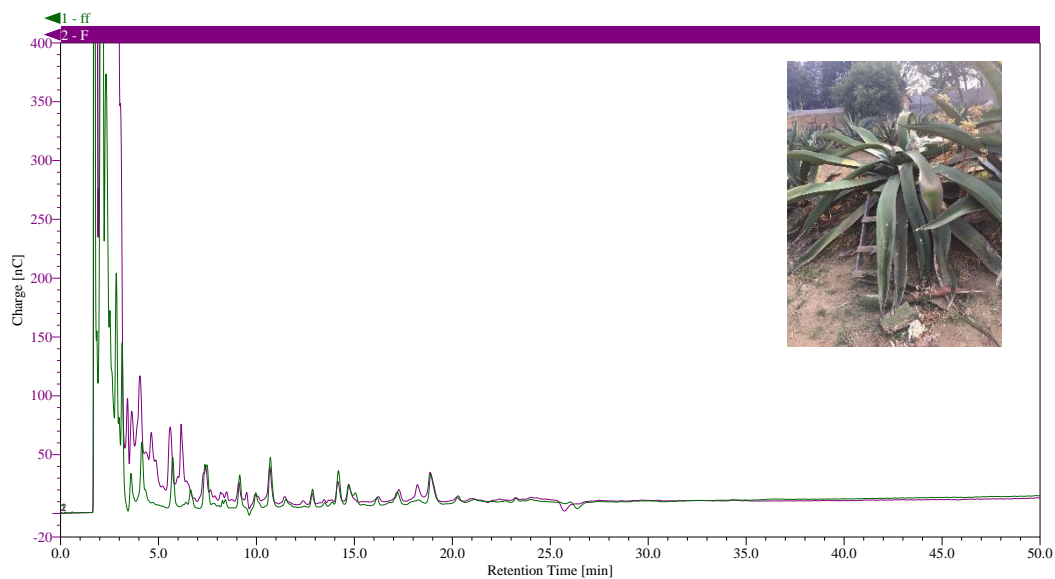


Figura 56. Agave F. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

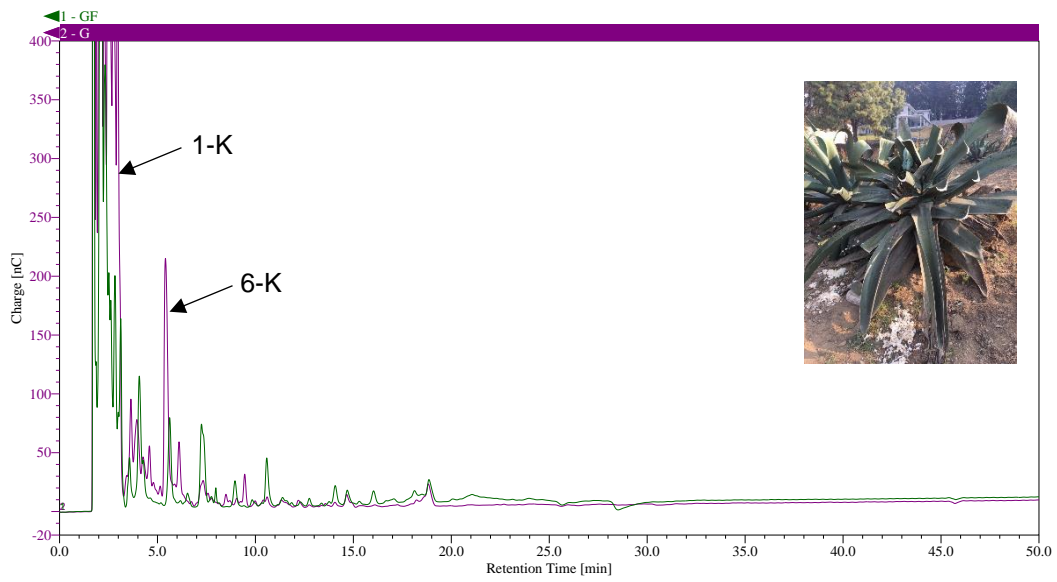


Figura 57. Agave G. Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

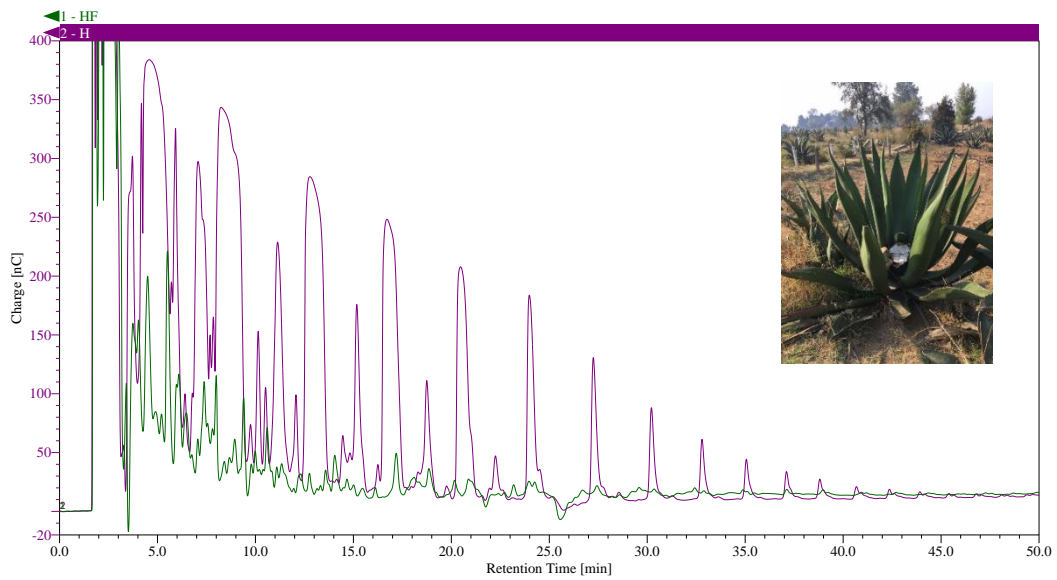


Figura 58. Agave H. (*A. salmiana*). Tipo 1. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

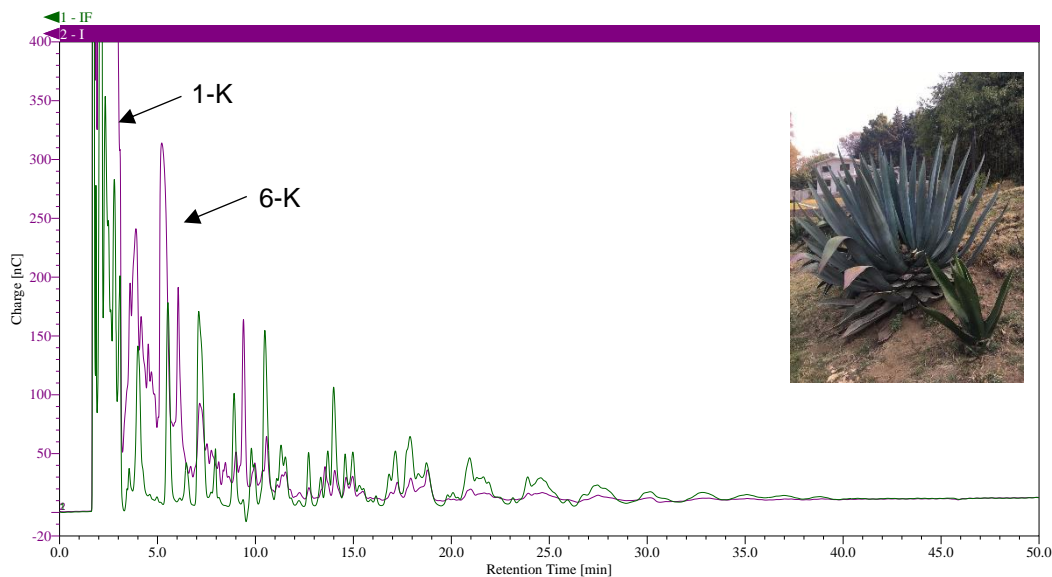


Figura 59. Agave I (*A. americana*). Tipo 2. Comparación del perfil de oligosacáridos del aguamiel fresco y acumulado, detectado por HPAEC-PAD.

En lo que a los azúcares simples se refiere, se encontró que en todos los casos parte de la sacarosa fue hidrolizada y consumida durante la acumulación de aguamiel tal como se había mencionado. Las plantas que parecen tener mayores cambios en cuanto al perfil de fructanos, son aquellas que se encontraban al inicio de la producción, mientras que aquellas que se encontraban en una etapa final o intermedia no mostraban ningún cambio significativo más que la dilución (Tabla 16). Un agave que mostró un comportamiento *sui generis* fue el C (Figura 53), cuyo aguamiel recién exudado contenía pequeñas concentraciones de glucosa y fructosa. Dados los resultados anteriores, es posible concluir que esta planta posiblemente contenía del aguamiel acumulado anterior o quizá tenía un mayor nivel de microorganismos que pudieron actuar en el tiempo que se tomó la muestra.

Tabla 16. Concentración de F, G y S en muestras de aguamiel fresco y aguamiel acumulado obtenidas de las 10 plantas de agave de diferentes especies y con diferente tiempo de vida productiva.

<i>Planta</i>	<i>Aguamiel</i>	<i>Fructosa (mg/mL)</i>	<i>Glucosa (mg/mL)</i>	<i>Sacarosa (mg/mL)</i>
A	Fresco	Nd	Nd	176.9±9.9
	Acumulado	14.3±0.3	13.2±2.5	90.3±5.4
B*	Fresco	Nd	Nd	165±17.3
	Acumulado	6.6±1.16	2.2±0.6	157.9±2.3
B	Fresco	Nd	Nd	129.4±3.2
	Acumulado	Nd	Nd	117.1±2.4
C	Fresco	5.4±0.1	7.1± 0.2	88.9±9.8
	Acumulado	16.4±1	16.4±1.5	60.5±9.8
D	Fresco	Nd	Nd	182.5.8±4.9
	Acumulado	4.1±0.1	3.1±0.04	162.5±5.2
E	Fresco	Nd	Nd	146.3±13.1
	Acumulado	4.1	2.1	160.8±3.6
F	Fresco	Nd	Nd	85.2 ± 2.9
	Acumulado	6.8 ± 0.6	6.3 ± 0.04	75.1± 2.2
G	Fresco	Nd	Nd	77.4±3.9
	Acumulado	92.9	17.9	56.7±11.1
H	Fresco	Nd	Nd	184.5± 12.5
	Acumulado	13.5 ± 2.6	16.4±0.1	154.4±0.4
I	Fresco	Nd	Nd	157.4±6.1
	Acumulado	42.8±0.8	27±0.9	82.9±3.1

Nd: No detectado.

Se realizó un muestreo en 3 diferentes regiones para comprobar que este comportamiento no era atribuible sólo a muestras de aguamiel obtenidas en la zona de Huitzilac. Las muestras de aguamiel acumulado se obtuvieron de Morelia, Michoacán; Santa Catarina, Tlaxcala y Tenango del Aire, Estado de México (Figura 60). El perfil de oligosacáridos observado en cada uno de los 3 aguamieles fue distinto, pero cada uno de ellos coincidió con alguno de los 3 tipos de aguamiel ya mencionados: Tenango del Aire, Aguamiel Tipo 1; Santa Catarina y Morelia, Aguamiel Tipo 3.

Con base en toda la información anterior podemos decir que, el aguamiel fresco y el aguamiel acumulado presentan cambios a lo largo de la vida productiva del agave.

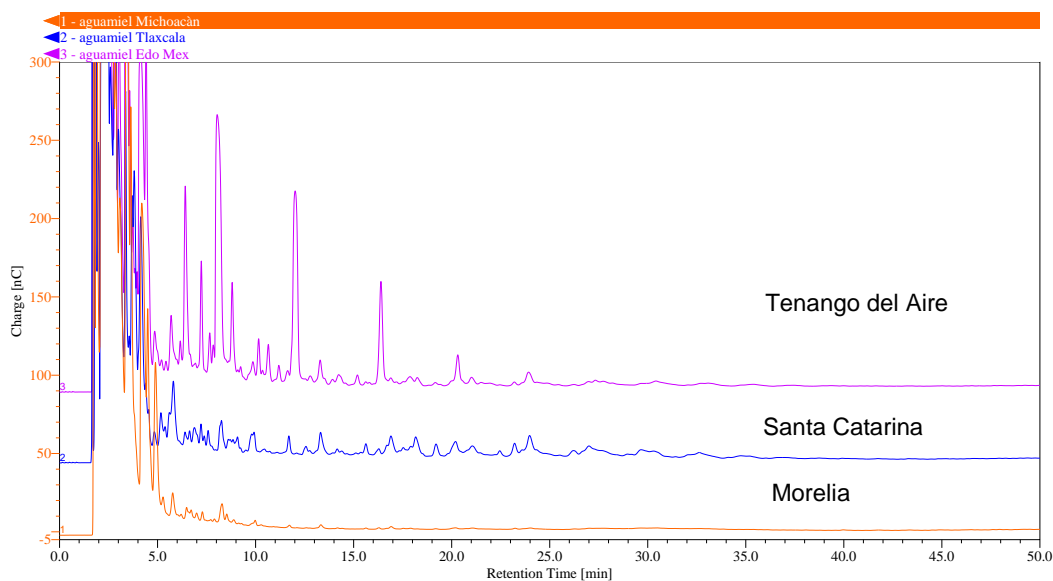


Figura 60. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel obtenido en tres zonas geográficas diferentes. Morelia, Michoacán; Santa Catarina, Tlaxcala: Tenango del Aire, Estado de México, detectado por HPAEC-PAD.

5.4.1 Actividad enzimática

5.4.1.1 Aguamiel

Partiendo de los resultados anteriormente descritos, que indican que conforme se acumula el aguamiel el cajete hay una hidrólisis de la sacarosa atribuible a invertasas, y un cambio en el perfil y diversidad de fructanos atribuible a enzimas hidrolasas y transferasas, se realizó un experimento para determinar la presencia de dichas enzimas en el aguamiel fresco.

Los resultados se presentan en las Figuras 61 y 62 en los que se puede constatar que no hubo diferencia en la concentración de sacarosa en las primeras 6 h, lo cual nos sugiere que en el aguamiel fresco no hay actividad Inv, hecho que se confirma con la nula presencia de fructosa y glucosa. Se corrobora también que no hubo actividad FEH ni FFT, ya que el perfil de fructanos fue prácticamente el mismo.

Estos resultados sugieren que el cambio del perfil de F, G y S y fructanos en las muestras de aguamiel acumulado fue debido a una actividad microbiana y no a enzimas de la planta que pudiesen haberse encontrado en la savia.

Existen reportes de presencia de FEH en el apoplasto (Livingston y col., 1998) y en el floema de agave (Wang y col., 1998) y el aguamiel, al provenir de ambos podría estar provisto de ellas. Sin embargo, parecen no tener impacto, lo cual podría atribuirse a las altas concentraciones de sacarosa (y bajas concentraciones de enzima), misma que inhibe la actividad de FEH de plantas (Verhaest y col., 2006). Cabe mencionar que el floema no contiene invertasas agave (Wang y col., 1998) por lo que la hidrólisis de la sacarosa es directamente atribuible a los microorganismos.

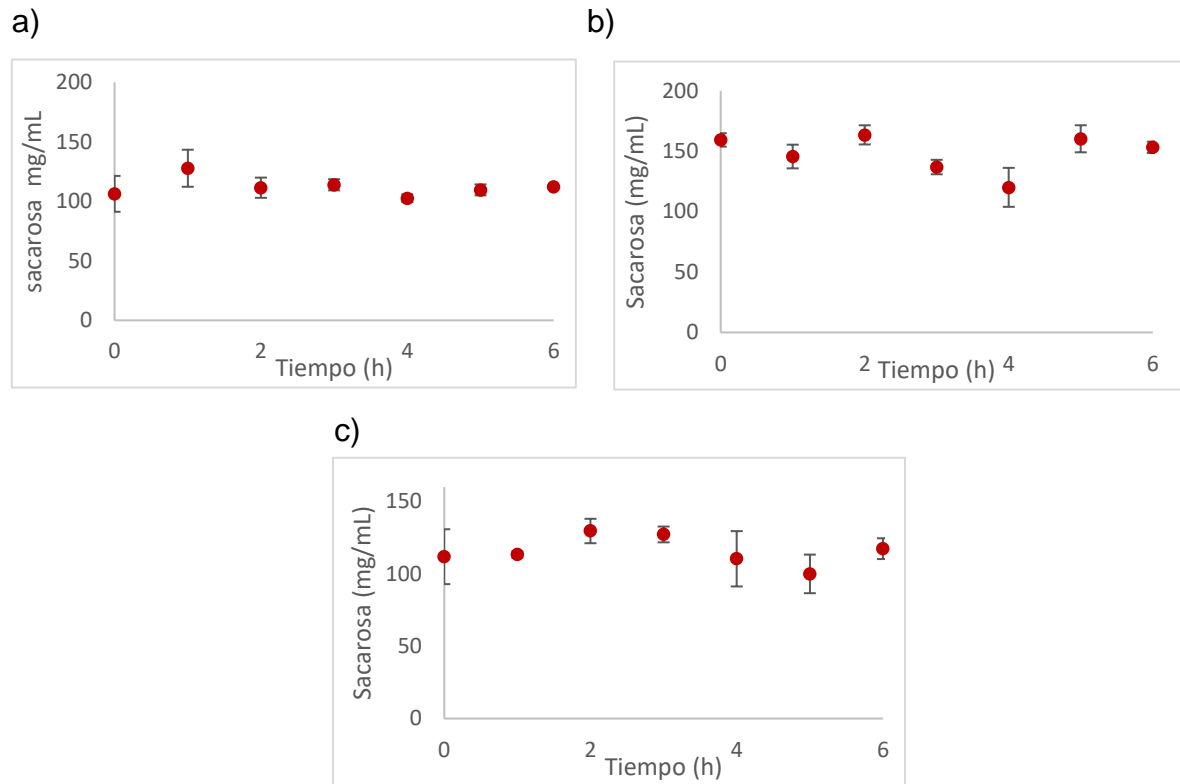


Figura 61. Evolución de la concentración de sacarosa en aguamiel fresco microfiltrado incubado a temperatura ambiente: a) P1 (*A. mapisaga*), 7 semanas b) P1 (*A. mapisaga*), 11 semanas y c) P2 (*A. salmiana*), 5 semanas.

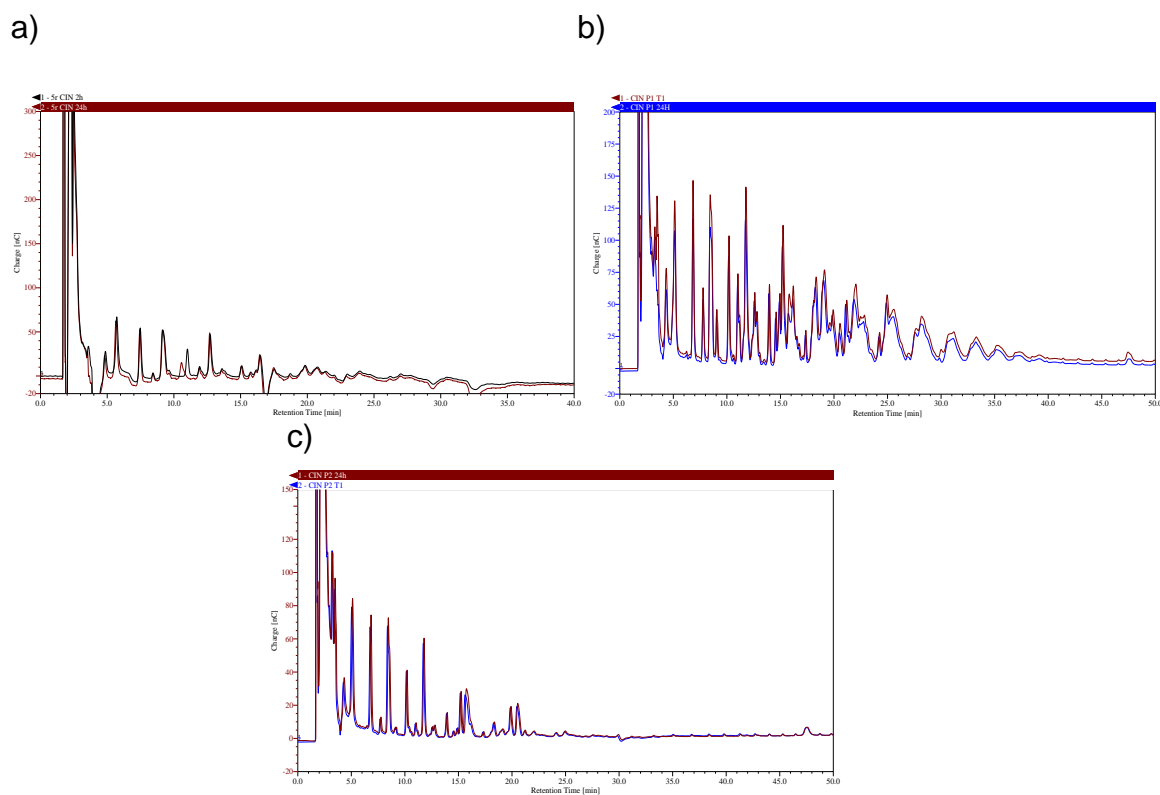


Figura 62. Perfil comparativo de fructanos en el aguamiel fresco microfiltrado a las 24 h de ser incubado a temperatura ambiente: a) P1 (*A. mapisaga*), 7 semanas b) P1 (*A. mapisaga*), 11 semanas y c) P2 *A. salmiana*, 5 semanas.

5.4.1.2 Metzal

Para medir la actividad enzimática en el extracto de metzal, se incubó el extracto a temperatura ambiente, tomándose muestras como ya se indicó. En cada muestra se cuantificaron F, G y S y se determinó su perfil de fructanos. Los resultados mostraron actividad Inv, ya que la sacarosa presente en el metzal fue hidrolizada conforme transcurrió el tiempo. Se observó también actividad FEH ya que hubo un mayor incremento en la concentración de fructosa que en glucosa (Figura 63).

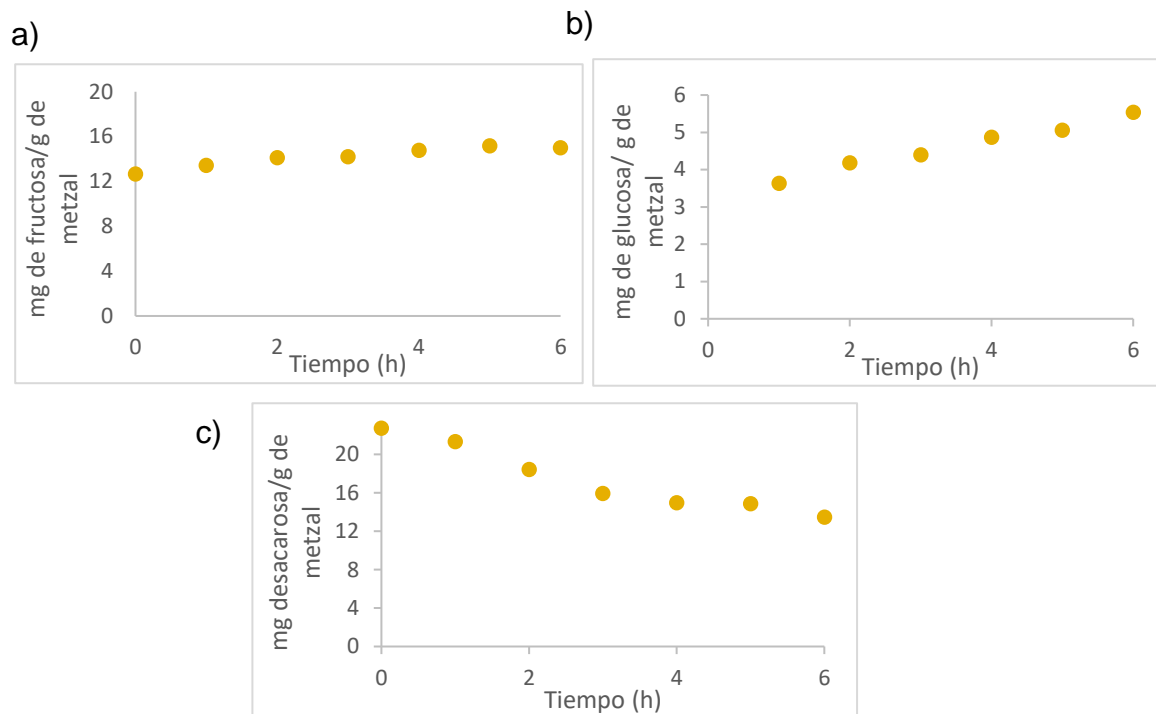


Figura 63. Cinética de reacción de hidrólisis de sacarosa en el extracto de metzal de P1 (*A. mapisaga*), en la semana 15 de su vida productiva. La gráfica se reporta en peso húmedo.

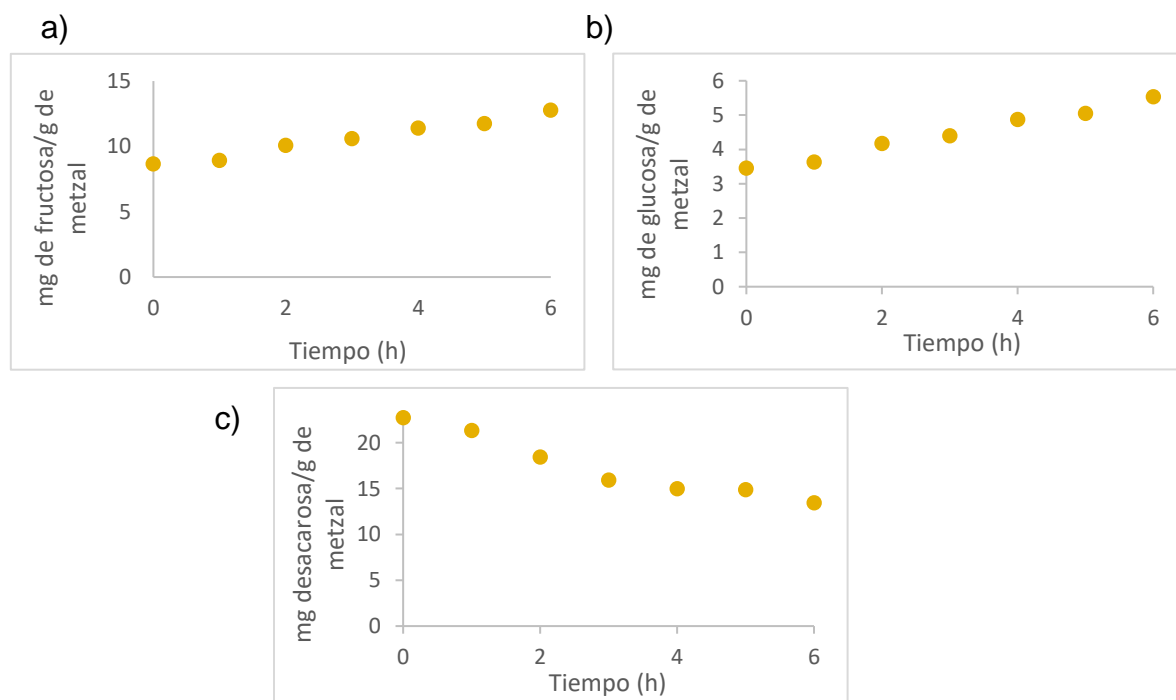


Figura 64. Cinética de la reacción de hidrólisis de la sacarosa en el extracto de metzal de la planta P3 (*A. salmiana*) en la semana 17 de su vida productiva. La gráfica se reporta en peso húmedo.

5.4.2 Oligosacáridos en el aguamiel acumulado

Con el fin de identificar los oligosacáridos presentes en las muestras de aguamiel acumulado (sintetizados), se procedió a realizar dos tipos de análisis empleando enzimas hidrolíticas. Se efectuó un primer tratamiento con la enzima dextranasa, ya que en ensayos preliminares se había detectado en placas de TLC la presencia de glucósidos y existe una alta posibilidad de que entre los microorganismos presentes en el cajete se encuentren bacterias lácticas capaces de producir dextranas, características del pulque (Escalante y col., 2008). Ejemplo de ello es *Leuconostoc mesenteroides* conocida por su capacidad de síntesis de dextrana (Farwa- Sarwat y col., 2008), especie que ha sido reportada como bacteria endófito del agave (Martínez-Rodríguez., 2014). El segundo tratamiento se efectuó con la enzima Fructozyme, con el fin de hidrolizar los fructanos y eventualmente la sacarosa. Mediante estos dos tratamientos se podrían identificar cuáles de las señales corresponden a polímeros de fructosa y cuales a polímeros de glucosa.

Las muestras de aguamiel tratados con enzima dextranasa no mostraron ningún cambio en el perfil de oligosacáridos como se ilustra para tres casos en las Figuras 65-67, en las que queda claro que no hubo ningún cambio en el perfil de productos después de 4h de reacción. Esto permite inferir que no existen enlaces del tipo isomaltosa (alfa 1-6) entre glucosas en el aguamiel. Los perfiles de aguamiel restantes tratados con dextranasa se presentan en la sección de Anexos.

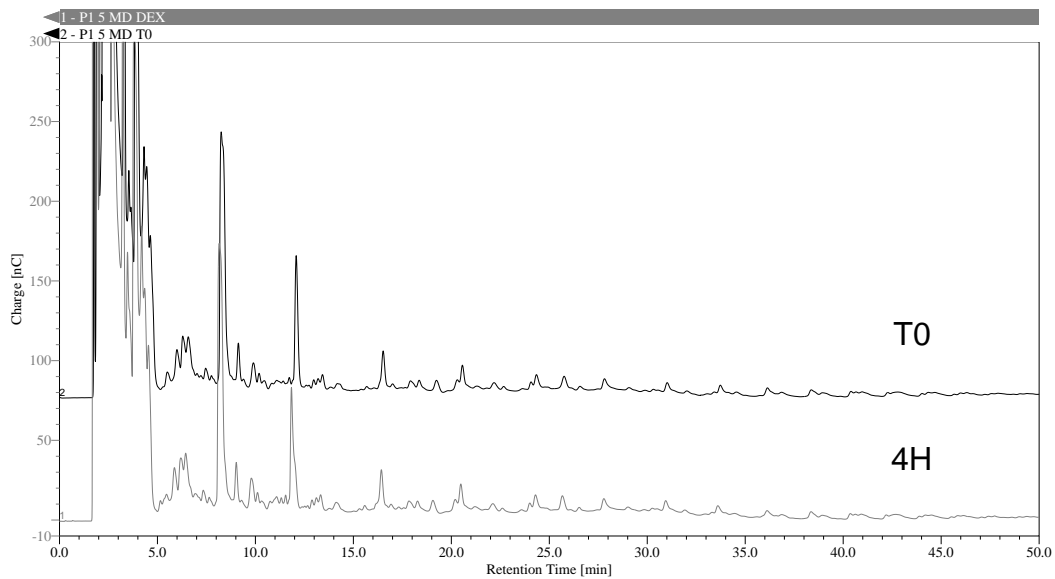


Figura 65. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P1 (*A. mapisaga*), de la semana 5 de su vida productiva, antes y después de ser tratado con dextranasa, detectado por HPAEC-PAD.

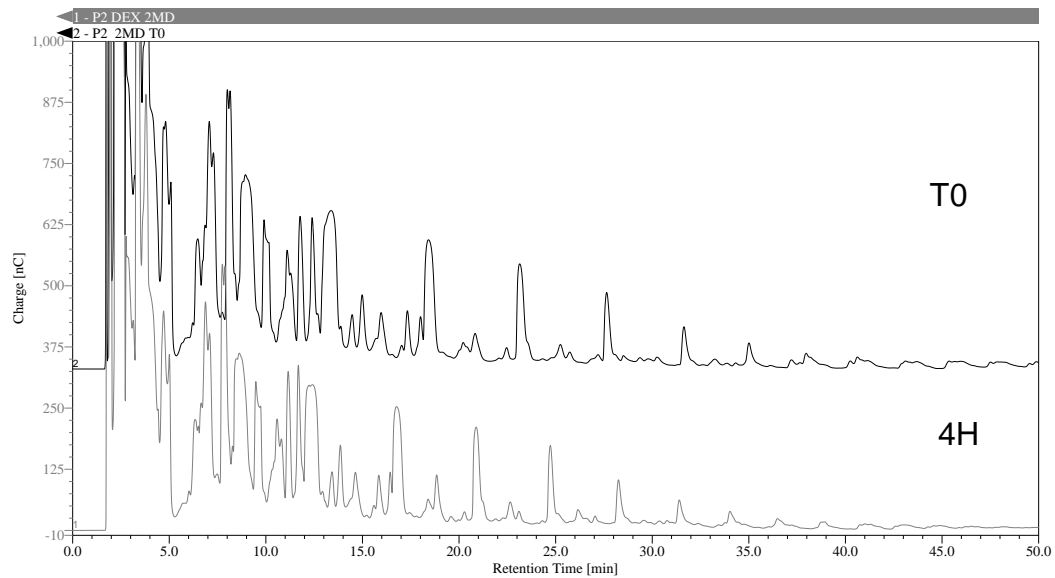


Figura 66. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P2 (*A. mapisaga*), de la semana 2 de su vida productiva, antes y después de tratar con dextranasa, detectado por HPAEC-PAD.

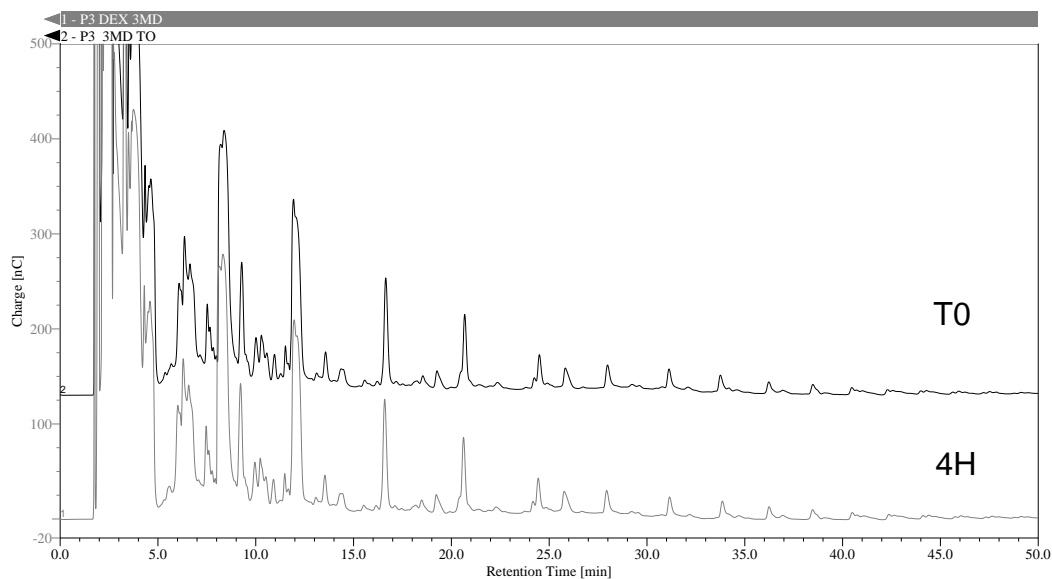


Figura 67. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P3 (*A. salmiana*), de la semana 3 de su vida productiva, antes y después de tratar con dextranasa, detectado por HPAEC-PAD.

Por otro lado, se observó un cambio drástico en el perfil de oligosacáridos en las muestras de aguamiel acumulado, obtenidas de los 3 agaves en diferentes semanas de su vida productiva, al ser tratadas con Fructozyme (Figura 68). En la sección de anexos se muestran los resultados de las plantas P1 y P3. Se pudo concluir que dichas muestras de aguamiel contenían principalmente oligofructanos.

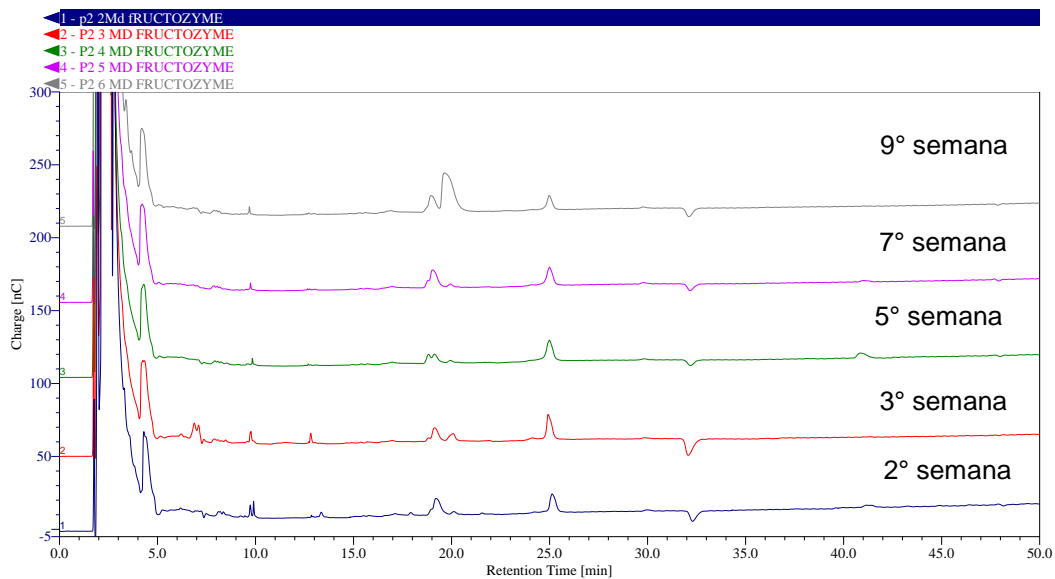


Figura 68. Perfil de oligosacáridos de diferentes muestras de aguamiel acumulado, de diferentes semanas de producción, provenientes de la P2 (*A. mapisaga*), hidrolizados con Fructozyme.

El aguamiel resultante de la hidrólisis se comparó con un estándar de maltodextrinas, los picos en los tiempos de retención de 20 y 25 coincidieron (Figura 69).

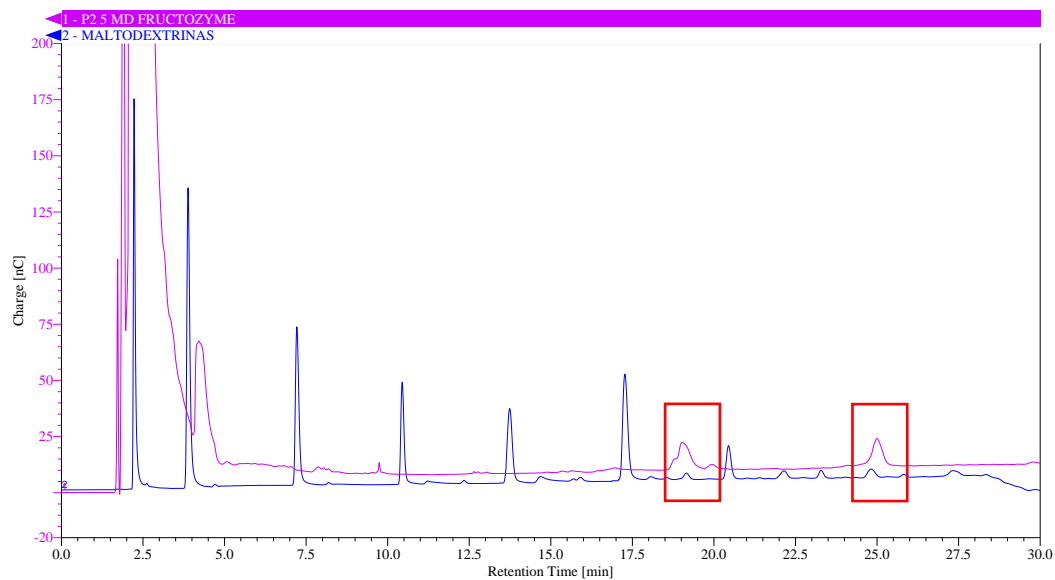


Figura 69. Comparación del perfil de oligosacáridos de una muestra de aguamiel acumulado proveniente de la P2 (*A. mapisaga*) tratada con Fructozyme y un estándar de maltodextrinas, detectado por HPAEC-PAD. ■ Aguamiel acumulado con Fructozyme ■ Estándar de maltodextrinas.

Los resultados obtenidos mostraron que los oligosacáridos sintetizados por los microorganismos presentes en el aguamiel acumulado son de tipo F-F- y G-F, y que los oligosacáridos de tipo G-G que hay en el aguamiel son maltodextrinas. Para determinar cuáles de estos se encontraban presentes desde el aguamiel fresco, se hidrolizaron muestras de aguamiel fresco con Fructozyme (Figura 70). En la hidrólisis se observó que se conservaron estos picos e incluso había algunos más que no fueron hidrolizados por Fructozyme por lo que se concluyó que las maltodextrinas están presentes desde el aguamiel fresco, es decir, que provienen directamente de la planta.

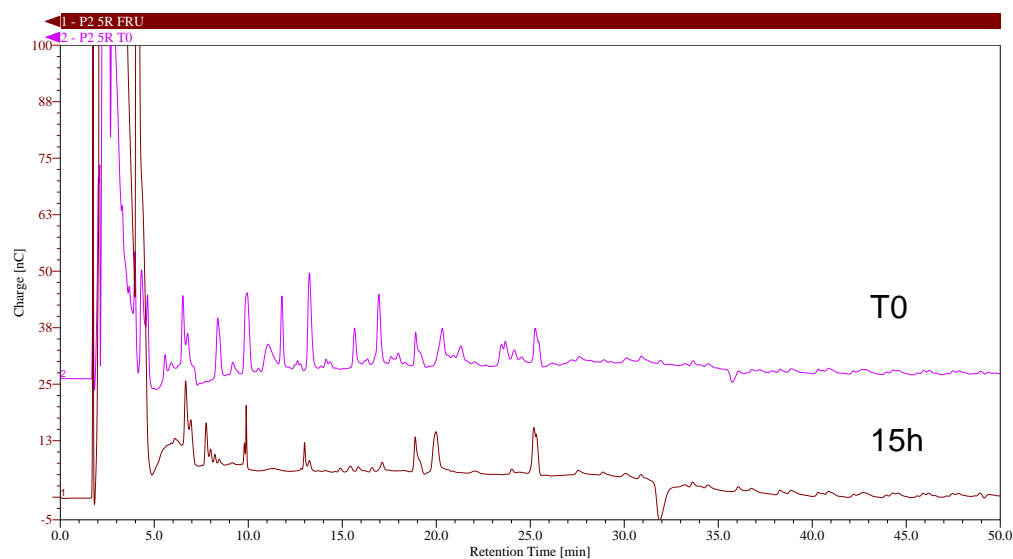


Figura 70. Perfil de oligosacáridos en el aguamiel acumulado de la P2 (*A. mapisaga*) de la semana 7, al T0 y después de 15 horas de tratar con Fructozyme, detectado por HPAEC-PAD.

5.5 Determinación global de la cantidad de azúcares obtenidos mediante el proceso de producción de aguamiel

5.5.1 Volumen de aguamiel a través del tiempo de vida productivo del agave

Se midió el volumen de aguamiel acumulado en los agaves en cada recolección a lo largo del tiempo de producción. En la Figura 71 se muestra el volumen de aguamiel acumulado en 24 h, recordar que los productores colectan el aguamiel dos veces al día, en las tres plantas P1, P2 y P3. El volumen de aguamiel producido por la planta 1 se comenzó a monitorear a partir de la semana 13, por tal motivo no se muestran las semanas anteriores. Se observó que los agaves P2 y P3 tienen un comportamiento semejante, mostrando un tiempo de máxima producción que sucede a las 9 semanas de su vida productiva. Este resultado concuerda con otros reportes donde se indica que la máxima cantidad de aguamiel se produce a los 2 meses (Ortiz y col., 2008).

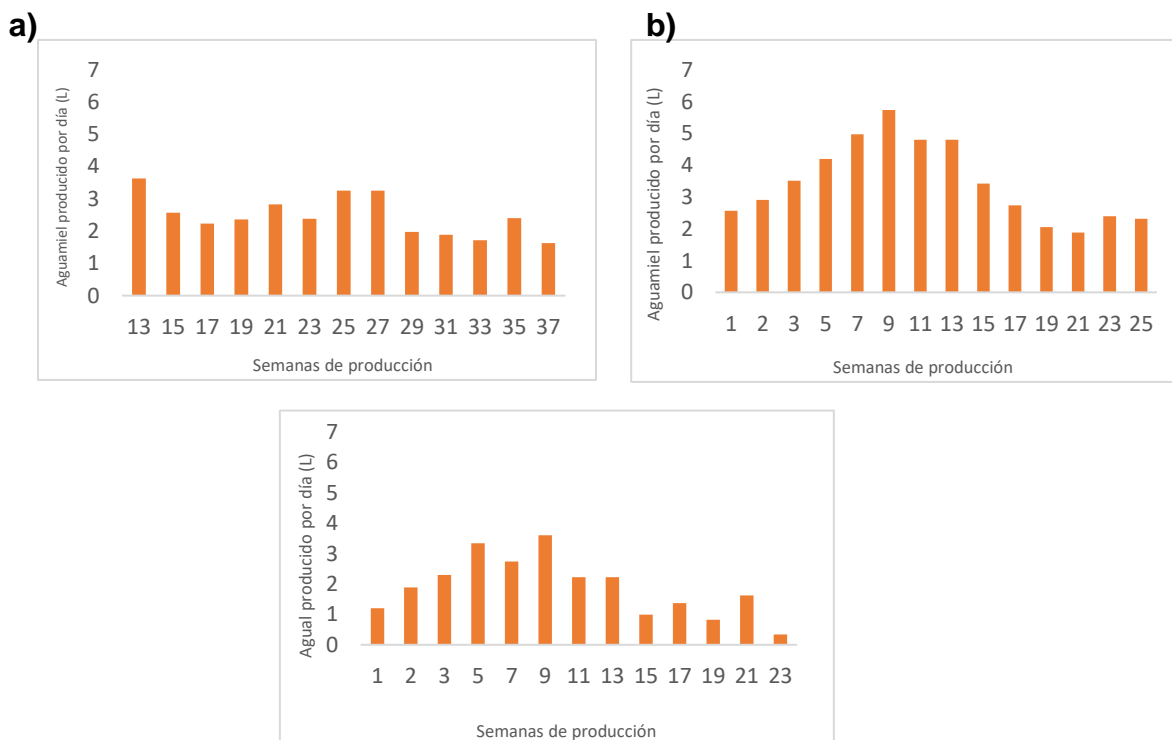


Figura 71. Volumen de aguamiel acumulado a las 24 h a lo largo de la vida productiva del agave: a) P1 (*A. mapisaga*) b) P2 (*A. mapisaga*) y c) P3 (*A. salmiana*).

Cada agave tuvo un tiempo de vida productiva diferente, en la Tabla 17 se puede apreciar que la planta 1 fue la de mayor vida productiva. En el caso de la planta P3, el aguamiel total producido fue un poco menor a la mitad de lo producido por las plantas P1 y P2, esta diferencia la asociamos en principio al tamaño ya que la planta 3 era más pequeña, lo cual se puede apreciar con el volumen total del cajete (Tabla 17). Es importante recordar que dicha planta presentaba diferencias en cuanto a especie, ya que, si bien no se pudo clasificar con exactitud, tentativamente tenía mayor parecido con *A. salmiana* que con *A. mapisaga* a diferencia de las otras 2 que fueron clasificadas sin duda alguna como *A. mapisaga*, una razón más a la cual se le podría atribuir esta diferencia de volumen de aguamiel producido.

Tabla 17. Volumen de aguamiel durante la vida productiva de los agaves. P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*) y P3 (*A. salmiana*).

	<i>Planta 1</i>	<i>Planta 2</i>	<i>Planta 3</i>
Volumen promedio de aguamiel por día (L)	2.3±0.7	3.4±1.2	1.9±1.0
Volumen total de aguamiel por planta (L)	677	662	335
Volumen aproximado del cajete (L)	38.8	29.7	22.2
Temporada de producción	9 de agosto – 14 de mayo	10 noviembre – 14 mayo	21 diciembre- 25 de mayo
Tiempo de producción (días)	278	185	155

5.5.2 Determinación global de la cantidad de azúcares

Para determinar la cantidad total de sacarosa durante la vida productiva del agave, se consideró que la concentración es constante durante las 24 h. Se hace esta suposición basándonos en los resultados discutidos en el capítulo 5.3 en donde se mostró que la concentración de sacarosa fue constante de 7:00 -14:00 h. Es de esperar que el valor esté sobrestimado debido a que las plantas con metabolismo CAM se caracterizan por mayor captación de CO₂ durante la noche y gluconeogénesis durante el día (Andrade y col., 2007), por lo que el lote que abarca la noche es probable que contenga una concentración de sacarosa menor.

Para cuantificar la cantidad total de fructanos durante la vida productiva del agave, se consideró que la concentración medida en los primeros 15 mL de aguamiel fresco era la misma hasta llegar a 200 mL. Se hizo esta suposición ya que como se demostró en el capítulo 5.3, Tabla 13, ese fue el volumen en el que aún había presencia de fructanos. La concentración de fructanos iniciaba con un valor máximo y se iba diluyendo, por lo que al igual que en la sacarosa se trató de un valor aproximado.

Los resultados se muestran en la Tabla 18, la cantidad de sacarosa producida por el agave, cuya fuente principal se asoció a la fotosíntesis, fue alrededor del 10% p/v del volumen de aguamiel producido, mientras que la concentración de fructanos estuvo entre el 0.3-0.6 % p/v. En cuestión de los azúcares del metzal el patrón fue distinto. El valor de azúcares simples que se obtuvo en las plantas raspadas fue alto en comparación con el control, reforzando la hipótesis de que la planta responde al estrés, hidrolizando los fructanos, como se discutió anteriormente.

La cantidad de los azúcares totales (F, G y S + fructanos) con respecto a la masa de metzal (peso húmedo) se encontró entre el 4-6% p/p, caso distinto a la concentración de azúcares en el tallo de la piña en el cuál en promedio fue del 17 % (Tabla 18). Esta proporción se relaciona con la hidrólisis de fructanos y la pérdida de azucares a través del aguamiel.

Cabe resaltar que la proporción de fructanos en el metzal, llegó a ser de hasta el 50% con relación a los recuperados en el aguamiel. Dependiendo de la zona productora el metzal es utilizado en alimentación animal o se tira junto a la planta, lo que representa una gran pérdida en términos de fibra. Considerando la proporción que se pierde, una perspectiva del trabajo es desarrollar opciones que permitan aprovechar esta riqueza de azúcares complejos.

Tabla 18. Cantidad de azúcares provenientes del aguamiel y metzal durante la vida productiva de los agaves: P1 (*A. mapisaga*), P2 (*A. mapisaga*), P3 (*A. salmiana*) y del tallo del agave control: P4 (*A. salmiana*).

		<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4 (tallo)</i>
Aguamiel	Volumen (L)	676.6	662.3	334.9	---
	Sacarosa (Kg)	70.6	61.5	36.8	---
	Fructanos (Kg)	3.0	1.7	2.1	---
Metzal	Masa (Kg)	37.2	27.4	23.5	8.2
	FGS (Kg)	0.9	0.5	0.6	0.05
	Fructanos (Kg)	1.3	0.5	0.9	1.3
	% p/p	6.0	3.6	6.4	17.4

6.0 CONCLUSIONES

- La estructura de los fructanos del agave se modifica durante la vida productiva del agave, lo que repercute en la concentración y perfil de los fructooligosacáridos del aguamiel.
- La cantidad de fructanos presentes en cada lote de aguamiel se libera de la planta únicamente con los primeros mililitros después del raspado y se diluye posteriormente hasta la recolección, por lo que mientras mayor sea el volumen de exudación de la planta habrá mayor dilución de fructanos.
- El aguamiel sufre diferentes tipos de cambios durante su acumulación en el cajete, que en términos de fructanos pueden clasificarse en 3 grupos: Aguamiel tipo 1, se caracteriza por síntesis de nuevos oligosacáridos y presenta un perfil distinto al de los fructanos de agave; Tipo 2, en él se combinan los fructanos de agave con los oligosacáridos sintetizados y/o hidrolizados y Tipo 3 en el que los fructanos de agave solo se diluyen. Estos cambios parecen estar correlacionados con la etapa productiva (menor tiempo de producción, mayores cambios) y/o con el manejo de la planta.
- Debido a que no se observaron cambios en el aguamiel fresco microfiltrado e incubado a temperatura ambiente, los cambios que sufre el aguamiel al acumularse en el cajete pueden ser atribuidos principalmente a los microorganismos.
- Los oligosacáridos producidos de la actividad microbiana durante la acumulación del aguamiel son de tipo F-F y G-F.
- Como consecuencia del castrado y raspado continuo se induce una respuesta en la planta que produce cambios en la concentración de los fructanos y su grado de polimerización en el tallo.
- El extracto metzal microfiltrado, presenta actividad invertasa y fructano hidrolasa. Estas actividades ocasionan la hidrólisis de sacarosa y cambios en la composición de fructanos del metzal.

- El proceso tradicional de producción de aguamiel provee la ventaja de extraer gran parte de los azúcares almacenados en todos los órganos del agave y los que se generan durante su vida productiva, obteniendo hasta 70 Kg de sacarosa para una planta para la especie *A. mapisaga* y 37 Kg para *A. salmiana*. Sin embargo, tiene como desventaja que hasta un 50% de los fructanos de agave se desperdician en el metzal.

7.0 PERSPECTIVAS

Realizar un estudio de la expresión y actividad de las enzimas del agave involucradas en el cambio de los fructanos durante el proceso tradicional de producción de aguamiel.

Analizar el efecto antimicrobiano de compuestos asociados a la planta (sapogeninas y polifenoles) y su impacto en la conservación del aguamiel en el cajete.

Evaluar las propiedades que le conferiría al pulque realizar un enriquecimiento con los fructanos provenientes del metzal.

Explorar la posibilidad de la producción de una bebida similar al pulque partiendo de la piña madura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alfaro-Rojas, G., Legaria, J.P., Rodríguez, J. E. (2007). Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave sp*) del Nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(1): 1-12.
- Andrade, J.L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M., Vargas-Soto, G. & Cervera, J, (2007). El Metabolismo ácido de las Crasuláceas:Diversidad, fisiología ambiental, y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 81: 37-50.
- Aspinall, G. O., & Gupta, P. Das. (1957). The structure of the fructosan from a *Agave vera cruz Mill*. *Journal of the Chemical Society*. 718: 718–722.
- Ávila-Fernández, Á., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., & López-Munguía, A. (2007). Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Science*. 173(4): 478–486.
- Bolouri Moghaddam, M.R. & Vanden Ende, W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *Journal of Experimental Botany*. 64: 1349-1449.
- Campbell, N., Reece, J. (2005). *Biología*. Séptima edición. EDITORIAL MÉDICA Panamericana. Madrid, España.
- Carpita, N., Kanabus, J. & Housley, T. (1989). Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *Journal Plant Physiology*. 134: 162-168.
- Chen, P.Y., Kuo, Y.C., Chen, C.H., Kuo, Y.H., Lee, C.K. (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules*. 14: 1789-1795.

- CONAGUA (2019). Observaciones Climatológicas de la estación Huitzilac. Subgerencia Regional Técnica Departamento de Redes de Medición Y Sistemas. Cuernavaca, Morelos.
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. & Flores, G.(2006). *Invitación a la biología*. EDITORIAL MÉ DICA Panamericana. Buenos Aries, Argentina.
- De Preter, V., Vanhoutte, T., Huys, G., Swings, J., De Vuyst, L. & Rutgeerts, P., (2007). Effects of *Lactobacillus casei* Sgiirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthyhumans. *American Journal of Physiology -Gastrointest and Liver Physiology*. 292(1): 358- 368
- Delgado, G. T. C., Tamashiro,W., & Pastore, G. M. (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*. 43: 1231–1236.
- Devlin, R. (1982). *Fisiología vegetal*. Editorial Omega: Barcelona, España.
- De Vrese M. & Schrezenmeir, E.(2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Food Biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg.111: 1-66.
- Dood, A., Borland, A., Haslam, R., Griffiths, H. & Maxwell, K.2002.Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *Journal of Experimental Botany*. 53:569-580.
- Esau, K. (1976). *Anatomía vegetal*. Tercera Edición. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Cordoba, A., López-Munguía, A. Gosset, G & Bolivar, F.(2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. Journal Food Microbiology*. 124(2): 126-134.

- Escalante, A., Giles-Gomez, M., Esquivel, G., Matus, V., Moreno, R., López-Munguía, A. and Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque fermentación in Handbook of plant-based fermented food and beverage technology, ed Hui Y. H., editor: Boca Raton, FL: CRC Press;), 691-706.
- Escalante, A., López, D., Velázquez, J., Giles Gómez, M., Bolívar, F & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7(1026):1-18
- Escobar, R. E. (2009). Estudio de la biología reproductiva y análisis molecular de la reproducción sexual y asexual de *Agave tequilana Weber* var. azul (Tesis de doctorado). CINVESTAV Irapuato, México.
- Farwa-Sarwat, Shah Ali Ul Qade & Nuzhat Ahmed. (2008). Production and Characterization of a unique dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*. 4(6): 379-386.
- Franco-Robles, E. & López, M. (2016). Agavins increase neurotrophic factors and decrease oxidative stress in the brain of high-fat diet-induced obese mice. *Molecules*. 21(8): 1-15.
- Franco-Robles, E., Ramírez-Emiliano, J. & López, M. (2019). Agave fructans and oligofructose decrease oxidative stress in brain regions involved in learning and memory of overweight mice. *Natural Product Research*. 1-4.
- García-Curbelo, Y., López, M. & Bocourt, R. (2009). Fructanos en *Agave fourcroydes*, potencialidades para su utilización en la alimentación animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(2): 175-177.

- García-Mendoza, A. (1992). Con sabor a maguey. Guía de la Colección Nacional de Agavaceas y Nolinaceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología. UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México. DF, México, 144.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87, julio a septiembre. 14-23.
- Granado-Sánchez, D. (1993). Cultura y utilización del maguey. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Hincha, D. K., Zuther, E., Hellwege, E. M., & Heyer, A. G. (2002). Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology*. 12(2): 103–110.
- Hoopking, W. (1999). *Introduction to plant physiology*. Segunda edición. John Wiley & Sons Inc, USA.
- Huazano, A., Shin, H. & López, M. (2017). Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients*. 9(9), 1-12.
- Lincoln, T. & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Tercera edición. Universita Jaume. Castellón de la Plana, España.
- Livingstone, D.P., Chattertone, N. & Harrison, P. (1993). Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena spp.*) *New Phytologist*. 123: 725-734.
- Livingston, D.P. & Henson, C. (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology*. 116: 403-408.
- López, M. G., 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.

- Mancilla-Margalli, N., López, A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave and Dasylirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(20):7832–7839.
- Martínez-Rodríguez, J., De la Mora-Amutio, M., Pascencia-Correa, L., Audelo-Regalado, E., Guardado, F., Hernández-Sánchez, E., Peña-Ramírez, Y., Escalante, A., Beltrán-García & M. Ogura, T.(2014). Cultivable endophytic from leaf bases of *Agave tequilana* ad their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(4): 1333-1339.
- Mellado-Mojica, E. & López, M. (2012). Fructan Metabolism of *Agave tequilana* Weber Blue Variety along iys Developmental Cycle in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(47): 11704-11713.
- Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. and López, M. G. (2017). Fructan actives enzymes (FAZY) activities and byoshinteshis of fructooligosaccharides in the vacuoles of *Agave*. *Planta*. 245(2): 265-281
- Misra, A. K., Varma, S. K., & Kumar, R. (2018). Anti-inflammatory effect of an extract of *Agave americana* on experimental animals. *Pharmacognosy Research*. 10(1): 104–108.
- Moreno-Vilet, L., Espinosa-Andrews, H., Flores-Montaña, J. & Camacho-Ruiz, R. (2016). Caracterización de fructanos de agave comerciales por HP-SEC, HPLC y DSC. *Academia Mexicana de investigación y Docencia en Ingeniería Química*. 189-193.
- Nobel, P.S., García-Moya, E. & Quero, E. (1992). High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. *Plant, Cell and Environment*. 15: 329-335.
- Olvera, C., Ávila, A., Bustillo, G. & López-Munguia, A. (2015). Capitulo 15. Proccesing of fructans and oligosachharides from agave plants. En: Preedy Victor (Ed). *Proccesing and Impact on Active Componentes in Food*. Academic

Press. London, UK.

- Orthen, B. & Wehrmeyer, A. (2004). Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in bulbs and shoots of the geophyte *Galanthus nivalis*. *Physiologia Plantarum*. 120: 539-536.
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dormer, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(10): 3682–3687.
- Praznik, W., Löpert, R., Rubio, C., Zangger, K. & Huber, A. (2013). Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var azul. *Carbohydrate Research*. 381: 64-73.
- Ramírez-Rancaño, M. (2012). *El Rey del Pulque. Ignacio Torres Adalid y La industria Pulquera*. Instituto de Investigaciones Sociales y Quinta Chilla Ediciones. Nezahualcoyotl, Estado de México.
- Ritsema, T., Verhaar, A., Vijn, I. & Smeekens, S. (2004). Fructosyltransferase mutants specify a function for the b-fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized. *Plant Molecular Biology*. 54: 853-863.
- Romero-López, M.R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(2): 281-292.
- Sánchez, L. (2010). Estudio de la morfo estructura de dos variedades mexicanas de agave (*Agave angustifolia* Haw y *Agave tequilana* Weber) caracterizadas mediante microscopía óptica, tratamiento digital de imágenes y conceptos de dimensión fractal (Tesis de Licenciatura) Universidad de la Sabana, Colombia.
- Santos-Zea, L., Leal, A., Jacobo, D., Rodríguez, J., García S. & Gutiérrez, J. (2016).

- Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 45: 113-120.
- Scholz-Ahrens, K., Schaafsma, G., Van den Heuvel, E. & Schrezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 459S-464S.
- Shiomi, N.(1989). properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. *Journal Plant Physiology*. 134: 151-155.
- Valluru, R., Lammens, W., Claupein, W. & Van den Ende, W. (2008). Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends in plant science*. 13(8): 410-414.
- Van Laere, A., & Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: Chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*. 25(6): 803–813.
- Verhaest, M., Lammens, W., Le-Roy, K., De-Ranter, C., Van Laere, A., Rabinjs, A. (2006). Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New phytologist*. 147: 90-100
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Islamov, A., Kuklin, A., Hinch, D. K., & De Kruijff, B. (2003). The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal*. 85(5): 3058–3065.
- Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy Óner, E. & Van den Ende, W. (2017a). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant Cell & Environment*. 41:16-38
- Versluys, M., Tarkowsky, L. & Van den Ende, W. (2017). Fructans as DAMPs or MAMPs: evolutionary prospects, cross-tolerance, and multi-stress resistance potential. *Frontiers in Plant Science*. 2061(7):1-7.

- Vijn, I. & Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology*. 120: 351-359.
- Villalobos-Rodríguez, E. (2002). Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Universidad de Costa Rica.
- Wang, N., & Nobel, P. S. (1998). Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology*. 116(2): 709–714.
- Yokosuka, A., Jitsuno, M., Yui, S., Yamazaki, M. & Mimaki, Y. (2009). Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*. 72: 1399-1404.

ANEXOS

ANEXO A

Comparación del perfil de fructanos de aguamiel acumulado y recién exudado de las plantas 2 y 3

Planta 2

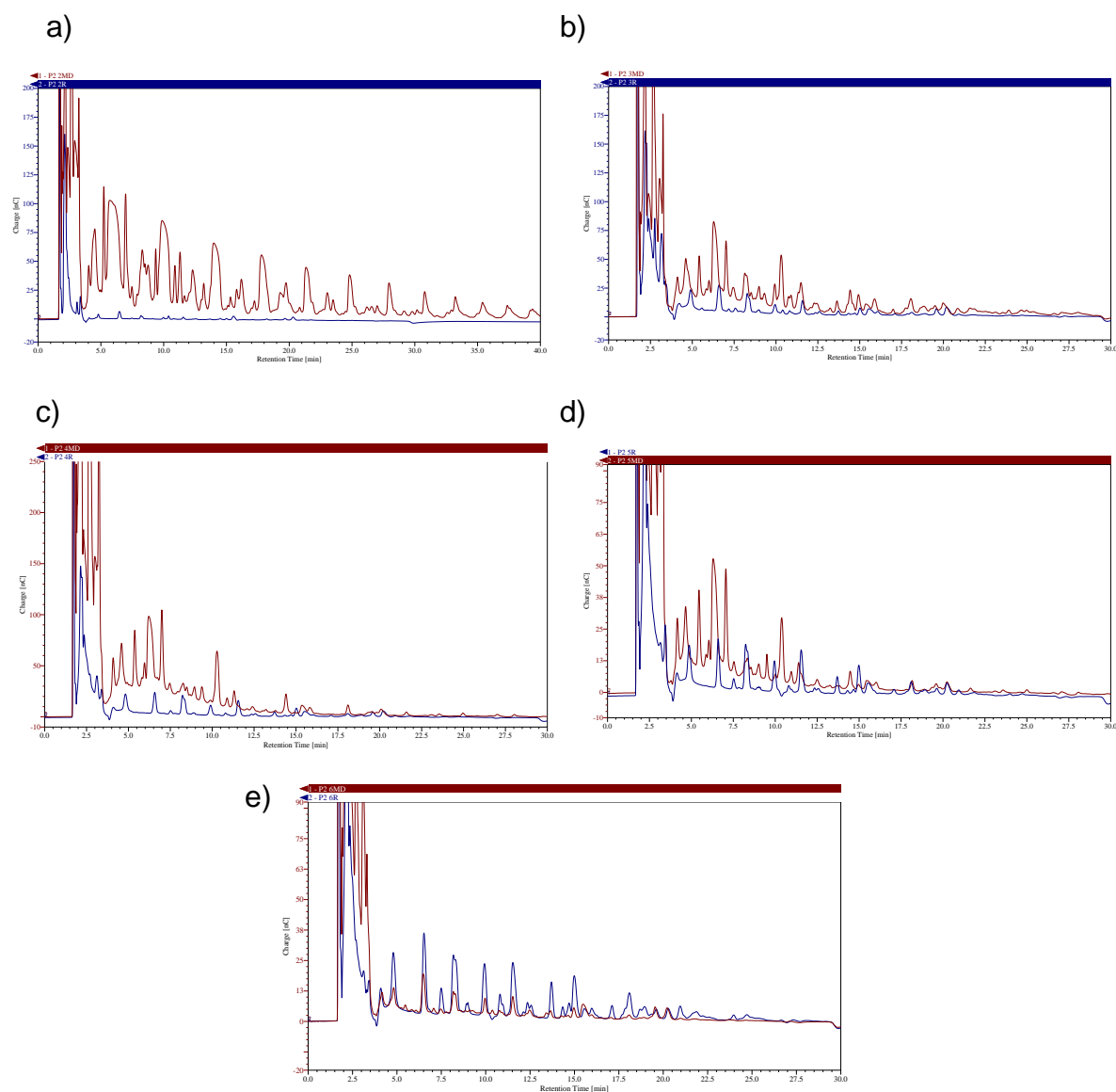


Figura A 1. HPAEC-PAD aguamiel fresco vs aguamiel acumulado P2 (*A. mapisaga*): a) 2° semana, tipo I; b) 3° semana, tipo I c) 5° semana, tipo I d) 7° semana, tipo I y e) 8° semana, tipo III. ■ Aguamiel acumulado ■ Aguamiel fresco.

Planta 3

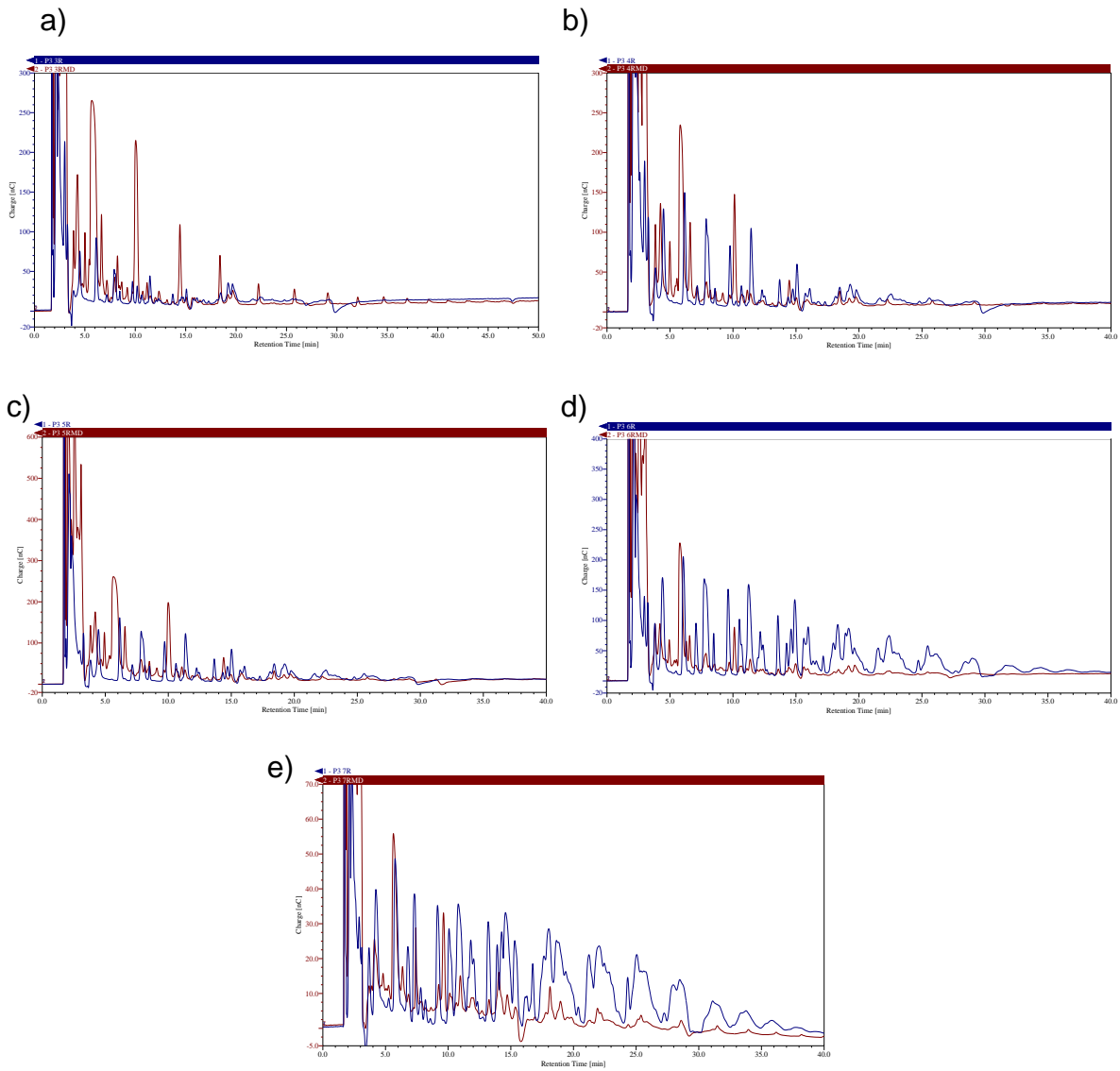
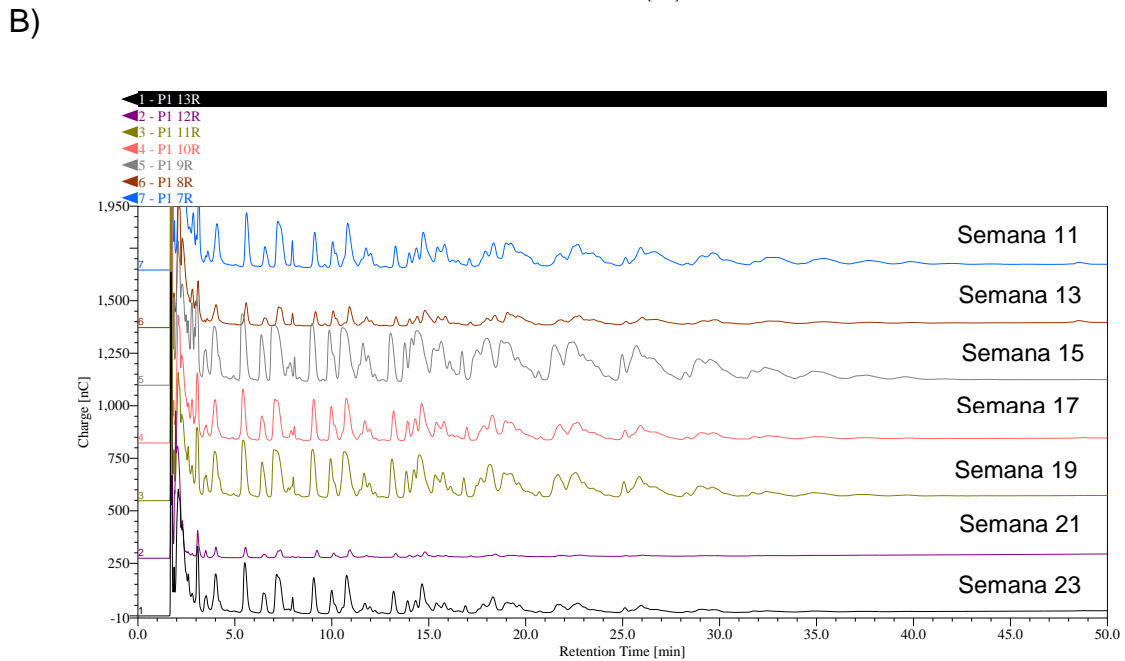
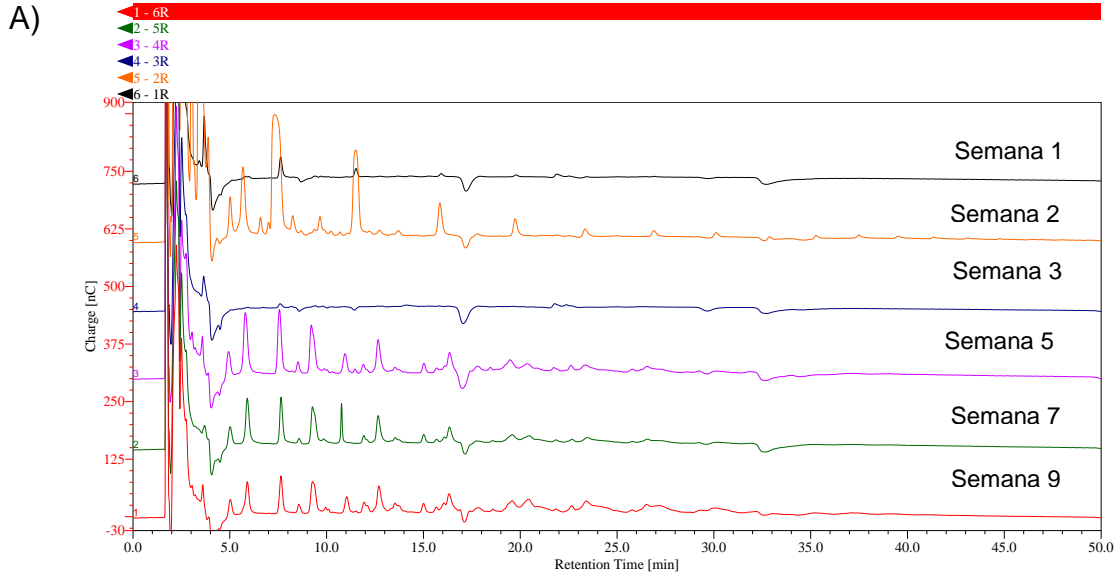


Figura A2. HPAEC-PAD Agumiel fresco vs agumiel acumulado P3 (*A. salmiana*): a) 3^o semana, tipo I b) 5^o semana, tipo II c) 7^o semana, tipo II d) 9^o semana, tipo II y e) 11^o semana, tipo II. Agumiel acumulado ■ Agumiel fresco. ■

ANEXO B

Perfil de azúcares del durante el tiempo de vida productiva de los agaves.

Aguamiel fresco



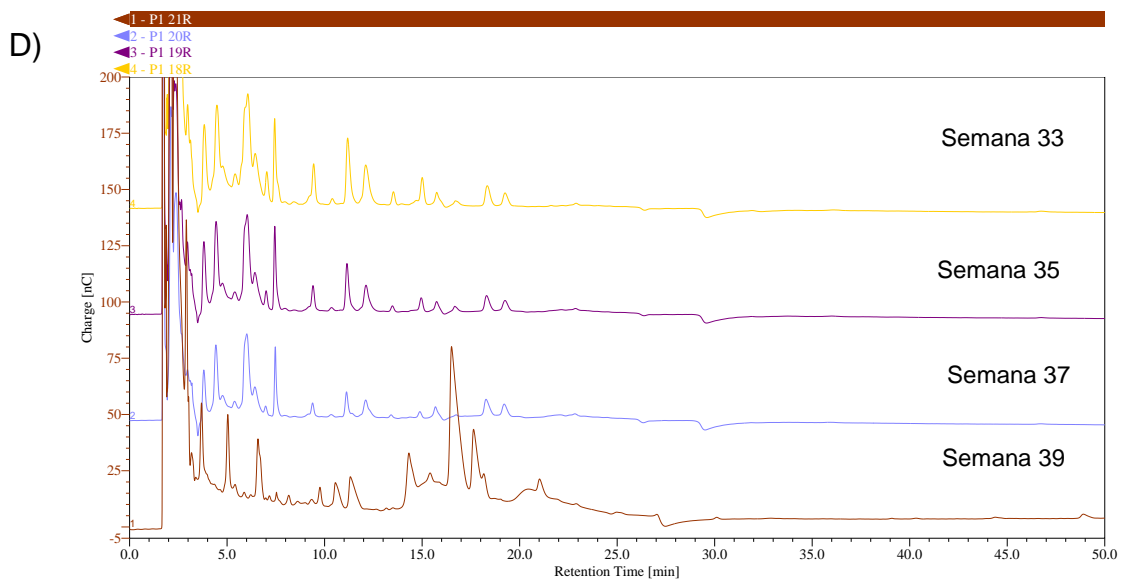
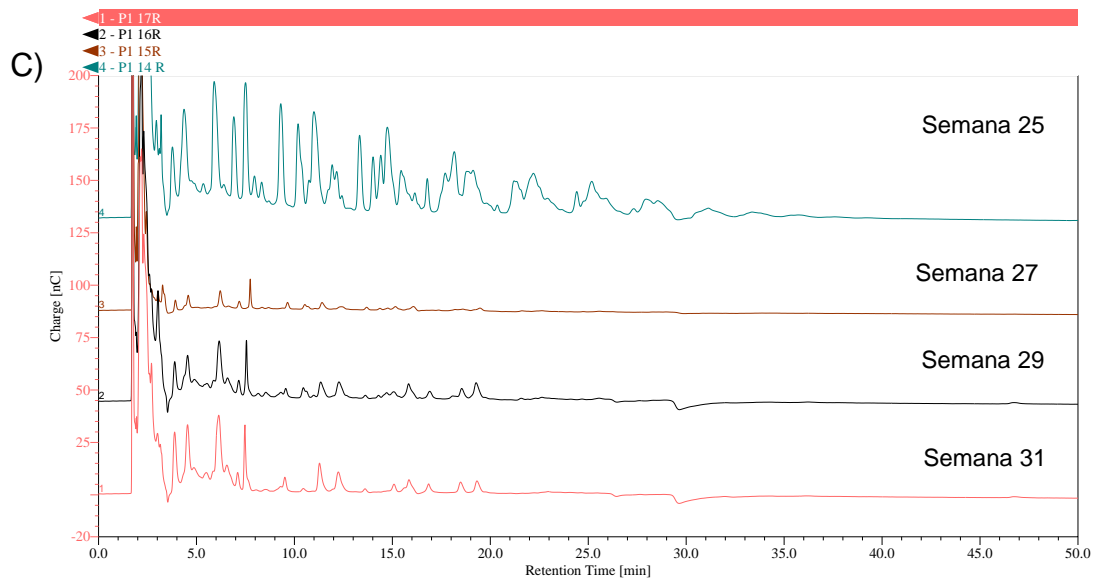
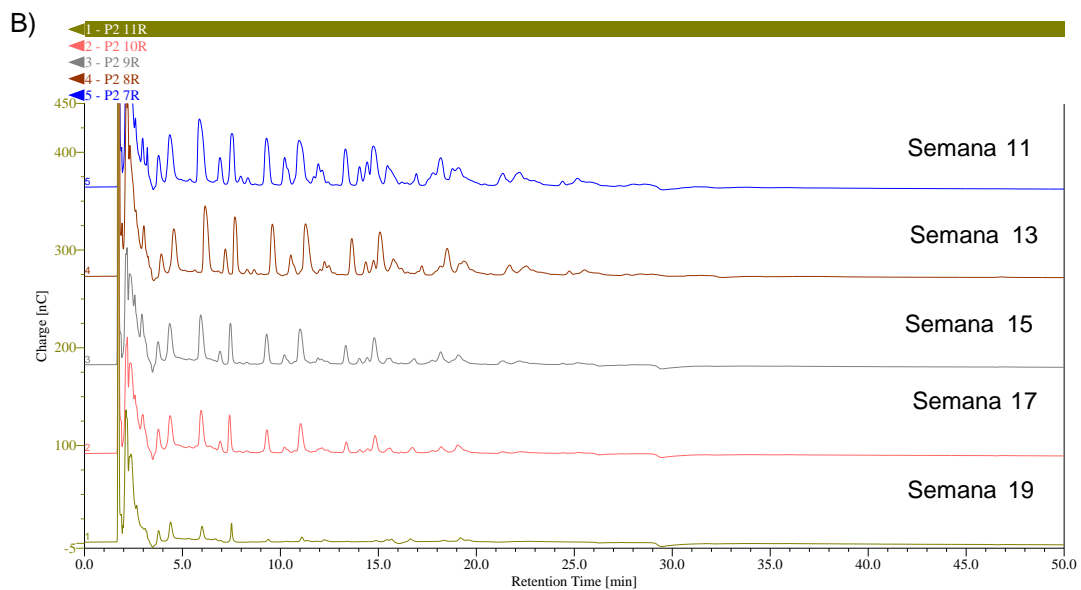
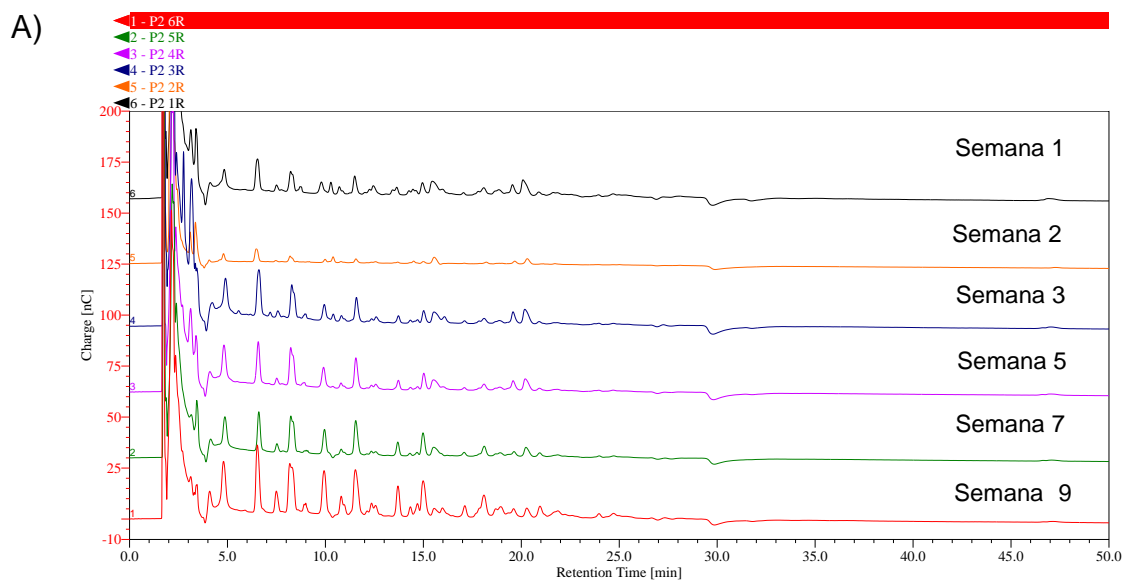


Figura B1. HPAEC-PAD Perfil de fructanos del aguamiel fresco proveniente de la P1 (*A. mapisaga*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida: a) semanas 1- 9. b) semanas 11- 23, c) semanas 25-31 y d) semanas 31 -39.



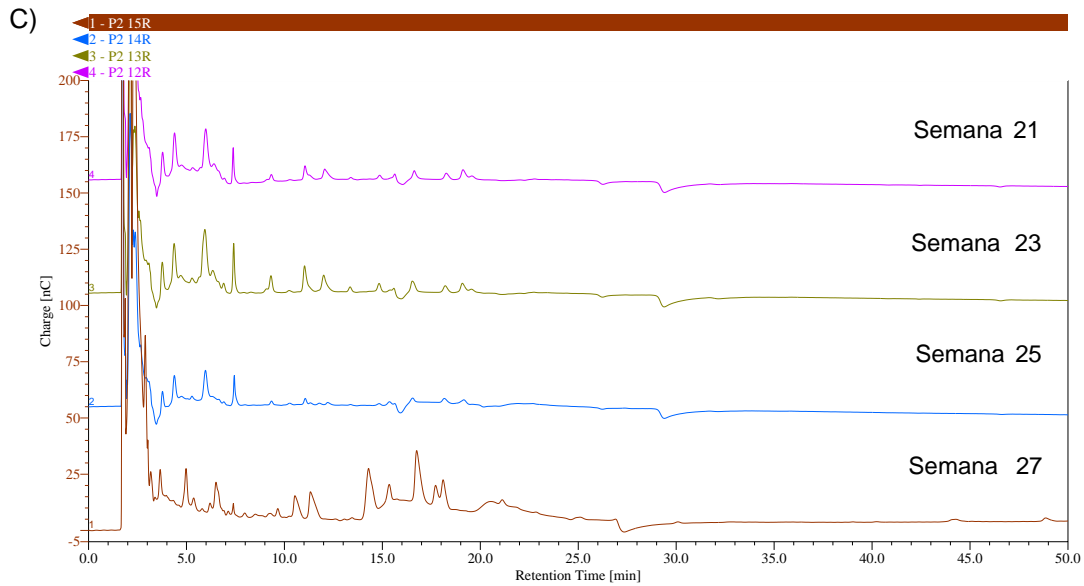
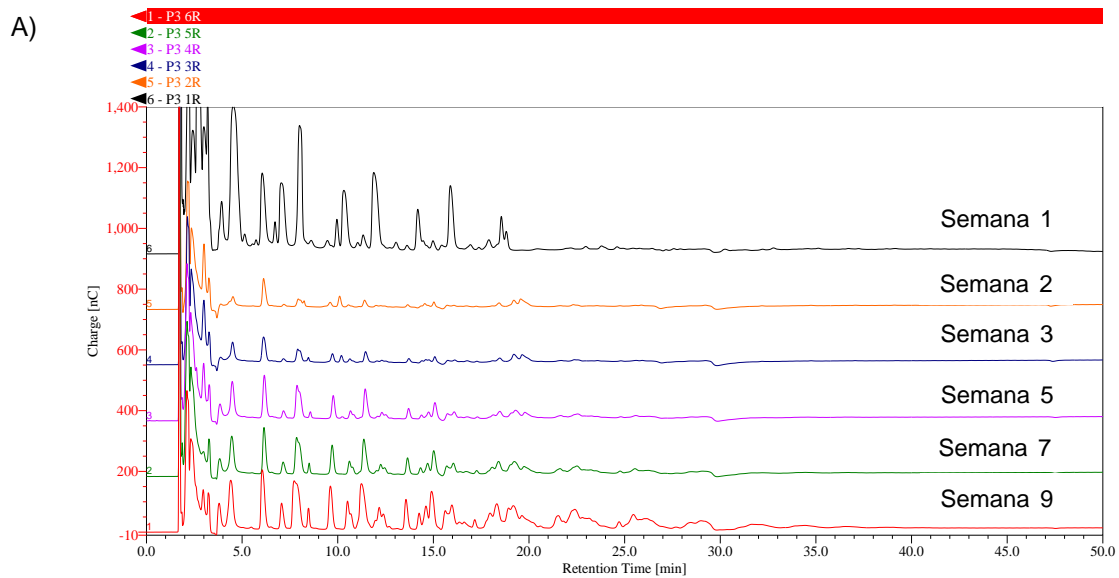


Figura B2. HPAEC-PAD Perfil de fructanos de aguamiel fresco proveniente de la P2 (*A. mapisaga*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida a) semanas 1-9 b) semanas 11-19 y c) semanas 21-27.



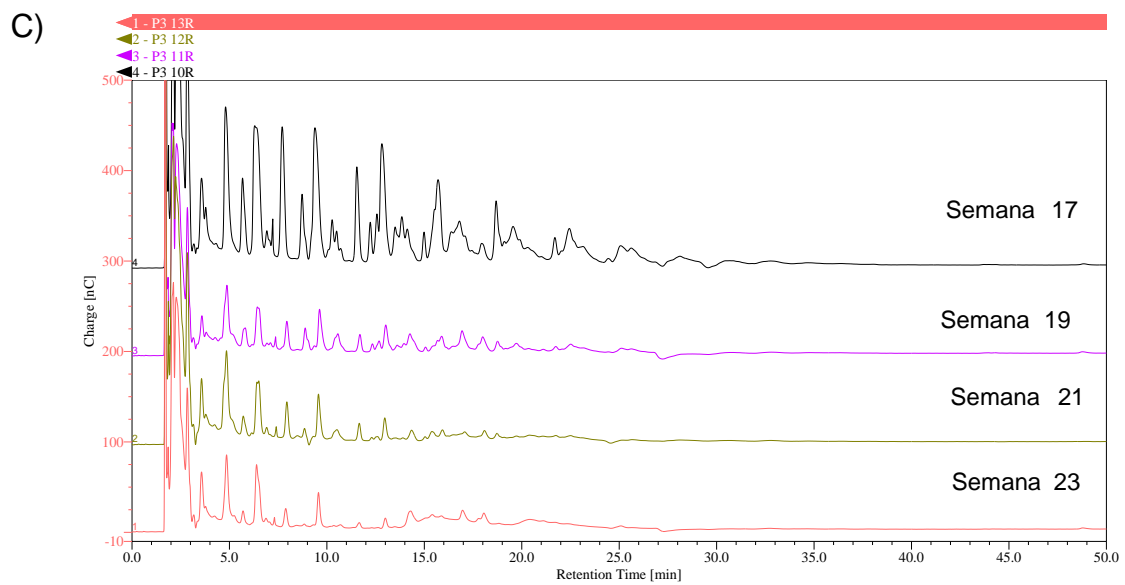
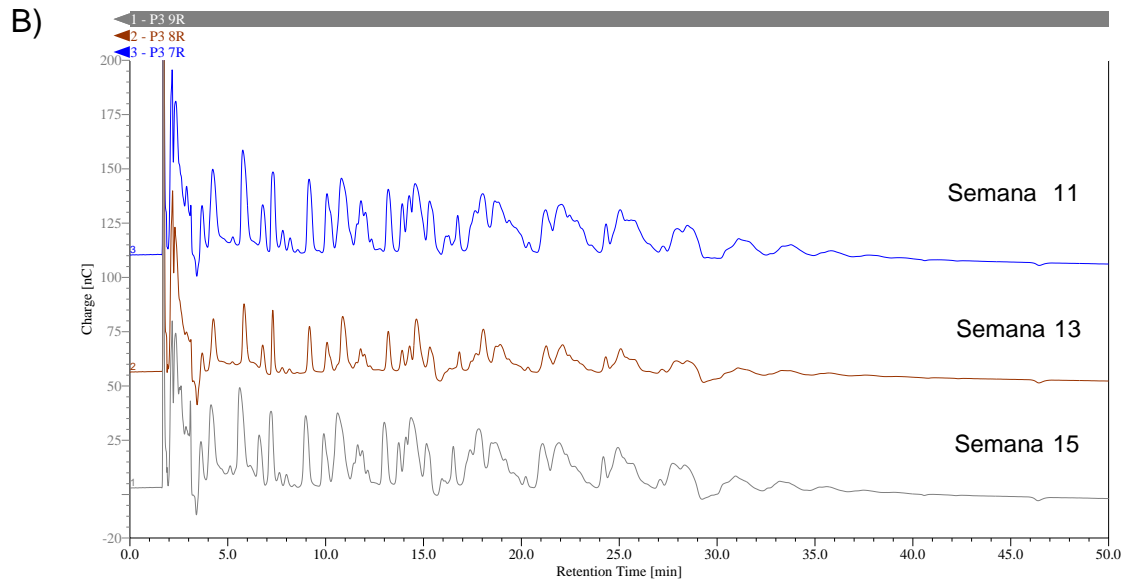
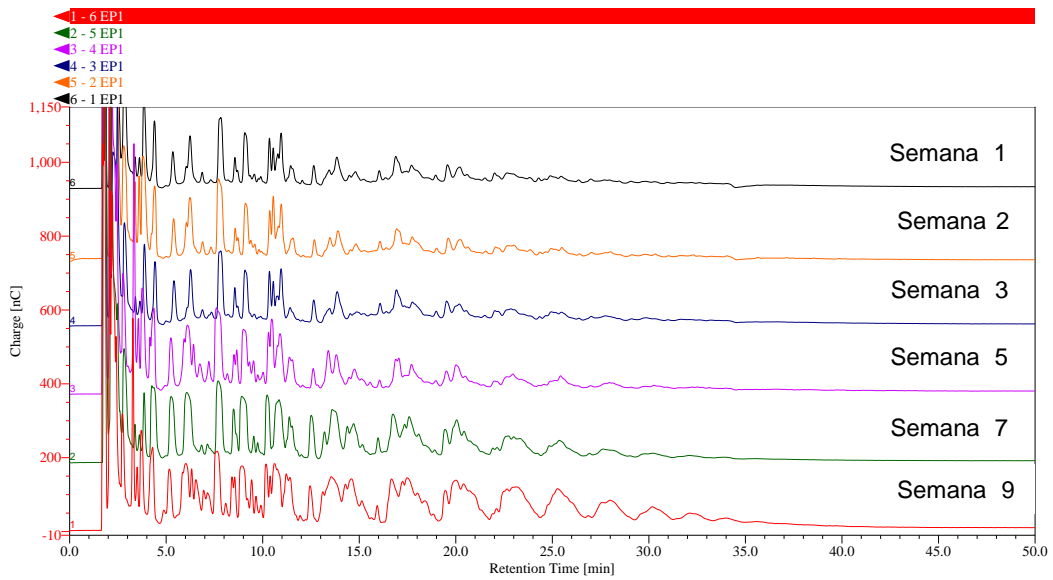


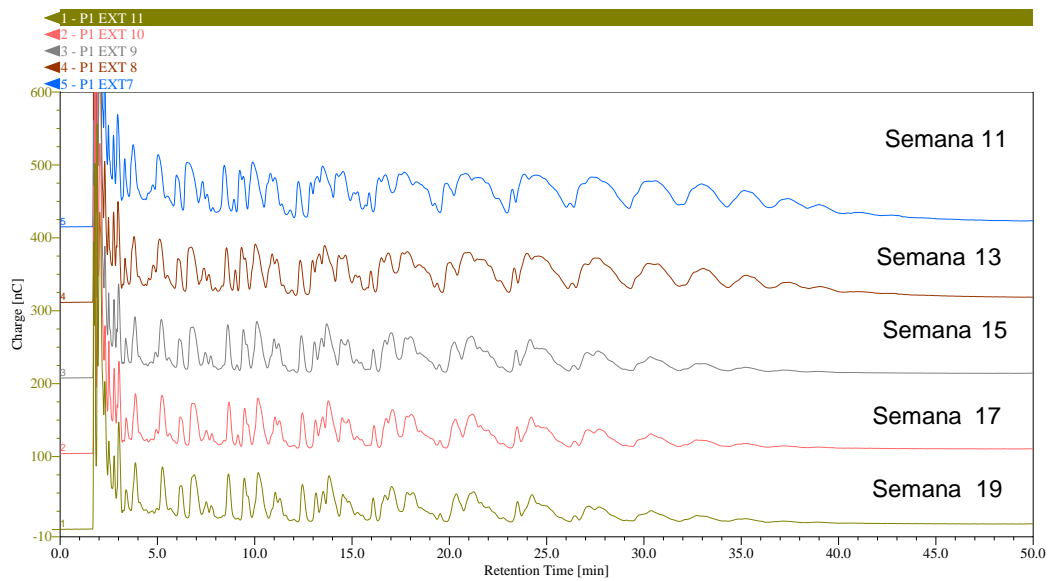
Figura B3. HPAEC-PAD Perfil de la fructanos de aguamiel fresco proveniente de la P3 (*A. salmiana*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida: a) Semanas 1-9 b) semanas 11-15 y c) 17-23.

Extracto de metzal

A)



B)



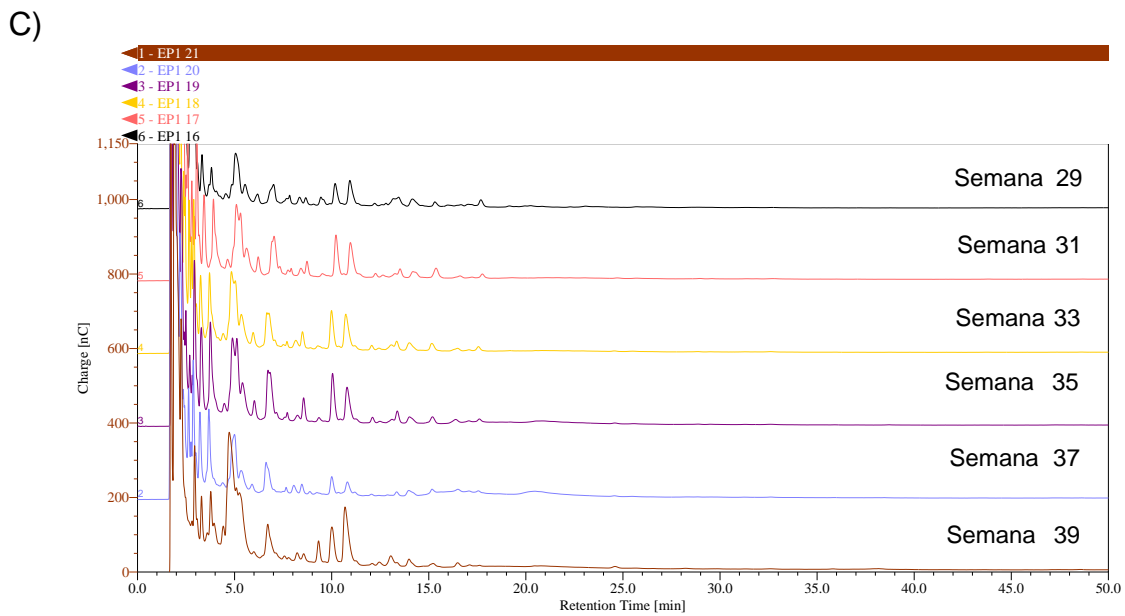
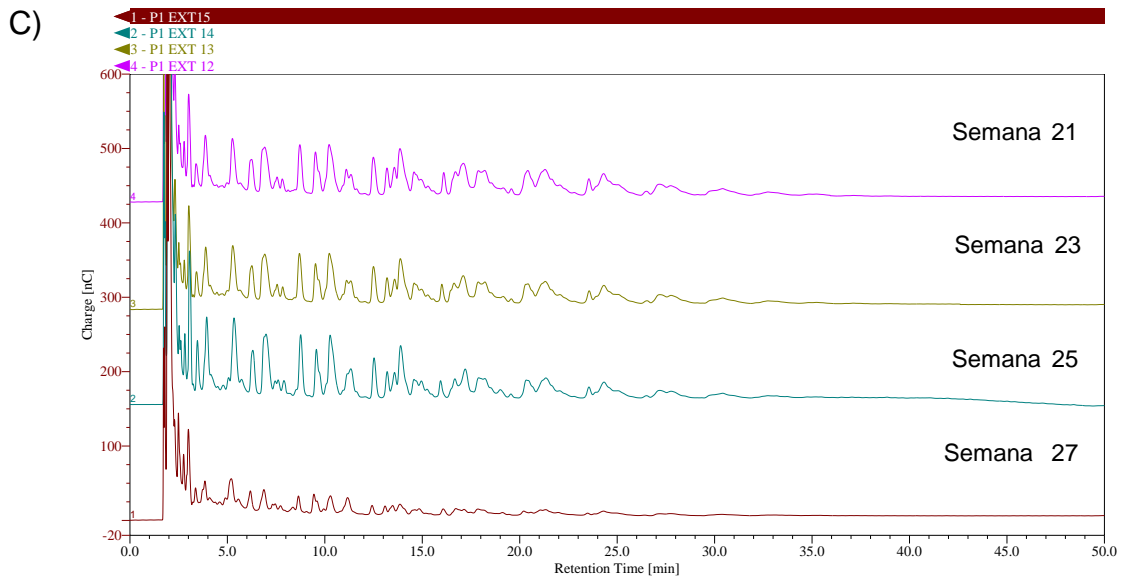
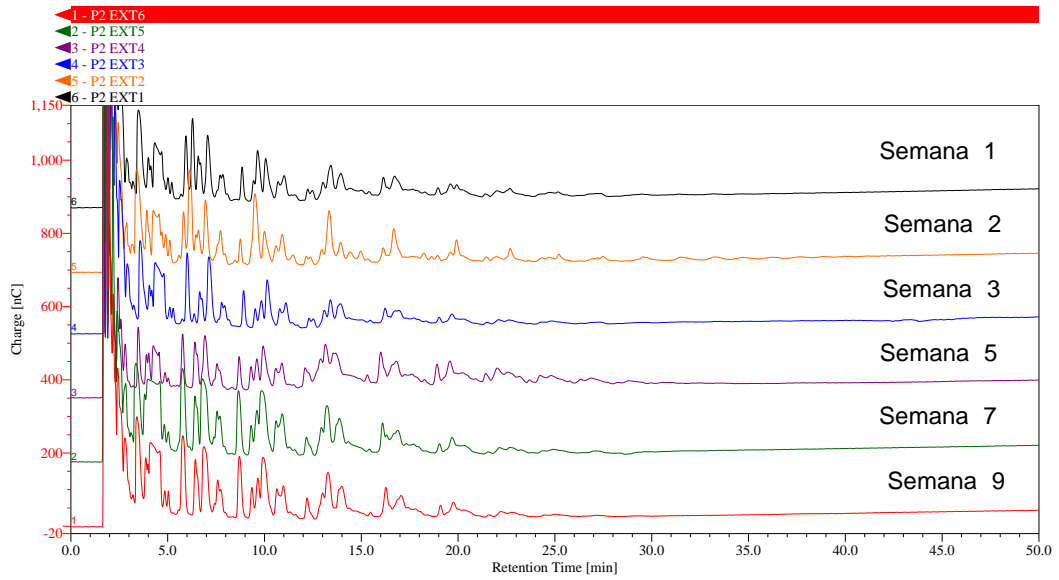
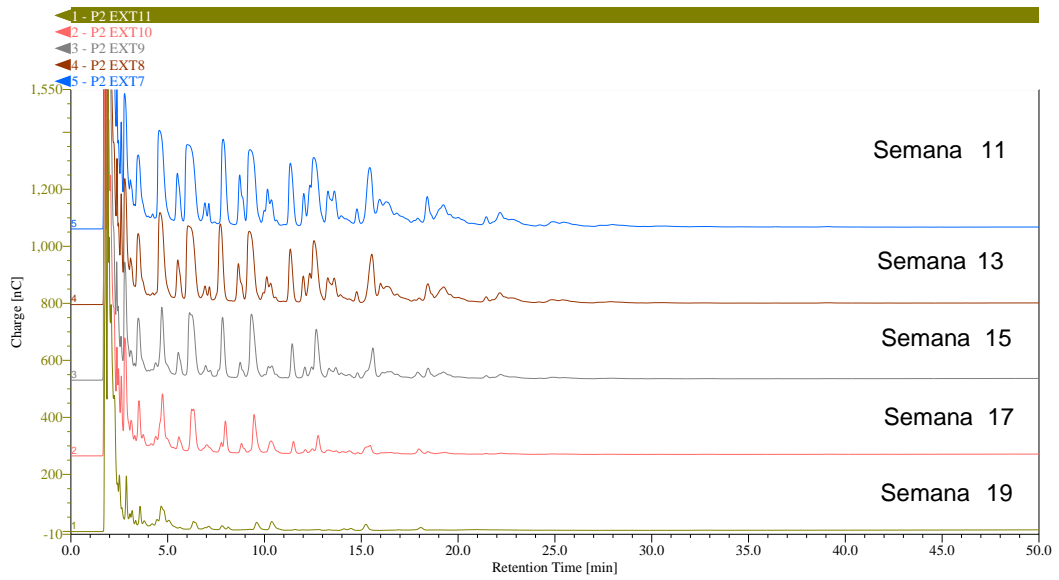


Figura B4. HPAEC-PAD Perfil de fructanos del extracto de metzal de la P1 (*A. mapisaga*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida. a) semanas 1- 9. b) semanas 11 y 23, c) semanas 25 a 31 y d) semanas 31 -39

A)



B)



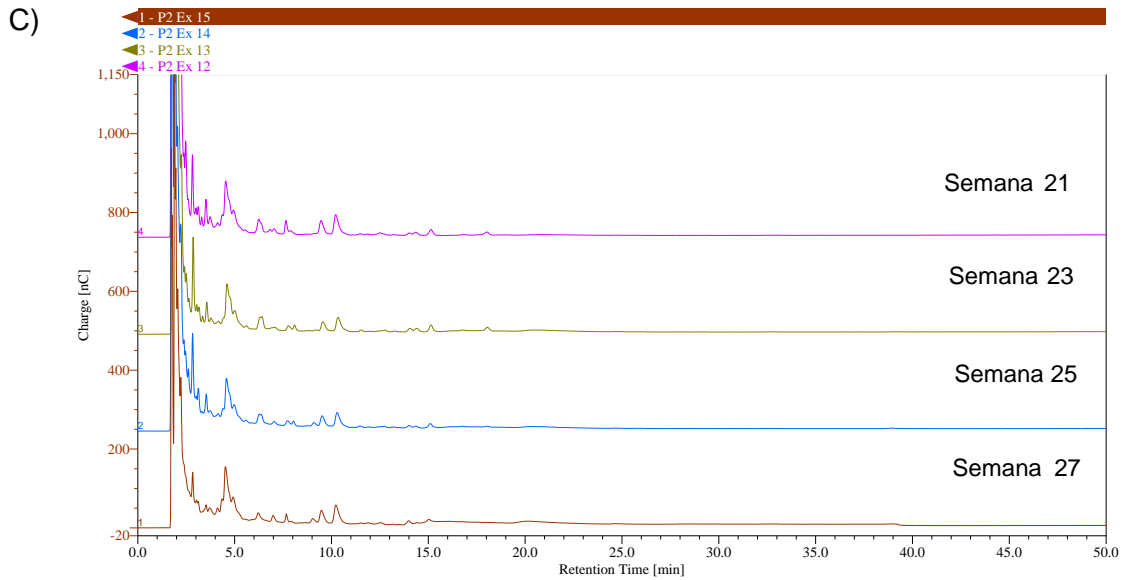
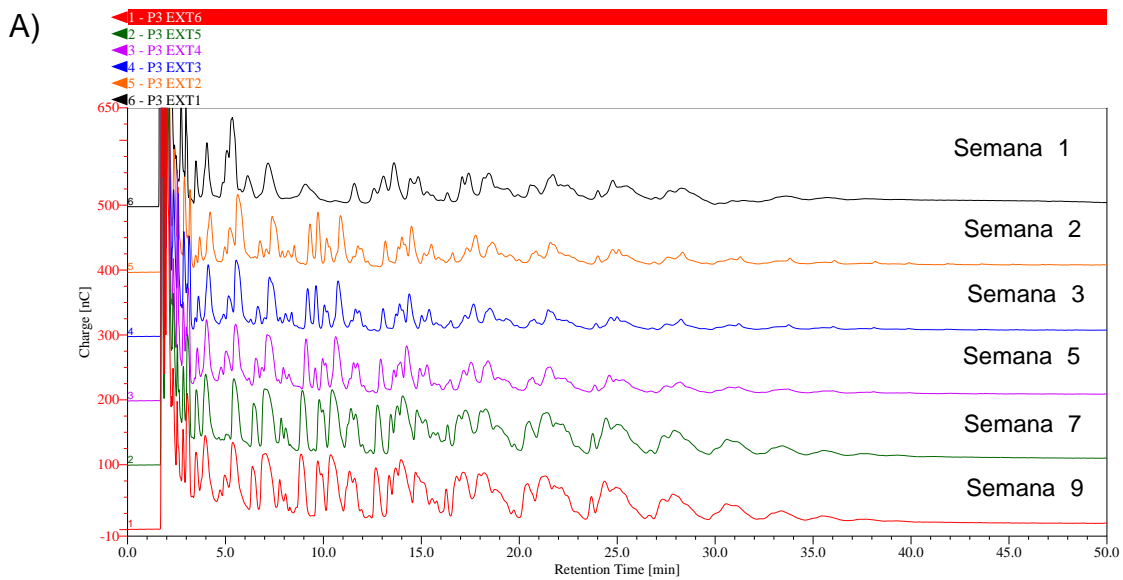


Figura B5. HPAEC-PAD Perfil de fructanos del metzal proveniente de la P2 (*A. mapisaga*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida a) semanas 1-9 b) semanas 11-19 c) semanas 21-27.



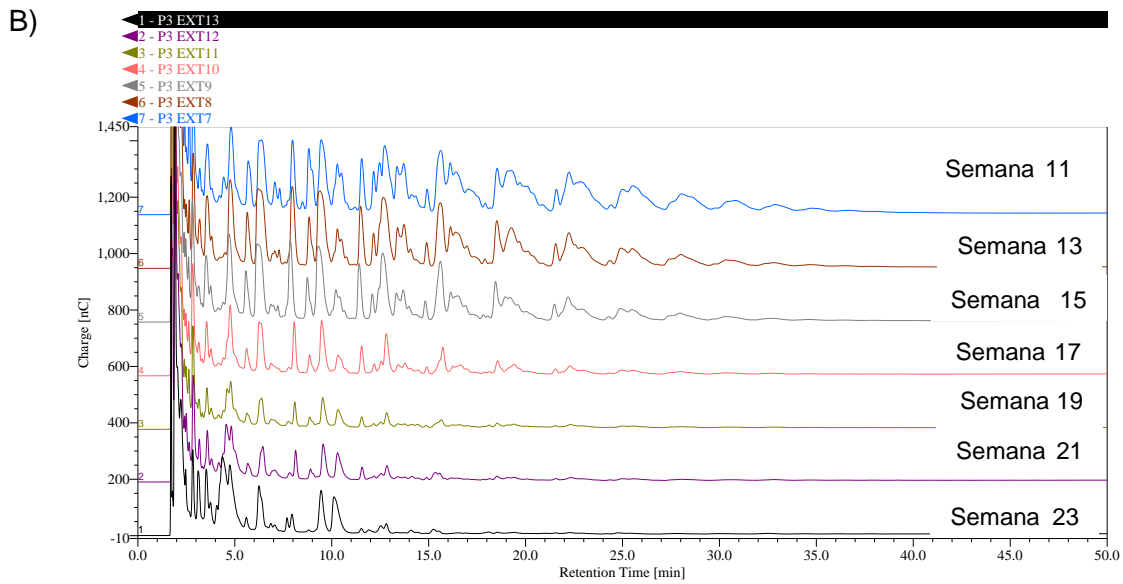
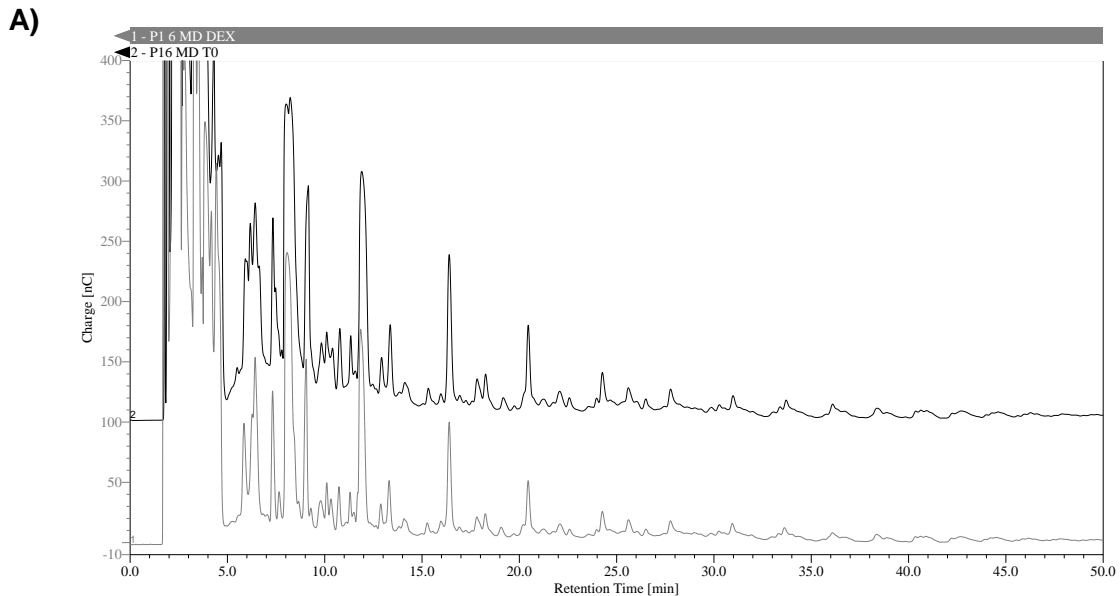


Figura B6. HPAEC-PAD Perfil de los fructanos del extracto de metzal proveniente de la P3 (*A. salmiana*), recolectado en diferentes tiempos de producción. Las muestras comparadas en cada cromatograma fueron inyectadas en la misma corrida. a) semanas 1-9 b) semanas 11-23 .

ANEXO C. Cromatogramas resultantes de la hidrólisis con Dextranasa y Fructozyme

Dextranasa



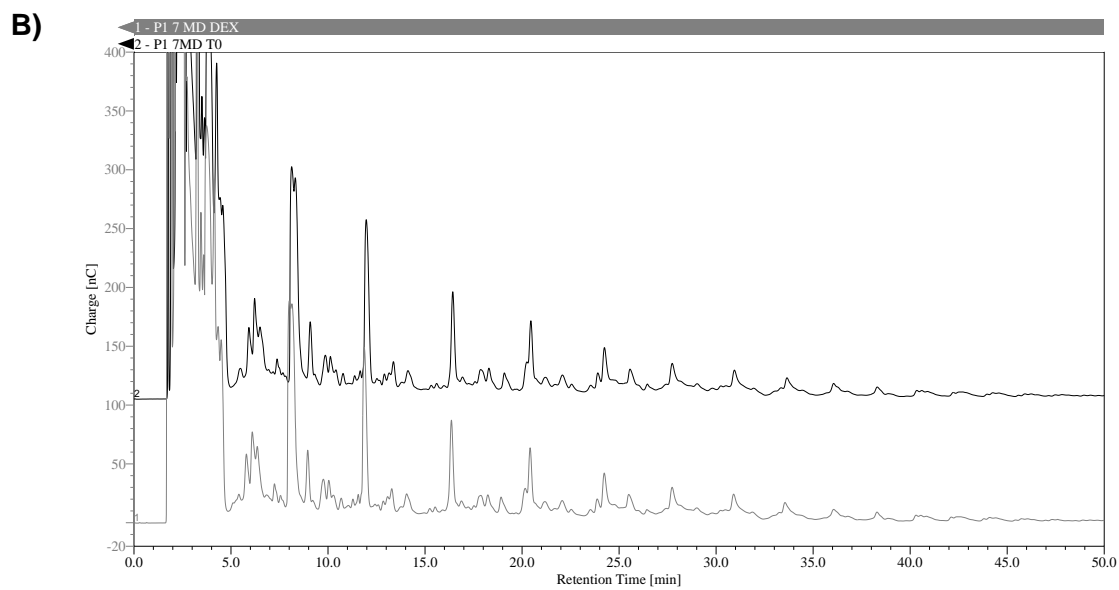
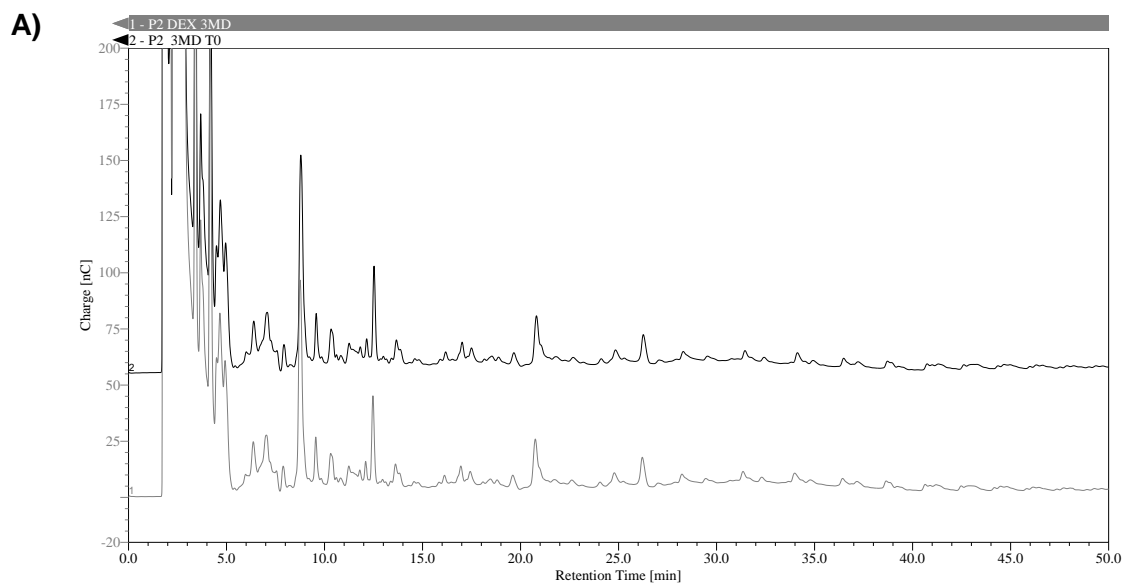
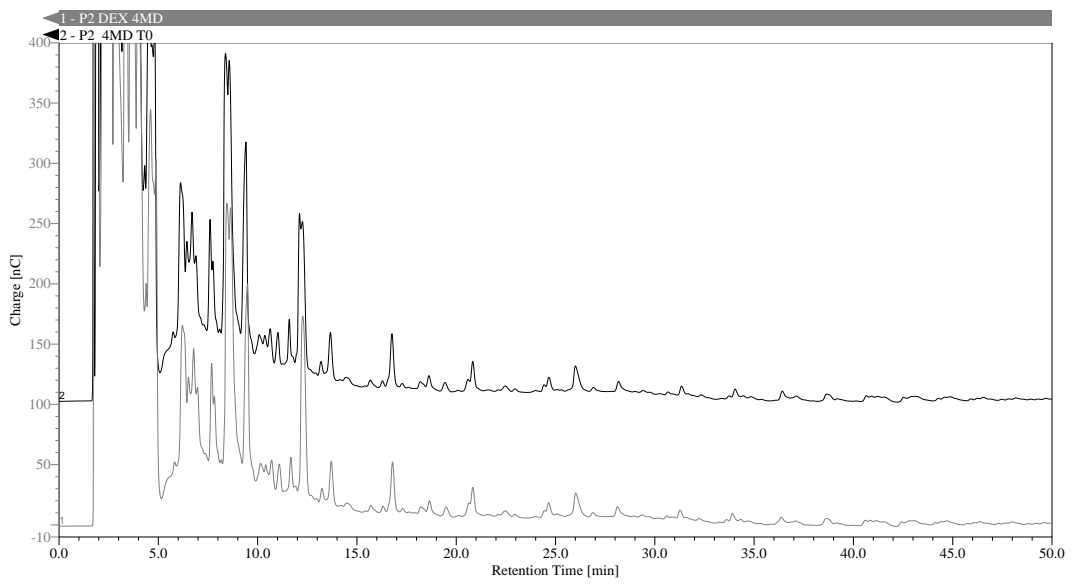


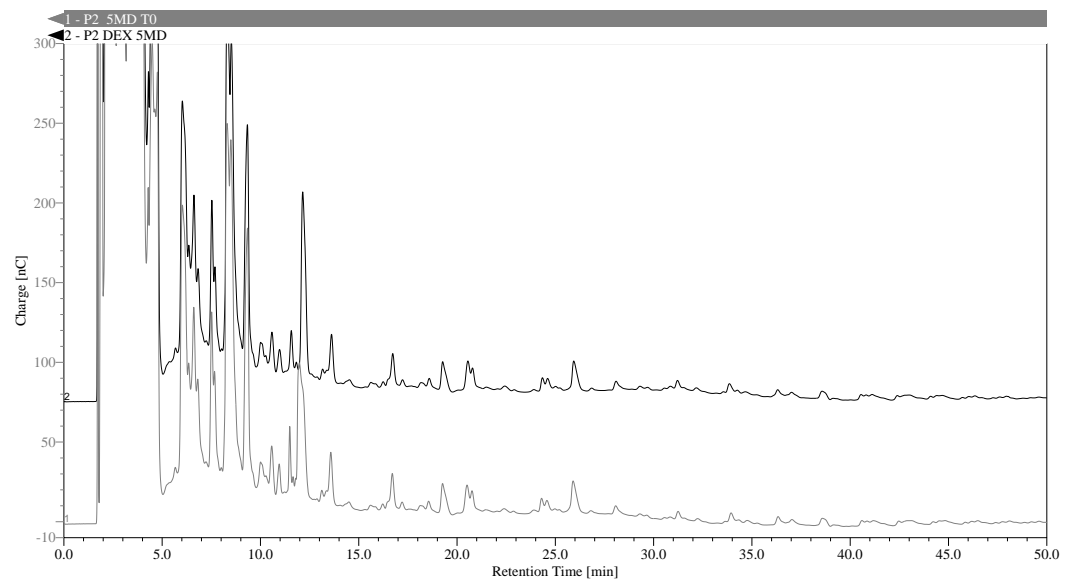
Figura C1. HPAEC-PAD Perfil de aguamiel acumulado de la P1 (*A. mapisaga*), tratado con enzima dextranasa. A) Semana 9 y B) Semana 11



B)



C)



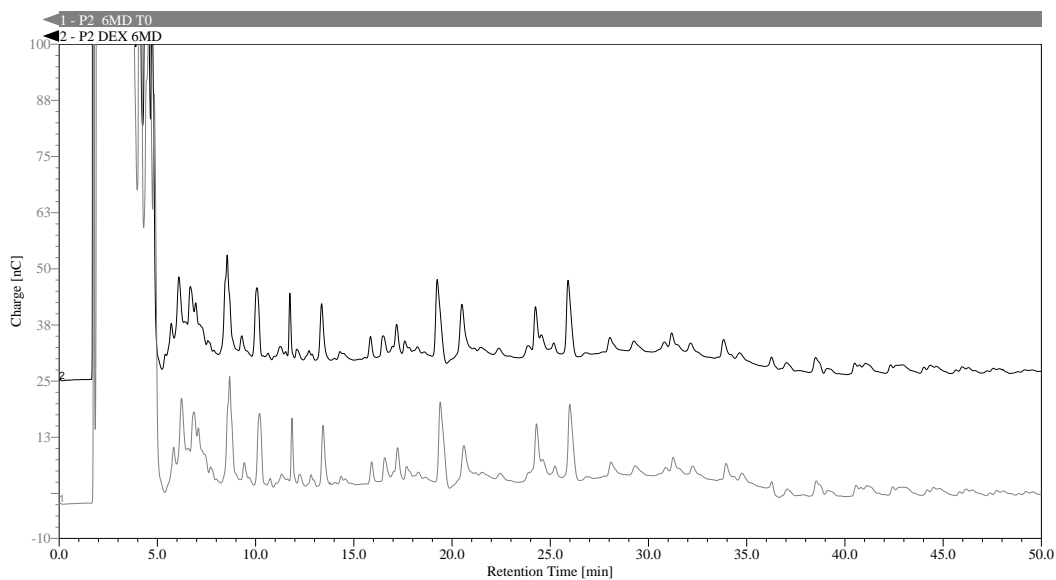
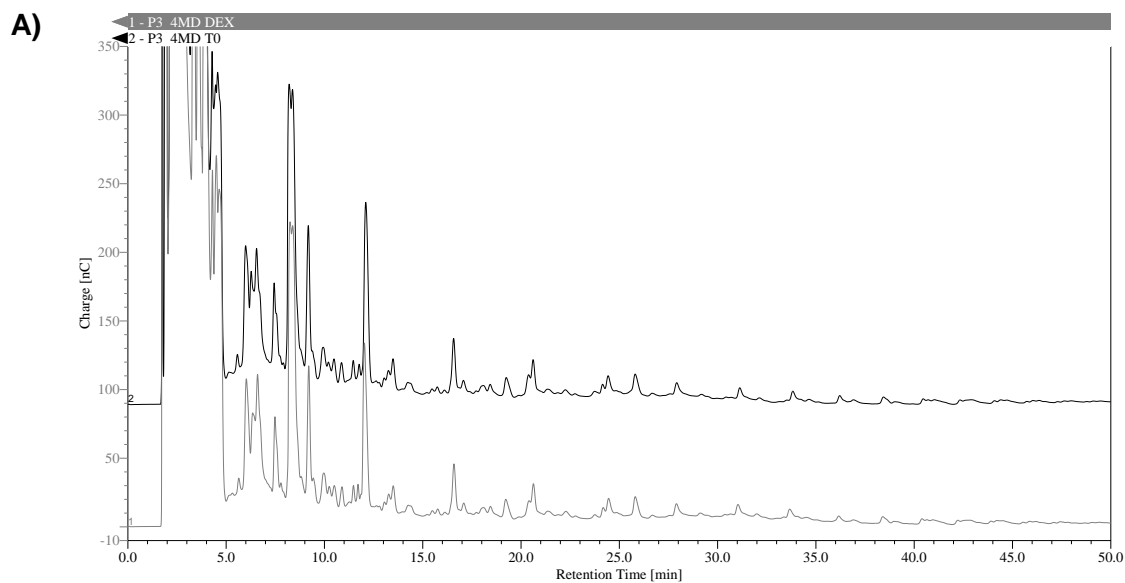
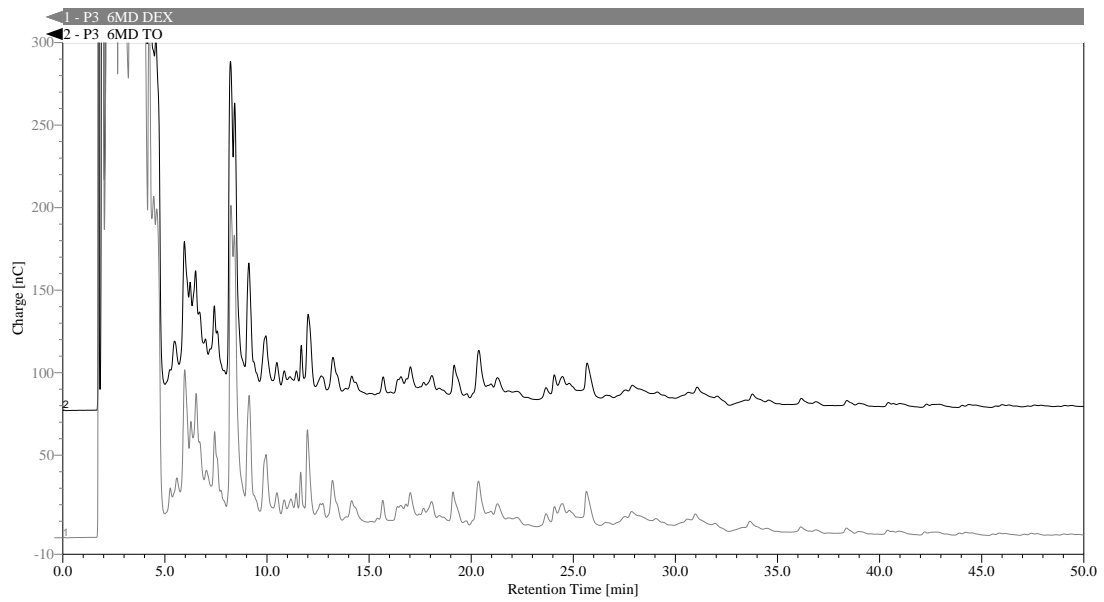


Figura C2. HPAEC-PAD Perfil de aguamiel acumulado de la P2 (*A. mapisaga*), tratado con enzima dextranasa. A) Semana 3 B) Semana 5, C) Semana 7 y D) Semana 9



B)



C)

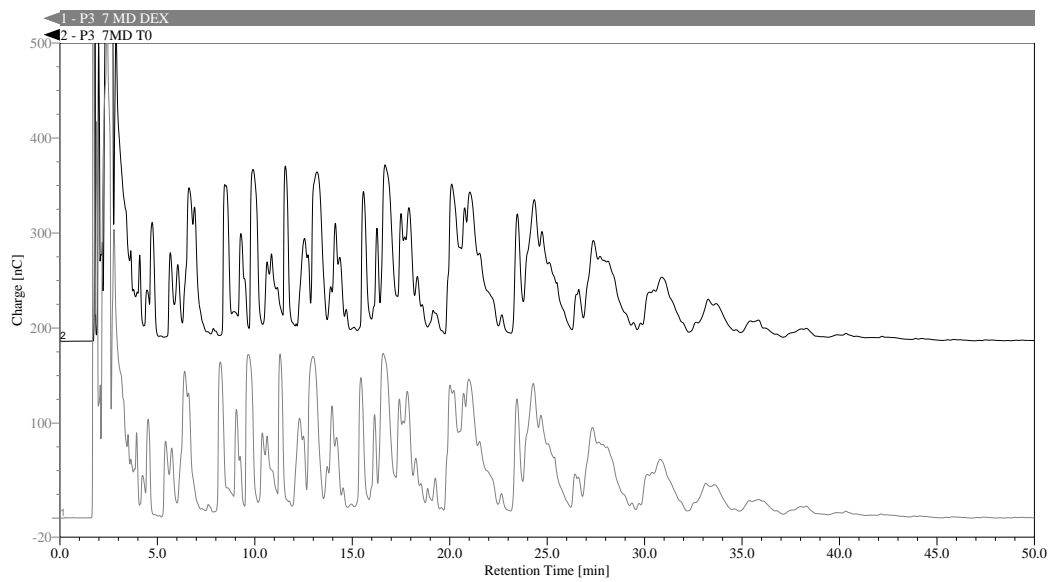


Figura C3. HPAEC-PAD Perfil de aguamiel acumulado de la P3 (*A. salmiana*), tratado con enzima dextranasa. A) Semana 5 B) Semana 9 y C) Semana 11

Fructozyme

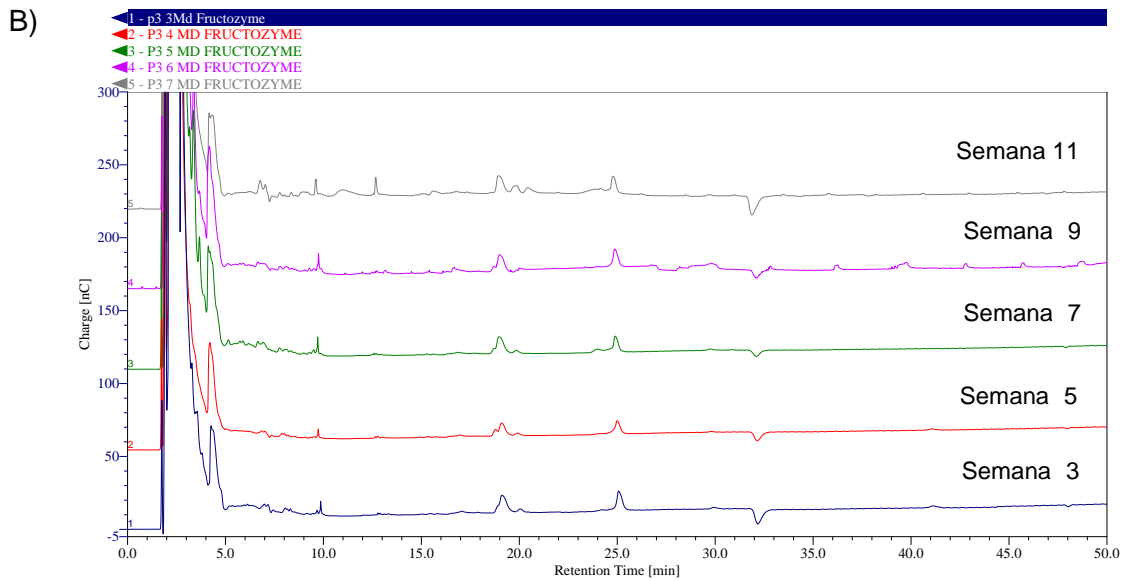
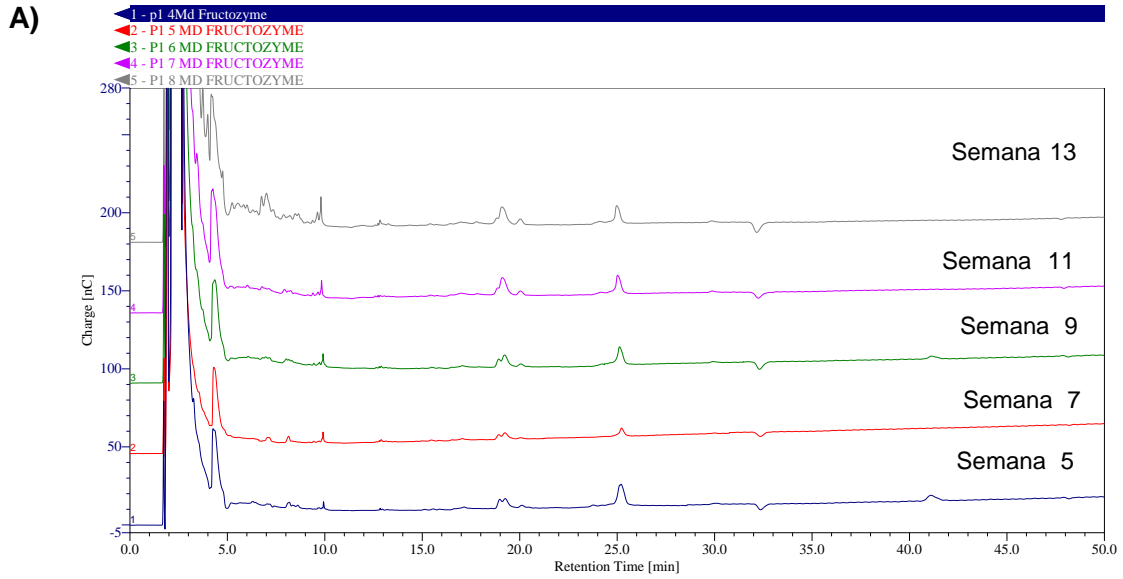
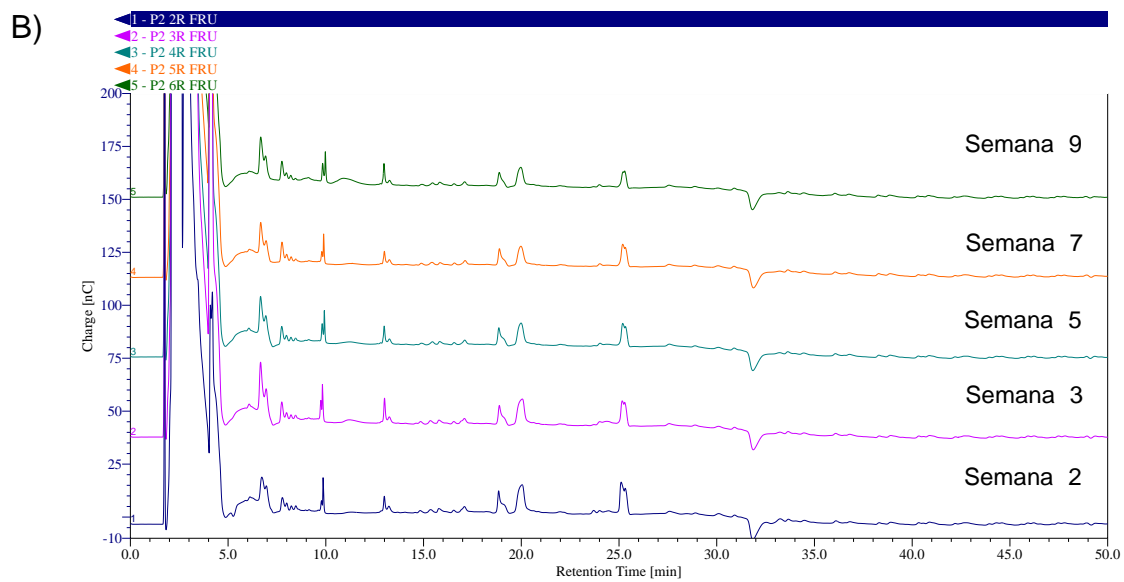
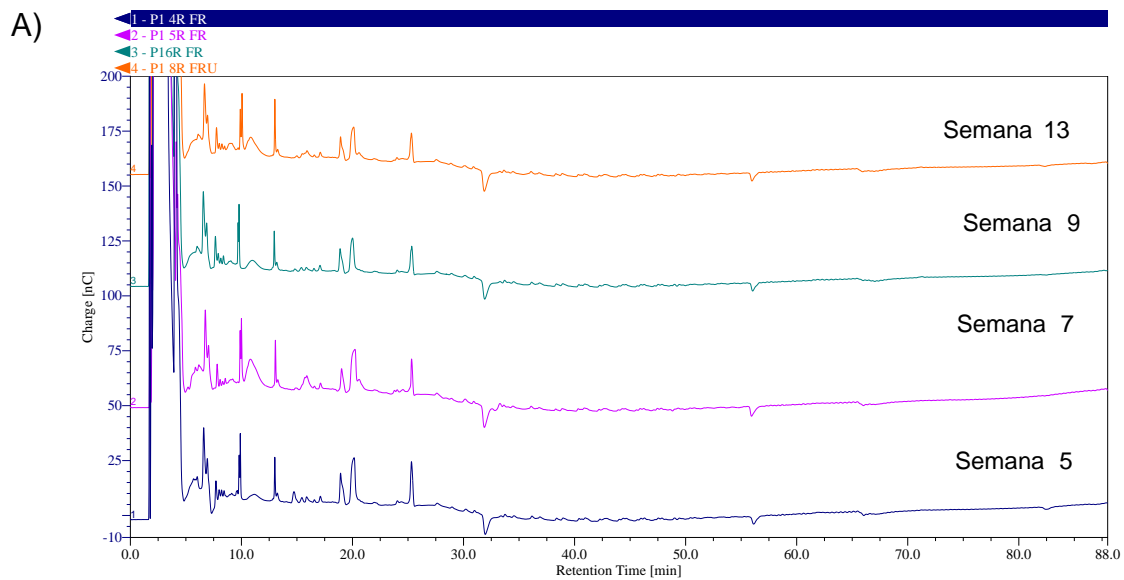


Figura C4. HPAEC-PAD Perfil de aguamiel acumulado del tratado con enzima Fructozyme A) P1 (*A. mapisaga*) y B) P2 (*A. mapisaga*).



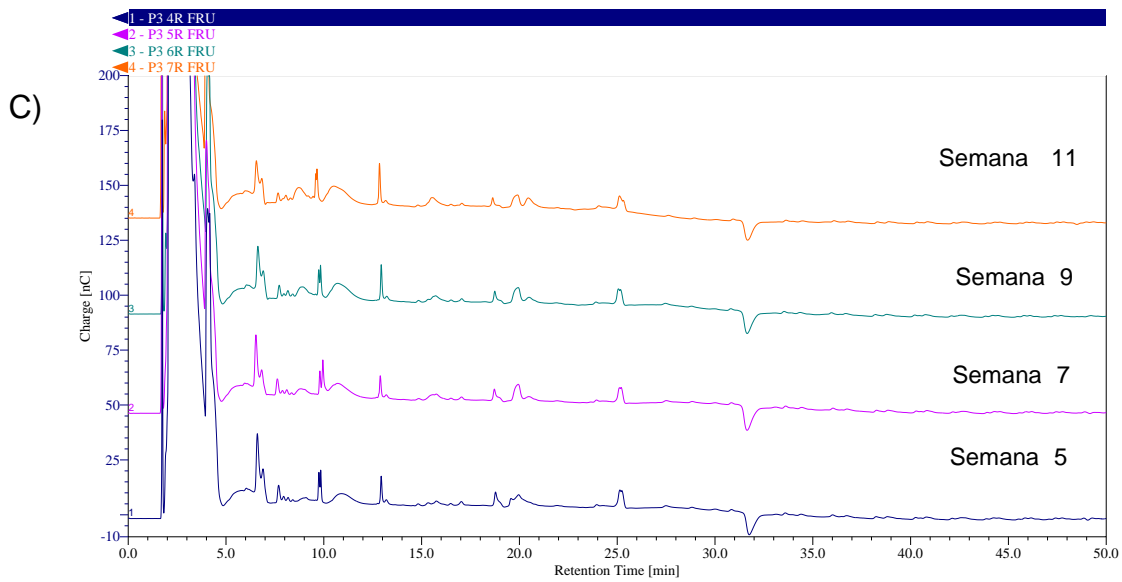


Figura C4. HPAEC-PAD Perfil de aguamiel acumulado del tratado con enzima Fructozyme A) P1 (*A. mapisaga*), B) P2 (*A. mapisaga*) y C) P3 (*A. salmiana*)

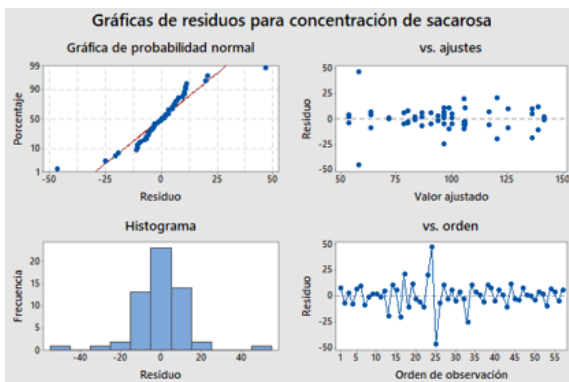
Anexo D. Análisis Estadístico (Minitab 18)

ANOVA y gráficas de residuos. Aguamiel

P1 Sacarosa

Análisis de Varianza

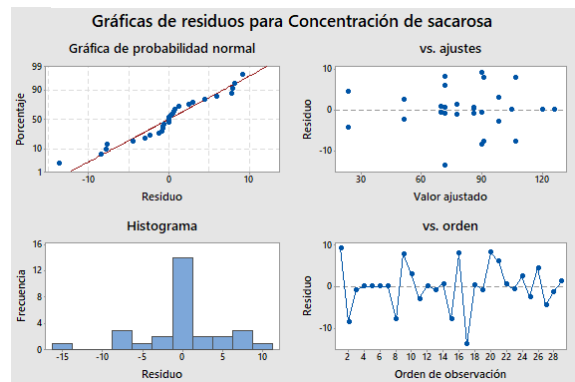
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semana	20	33189	1659.4	6.85	0.000
Error	36	8727	242.4		
Total	56	41916			



P2 Sacarosa

Análisis de Varianza

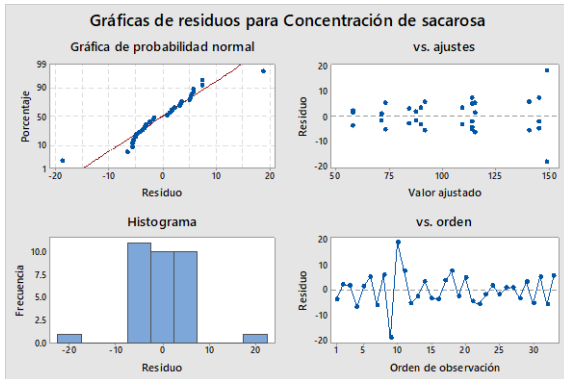
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semana	13	17090.5	1314.65	25.56	0.000
Error	15	771.5	51.43		
Total	28	17862.0			



P3 Sacarosa

Análisis de Varianza

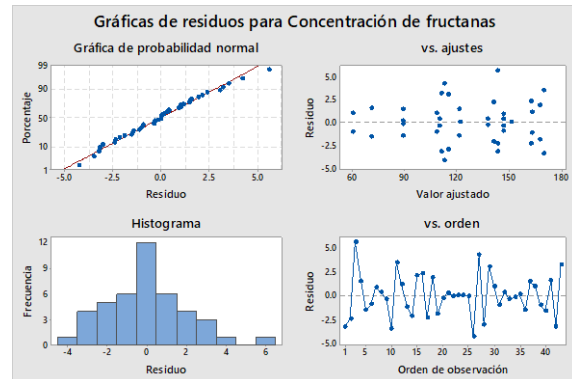
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semana	12	26169	2180.78	34.08	0.000
Error	20	1280	63.98		
Total	32	27449			



P1 Fructanos

Análisis de Varianza

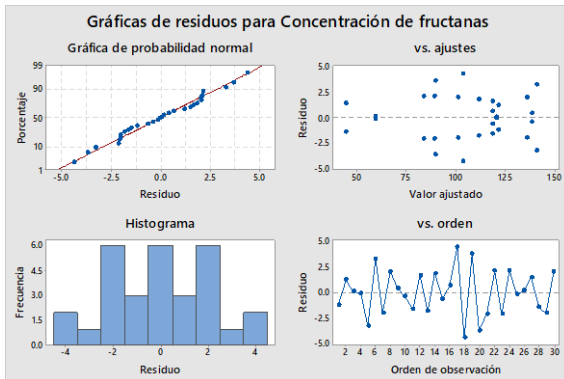
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semana	20	39403.0	1970.15	218.29	0.000
Error	22	198.6	9.03		
Total	42	39601.5			



P2 Fructanos

Análisis de Varianza

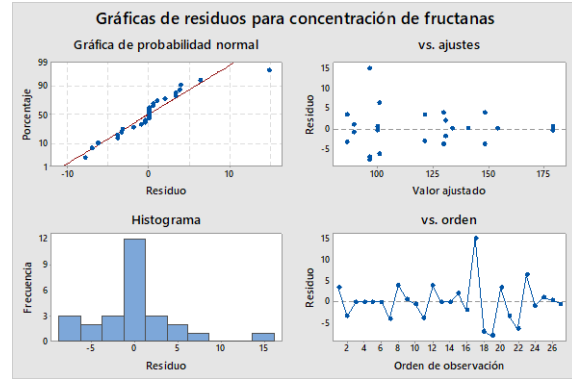
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	14	22237.4	1588.38	165.98	0.000
Error	15	143.5	9.57		
Total	29	22380.9			



P3 Fructanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	12	19940.4	1661.70	43.62	0.000
Error	14	533.3	38.09		
Total	26	20473.6			

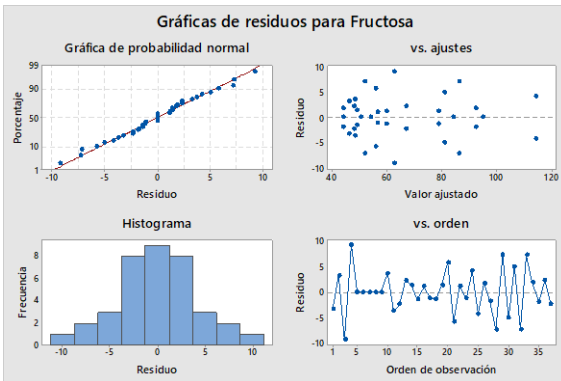


ANOVA y gráficas de residuos. Metzal

P1 Fructosa

Análisis de Varianza

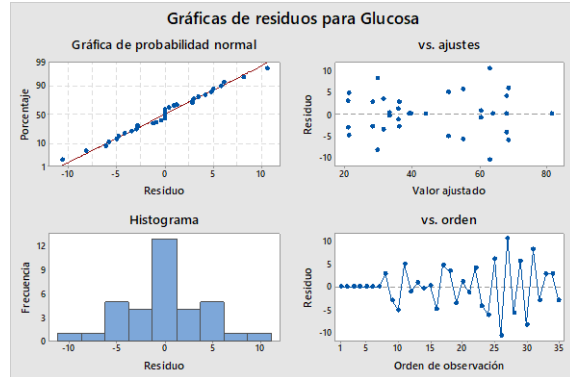
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	20	14178.7	708.93	17.90	0.000
Error	16	633.5	39.60		
Total	36	14812.2			



P1 Glucosa

Análisis de Varianza

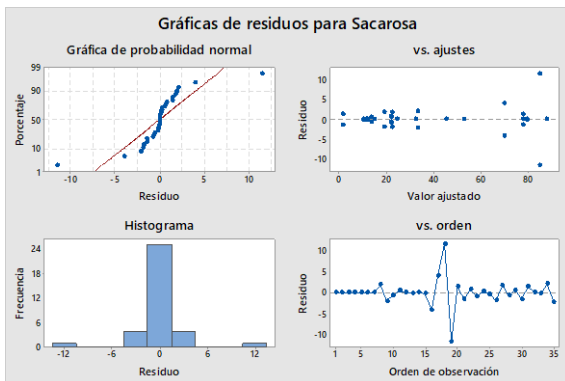
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	20	10086.8	504.34	9.85	0.000
Error	14	716.9	51.21		
Total	34	10803.7			



P1 Sacarosa

Análisis de Varianza

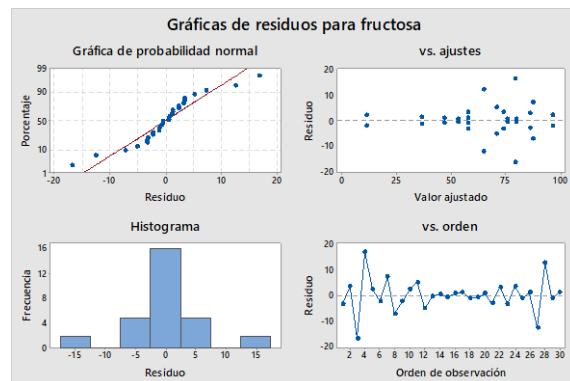
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	20	28374.1	1418.70	59.39	0.000
Error	14	334.4	23.89		
Total	34	28708.5			



P2 Fructosa

Análisis de Varianza

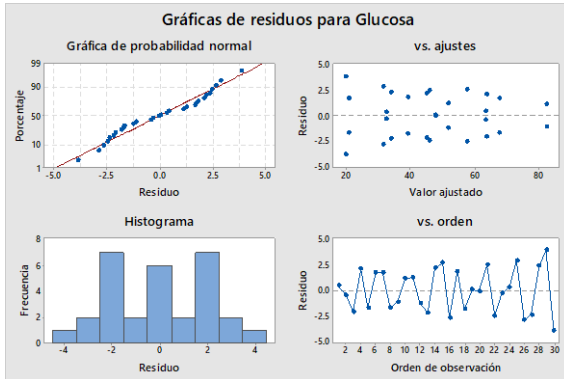
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	14	13695	978.22	12.98	0.000
Error	15	1130	75.35		
Total	29	14825			



P2 Glucosa

Análisis de Varianza

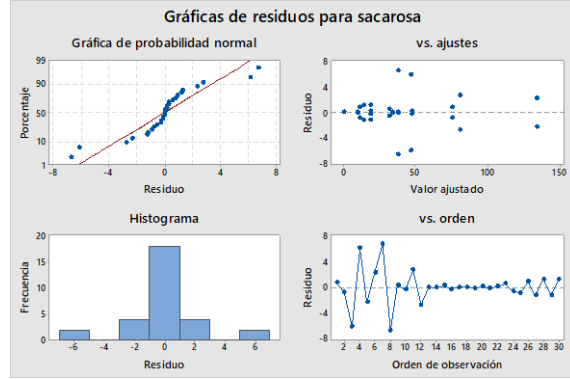
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	14	8937.0	638.354	75.62	0.000
Error	15	126.6	8.442		
Total	29	9063.6			



P2 Sacarosa

Análisis de Varianza

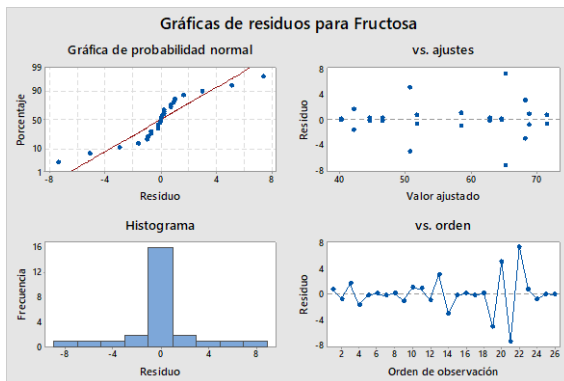
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
semanas de producción	14	33861.8	2418.70	180.45	0.000
Error	15	201.1	13.40		
Total	29	34062.9			



P3 Fructosa

Análisis de Varianza

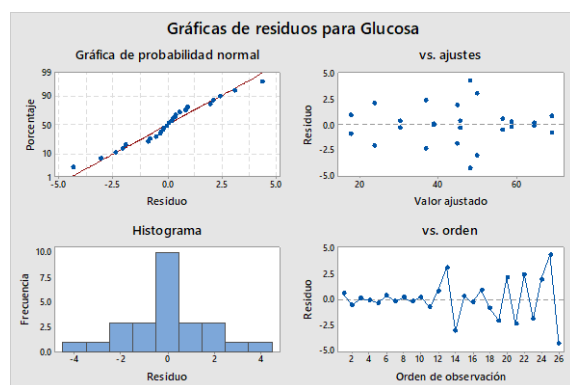
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	12	2952.2	246.01	16.68	0.000
Error	13	191.7	14.75		
Total	25	3143.9			



P3 Glucosa

Análisis de Varianza

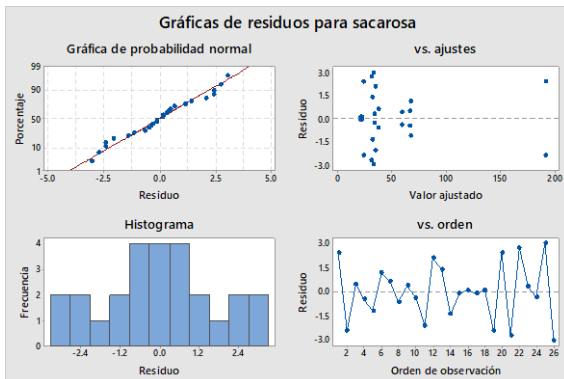
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	12	5622.58	468.549	68.07	0.000
Error	13	89.48	6.883		
Total	25	5712.06			



P3 sacarosa

Análisis de Varianza

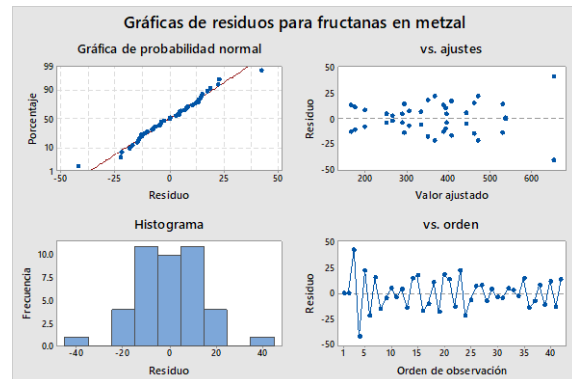
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	12	49458.7	4121.56	726.11	0.000
Error	13	73.8	5.68		
Total	25	49532.5			



P1 Fructanos

Análisis de Varianza

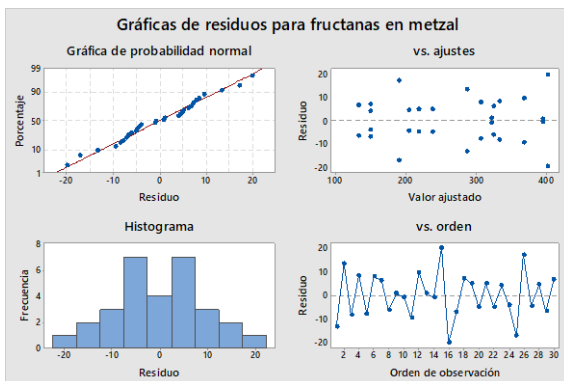
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	20	628196	31409.8	67.50	0.000
Error	21	9772	465.4		
Total	41	637968			



P2 Fructanos

Análisis de Varianza

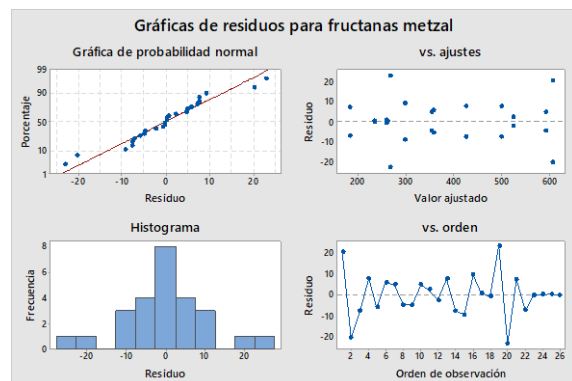
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	14	230645	16474.7	93.48	0.000
Error	15	2644	176.2		
Total	29	233289			



P3 Fructanos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Semanas de producción	12	483284	40273.7	203.98	0.000
Error	13	2567	197.4		
Total	25	485851			



Apéndice

1.0 Ecuaciones

Ecuación para determinar el peso molecular de las muestras (PM) con base en el tiempo de retención en la columna Linnear.

