



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS,
INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO
EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DE LOS
CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES DEL
MAGUEY MEZCALERO POTOSINO
(*Agave salmiana*)**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

ING. CHRISTIAN MICHEL CUELLO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL PINOS RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTELAR:

DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS,
INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO
EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DE LOS
CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES DEL
MAGUEY MEZCALERO POTOSINO
(*Agave salmiana*)**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

ING. CHRISTIAN MICHEL CUELLO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL PINOS RODRÍGUEZ

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA _____

SECRETARIA:

DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES _____

VOCAL:

DR. MIGUEL ÁNGEL RUIZ CABRERA _____

Proyecto realizado en:

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

El Fondo Mixto Gobierno del Estado de San Luis Potosí- Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) SLP-2002-C01-3790.

Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACYT): 190542.

La maestría en Ciencias Ambientales recibe apoyo a través del
Programa de Fortalecimiento al Posgrado Nacional (PIFOP-SEP).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, abuelos y familia por brindarme siempre su apoyo, confianza y cariño.

A la M. en C. Lucía Gabriela García Pedraza por su gran ayuda y, sobre todo por estar siempre a mi lado.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por el equipo, transporte y material bibliográfico facilitados.

Al Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez por su tiempo y apoyo.

Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera por su experiencia, compromiso y conocimientos para la realización de este trabajo.

Agradecimiento especial a la Dra. Bertha Irene Juárez Flores por sus conocimientos, apoyo, confianza y amistad.

Caracterización cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*)

Christian Michel-Cuello, Juan Manuel Pinos-Rodríguez¹, Bertha Irene Juárez-Flores, Juan Rogelio Aguirre-Rivera.

Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas y Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Altair 200, Colonia del Llano, San Luis Potosí, S.L.P. México. 78377.

¹Corresponding author. Tel and Fax + 444 8 421146. E-mail: jpinos@uaslp.mx

Índice de contenido

	Página
Resumen	1
Introducción.....	2
Materiales y métodos	4
Material vegetal	4
Extracción y filtración de jugos	4
Hidrólisis	4
Hidrólisis térmica.....	4
Hidrólisis ácida	5
Reactivos y muestras	6
Análisis por HPLC.....	6
Condiciones cromatográficas	6
Identificación y cuantificación.....	6
Diseño experimental y análisis estadísticos.....	8
Resultados y discusión.....	9
Azúcares en los jugos de maguey	9
Variación en la concentración de glucosa y fructosa	11
Conclusiones.....	14
Agradecimientos.....	14
Literatura citada.....	15

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Tiempos de retención (min) de los estándares utilizados en la columna Zorbax para carbohidratos y coeficientes de correlación entre la refracción de muestras y estándares.	8
Cuadro 2. Concentración media (mg/ml) de azúcares en jugos de maguey (<i>Agave salmiana</i>) (n=3).	10
Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza y prueba de F para la concentración (mg/ml) de fructosa y glucosa en maguey mezcalero potosino (<i>Agave salmiana</i>).	11

Índice de figuras

Pág.

- Figura 1.** Efecto de la temperatura sobre el contenido de fructosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*) dispuestos durante 120 minutos en baño María.5
- Figura 2.** Efecto del calentamiento a 80 °C en baño María, sobre la concentración de carbohidratos en jugos crudos de maguey (*Agave salmiana*). La desviación estándar en todos los casos es ± 0.1 o menor.5
- Figura 3.** Tiempos de retención de 10 estándares utilizados para la identificación de carbohidratos: (1) ribosa, (2) xilosa, (3) arabinosa, (4) fructosa, (5) manosa, (6) glucosa, (7) galactosa, (8) sacarosa, (9) maltosa y (10) lactosa. La concentración de cada estándar fue de 5 % (w/v) en una solución 50:50 (v/v) acetonitrilo/agua (volumen de inyección 20 μ l). El primer pico representa el cambio de fase.7
- Figura 4.** Efectos del estado de madurez y la hidrólisis sobre la concentración (\pm EE) de fructosa y glucosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*). (I = tierno o inmaduro; Q = quiotillo o en reproducción incipiente; C = castrado).12
- Figura 5.** Efectos de la fracción de la planta y la hidrólisis sobre la concentración (\pm EE) de glucosa y fructosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*). (TT = tallo; PB = base de la hoja o penca; PC = cuello de la penca; PA = ala de la penca; PP = ápice de la penca).12

Resumen

La inulina es el carbohidrato de reserva en las plantas del género *Agave*. En las fábricas de mezcal este polisacárido se somete a hidrólisis térmica para liberar su fructosa y algo de glucosa, los cuales al fermentarlos junto con otros monosacáridos y disacáridos son la base para producir dicho aguardiente. El contenido de carbohidratos en los jugos de maguey determina el rendimiento y la calidad del producto terminado, lo cual puede depender de factores como fracción estructural de la planta, estado de madurez y condiciones de la hidrólisis térmica. Por ello, el objetivo de este estudio fue caracterizar cualitativa y cuantitativamente los carbohidratos no estructurales presentes en jugos crudos e hidrolizados de tallo y de penca de maguey mezcalero (*Agave salmiana*) con tres estados de madurez. La técnica analítica utilizada fue cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En los jugos de maguey se identificaron fructosa, glucosa, sacarosa, xilosa y maltosa. Solamente la interacción fracción x hidrólisis fue significativa en la concentración de glucosa. Las interacciones fracción x hidrólisis y madurez x hidrólisis fueron estadísticamente significativas en la concentración de fructosa. La concentración de fructosa se incrementó notablemente con la hidrólisis, pero sólo en los jugos extraídos de tallos de magueyes maduros (quiotillos y castrados). Este incremento sólo fue estadísticamente significativo con la hidrólisis ácida.

Palabras clave

Agave salmiana; hidrólisis térmica; fructosa; glucosa; sacarosa; xilosa; maltosa; cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Introducción

El maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*) presenta metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), lo cual es una adaptación bioquímica y fisiológica a los bajos niveles de CO₂ resultantes de una eficaz economía hídrica (1, 2). Durante la fotosíntesis, en las hojas se forma de manera directa la glucosa, generalmente por la acción de una fosfatasa sobre la glucosa-1-fosfato (G1P) (3). Posteriormente, al intervenir la enzima hexoquinasa, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato (G6P); luego, por acción de la enzima hexosafosfato isomerasa, la G6P se transforma en fructosa-6-fosfato (F6F) (4). Finalmente la F6F pierde el fosfato y libera fructosa (5, 6, 7). La glucosa y la fructosa son las hexosas más importantes como material energético para la planta (3). Estos y otros azúcares menos abundantes se encuentran en las plantas en estado dinámico, ya que su energía es requerida en muchas de las reacciones celulares, como la síntesis de proteínas y de lípidos, entre otras (8). El producto fotosintético más utilizado para el transporte de carbohidratos a través de la planta es la sacarosa, cuya síntesis está regulada por la acción de la sacarosa-fosfato sintasa, la cual cataliza la unión de una molécula de glucosa y una de fructosa (9). Cuando la planta requiere energía, la sacarosa es hidrolizada mediante la sacarasa (10), con lo cual se libera fructosa y glucosa. La sacarosa también constituye un sustrato para la síntesis de inulina, polisacárido de reserva en las plantas del género *Agave*, formado por la polimerización de 35 unidades de fructosa y dos de glucosa por cada molécula (11). En los magueyes, la inulina se sintetiza y almacena en el tallo, durante su prolongado periodo vegetativo (12, 13). Al comenzar el periodo de reproducción, la formación y sostenimiento de las enormes estructuras reproductoras significa una gran demanda de energía, la cual proviene de la fructosa y glucosa, resultantes de la inulina hidrolizada mediante la exoinulinasa (14, 15).

Por su alto contenido de carbohidratos de reserva, el maguey maduro es aprovechado como materia prima en la producción de mezcal. En las fábricas se utilizan únicamente las piñas o cabezas de maguey, estructuras formadas por el tallo y la base de las pencas; el resto de la planta se desecha en el campo. Para el aprovechamiento de maguey mezcalero es fundamental considerar el estado de madurez de las plantas, pues de ello depende el grado

de acumulación de los carbohidratos de reserva, y la madurez está poco relacionada con el tamaño (16). Cuando el maguey muestra síntomas de haber iniciado su fase reproductora (cogollo adelgazado en su base y pencas sin desplegar de menor tamaño y con espinas terminales negras y brillantes) se le llama quiotillo y entonces suele eliminarse el meristemo apical (castración); a partir de entonces y hasta uno a dos años de castrado, el maguey se considera en madurez óptima para ser aprovechado (16). Con la cocción en las fábricas de mezcal, la inulina presente en las piñas se hidroliza, y la fructosa y glucosa liberadas, junto con otros monosacáridos y disacáridos existentes en los jugos, se fermentan para la producción de alcohol.

Una de las técnicas analíticas utilizadas para la identificación y cuantificación de compuestos químicos en mezclas complejas es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (17). Esta técnica ha sido extensamente utilizada en la identificación de carbohidratos en plantas (12), alimentos (18), bebidas (19, 20) y edulcorantes (21).

La caracterización cualitativa y cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del maguey mezcalero, en dependencia del órgano, madurez de la planta y la hidrólisis, resulta fundamental para evaluar y eventualmente mejorar su forma actual de aprovechamiento. Por ello, el objetivo de este estudio fue identificar y cuantificar los carbohidratos no estructurales presentes en jugos crudos y en jugos hidrolizados del tallo y de las cuatro secciones transversales reconocibles de la penca (base, cuello, ala y ápice), de plantas de maguey mezcalero potosino tiernas o inmaduras, quiotillas y con un año de castradas, por medio de HPLC.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron nueve plantas completas de maguey mezcalero potosino en el paraje El Llano, perteneciente al ejido Ipiña en el municipio de Ahualulco, San Luis Potosí, en julio del 2006; de ellos, tres correspondieron a cada uno de tres estados de madurez: tiernos o inmaduros (antes de un año para iniciar su periodo de reproducción), quiotillos o con reproducción incipiente y con un año de castradas. De cada planta, únicamente se utilizó una cuarta parte de su tallo, resultante de dos cortes longitudinales cruzados; y cuatro pencas maduras (con una inclinación de 45° con respecto al eje central), orientadas cada una de ellas hacia uno de los cuatro puntos cardinales.

Extracción y filtración de jugos

Las pencas fueron seccionadas en base, cuello, ala y ápice. Para obtener los jugos del tallo se utilizó un extractor centrífugo para frutas International (Cd. México, México), y para los jugos de penca, un trapiche de acero inoxidable Gerrey (Bogotá, Colombia). La eliminación de los restos de fibras se realizó con un filtro de celulosa Pentek, con diámetro de poro de 5 µm (Sheboygan, WI). Los jugos se almacenaron en recipientes herméticos y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

Hidrólisis

Hidrólisis térmica. En un ensayo preliminar, muestras de los jugos de cada fracción de la planta fueron colocados en tubos de ensaye de 5 ml, y posteriormente se introdujeron en un baño de agua Precision Scientific (Chicago, Ill), a tres temperaturas (60 °C, 70 °C y 80 °C) durante 2 horas. La concentración de fructosa en los jugos sometidos a 80 °C fue estadísticamente superior. Sin embargo, el incremento de fructosa durante las 2 h fue mínimo (Figura 1), por lo que el proceso se prolongó a 80 °C con análisis de muestras cada tres h. A las 30 h la concentración de fructosa tendió a estabilizarse (Figura 2). De esta manera, 80 °C y 30 h se establecieron como las condiciones de hidrólisis térmica, lo cual es semejante a lo utilizado en las fábricas de mezcal (30 h a ± 110 °C) (22) y de tequila (32 h a ± 100 °C) (23).

Hidrólisis ácida. Muestras de los jugos crudos similares a las anteriores fueron colocadas en tubos de ensaye de 5 ml. El pH de estas muestras se ajustó a 1 con ácido sulfúrico concentrado; luego, los tubos se colocaron en el baño de agua Precision Scientific, a 80 °C durante 2 h (24). Finalmente, a las muestras se les ajustó el pH a su valor inicial de 5, con una solución de hidróxido de sodio al 10 %; ambos reactivos utilizados fueron de Merck (Darmstand, Alemania).

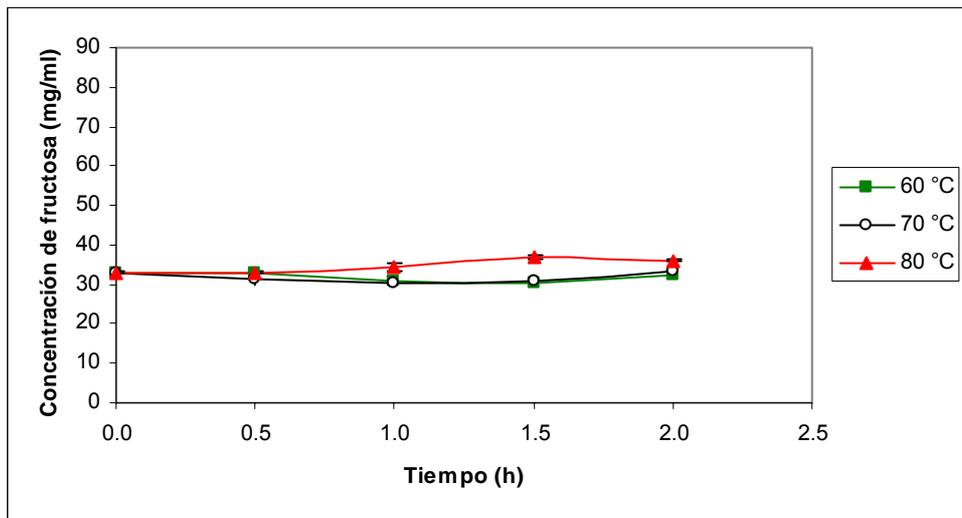


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre el contenido de fructosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*) dispuestos durante 120 minutos en baño María.

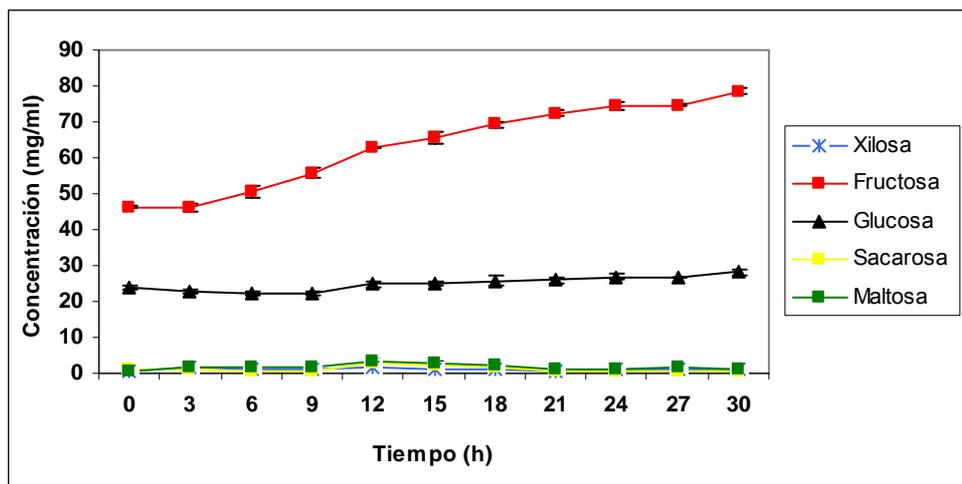


Figura 2. Efecto del calentamiento a 80 °C en baño María, sobre la concentración de carbohidratos en jugos crudos de maguey (*Agave salmiana*). La desviación estándar en todos los casos es ± 0.1 o menor.

Reactivos y muestras

Se utilizó acetonitrilo y agua grado HPLC de JT-Baker (Deventer, Holanda), y el kit de carbohidratos CAR-11 (arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, ribosa, sacarosa y xilosa) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Las muestras de jugos fueron diluidas al 20 % (v/v) en una solución 50:50 (v/v) acetonitrilo/agua, se filtraron a través de acrodiscos con membrana de nylon (0.45 μm) acoplados a jeringas de polipropileno de 5 ml, ambos de Waters (Milford, Ct), y se analizaron inmediatamente.

Análisis por HPLC

Se utilizó un equipo cromatográfico Agilent HP serie 1100 (Waldbronn, Alemania), compuesto por desgasificador, bomba cuaternaria, compartimiento de la columna y detector de índice de refracción. Las muestras se inyectaron al sistema con una jeringa Lc de 50 μL de Agilent (Sydney, Australia) y el inyector manual fue Rheodyne de 20 μL (Cotati, Ca.). Como fase estacionaria se utilizó una columna Zorbax específica para carbohidratos (4.6 mm i. d. x 250 mm x 5 μm de tamaño de partícula) de Agilent (Palo Alto, Ca.).

Condiciones cromatográficas. Las separaciones cromatográficas de los carbohidratos se lograron en una fase móvil con una proporción 75:25 (v/v) de acetonitrilo-agua. El flujo del diluyente fue de 1.4 ml/min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 μl (con el inyector completamente lleno). El tiempo de separación cromatográfica fue de 15 min. La temperatura del compartimiento de la columna y del detector se mantuvieron a 30 °C; la temperatura del laboratorio se mantuvo constante a 20 °C. Para el control del sistema y el análisis de resultados se empleó el software HP Chem Station para LC Rev A. 09. 03 de Agilent (Palo Alto, Ca.).

Identificación y cuantificación. Los azúcares presentes en los jugos de maguey fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención, con los correspondientes a los estándares del kit de carbohidratos CAR-11. En la Figura 3 se presenta el cromatograma de una mezcla de carbohidratos puros separados por la columna Zorbax del HPLC y detectados por su índice de refracción. Todos los estándares de carbohidratos pudieron ser separados en una operación sencilla. En el Cuadro 1 se observan los tiempos de retención de dichos estándares, los cuales fueron relativamente constantes, con ligeras

variaciones cuando la temperatura del laboratorio superaba los 20 °C. Sólo xilosa, fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa pudieron ser identificadas en los jugos, mismos carbohidratos que han sido previamente observados en otras especies de *Agave* (12, 13, 23, 25). Los restantes carbohidratos no se encontraron o presentaron concentraciones traza que estaban por debajo del límite de detección. La afinidad de los carbohidratos hacia la fase estacionaria presentó el siguiente orden: monosacáridos (pentosas < hexosas) < disacáridos. Esto coincide con lo observado en cromatogramas generados por HPLC, para identificar carbohidratos de champiñón común (*Agaricus bisporus*) (26).

La cuantificación de los azúcares se realizó por el método de estándar externo, el cual permite calcular la concentración tomando como base el área bajo la curva del cromatograma correspondiente a cada carbohidrato, y su comparación con la generada para los estándares, cuya concentración es conocida.

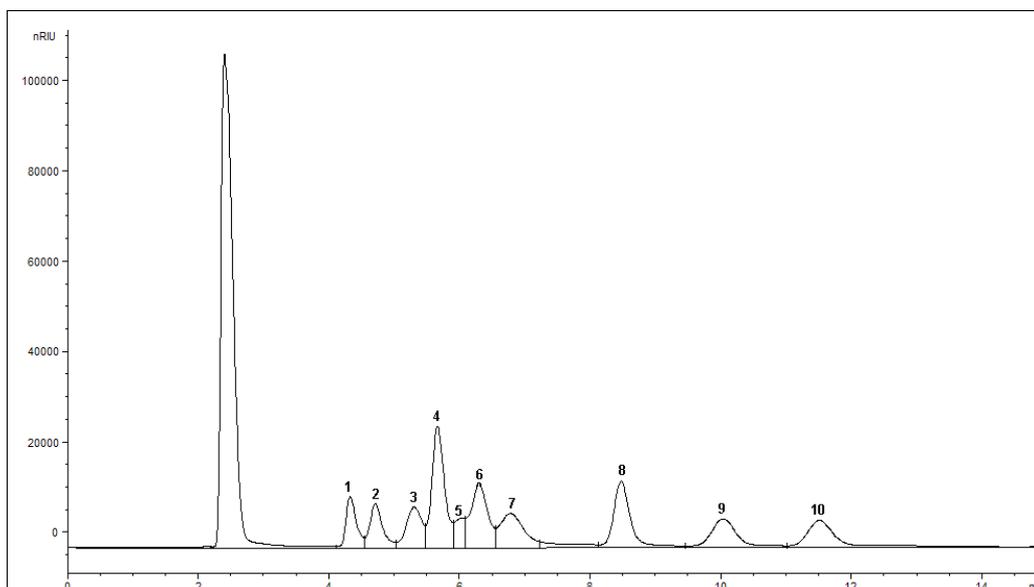


Figura 3. Tiempos de retención de 10 estándares utilizados para la identificación de carbohidratos: (1) ribosa, (2) xilosa, (3) arabinosa, (4) fructosa, (5) manosa, (6) glucosa, (7) galactosa, (8) sacarosa, (9) maltosa y (10) lactosa. La concentración de cada estándar fue de 5 % (w/v) en una solución 50:50 (v/v) acetonitrilo/agua (volumen de inyección 20 µl). El primer pico representa el cambio de fase.

La curva de calibración para cada carbohidrato se generó con soluciones estándar al 2 %, 4 %, 6 %, 8 % y 10 % (v/v). Se calcularon los coeficientes de

correlación (r) entre los valores de refracción de las muestras y de los estándares para cada azúcar, y estimar así la consistencia del detector en la amplitud de concentraciones; los valores de r variaron entre 0.9980 y 0.9999 (Cuadro 1). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, y diariamente se inyectó una mezcla de estándares para reconocer posibles variaciones en la calibración.

Diseño experimental y análisis estadísticos

El experimento se condujo de acuerdo con un diseño completamente aleatorio, con arreglo factorial de tratamientos (3x5x3). Los factores y niveles fueron: a) estado de madurez: plantas tiernas o inmaduras, plantas quiotillas o en reproducción incipiente y plantas con un año de castradas; b) órgano o estructura: tallo, base de la hoja o penca, cuello de la penca, ala de la penca y ápice de la penca; c) hidrólisis: jugos crudos, jugos hidrolizados térmicamente y jugos hidrolizados con ácido. Las concentraciones obtenidas de los carbohidratos en los jugos crudos e hidrolizados, fueron sometidas a un análisis de varianza (SAS, versión 8, SAS, Inc., Cary, NC.).

Cuadro 1. Tiempos de retención (min) de los estándares utilizados en la columna Zorbax para carbohidratos y coeficientes de correlación entre la refracción de muestras y estándares.

Carbohidrato ^a	t _R ^b (min)	Coefficiente de correlación
Ribosa	4.32	
Xilosa	4.71	0.9999
Arabinosa	5.30	
Fructosa	5.66	0.9996
Manosa	6.03	
Glucosa	6.30	0.9997
Galactosa	6.78	
Sacarosa	8.48	0.9980
Maltosa	10.04	0.9994
Lactosa	11.51	

^a Los límites de detección se encontraron entre 2 y 10 % (w/v) para jugos crudos e hidrolizados,

^b La desviación estándar en los tiempos de retención (t_R) fue en todos los casos menor que ± 0.15 min.

Resultados y discusión

Azúcares en los jugos de maguey

Sólo se registró la presencia destacable de xilosa, fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa (Cuadro 2). La sacarosa es el primer disacárido en ser hidrolizado por la planta al requerirse energía en diversos procesos metabólicos (27, 28). La xilosa solamente ha sido encontrada en concentraciones traza en las plantas, asociada con polisacáridos estructurales como la hemicelulosa, o en la pared celular primaria asociada con xiloglucano (29). La maltosa se forma únicamente a partir de la hidrólisis del almidón transitorio, lo cual sucede en las hojas durante la noche, y es utilizada inmediatamente como fuente de energía (30, 31). Las concentraciones de los cinco azúcares identificados en las muestras de jugos de maguey presentaron variaciones específicas en dependencia de los factores fracción de la planta, estado de madurez e hidrólisis.

La hidrólisis térmica y ácida aumentó considerablemente la concentración de fructosa en comparación con la registrada en los jugos crudos, efecto también documentado en jugos de maguey tequilero (*Agave tequilana* Weber) (23). En general, la mayor concentración de fructosa se observó en los jugos hidrolizados provenientes del tallo, lo cual confirma que en esta fracción de la planta es donde se acumula la mayor proporción de inulina, como energía de reserva en los magueyes (12). El tratamiento de hidrólisis sólo provocó un ligero aumento en la concentración de glucosa, pues la inulina además de fructosa, contiene dos unidades de glucosa por molécula (13), y los jugos probablemente carecen de almidón que pudiera generarla. La ausencia en los jugos del resto de los carbohidratos del estándar utilizado, se explica por su naturaleza y origen. Así, la arabinosa y la manosa se encuentran generalmente asociadas a glucoproteínas animales y en los vegetales sólo se localizan en las paredes celulares en baja concentración; en cambio, la galactosa forma parte de la lactosa y ambas son de origen animal, y la ribosa es un componente del ácido ribonucleico y del núcleo de las células animales (32, 33, 34). Debido a que la glucosa y la fructosa se presentaron en mayor concentración, sólo para estos azúcares se practicaron los análisis de variación; los cuadrados medios y la prueba de F se observan en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Concentración media (mg/ml) de azúcares en jugos de maguey (*Agave salmiana*) (n=3).

	Tratamiento	Xilosa	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Total
1)	I - TT - C	7.958	8.392	8.304	0.825	1.762	27.241
2)	I - TT - HT	4.549	52.806	14.421	7.792	2.933	82.501
3)	I - TT - HA	3.483	81.338	20.225	2.151	2.775	109.973
4)	I - PB - C	6.121	4.858	12.222	2.136	2.202	27.539
5)	I - PB - HT	0.922	13.900	9.306	2.038	0.406	26.571
6)	I - PB - HA	2.047	29.058	13.947	0.525	4.222	49.798
7)	I - PC - C	4.486	9.904	9.528	0.855	1.549	26.321
8)	I - PC - HT	2.100	13.350	6.811	0.846	0.494	23.601
9)	I - PC - HA	2.872	32.097	12.033	0.892	2.623	50.517
10)	I - PA - C	9.073	8.671	8.019	0.793	1.302	27.858
11)	I - PA - HT	3.970	15.171	7.269	1.421	0.438	28.268
12)	I - PA - HA	2.157	22.012	9.742	0.000	1.598	35.508
13)	I - PP - C	12.946	5.262	9.898	4.334	4.857	37.297
14)	I - PP - HT	6.017	13.328	7.872	0.934	4.735	32.886
15)	I - PP - HA	3.825	29.959	8.963	0.000	0.868	43.615
16)	Q - TT - C	2.916	2.946	4.448	2.180	1.397	13.886
17)	Q - TT - HT	1.998	68.687	10.456	8.903	4.178	94.221
18)	Q - TT - HA	2.310	155.910	26.927	0.843	2.770	188.760
19)	Q - PB - C	0.891	4.017	5.978	4.187	9.543	24.616
20)	Q - PB - HT	0.633	36.226	13.608	3.904	1.552	55.924
21)	Q - PB - HA	3.033	82.605	18.745	1.870	1.968	108.222
22)	Q - PC - C	2.428	2.487	7.966	2.370	5.560	20.811
23)	Q - PC - HT	3.348	44.274	16.250	3.674	2.646	70.193
24)	Q - PC - HA	2.412	84.622	14.703	1.367	1.543	104.647
25)	Q - PA - C	13.867	3.668	8.899	0.848	0.677	27.958
26)	Q - PA - HT	2.649	26.499	12.901	3.437	2.328	47.813
27)	Q - PA - HA	3.410	48.338	14.487	3.702	1.008	70.945
28)	Q - PP - C	12.009	7.035	9.272	2.550	3.270	34.136
29)	Q - PP - HT	4.841	24.372	12.028	4.624	3.197	49.063
30)	Q - PP - HA	1.120	49.718	12.073	5.005	0.000	67.916
31)	C - TT - C	2.723	2.487	4.506	2.933	5.599	18.249
32)	C - TT - HT	4.259	43.257	11.073	4.787	3.541	66.917
33)	C - TT - HA	0.378	145.310	20.773	2.822	0.240	169.523
34)	C - PB - C	0.779	3.159	10.845	3.601	11.361	29.744
35)	C - PB - HT	2.150	30.413	8.672	3.897	0.828	45.960
36)	C - PB - HA	0.670	48.475	15.930	1.987	0.785	67.846
37)	C - PC - C	4.209	5.789	10.844	5.330	3.777	29.949
38)	C - PC - HT	2.671	25.093	10.033	2.176	2.085	42.058
39)	C - PC - HA	0.365	70.420	13.730	1.472	1.415	87.401
40)	C - PA - C	3.500	6.504	12.056	2.016	1.062	25.139
41)	C - PA - HT	5.958	32.169	14.679	4.290	2.063	59.159
42)	C - PA - HA	2.377	67.783	16.036	2.453	0.000	88.649
43)	C - PP - C	4.891	4.803	11.280	2.681	1.816	25.472
44)	C - PP - HT	4.997	34.713	13.056	5.115	1.932	59.812
45)	C - PP - HA	1.688	61.350	15.039	1.028	0.000	79.106

* Factor madurez: I = tierno o inmaduro; Q = quietillo o en reproducción incipiente; C = castrado. Factor órgano o estructura: TT = tallo; PB = base de la hoja o penca; PC = cuello de la penca; PA = ala de la penca; PP = ápice de la penca. Factor hidrólisis: C = jugos crudos; HT = jugos hidrolizados a 80 °C durante 30 h; HA = Jugos hidrolizados con ácido sulfúrico concentrado durante 2 h.

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza y prueba de F para la concentración (mg/ml) de fructosa y glucosa en maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*).

	G. L.	Glucosa	Fructosa
Madurez	2	0.6033	50.9014*
Fracción	4	0.2465	66.1515*
Hidrólisis	2	5.0879*	434.8382*
Madurez x hidrólisis	4	0.5349	27.0683*
Fracción x hidrólisis	8	0.8464*	27.6592*
Fracción x madurez	8	0.2589	3.0578
Fracción x madurez x hidrólisis	16	0.1190	2.7603
Error	90	0.2513	2.9231
C. V. (%)		42.101	49.2154

*Significativo en los niveles de probabilidad de 0.05, G. L. = Grados de libertad; CV = Coeficiente de variación.

Variación en la concentración de glucosa y fructosa

De acuerdo con la prueba de F, se carece de evidencias estadísticas de que el factor madurez altere la concentración de glucosa en los jugos de maguey (Figura 4). Esto se debe probablemente a que este monosacárido, después de generarse en la fotosíntesis, no se acumula libremente en la planta, pues es utilizado inmediatamente como fuente de energía, y el excedente se isomeriza en fructosa, o con ambos se forma sacarosa, la cual es utilizada como azúcar de transporte (9). La significación estadística de la interacción fracción x hidrólisis (Cuadro 3, Figura 5) muestra que sólo la hidrólisis ácida, la más enérgica, incrementó la cantidad de glucosa en los jugos, pero que este incremento presentó un gradiente desde un máximo en el tallo hasta ser nulo en el ápice de la hoja. Esta mayor concentración de glucosa parece derivarse principalmente de la hidrólisis ácida de la inulina (dos unidades de glucosa por molécula) (13), la cual tiende a acumularse en el tallo, pero también puede proceder de la hidrólisis de la sacarosa y de maltosa, particularmente en los jugos extraídos de las porciones de las pencas (Figura 5).

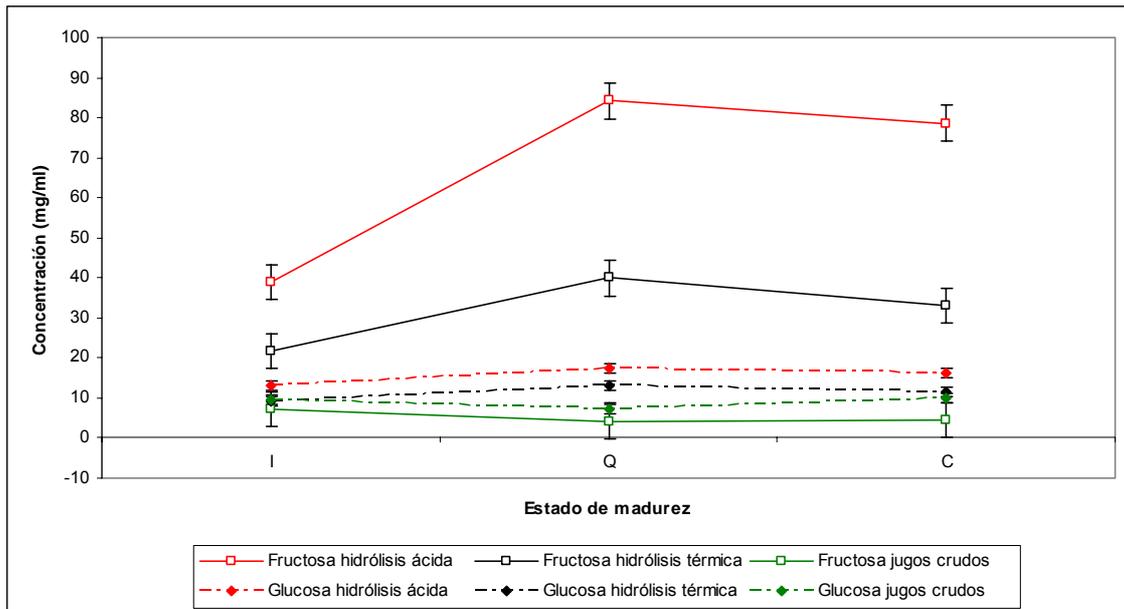


Figura 4. Efectos del estado de madurez y la hidrólisis sobre la concentración (\pm EE) de fructosa y glucosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*). (I = tierno o inmaduro; Q = quiotillo o en reproducción incipiente; C = castrado).

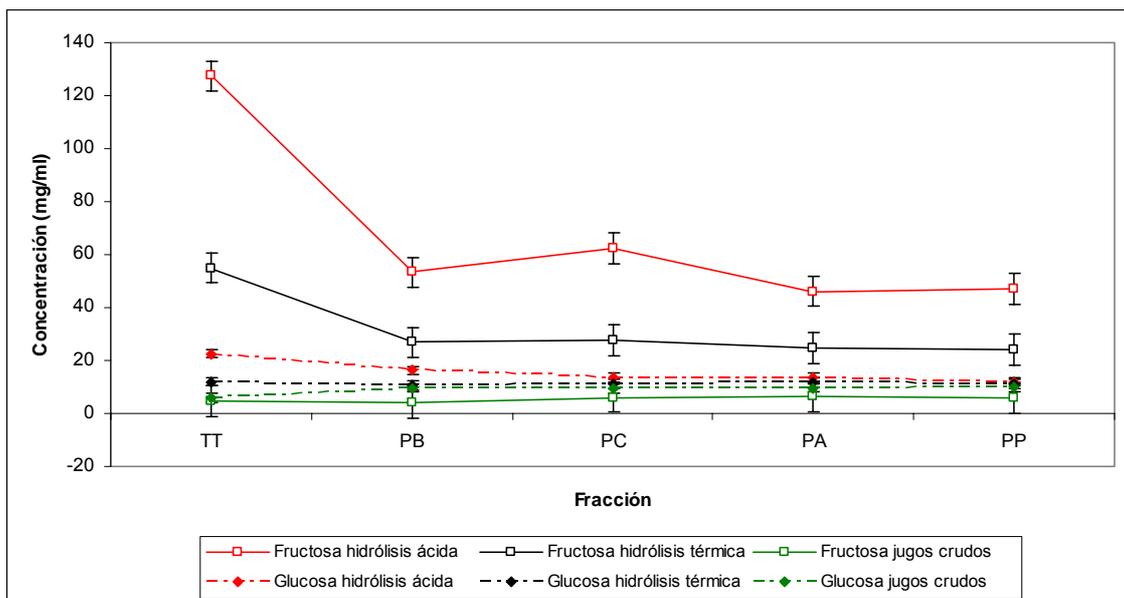


Figura 5. Efectos de la fracción de la planta y la hidrólisis sobre la concentración (\pm EE) de glucosa y fructosa en jugos de maguey (*Agave salmiana*). (TT = tallo; PB = base de la hoja o penca; PC = cuello de la penca; PA = ala de la penca; PP = ápice de la penca).

En cuanto a la fructosa, la interacción estadísticamente significativa madurez x hidrólisis (Cuadro 3), acredita la importancia de la madurez en la acumulación de carbohidratos de reserva (inulina), los cuales al hidrolizarse liberan su fructosa (23). Como se observa en la Figura 4, la concentración de fructosa en los jugos hidrolizados es máxima en el estado de madurez quiotillo, lo cual se puede relacionar con el inicio de la reproducción, ya que estas

reservas se canalizan al desarrollo y mantenimiento de las estructuras reproductoras, si la planta se mantiene intacta (16). Con el inicio de la fase reproductora, comienza la senescencia general de la planta, y la castración lo que hace es retardarla y alargar el periodo de aprovechamiento con mermas mínimas de reservas útiles. Esta tendencia se percibe también en los jugos sin hidrolizar, y en general es concordante con estudios previos (23).

La interacción fracción x hidrólisis, también estadísticamente significativa (Cuadro 3), indica que el efecto de la hidrólisis sobre la concentración de fructosa depende además de la fracción de la planta de la que se hayan extraído los jugos (Figura 5). Así, en tanto que la concentración de fructosa en los jugos crudos fue mínima y casi idéntica en las diferentes fracciones, en los jugos hidrolizados derivados del tallo se eleva notablemente, y en los jugos de las porciones de la penca se aprecia un incremento mucho menor y decreciente conforme se alejan del tallo. Estas tendencias confirman la función del tallo como órgano de almacenamiento de carbohidratos de reserva (inulina) (12, 13, 16), y sugieren que la fructosa en las pencas se incrementa posiblemente como resultado de la hidrólisis de la sacarosa, pero sobre todo de las cadenas de fructosa en proceso de polimerización hacia inulina, o de las resultantes de la hidrólisis metabólica de dicha inulina.

Cabe destacar la gran diferencia (más que el 100 %) entre la riqueza de fructosa generada por ambos tipos de hidrólisis, aunque sólo haya sido estadísticamente significativa (Tukey $\alpha=0.05$) en los jugos extraídos de los tallos de magueyes quiotillos y castrados. Es probable que la hidrólisis térmica de la inulina existente en las cabezas enteras, como se realiza actualmente en las fábricas de mezcal, sea aun más incompleta, y que aquí radique una de las causas principales de la ineficiencia registrada en sus procesos de producción (16).

Conclusiones

Los jugos crudos del maguey mezcalero contienen fructosa, glucosa, sacarosa, xilosa y maltosa, en cantidades relativamente pequeñas y similares entre sí, con independencia estadística de los estadios de madurez y fracciones de la planta estudiadas.

La hidrólisis sólo provocó incrementos notables de fructosa, particularmente en los jugos procedentes de los tallos de magueyes maduros (quiotillos y castrados). En estos casos la hidrólisis ácida superó estadísticamente la liberación de fructosa alcanzada con la hidrólisis térmica.

Agradecimientos

Este trabajo recibió financiamiento del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de San Luis Potosí (clave SLP-2002-C01-3790).

El Biól. Antonio Camacho Benítez (Analitek. Monterrey, México) proporcionó el respaldo técnico oportuno durante el análisis por HPLC.

La Quim. María del Socorro Jasso Espino colaboró durante el trabajo de laboratorio.

Literatura citada

1. Goldstein, G.; Ortega, J. K.; Nerd, A. y P. S. Nobel. Diel patterns of water potential components for the crassulacean acid metabolism plant *Opuntia ficus-indica* when well-watered on droughted. *Plant Physiology*. **1991**. 95: 274-280.
2. Nobel, P. Responses of some North American CAM plants to freezing temperatures and doubled CO₂ concentrations: explications of global climate change for extending cultivation. *Journal of Arid Environments*. **1996**. 34: 187-196.
3. Rojas G., M. *Fisiología vegetal aplicada*. McGraw-Hill. México. **1972**. 302 p.
4. Gil M., F. Elementos de fisiología vegetal. Mundiprensa. Madrid, España. **1995**. 1147 p.
5. Gibbs, M. Metabolism of carbon compounds. *Annu. Rev. Plant Physiology*. **1959**.10: 329-378.
6. Mendicino, J. Sucrose phosphate synthesis in wheat germ and green leaves. *The Journal of Biological Chemistry*. **1960**. 235(12): 3347- 3352.
7. Rorem, E. S.; Walter, H. G. y R. M. McCready. Biosíntesis of sucrose and sucrose phosphate in sugar beet leaf extract. *Plant Physiology*. **1960**. 35: 269-272.
8. Claassen, P. A.; Budde, M.A.; de Ruyter, H. J.; van Calker, M. H. y van Es, A. Potential role of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase in carbohydrate metabolism of cold stored tubers of *Solanum tuberosum* cv Bintje. *Plant Physiology*. **1991**. 95: 1243-1249.
9. Babb, V. M. y C. H. Haigler. Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiology*. **2001**. 127: 1234-1242.
10. Davies, C. y S. P. Robinson. Sugar accumulation in grape berries. *Plant Physiology*. **1996**. 111: 175-273.
11. Devlin, R. *Fisiología vegetal*. Omega. España. **1980**. 517 p.
12. Wang, N. y P. S. Nobel. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology*. **1998**. 116: 709-714.

13. López, M. G.; Mancilla-Margalli, N. A. y G. Mendoza-Díaz. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**. 51: 7835-7840.
14. Won Y., J.; Hyun K., D.; Woo K., B. y S. Koo S. Production of inulo-oligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **1997**. 84(4): 369-371.
15. Nakamura, T.; Ogata, Y.; Shitara, A.; Nakamura, A. y K. Ohta. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. *Journal of Fermentation and bioengineering*. **1995**. 80(2): 164-169.
16. Aguirre, R. J. R; Charcas, H; Flores; J. L. *El maguey mezcalero potosino*; Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología: San Luis Potosí. **2001**. 87 p.
17. Skoog, D.; West, D. M. *Química analítica*. Mc. Graw Hill. México. **1986**. 725 p.
18. Hofer, K. y D. Jenewein. Enzymatic determination of inulin in food and dietary supplements. *Eur Food Res Technol*. **1999**. 209: 423-427.
19. Lee, H. S.; Coates, G. A. Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus juices by HPLC and a literature compilation. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*. **2000**. 23 (14), 2123-2141.
20. Chinnici, F.; Spinabelli, U.; Amati, A. Simultaneous determination of organic acids, sugars, and alcohols in musts and wines by an improved ion-exclusion HPLC method. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*. **2002**. 25 (16), 2551-2560.
21. Mora, M. I.; Marioli, J. M. Honey carbohydrate analysis by HPLC, with electrochemical detection, using a Ni-Cr alloy electrode. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*. **2001**. 24 (5), 711-720.
22. Michel C., C. Mejoramiento de la eficiencia en la molienda en el proceso de elaboración de mezcal potosino. *Tesis profesional*. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. SLP. **2004**. 71 p.

23. López, M. G. y N. Mancilla-Margalli. Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**. 50, 806-812.
24. Saha. B. C. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Enzyme and microbial technology*. **2006**. 39(5): 991-995.
25. Srinivasan, M.; Bathia, I. S. The Carbohydrates of *Agave vera cruz* Mill. *Biochem. J*. **1953**. 55, 286-289.
26. Wannet, W. J.; Hermans, J. H.; van der Drift, C. y H. J. Op den Camp. HPLC detection of soluble carbohydrates involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**. 48, 287-291.
27. Echeverria, E. Developmental transition from enzymatic to acid hydrolysis of sucrose in acid limes (*Citrus aurantifolia*). *Plant Physiology*. **1990**. 92: 168-171.
28. Davies, C. y S. P. Robinson. Sugar accumulation in grape berries. *Plant Physiology*. **1996**. 111: 175-273.
29. Hayashi, T.; Koyama, T. y K. Matzuda. Formation of UDP-xylose and xyloglucan in soybean golgi membranas. *Plant Physiology*. **1988**. 87: 341-345.
30. Weise, S. E.; Kim, K. S.; Stewart, R. P. y T. D. Sharkey. β - maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiology*. **2005**. 137: 756-761.
31. Lu, Y.; Gehan, J. P. y T. D. Sharkey. Daylength and cicardian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiology*. **2005**. 138: 2280-2291.
32. Herrera, E. Elementos de bioquímica. Interamericana McGraw-Hill. México. **1993**. 1076 p.
33. Mathews, K. C.; K. E. van Holde; K. G. Ahern. Bioquímica; 3^a Ed; Addison Wesley. Madrid. **2002**. 1335 p.
34. Lehninger, A. L. Bioquímica. Omega. Barcelona, España. **2005**. 1117 p.