



**CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

**“BIOSÍNTESIS *IN VITRO* DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN EL SISTEMA
Agave tequilana – Fragaria x ananassa”**

Tesis que presenta

Paulina Guevara Domínguez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad

BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Directora de tesis: Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez

Irapuato, Gto. México

Agosto, 2017

COMITÉ TUTORIAL

Dra. López Pérez Mercedes Guadalupe. Profesora Investigadora del departamento de biotecnología y bioquímica. CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Dra. Simpson Williamson June Kilpatrick. Profesora Investigadora del departamento de Ingeniería Genética. CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Dr. Ordaz Ortiz José Juan. Profesor investigador de la Unidad de Genómica Avanzada. CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de **Química de Productos Naturales** del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la **Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez** profesora investigadora del departamento de Biotecnología y Bioquímica.

Los estudios de Maestría fueron posibles gracias a la beca otorgada por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) y los apoyos económicos del Departamento de becas y Estímulos de Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (**CINVESTAV-IPN**) y del Laboratorio de Química de Productos Naturales de **CINVESTAV Irapuato**.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mercedes G. López Pérez por su infinita paciencia, apoyo y enseñanzas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindando a lo largo de estos dos años.

A mi comité tutorial por su apoyo, comentarios y preguntas durante las evaluaciones.

A la M. en C. María de Jesús Alvarado por su apoyo técnico incondicional.

Al equipo “Agavinas” Laboratorio de Química de Productos Naturales por su ayuda y por hacer del laboratorio un lugar más divertido 😊

A mi familia por siempre creer en mí, apoyarme y amarme ❤️

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIACIONES EMPLEADAS EN EL TEXTO	x
UNIDADES DE MEDIDA USADAS EN EL TEXTO	xi
I. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Fructanos	3
II.1.1 Clasificación de los fructanos.	3
II.1.1.1 Por grado de polimerización.	3
II.1.1.2 Por ausencia o presencia de glucosa.....	3
II.1.1.3 Por tipo de enlace glicosídico (Figura 1).	3
II.1.2 El papel de fructanos en plantas.	5
II.1.3 Metabolismo de los fructanos en plantas.....	6
II.1.3.1. Fructosiltransferasas de la familia GH 32.....	6
II.1.4. Enzimas que participan en la síntesis de fructanos.	8
II.1.4.1. Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST).....	9
II.1.4.2. Fructan:fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT)	9
II.1.4.3. Sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa (6-SFT).....	9
II.1.4.4. Fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT).....	9
II.1.4.5. Fructan-exohidrolasas (FEH)	9
II.1.4.6. Invertasas	9
II.2. El agave y sus fructanos.	10
II.2.1. Género agave	10
II.2.2. <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.....	10
II.2.3. Fructanos de Agave.	11
II.2.4. Fructosiltransferasas de <i>Agave tequilana</i>	12
II.2.4.1. 1-SST.....	12
II.2.4.2. 1-FFT.....	12
II.2.4.3. 6G-FFT	13
II.2.4.4. 6-SFT.....	13

II.2.4.5. FEH	13
II.2.4.6 Invertasas vacuolares (InvV) y de pared celular (CWInv).....	13
II.3. Síntesis de FOS <i>in-vitro</i>.	14
II.3.1. Fuentes alternativas de sustratos para la síntesis de FOS.	15
II.4. <i>Fragaria x ananassa</i>.	16
II.4.1. La corona de <i>Fragaria x ananassa</i>	16
II.4.2. Estatus comercial y mexicano	17
II.4.3. <i>F. x ananassa</i> variedad Nikté y Pakal	18
II.5. FOS y salud.	19
II.5.1. ¿Por qué sintetizar FOS?	19
II.5.2 Estatus comercial de fructooligosacáridos.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPOTESIS	22
V. OBJETIVOS.	23
V.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	24
VI.1. <i>Agave tequilana</i>.	25
VI.1.1. Material vegetal.....	25
VI.1.1.1 Selección y manipulación del material vegetal.....	25
VI.1.2. Obtención de protoplastos.	25
VI.1.2.1. Visualización de protoplastos	26
VI.1.2.2. Conteo de células viables/ml	26
VI.1.2.3. Cuantificación de proteína.....	26
VI.2. <i>Fragaria x ananassa</i>.	27
VI.2.1. Selección del material vegetal.	27
VI.2.1.1. Obtención de coronas de <i>F. x ananassa</i>	27
VI.2.1.2 Extracción de carbohidratos de corona de <i>F. x ananassa</i>	27
VI.2.2. Caracterización de fructanos de corona de <i>Fragaria x ananassa</i>	28
VI.2.2.1. Cromatografía de capa fina (TLC) de fructanos de corona.	28
VI.2.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) de fructanos de corona.....	28
VI.3. Biosíntesis de fructanos en el sistema <i>A. tequilana – F. x ananassa</i>	28

VI.3.1. Ensayo de síntesis enzimática.....	28
VI.3.2. Caracterización y cuantificación de productos en el sistema <i>A. tequilana</i> – <i>F. x ananassa</i>	29
VI.4. Análisis estadístico.....	29
VI.4.1. ANOVA.	29
VII. RESULTADOS	30
VII.1. <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté a través de su desarrollo.....	30
VII.1.1. Plantas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté.	30
VII.1.2. Coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté.....	31
VII.1.3. Perfil de carbohidratos en coronas de <i>F. x ananassa</i> durante su ciclo biológico.....	32
VII.1.3.1 Extracción térmica de carbohidratos.....	32
VII.1.3.2 Identificación de carbohidratos por cromatografía de capa fina.	32
VII.1.3.3. Cuantificación de carbohidratos solubles.....	33
VII.2. Protoplastos de <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul.....	39
VII.2.1. Obtención de protoplastos.	39
VII.2.2. Actividad FAZY de protoplastos de <i>A. tequilana</i> de 4 años de edad.	41
VII.3. Biosíntesis de FOS en el sistema <i>A. tequilana</i> – <i>F. x ananassa</i>	41
VII.3.2. Identificación de productos en el sistema <i>A. tequilana</i> – <i>F.x ananassa</i> mediante HPAEC-PAD.....	42
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	45
VIII.1. <i>Fragaria x ananassa</i>	45
VIII.2. Obtención de protoplastos.	46
VIII.2.1 Actividad FAZY.....	46
VIII.3. Biosíntesis <i>in-vitro</i> de FOS.....	46
IX. CONCLUSIONES.....	48
X. REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las glicosilhidrolasas.....	7
Tabla 2. Tamaño de coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté a través de su ciclo biológico	31
Tabla 3. Concentración de carbohidratos en coronas de <i>F. x ananassa</i> durante el ciclo biológico.	39
Tabla 4. Concentración de proteína en protoplastos de <i>A. tequilana</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los fructanos de acuerdo al tipo de enlace glicosídico	5
Figura 2. Metabolismo de carbohidratos en una célula vegetal.....	6
Figura 3. Mecanismo de acción general de las fructosiltransferasas en presencia de sacarosa.....	6
Figura 4. Estructura de 1-FEH de <i>Cichorium intybus</i>	8
Figura 5. Catálisis ácido/base de las fructosiltransferasas.....	8
Figura 6. Fructanos de <i>A. tequilana</i> a través del ciclo biológico.....	12
Figura 7. Diagrama general de síntesis de fructanos en <i>A. tequilana</i>	13
Figura 8. Coronas de <i>Fragaria x ananassa</i>	17
Figura 9. Diagrama general de trabajo para la biosíntesis de FOS en el sistema <i>A. tequilana</i> - <i>F. x ananassa</i>	24
Figura 10. Plantas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté a través del desarrollo	30
Figura 11. Coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté en diferentes etapas de desarrollo.....	31
Figura 12. Perfil de carbohidratos de corona de <i>F. x ananassa</i> variedad Nikté y Pakal por cromatografía de capa fina (TLC).	32
Figura 13. Perfil de glucosa, fructosa y sacarosa en coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal	34
Figura 14. Perfil de FOS y MOS en coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal	35
Figura 15. Perfil de glucosa, fructosa y sacarosa en coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Nikté.....	37
Figura 16. Perfil de FOS y MOS en coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Nikté.....	38
Figura 17. Mesontle de <i>A. tequilana</i> de diferentes edades de La Romita, Guanajuato, México.....	40
Figura 18. Protoplastos de <i>A. tequilana</i> de 4 años de edad.....	40
Figura 19. Actividad FAZY de protoplastos de <i>A. tequilana</i> de 4 años de edad.....	41
Figura 20. Biosíntesis de fructooligosacáridos a diferentes concentraciones de sustrato .	42
Figura 21. Biosíntesis de FOS en el sistema <i>A. tequilana</i> - <i>F.x ananassa</i>	43
Figura 22. Cinética de formación de productos en sistema <i>A. tequilana</i> - <i>F. x ananassa</i>	44

ABREVIACIONES EMPLEADAS EN EL TEXTO

1-K	1-Kestosa
1-N	1-Nistosa
1-FFT	Fructan:fructan 1-fructosiltransferasa
1-SST	Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa
6G-FFT	Fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa
6-K	6-Kestosa
6-SFT	Sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa
A.t.	<i>Agave tequilana</i>
Conc.	Concentración
DP	Grado de polimerización (por sus siglas en inglés)
DP5	Kestopentosa
EGTA	Trietilen glicoldiamina ácido tetracético (Por sus siglas en inglés)
F	Fructosa
FAZY	Enzimas activas de agave (por sus siglas en inglés)
FEH	Fructan hexohidrolasa
FTFs	Fructosiltransferasas
FOS	Fructooligosacáridos
G	Glucosa
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico
mes	2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
NaOH	Hidróxido de sodio
RNE	Raftiline
RSE	Raftilose
Tris HCl	Tris ácido clorhídrico

UNIDADES DE MEDIDA USADAS EN EL TEXTO

%	Porcentaje
g	Gramos
h	Horas
M	Molar
mbar	Milibares
mg	Miligramos
min	Minutos
Mm	Milimolar
rpm	Revoluciones por minuto
μl	Microlitros

I. RESUMEN

Los fructanos, son polímeros de fructosa lineales o ramificados unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta(2, 1)$ y $\beta(2, 6)$, por su grado de polimerización (DP) los fructooligosacáridos (FOS) son aquellos que tienen entre 2 y 14 unidades de fructosa. Los fructanos se sintetizan y almacenan en las vacuolas de las células vegetales por medio de enzimas fructosiltransferasas, donde los sustratos principales para iniciar la síntesis son sacarosa y otros FOS como 1-kestosa. Entre los sistemas vegetales que sintetizan este tipo de carbohidratos destaca la planta de *Agave tequilana*, en donde el DP y la complejidad molecular está directamente relacionada con la edad, encontrando FOS entre los 2 y los 5 años de edad en campo. Muchos esfuerzos se han realizado para sintetizar FOS a escala industrial, sin embargo, el uso de sustratos provenientes de desechos agrícolas ha sido poco explorado. Recientemente se ha reportado la presencia de FOS en frutos de *Fragaria vesca*, lo cual abre las posibilidades a que estos carbohidratos se encuentren en órganos de reserva como la corona de *Fragaria x ananassa*, planta ampliamente cultivada en México, específicamente en la región de Irapuato, Gto, la cual, puede ser utilizada como sustrato en la síntesis de FOS.

Los fructanos son utilizados en la industria alimentaria para diversos fines, sin embargo los FOS son utilizados para promover la salud. La actividad prebiótica de las agavinas ha sido evaluada en modelos murinos, mostrando un incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena corta, los cuales se han relacionados con la promoción de saciedad y reversión de desórdenes metabólicos causados por el sobrepeso u obesidad. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue obtener FOS usando como sustrato los carbohidratos de la corona de plantas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté durante su desarrollo biológico y protoplastos de *A. tequilana* como fuente de fructosiltransferasas. Se determinó la concentración y los tipos de carbohidratos presentes en ambas variedades de *F. x ananassa* durante tres etapas: Vegetativa, Florescencia y Frutescencia. La formación de productos en el sistema de biosíntesis se monitoreo mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) encontrándose que a las 12 y 24 horas de reacción la formación de 1-kestosa y 6-kestosa respectivamente alcanzan su máxima concentración, evidenciando la actividad FAZY (1-SST y 6-SFT). Hasta el momento no existen FOS sintéticos de agave en la industria alimenticia por lo que este sistema presenta una opción para la producción de prebióticos.

ABSTRACT

Founding around in 15% of vascular plants, fructans are polysaccharides with a short degree of polymerization constituted by D-fructose units with $\beta(2,1)$ and $\beta(2,6)$ linked, their storage and synthesis is perform in the vacuole through fructosyltransferases enzymes where the main substrate to initiate the synthesis are sucrose and other FOS like 1-kestose. In *A. tequilana* the native degree of polymerization (DP) and complex structure is related to the plant age, finding the shorter DP in young plants (2 to 5 years old). Many efforts has been made to synthesized FOS to an industrial scale, however, the use of agricultural wastes as a substrate has been poorly studied. Recently, the presence of small quantities of FOS in *Fragaria vesca* fruit has been report, open the possibilities to found these type of carbohydrates in other reserve organs such as the crown of *Fragaria x ananassa*, a plant extensively cultivated in Mexico, in the region of Irapuato, Gto, which can be used as a substrate in FOS biosynthesis.

Fructans can be used in the food industry in many forms, but only FOS are used as food ingredient to promote health, its prebiotic activity has been tested in mice and it is know that it's consume increase short fatty acid concentration (SCFA) which promotes satiety and decrease body mass index (BMI). For this reason the aim of this work was to generate FOS using *F. x ananassa* carbohydrates as substrates and *A. tequilana* protoplasts as the fructosyltransferases source. *A. tequilana* stem protoplasts of 3, 4 and 5 years old plants were obtained by cell wall hydrolysis following their precipitation and microscopy identification. Thermal extraction, thin layer chromatography (TLC) and high performance anion exchange chromatography with pulse amperometric detention (HPAEC-PAD) were used for FOS identification in strawberry crowns of Pakal and Nikté Mexican varieties during development. *In vitro* biosynthesis were carried out mixing *A. tequilana* protoplast and crown carbohydrates. FOS production was monitoring by HPAEC-PAD, founding the highest concentration of 1-kestose and 6-kestose at 12 and 24 hours respectively, and evidencing FAZY activity. Since there are no agave FOS in the food industry at the present time, we believe this system present a high potential for their production.

II. ANTECEDENTES

II.1. Fructanos

Los fructanos son polímeros lineales o ramificados compuestos por unidades de D-fructosa unidas mediante enlaces glicosídicos β (2,1) y β (2,6) más una unidad de D-glucosa en el extremo reductor ^{1,2}. Son altamente solubles en agua y así como el almidón y la sacarosa, actúan como carbohidratos de reserva en el 15% de las angiospermas, otros estudios indican que aumentan la tolerancia a la sequía y bajas temperaturas, por lo que su síntesis juega un papel importante en la supervivencia de estas bajo condiciones de estrés. Las bacterias y hongos también biosintetizan fructanos ³.

Por sus características físicas y químicas los fructanos han jugado un papel importante en la industria de alimentos, siendo utilizados como endulzantes, espesantes y emulsificantes, así mismo su uso como fibra prebiótica ha tomado importancia mundial, ya que se ha demostrado que su consumo tiene beneficios sobre la salud humana.

II.1.1 Clasificación de los fructanos.

Existen diferentes formas de clasificar a los fructanos:

- a) Por grado de polimerización.
- b) Por ausencia o presencia de glucosa.
- c) Por tipo de enlace glicosídico.

II.1.1.1 Por grado de polimerización.

Por grado de polimerización los fructanos se clasifican en fructooligosacáridos (FOS), que son aquellos formados por cadenas de grado de polimerización pequeño (entre 2 y 14 unidades) y fructanos, aquellos con 14 o más unidades de fructosa. La cadena de fructosas en los fructanos de sistemas vegetales son mucho más pequeñas y variables comparada con aquellos provenientes de bacterias, encontrando así grados de polimerización de entre 20 y 30 residuos de fructosa, los cuales pocas veces exceden un DP de 200 unidades ².

II.1.1.2 Por ausencia o presencia de glucosa.

Existen también aquellos con ausencia de glucosa (Serie Fn) como la inulobiosa e inulotriosa las cuales están presentes en las raíces de *Arctium lappa L.* ⁴ o se sintetizan como productos de la catálisis de 1-Kestosa en presencia de la enzima 6 G-FFT ⁵. Dentro de esta clasificación también se tiene a aquellos fructanos con presencia de glucosa en la cadena polimérica (Serie GFn).

II.1.1.3 Por tipo de enlace glicosídico (Figura 1).

En plantas las diferencias estructurales de los fructanos se pueden clasificar por el tipo de enlace glicosídico que presentan en:

A) Inulinas.

Son aquellos polímeros de fructosa lineales que tienen en su mayoría o exclusivamente enlaces glicosídicos β (2,1). Están presentes en especies de dicotiledóneas pertenecientes a la familia *Asterácea*, donde se encuentra la achicoria (*Cichorium intybus* L.), la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.), la alcachofa (*Cynara scolymus*), la flor de dalia (*Dahlia variabilis*) y el tubérculo yacón (*Polymnia sonchifolia*). Las moléculas con menor DP y más representativas de este grupo son la 1-kestosa y la inulobiosa ⁶.

B) Levanos.

Son fructanos de estructura lineal con enlaces β (2,6) entre las unidades de fructosa. Se encuentran de manera predominante en algunos pastos como *Dactylis Glomerata*. Sus moléculas representativas son la 6-kestosa y la levanobiosa ⁶.

C) Graminanos.

Los graminanos son fructanos mixtos y ramificados, que pueden tener en su estructura enlaces tipo β (2,1) y β (2,6) así como un residuo de glucosa terminal. Se ha reportado su presencia en trigo y cebada y en algunos miembros del orden Asparagales como *Arthropodium cirratum*, *Astelia banksii* y *Bulbinella hookeri* ^{7,8}.

D) Neo-series.

Son aquellos fructanos en los que la cadena de fructosas crece en ambos extremos de la molécula de glucosa. Se pueden encontrar levanos neo-series en la familia Liliácea como el ajo y los espárragos ^{9,10}, así como inulinas-neo series en la familia Poaceae (Livingston et al. 1993)

E) Agavinas.

Carbohidratos complejos presentes en el género agave altamente ramificados, con mayor proporción de enlaces β (2,1) en comparación con β (2,6) y presencia de glucosa interna y terminal ¹².

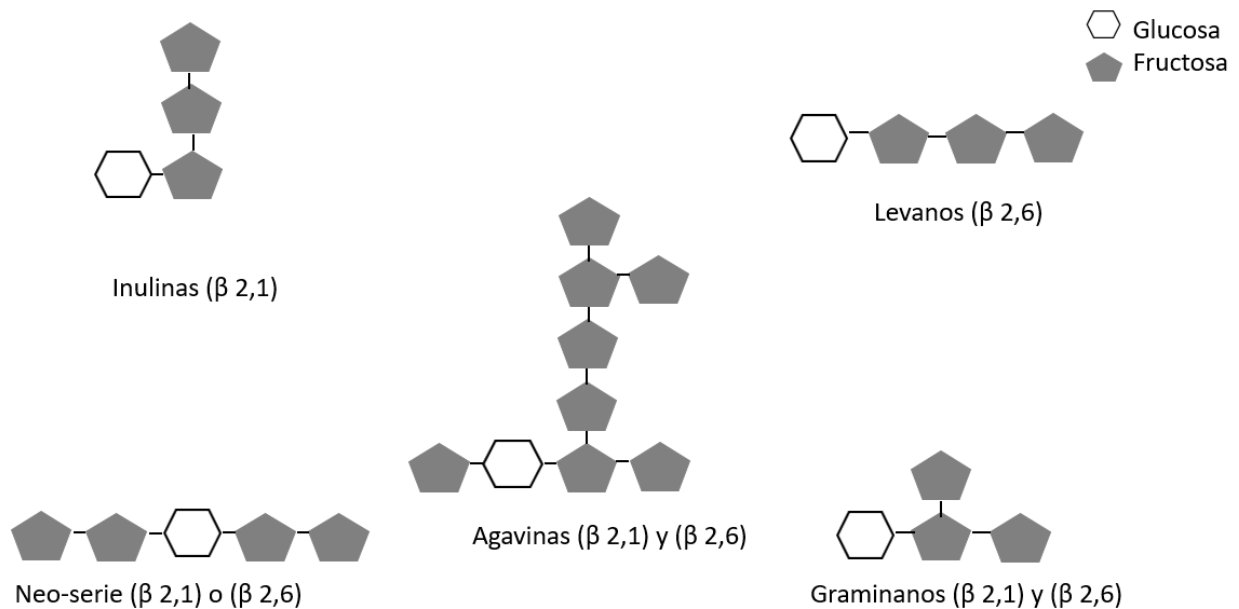


Figura 1. Clasificación de los fructanos de acuerdo al tipo de enlace glicosídico.

II.1.2 El papel de fructanos en plantas.

Hasta 45,000 especies de plantas, sintetizan, acumulan, procesan y degradan fructanos como parte de su metabolismo. La principal función de estos carbohidratos es servir como almacén energético, por lo que durante el crecimiento normal de éstas se acumulan en órganos de reserva como raíces, bulbillos y coronas, entre otros. En años recientes se han descubierto los diferentes papeles de los fructanos en las plantas, ya sea como moléculas mediadoras, especies reactivas de oxígeno y como moléculas protectoras contra el estrés salino y el déficit de agua ^{13, 14}.

Los fructanos se sintetizan y acumulan en vacuola, sin embargo otros estudios demuestran su presencia también en el apoplasto bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas, mecanismo que es posiblemente mediado a través de vesículas desde la vacuola hasta la membrana plasmática, la cual está implicada en el mecanismo de degradación de los fructanos ¹⁵.

El sustrato para la síntesis *de novo* de fructanos en las plantas es la sacarosa, y al igual que la sacarosa, los fructanos se almacenan y sintetizan en la vacuola por medio de enzimas específicas llamadas fructosiltransferasas ² (Figura 2).

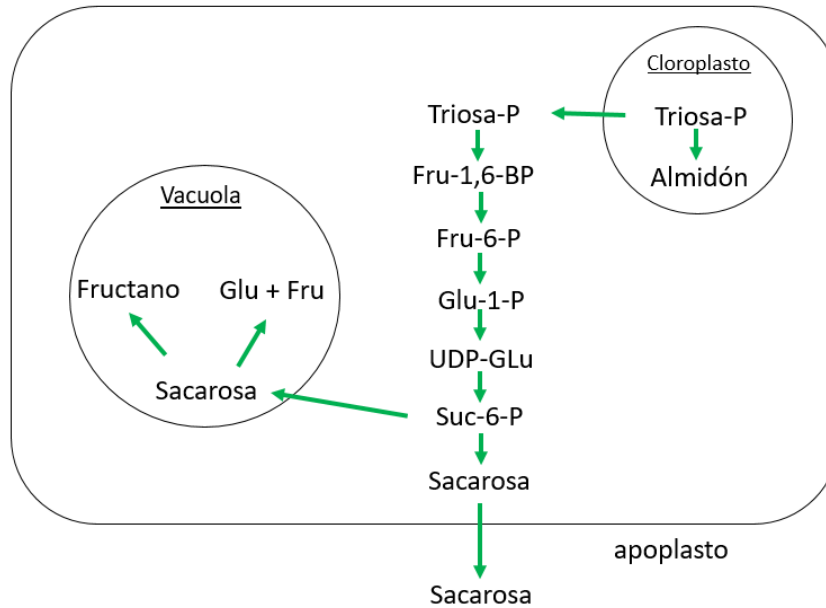


Figura 2. Metabolismo de carbohidratos en una célula vegetal. La actividad fotosintética alta está asociada a grandes tasas de carbono que se exportan del cloroplasto al citoplasma, dando como resultado un aumento en los intermediarios de la síntesis de sacarosa ².

II.1.3 Metabolismo de los fructanos en plantas.

II.1.3.1. Fructosiltransferasas de la familia GH 32.

Las enzimas que regulan la biosíntesis de fructanos son las fructosiltransferasas, las cuales hidrolizan el enlace glicosídico, entre un carbohidrato y otro, transfiriendo una unidad de fructosa a la sacarosa, a una molécula de agua o a otro fructano ¹⁴ (Figura 3).

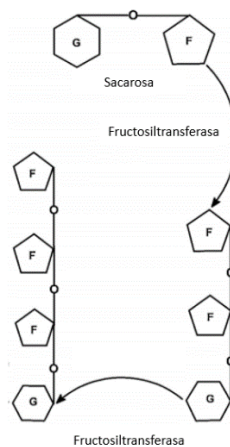


Figura 3. Mecanismo de acción general de las fructosiltransferasas en presencia de sacarosa.

Las fructosiltransferasas (FFT), las fructanexohidrolasas (FEH), las invertasas de pared celular y las invertasas vacuolares de las plantas son enzimas que pertenecen a la familia 32 de las glicosilhidrolasas, las cuales son muy similares a nivel molecular, pero con funciones distintas ¹⁴. Todas estas enzimas a su vez, se encuentran agrupadas con las β -fructosidasas y fructanhidrolasas microbianas, con las cuales comparten homología. La familia GH32 se agrupa también con la GH68 (donde se encuentran algunas levansacarosas, inulosacarosas e invertasas) formando el clan GH-J o súper familia β -fructosidasa (Tabla 1), con la cual a pesar de ser poco similares en homología, comparten un dominio compuesto por una β -propela de 5 hojas en el extremo N terminal, considerado el sitio activo de la enzima ¹⁶ y donde se encuentran tres dominios catalíticos altamente conservados: WMNDPNG, RDP Y EC los cuales participan en la catálisis ¹⁷ (Figura 4 y 5)

POR HOMOLOGÍA	POR ACTIVIDAD CATALÍTICA
<ul style="list-style-type: none"> • Fructosiltransferasas (SST y FFT) • Fructanexohidrolasas (FEH) • Invertasas de pared Celular • Invertasas vacuolares 	<ul style="list-style-type: none"> • Clan GH-J o súperfamilia β-fructosidasa
<ul style="list-style-type: none"> • β-Fructosidasas • Fructanhidrolasas 	

Tabla 1. Clasificación de las glicosilhidrolasas. Recuadro rojo: fructosiltransferasas de plantas, recuadro azul: fructosiltransferasas microbianas.

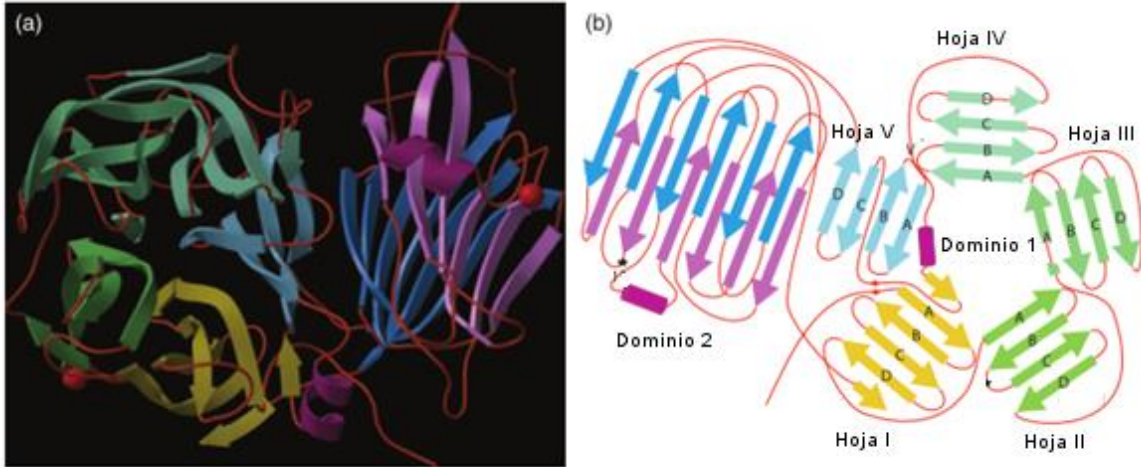


Figura 4. Estructura de 1-FEH de *Cichorium intybus*. a) Estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, los círculos rojos indican los sitios de glicosilación b) Diagrama de la topología de 1-FEH ¹⁶.

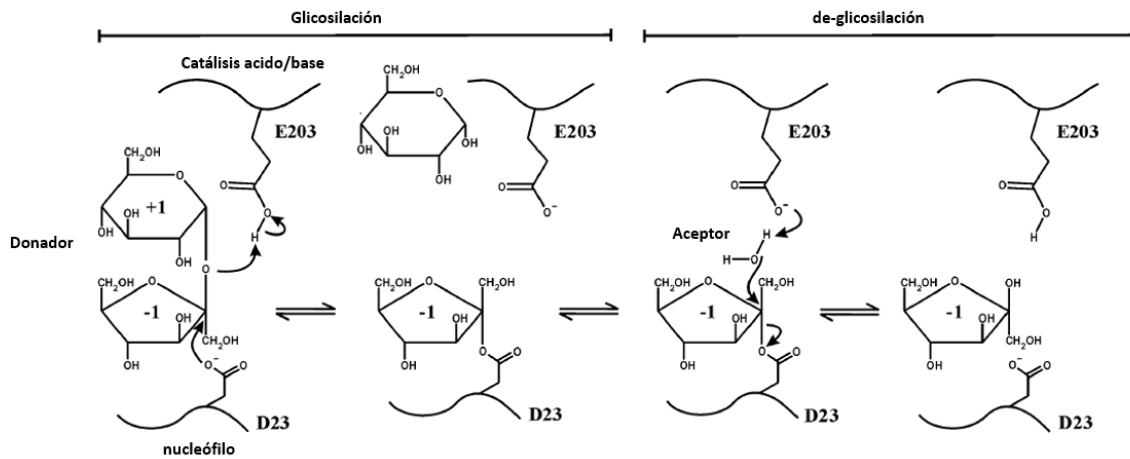


Figura 5. Catálisis ácido/base de las fructosiltransferasas. El residuo de Asp del motivo WMNDPNG o caja de unión a sacarosa (D23) actúa como nucleófilo y el residuo de Glu del motivo EC (E203) actúa realizando la catálisis ácido/base jugando así un papel vital en el mecanismo ¹⁷.

II.1.4. Enzimas que participan en la síntesis de fructanos.

Las fructosiltransferasas que participan en la síntesis de fructanos difieren por su afinidad al sustrato y el producto formado, dentro de las fructosiltransferasas y FEH que participan en la síntesis de fructanos se tiene:

II.1.4.1. Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST)

La síntesis de fructanos es iniciada a partir de sacarosa, por medio de la 1-SST la cual produce 1-kestosa, transfiriendo un residuo de fructosa de una sacarosa donadora a una aceptora.

II.1.4.2. Fructan:fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT)

Teniendo 1-kestosa como sustrato, la 1-FFT polimeriza o elonga la cadena, transfiriendo residuos de fructosa que aumentan el grado de polimerización de la cadena.

II.1.4.3. Sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa (6-SFT)

La enzima 6-SFT cataliza la formación de bifurcosa, utilizando la sacarosa como donador de unidades de fructosa y 1-kestosa (producto de la 1-SST) como aceptor ¹⁸. La 6-SFT también sintetiza y elonga la cadena de fructanos tipo levano formando enlaces β (2,6), su actividad ha sido identificada en algunos cereales como trigo, cebada y avena ^{19, 8}.

II.1.4.4. Fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT)

Esta enzima se caracteriza por sintetizar fructanos de tipo neo-serie, formando enlaces en los carbonos 1 y 6 de la molécula de glucosa. La elongación de la cadena en uno u ambos extremos genera neo series de inulina, levanos o graminanos ramificados. La actividad 6G-FFT se ha identificado en algunas plantas como *Allium cepa*, *Lolium perenne L.* y *Asparagus officinallis* ^{10, 18}.

II.1.4.5. Fructan-exohidrolasas (FEH)

Las FEH de plantas monocotiledóneas son específicas y promueven de forma preferente la hidrólisis de enlaces β (2,1) (1-FEH) o β (2,6) (6-FEH). En conjunto con las fructosiltransferasas las FEH permiten la acumulación de un conjunto específico de fructanos ²⁰.

II.1.4.6. Invertasas

Hidrolizan el enlace glicosídico de la sacarosa para formar glucosa y fructosa. Dentro de las invertasas ácidas se encuentran las invertasas vacuolares (VI) y las invertasas de pared celular (CWI) ¹⁷.

II.2. El agave y sus fructanos.

II.2.1. Género agave

Ya sean plantas silvestres o plantas modificadas genéticamente, existe una amplia gama de sistemas vegetales productores de fructanos, los cuales pueden tener diferente concentración y tipo de fructanos. Algunas de estas especies se caracterizan por ser de importancia agronómica, cultivándose en diferentes regiones ya sea para su consumo en fresco o para la extracción comercial de fructanos.

En género *Agave Sensu Stricto* es un género joven, el cual tiene de 7.8 a 10.1 millones de años²¹. Tiene alrededor de 200 taxones, de los cuales 150 se extienden en 75% del territorio mexicano y 129 son endémicos²² por lo que México se considera el centro de origen y de distribución de éste. Restos de coprolitos con fibras masticadas, semillas y puntas de agave sugieren que la inclusión del género a la dieta mexicana data de hace 10,000 años²³, por lo que representa un elemento cultural y económico muy importante para la sociedad mexicana.

El uso de los Agaves por culturas locales mexicanas continúa hasta la presente fecha, variando desde la utilización de sus fibras para la fabricación de ropa, textiles, herramientas y artesanías hasta su uso para la preparación de bebidas alcohólicas como pulque (*A. atrovensis* y *A. americana*), mezcal (*A. potatorum*) y tequila (*A. tequilana* Weber var. Azul)^{24, 25}, así como para la producción industrial de fructanos y jarabe de agave.

En México, el género Agave representa la fuente más importante para la obtención de fructanos, los cuales se encuentran hasta en un 60% del total de los carbohidratos presentes en la piña. La presencia de éstos se ha reportado en especies como *A. angustifolia*, *A. fourcroydes*, *A. potatorum* y *A. cantala*¹², sin embargo y por su importancia agronómica y comercial la especie más estudiada es *A. tequilana* Weber var. Azul.

II.2.2. *Agave tequilana* Weber var. Azul

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Género	Agave
Especie	<i>A. tequilana</i> F.A.C. Weber

La planta de *A. tequilana* es perenne con hojas dispuestas en espiral, arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, las hojas son suculentas, fibrosas, de forma linear, de márgenes dentados, con una espina al final del ápice y de color azul-verdoso, característica que las distingue, en la etapa madura presenta una inflorescencia racemosa que surge del meristemo apical de la planta²². Al igual que la mayoría de la especies del género Agave, *A. tequilana* es una planta xerófita, adaptada a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas, posee estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos. Su metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) constituye una especialización fisiológica que les permite tener una transpiración nocturna, fijando el carbono en ácidos orgánicos, principalmente en ácido málico, el cual se acumula en la vacuola y es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos durante el día. Este metabolismo permite obtener una ganancia de carbono con una pérdida mínima de agua, de tal manera que su supervivencia depende del volumen de agua y de los carbohidratos almacenados durante la época favorable, de los cuales los fructanos son el principal producto de la fotosíntesis^{26, 27}.

En México, *A. tequilana* Weber variedad azul, es un cultivo económicamente importante, debido a que por denominación de origen es la única materia prima para la elaboración del tequila, sin embargo y por su alto contenido en carbohidratos, en años recientes su uso se ha extendido para la producción de fructanos y jarabe de agave.

II.2.3. Fructanos de Agave.

En el 2006, Marcilla Margali y López demostraron que los fructanos de agave son mezclas complejas, heterogéneas y polidispersas de fructooligosacáridos y fructanos tipo graminano (glucosa externa) y agavina (glucosa interna) unidos mediante enlaces β (2,1) y β (2,6), en donde las agavinas se encuentran en mayor abundancia¹².

La mezcla de fructanos en *A. tequilana*, el tipo de enlace y el grado de polimerización varían de acuerdo a la edad de la planta. Durante su ciclo biológico en el campo, la concentración de fructanos de *A. tequilana* aumenta hasta los 5 años y posterior a esta edad permanecen constante hasta los 7 años. Como se puede observar en la Figura 6, la proporción de agavinas/graminanos y un bajo grado de polimerización en plantas jóvenes es similar al inicio de la síntesis, aumentando la concentración de agavinas, el grado de polimerización y la complejidad estructural conforme la planta se va desarrollando (Mellado-Mojica & López 2012).

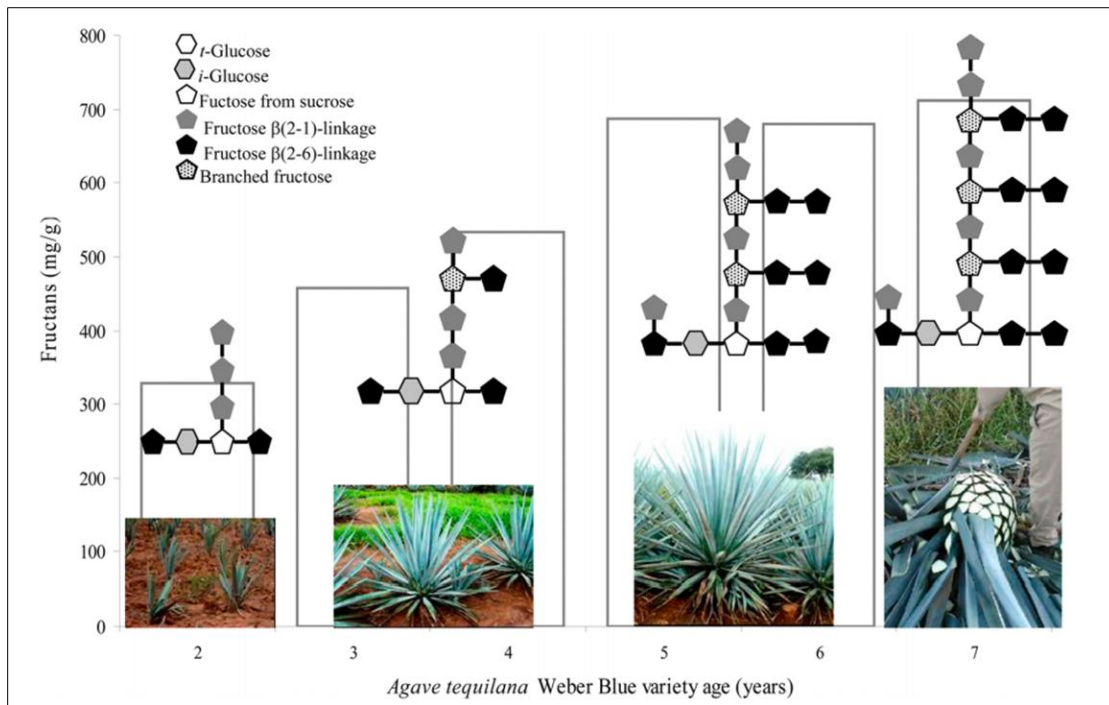


Figura 6. Fructanos de *A. tequilana* a través del ciclo biológico. Entre los 2 y los 4 años, las plantas de *A. tequilana* sintetizan fructanos de bajo grado de polimerización, los cuales son usados por las fructosiltransferasas para sintetizar moléculas más complejas y ramificadas con un alto grado de polimerización (agavinas) las cuales son los principales fructanos que se acumulan durante la etapa madura (5-7 años).

II.2.4. Fructosiltransferasas de *Agave tequilana*.

Para la síntesis e hidrólisis de fructanos en *A. tequilana* participan cuatro diferentes enzimas: la 1-SST, la 1-FFT, la 6-SFT, la 6G-FFT y la FEH.

II.2.4.1. 1-SST

Los ADNc que codifican para la 1-SST fueron aislados, clonados y expresados en el sistema heterólogo *Pichia pastoris*²⁹, así mismo otra isoforma (1-SST-2) fue caracterizada a nivel genético y funcional en *A. tequilana*³⁰.

II.2.4.2. 1-FFT

La expresión del gen que codifica para esta enzima se ha identificado en diferentes tejidos de *A. tequilana* y *A. inaequidensis* bajo condiciones de estrés, siendo mayor la expresión en tejidos de mesontle³¹, también se ha detectado la presencia de actividad 1-FFT en otros tejidos de *A. tequilana*, así como su actividad *in-vitro* usando vacuolas extraídas de mesontle de Agave^{32, 33}.

II.2.4.3. 6G-FFT

Dos isoformas de esta enzima fueron caracterizadas a nivel genético y funcional en tejidos de mesontle y hoja, así mismo su caracterización funcional se llevó a cabo usando 1-kestosa y sacarosa como sustrato ^{30, 34}.

II.2.4.4. 6-SFT

Su actividad se ha demostrado en estudios *in-vitro* al poner en contacto las vacuolas de FAZY con sacarosa 200 mM como sustrato, sin embargo en estudios recientes de transcriptoma, no identificaron secuencias que codifiquen para esta enzima, esto posiblemente debido a que los niveles de expresión de la enzima son muy bajos o son específicos de tejidos ^{34, 32}. e

II.2.4.5. FEH

Cuatro isoformas de esta enzima se ha detectado en *A. tequilana* ³⁴.

II.2.4.6 Invertasas vacuolares (InvV) y de pared celular (CWInv)

La presencia de las distintas isoformas reportadas en *A. tequilana* es consistente con las múltiples isoformas reportadas en otras especies, como *A. thaliana* y *Oryza sativa* Encontrándose en *A. tequilana* 2 isoformas de invertasas vacuolares y 2 invertasas de pared celular ³⁴.

A pesar de que solo se han reportado algunos genes que codifican para FTFs en *A. tequilana*, la actividad bioquímica *in-vitro* de la 1-SST, 1-FFT, 6G-FFT, 6-SFT y la FEH ha sido identificada de manera *in-vitro* usando vacuolas y protoplastos de agave, como fuente de FTFs ^{32, 35}.

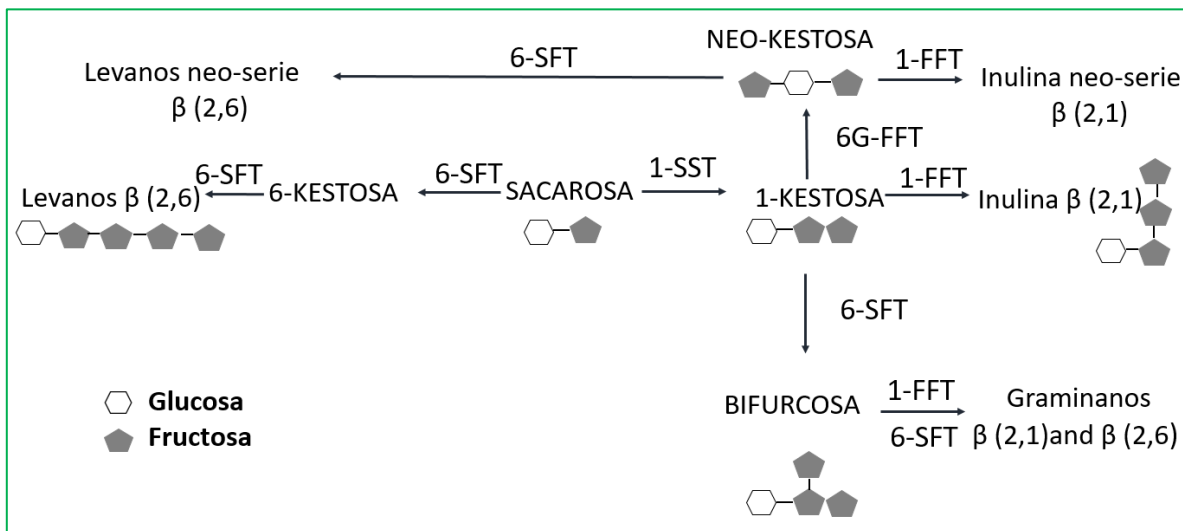


Figura 7. Diagrama general de síntesis de fructanos en *A. tequilana*.

II.3. Síntesis de FOS *in-vitro*.

La producción industrial de FOS involucra el uso de enzimas con actividad fructosiltransferasa. La mayoría de las síntesis industriales de FOS utilizan como fuente enzimática células completas de microorganismos, entre los cuales se encuentra hongos como *Aspergillus japonicus*, *A. niger*, *A. sydowi*, *A. foetidus*, *A. oryzae*, *A. pullulans*, *Penicillium citrinum*, *P. frequentans* y *Fusarium oxysporum*, bacterias como *Arthrobacter sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus reuteri* y *Bacillus macerans* y levaduras como *Kluyveromyces* y *Candida albicans* ³⁶.

También se han utilizado enzimas purificadas e inmovilizadas como fuentes de fructosiltransferasa, las cuales son separadas del medio celular usualmente por centrifugación y posterior precipitación, ultrasonificación o por medio del uso de columnas cromatográficas ³⁶.

A diferencia del uso de enzimas de microorganismos, con el uso de enzimas provenientes de fuentes vegetales el grado de polimerización de los fructanos sintetizados puede ser variable, debido a las diferentes condiciones climáticas del cultivo de la planta, la edad, el periodo de cosecha y las condiciones de almacenamiento, las cuales afectan directamente la concentración y actividad enzimática ³⁷. También se han hecho esfuerzos por obtener FOS de plantas transgénicas de tabaco y papa ³⁸.

La mayoría de las síntesis se han enfocado a la producción de 1-kestosa y 1-nistosa, existiendo pocos reportes sobre la producción de otros FOS como neo-kestosa y 6-kestosa, la cual se ha logrado sintetizar a partir de β -fructofuranosidasas de *Schwanniomyces occidentalis* obteniendo rendimientos de hasta 76 g/L ³⁹.

Dentro de la síntesis de FOS de agave, se ha llevado a cabo una hidrólisis térmica de fructanos de agave de alto grado de polimerización, con posterior purificación utilizando células de *Pichia pastoris*, la cual solamente utiliza como fuente de carbono fructosa y glucosa ⁴⁰, también se han utilizado exo y endo inulinasas para la obtención de FOS ramificados a partir de agavinas de *Agave angustifolia* ⁴¹

Desde el punto de vista industrial, la extracción de FOS a partir de plantas y síntesis química no son económicamente viables, debido a los altos costos y a los rendimientos variables, por lo que la producción enzimática de FOS provee una alternativa costeable y efectiva para la obtención de éstos ³⁷.

II.3.1. Fuentes alternativas de sustratos para la síntesis de FOS.

Los desechos orgánicos generados por la agricultura son una fuente abundante de biomasa natural, la cual puede ser reciclada mediante la producción de compuestos de interés comercial, es así como mediante el uso de materiales provenientes de la industria, el desarrollo tecnológico sustentable es una alternativa para reducir el impacto ambiental ⁴².

Pocos estudios han reportado el uso de otras plantas como fuente de sustrato para las FTFs, el uso de yacón ⁴³ y stevia ⁴² proveen una fuente importante para la obtención de endoinulinasa, así como para la producción de bioetanol, sin embargo la producción de FOS a partir de este tipo de sustrato no se ha estudiado a detalle, por lo que el uso de desechos agro-industriales representa una alternativa para su obtención.

Dentro de las plantas que producen fructanos, algunas son cultivadas por su producción frutal, entre las cuales se tiene a la pera, la ciruela, el plátano, la manzana, las uvas y recientemente se sabe de la presencia de FOS en el fruto de *F. x ananassa* ^{1, 44}.

II.4. *Fragaria x ananassa*.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Fragaria
Especie	<i>Fragaria x ananassa</i>

La especie *F. x ananassa* es una de las plantas domesticadas más joven. Su origen, el cual fue producto de una hibridación entre *Fragaria virginata* de Norteamérica y *Fragaria chiloensis* de Sudamérica data del siglo XVIII y fue documentado por el botánico Antonie Nicolas Duchense ⁴⁵.

F. x ananassa es una planta herbácea, octoploide, de porte bajo que generalmente no supera los 30 cm de altura, su ciclo vegetativo es perenne, aunque la durabilidad de las plantaciones depende del clima ⁴⁶. Tiene un sistema radicular variable, con raíces primarias y secundarias alrededor de la corona, las cuales crecen rápidamente en el periodo de frutescencia durante el invierno y la primavera, etapa en la que hay poca demanda de agua en las hojas, funciona también como almacén de carbohidratos en el invierno ⁴⁷.

Las hojas, normalmente trifoliadas varían en tamaño y forma, su producción también es regulada por condiciones ambientales como el fotoperiodo y la temperatura y tienen un ciclo de vida de uno a tres meses, para después ser reemplazadas por hojas nuevas. El estolón es un tallo rastrero que es emitido por la planta cuando el fotoperiodo y la temperatura son favorables, es una forma de propagación asexual y es producida por la planta mediante yemas axiales que se localizan en la corona ⁴⁶.

El fruto se origina en el racimo floral que depende directamente del tallo. Por lo general, cada racimo consta de cuatro flores hermafroditas y auto fértiles llamadas primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria en razón de su tamaño y secuencia en que se forman, la flor primaria produce el fruto de mayor tamaño ⁴⁶.

II.4.1. La corona de *Fragaria x ananassa*

Botánicamente la corona es el tallo de la planta, es un órgano corto, fibroso, donde se originan las raíces, hojas, frutas y estolones. Este tejido vascular forma un cilindro con conductos en espiral alrededor de todo el órgano, que suministrada a toda la planta de agua

y de nutrientes desde cualquier punto a lo largo de la circunferencia, por lo que es altamente resistente a la congelación ⁴⁷.

La corona *F. x ananassa* son una fuente importante de carbohidratos, por lo que pueden estar involucradas en el desarrollo de la planta y su relación con el dulzor del fruto ⁴⁸. Los principales carbohidratos solubles presentes en la corona de *F. x ananassa* variedad Camarosa son glucosa, sacarosa y fructosa los cuales disminuyen su concentración al inicio de la etapa de frutescencia ⁴⁸. Existen otros carbohidratos en las corona presentes en concentraciones más bajas como xilosa, arabinosa, mio-inositol y almidón.

Se ha reportado la presencia de polímeros de fructosa como 1-kestosa, 1-nistosa, neokestosa y kestopentosa únicamente en los frutos de la especie *Fragaria vesca*, siendo la concentración de 1-kestosa la más alta con 43 $\mu\text{g/g}$ de peso seco ⁴⁴, sin embargo la presencia de FOS en frutos y otros órganos de *F. x ananassa* no ha sido reportada, por lo que surge el interés de saber si este tipo de carbohidratos se acumulan en órganos de reserva como la corona.



Figura 8. Corona de *F. x ananassa*.

II.4.2. Estatus comercial y mexicano

El valor nutricional de las fresas es atribuido al alto contenido de compuestos fenólicos, los cuales son responsables de importantes propiedades organolépticas como el sabor, el aroma, el color y la apariencia ⁴⁹. Sin embargo, la producción de fresa arroja al año de toneladas de residuos agronómicos, los cuales pueden ser reutilizados.

Las plantas de fresa es uno de los cultivos frutales económicamente más importantes en el mundo, produciendo más 7.5 millones de toneladas al año (FAOSTAT). México se encuentra entre los 10 principales productores de fresa a nivel mundial, y su producción nacional asciende a 458,972 toneladas al año (FAOSTAT).

Desde 1950 México depende del material vegetativo de Estado Unidos, del cual se importan alrededor de 20 millones de plantas al año para utilizarse con fines de propagación, esto se repite cada año debido a la insuficiencia de horas-frío, y al ataque de *F. oxysporum* y el complejo viral los cuales causan del 10 al 30% de mortalidad y disminuyen la calidad de la fruta drásticamente ⁵⁰.

En Irapuato, Guanajuato, la tercer región productora de fresa en México se han logrado grandes avances en programas de cruzamiento, con la finalidad de crear variedades mejor adaptadas al clima mexicano y más resistentes a las enfermedades. Entre ellas destacan las variedades Pakal y Nikté que fueron liberadas al campo en 2009, las cuales reúnen las características fisiológicas deseadas ⁴⁶.

II.4.3. *F. x ananassa* variedad Nikté y Pakal

Mediante un programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) se han desarrollado distintas variedades de fresa, entre las cuales destacan la variedad Nikté y Pakal que fueron liberadas a campo en el 2009. Estas variedades muestran características de alta precocidad, productividad, calidad de fruta y tolerancia a las enfermedades, así mismo están adaptadas al clima de Irapuato, Guanajuato ⁴⁶. Nikté es una variedad de día corto que se caracteriza por su fruta de tamaño grande, color externo rojo brillante y pulpa roja, Pakal es de día neutro, es decir, que se adapta al foto periodo, ambas, tienen un rendimiento superior a 50 toneladas por hectárea.

II.5. FOS y salud.

II.5.1. ¿Por qué sintetizar FOS?

Debido a sus propiedades nutricionales y benéficas a la salud como su bajo índice glicémico, su baja cancerogenicidad y dulzor moderador, el uso de FOS en la industria de alimentos ha aumentado en años recientes ⁵¹.

Al ser carbohidratos no-digeribles, los FOS han sido probados por sus efectos sobre la microbiota del intestino ⁵¹. Estos presentan importantes propiedades fisicoquímicas y fisiológicas, benéficas para la salud de los consumidores, características por las cuales se consideran prebióticos, los cuales por definición son aquellos sustratos que son utilizados selectivamente por la microbiota intestinal y que generan un beneficio a la salud del hospedero ⁵².

Un criterio clave para que un alimento pueda ser considerado prebiótico es que no debe de ser hidrolizado o absorbido en la parte superior de tracto gastrointestinal de modo que llegue al colon, así mismo debe ser sustrato selectivo y estimular el crecimiento de una o más bacterias benéficas, para inducir efectos locales o sistémicos a través de los productos de la fermentación ⁵².

El consumo de agavinas de bajo grado de polimerización (promedio de DP=8) y otros FOS como 1-kestosa modifica la microbiota intestinal, la cual como productos de la fermentación produce ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como acético, propiónico, y butírico, estimulando así la producción de hormonas como GLP-1, las cuales a su vez, están involucradas con la sensación de saciedad en el hipotálamo, ayudando a disminuir la ingesta de alimentos y reduciendo el peso corporal ^{53, 54, 55}. Implementar FOS a la dieta también reduce el riesgo de padecer, enfermedades cardiovasculares y diabetes, ya que regula la concentración de glucosa en la sangre y disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos ⁵⁶.

En modelos murinos, el consumo de FOS también incrementa la absorción de minerales como el calcio y el magnesio. Los SCFAs producidos por las bacterias disminuyen el pH en el lumen creando así un ambiente ácido y más favorable para la solubilidad de los minerales, incrementando la formación ósea, la cual es dependiente de la estructura y el grado de polimerización del fructano ^{57, 58}.

II.5.2 Estatus comercial de fructooligosacáridos.

Los FOS son los oligosacáridos más estudiados y utilizados en el mercado Europeo de alimentos (Chen et al. 2000; Qiang et al. 2009; Nobre et al. 2013). Se estima que la demanda mundial de prebióticos es de 1,67,000 toneladas con ganancias de 225 millones de dólares

al año, siendo Japón uno de los consumidores principales (69,000 ton/año), entre éstos los FOS son de los más populares.

La solubilidad de los fructanos los hace atractivos para su uso en diferentes productos como panificación, lácteos, emulsificantes, endulzantes, sustitutos de grasa, entre otros. Diferentes compañías comercializan fructanos, los cuales varían en grado de polimerización, método y fuente de obtención, presentación y pureza, haciendo sus productos bajo el nombre de distintas marcas como Meiji Seika, Orafiti, Sensus, Cargill, Smart Nutrition, Jarrow Formulas, Douglas Lab, Nutricology, entre otras. Compañías como Wako y Sigma-Aldrich producen FOS de alta pureza (80-99%), los cuales son utilizados en laboratorios con fines analíticos ³⁷. En México, la producción de fructanos de Agave se encuentra a cargo de empresas como IMAG, Campos Azules, Nutriagave, IIDEA, Alit, entre otros. La mayoría de estos productos son de exportación.

III. JUSTIFICACIÓN

El estilo de vida sedentario, el consumo en exceso de alimentos altos en grasas y carbohidratos así como la falta de información nutrimental ha ocasionado a nivel mundial un gran incremento en enfermedades como la diabetes, el síndrome metabólico, y enfermedades cardiovasculares, las cuales están directamente relacionadas con la alimentación.

Para combatir estos problemas se han buscado alternativas, entre las cuales se encuentra la inclusión de prebióticos a la dieta, los cuales mediante diversos estudios se ha demostrado ayudan a modificar directamente la microbiota intestinal creando metabolitos que ayudan a mejorar la salud humana. Uno de los principales y más estudiado grupo de prebióticos son los fructooligosacáridos, los cuales se pueden obtener de manera natural a partir de distintas fuentes naturales, entre las cuales destacan las plantas de Agave.

En México, el consumo de fructanos de Agave ha aumentado en los últimos años, sin embargo la obtención de éstos depende de la disponibilidad de las plantas en campo, las cuales tardan hasta 7 años en madurar y que a su vez están expuestas a plagas y enfermedades que pueden mermar la cosecha.

Una alternativa en la obtención de prebióticos poco explorada es la síntesis *in-vitro*. Las enzimas presentes en las plantas de *A. tequilana* pueden representar un fuente importante de fructosiltransferasas para la síntesis de fructanos, aunado a esto, el uso de sustratos provenientes de plantas como *F. x ananassa* representa una alternativa para el uso de desechos proveniente de la agricultura.

El presente trabajo ayudará a conocer si las enzimas de protoplastos de *A. tequilana* y sustratos proveniente de coronas de *F. x ananassa* son un buen sistema para la síntesis de prebióticos. Así mismo, se conocerá cual es el perfil de carbohidratos presentes en las coronas de *F. x ananassa* a través de su ciclo biológico, para determinar que etapa contiene la mayor cantidad de sustrato para la síntesis de FOS.

IV. HIPOTESIS

La sacarosa y fructooligosacáridos presentes en la corona de *F. x ananassa* son el sustrato para las fructosiltransferasas presentes en protoplastos de *A. tequilana* Weber var. Azul en la biosíntesis *in-vitro* de fructanos.

V. OBJETIVOS.

V.1. OBJETIVO GENERAL.

Biosíntesis *in vitro* de FOS usando el sistema enzima *A. tequilana* - sustrato *F. x ananassa*.

V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar el perfil de fructanos en las coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté durante su ciclo biológico
2. Aislar protoplastos de mesontle de *A. tequilana* Weber var. Azul
3. Realizar ensayos de biosíntesis enzimática en el sistema *A.tequilana* - *F. x ananassa*

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

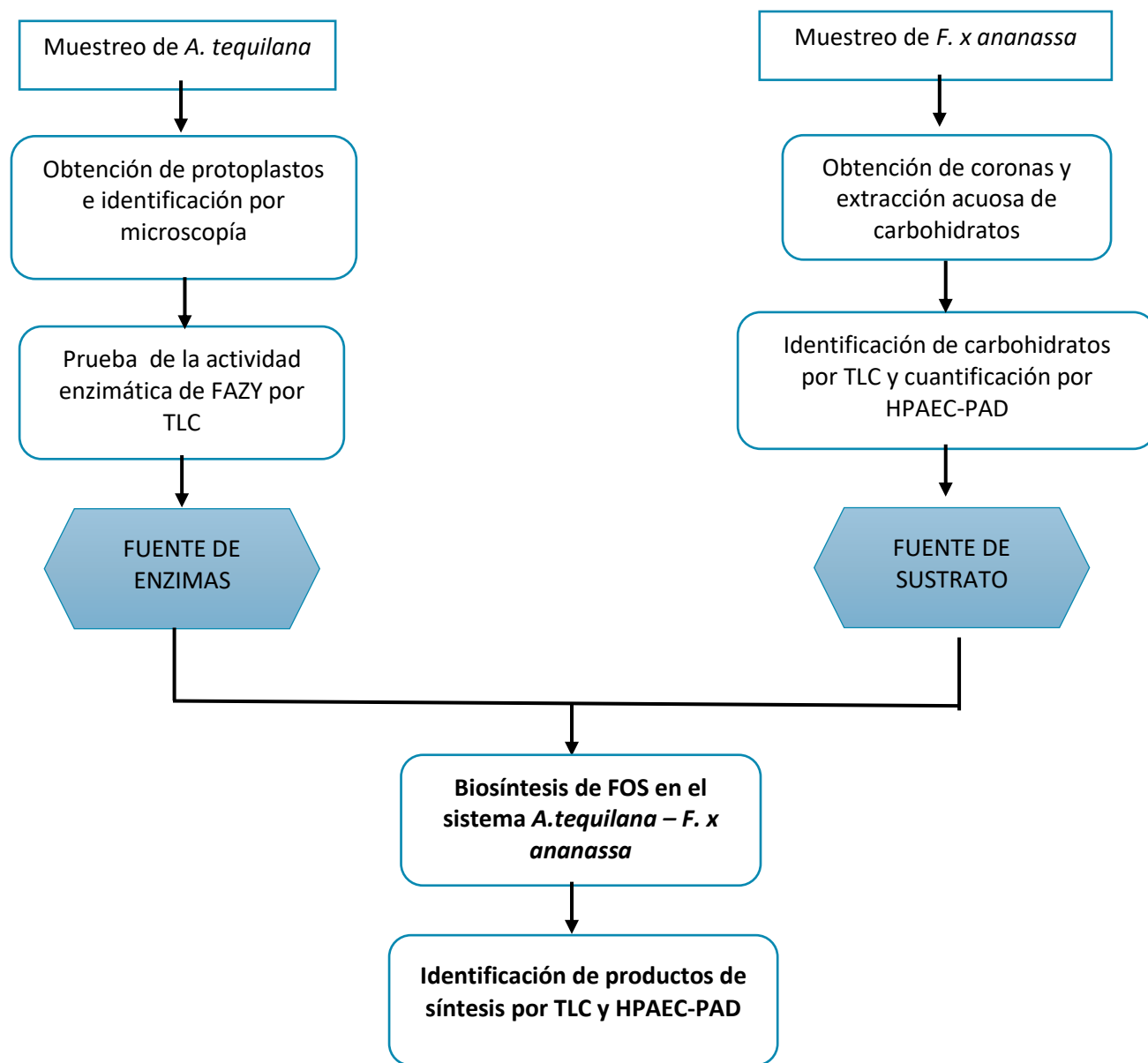


Figura 9. Diagrama general de trabajo para la biosíntesis de FOS en el sistema *A. tequilana* - *F. x ananassa*.

VI.1. *Agave tequilana*.

VI.1.1. Material vegetal.

Se analizaron plantas de *A. tequilana* Weber variedad Azul de 3, 4 y 5 años de edad provenientes del municipio La Romita ubicado en el estado de Guanajuato. Todas las plantas fueron proporcionadas por la empresa Inulina y Miel de Agave (IMAG) ubicada en Capilla de Guadalupe, Jalisco, México.

VI.1.1.1 Selección y manipulación del material vegetal.

La selección de material biológico se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos en campo. Durante el mes de agosto de 2016 y febrero de 2017 se eligió al azar una planta de cada edad que estuviera visiblemente libre de enfermedades, posteriormente, las plantas recién jimadas se trasladaron al laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, para inmediatamente llevar a cabo la obtención de protoplastos del mesontle.

Con la finalidad de obtener sólo el mesontle y retirar con mayor facilidad el tejido, las plantas se partieron con ayuda de un machete y un martillo en 8 partes, el tejido se pesó y de éste se tomó 10 g para la obtención de protoplastos, el mesontle restante se etiquetó y refrigeró a -20°C para estudios posteriores. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado

VI.1.2. Obtención de protoplastos.

Siguiendo el método de Krignstad y Robert con modificaciones^{59, 60}, 2 g de tejido fresco de mesontle fueron cortados en trozos de aproximadamente 2 mm con ayuda de un bisturí, posteriormente se colocaron en un matraz kitasato en proporción 1:10 (tejido/medio de digestión) para infiltrar al vacío por 10 min a 250 mbar de presión con la finalidad de que el medio de digestión penetrara en el tejido, el medio de digestión es una mezcla de manitol 0.7 M, mes NaOH 50 Mm a pH 5.5, MgCl_2 5 Mm, celulasa al 2% y pectinasa al 1%.

Para llevar a cabo la digestión de la pared celular, el tejido infiltrado se mantuvo en agitación suave a 50 rpm durante 4 horas a 30°C , una vez digerido se filtró para remover los sólidos y posteriormente se lavó con 5 ml de buffer de resuspensión fresco (manitol 0.5 M, tris HCl 25 mM y EGTA 5 mM a pH 8.8), posteriormente se centrifugó a 80 g por 20 min para remover el sobrenadante y lavar con 30 ml más de buffer de resuspensión fresco, por último se centrifugó por segunda vez, se removió el sobrenadante y se alicuotó en tubos.

Con el objetivo de concentrar las enzimas presentes en los protoplastos, una vez obtenidos estos se depositaron en tubos Amicon Ultra y se centrifugaron a 40000 rpm y 4°C durante 20 min, posteriormente con una pipeta se recuperó el concentrado y el precipitado por separado. Ambas partes se almacenaron a -20°C para estudios posteriores.

VI.1.2.1. Visualización de protoplastos

Para confirmar la presencia de protoplastos, al precipitado obtenido se le agregó una solución de tinción de rojo neutro al 1% en sacarosa 0.6 M.

Una gota de la muestra se colocó sobre un portaobjetos y se observó a 10, 30, 40 y 100x en un microscopio óptico Leica.

VI.1.2.2. Conteo de células viables/ml

Para conocer el número de células viables por mililitro de protoplastos se tomaron 200 ul de una mezcla 1:1 (protoplastos/rojo neutro 1%) los cuales se colocaron en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, posteriormente se observaron al microscopio óptico para contar el número de células visibles de los 4 cuadrantes de las esquinas, después del conteo se calculó el número de células viables por ml de protoplastos.

Los cálculos de hicieron de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de células viables} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

$$\text{Promedio del número de células} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Número de cuadros}}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen final}}{\text{Volumen de células aplicado}}$$

$$\text{Concentración} = \text{Promedio} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

VI.1.2.3. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína presente en los protoplastos concentrados se llevó a cabo mediante el método de Bradford siguiendo el procedimiento estándar para microplatos. Se colocaron 10 ul de muestra de protoplastos recién obtenidos más 200 ul de reactivo de Bradford (1:4 reactivo/agua) en cada pozo, se agitó 5 segundos y se leyó su absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas de Elisa marca Bio-Rad.

La cuantificación de proteína se obtuvo a partir de la curva de 10 puntos hecha de albumina de suero bovino de 96% de pureza utilizando el software X-Mark.

VI.2. *Fragaria x ananassa*.

VI.2.1. Selección del material vegetal.

Se seleccionaron 60 plantas de *F. x ananassa* de raíz desnuda provenientes de estolones de planta madre de aproximadamente tres meses de edad de las variedades Pakal y Nikté provenientes de los predios experimentales a campo abierto ubicados en el municipio de Pueblo Nuevo, Guanajuato.

Después de la selección, las plantas se trasladaron a los invernaderos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Politécnico Nacional, Unidad Irapuato para ser replantadas en macetas individuales, se regaron 3 veces por semana para mantener constante la humedad de la tierra y diariamente se monitoreó su crecimiento y adaptación al invernadero con la finalidad de obtener plantas sanas para llevar a cabo el estudio.

Las plantas de *F. x ananassa* fueron donadas por el Dr. Pedro Dávalos del Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuario.

VI.2.1.1. Obtención de coronas de *F. x ananassa*

Para la obtención de coronas a las distintas etapas de desarrollo, cada planta de *F. x ananassa* se extrajo de su maceta y se lavó a chorro de agua para eliminar la tierra, posteriormente se contó el número de hojas, flores y frutos. Con la ayuda de un vernier se midió el tamaño aproximado de la raíz y la altura de la planta, finalmente con un bisturí se les removieron las raíces, hojas y tallos para tener solo la corona.

Esta corona se cortó en trozos de aproximadamente 3 mm de espesor y se liofilizó durante tres días para remover la humedad, una vez liofilizada cada corona se trituró en un mortero de ágata y se almacenó individualmente en un desecador para estudios posteriores. Los frutos de las plantas también fueron liofilizados, molidos y almacenados.

La remoción de las coronas se llevó a cabo en tres etapas de desarrollo: vegetativa, floración y frutescencia.

VI.2.1.2 Extracción de carbohidratos de corona de *F. x ananassa*.

Para la extracción acuosa de fructanos 100 mg de tejido liofilizado y molido de las coronas de *F. x ananassa* se colocaron en 1 ml de agua, la extracción se llevó a cabo en un termomixer a 80°C durante 15 min a 100 rpm, se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm y se separó el sobrenadante de los sólidos, el cual se almacenó y congeló a -20°C para estudios posteriores.

VI.2.2. Caracterización de fructanos de corona de *Fragaria x ananassa*.

VI.2.2.1. Cromatografía de capa fina (TLC) de fructanos de corona.

Para conocer el perfil de los fructanos extraídos de las coronas, se colocaron sobre una placa de sílice 1 ul de cada extracción de fructanos con concentración de 100 mg/ml, la placa con las muestras aplicadas y secas, se corrió 4 veces en una cámara de vidrio para TLC que contenía una fase móvil de proporción (12:3:4) propanol/butano/agua.

Al final de la cuarta corrida, la placa se dejó secar hasta su totalidad y posteriormente se roció con una solución reveladora de carbohidratos compuesta de difenilamina, anilina y ácido fosfórico. La placa se reveló en un horno a 120°C por 60 segundos.

VI.2.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) de fructanos de corona.

Para confirmar la presencia de los carbohidratos presentes en las coronas de *F. x ananassa* se prepararon extracciones acuosas de carbohidratos con una concentración final de 5 mg/ml, posteriormente se centrifugaron y se pasaron por un filtro de 0.02 µm. Una vez preparadas las muestras se realizó el análisis de HPAEC-PAD en un equipo DIONEX ICS-300 en el cual se inyectaron 20 ul de cada una bajo las siguientes condiciones:

Columna: Carbopac 100

Eluente: NaOH 0.23M + CH₃COO⁻ Na⁺ 0.5 M + H₂O miliQ.

Temperatura: 25°C

Rango de Flujo: 0.5 - 0.8 ml/min

Detector: PAD (Detector de pulso amperométrico, por sus siglas en inglés)

VI.3. Biosíntesis de fructanos en el sistema *A. tequilana* – *F. x ananassa*

VI.3.1. Ensayo de síntesis enzimática.

Una vez obtenidos los protoplastos de mesontle de *A. tequilana* y los extractos de fructanos de corona de *Fragaria x ananassa* se realizaron los cálculos necesarios para llevar a cabo los ensayos de síntesis enzimática. Cada ensayo enzimático estaba formado por una mezcla que contenía enzima (protoplastos al 0.15 mg/ml de proteína), buffer de acetato de sodio de 5.5 pH y sustrato (extracto de corona al 3, 5, y 7.5%), la reacción se incubó a 30°C en un termomixer para tubos eppendorf de 2 ml y se monitoreó a diferentes intervalos de tiempo, hasta completar 52 horas. Para detener la reacción cada tubo se colocó en agua a ebullición

durante 5 min. Todas las reacciones se hicieron por triplicado y se almacenaron a -20°C para posteriores análisis.

VI.3.2. Caracterización y cuantificación de productos en el sistema *A. tequilana* – *F. x ananassa*.

La caracterización de los productos se llevó a cabo mediante las técnicas de cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), las cuales se realizaron siguiendo el mismo procedimiento usado para la caracterización de fructanos de coronas de *F. x ananassa*. La cuantificación de los productos se realizó a partir de curvas de calibración de al menos cinco puntos, utilizando el software chromeleon.

VI.4. Análisis estadístico.

VI.4.1. ANOVA.

Los datos correspondientes al tamaño de las coronas se realizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (One-way ANOVA) utilizando el graficador R Studio. Se utilizó un arreglo factorial de 3 x 6, con 6 réplicas biológicas y 18 plantas por lote, para cada una de las variedades.

VII. RESULTADOS

VII.1. *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté a través de su desarrollo.

VII.1.1. Plantas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté.

Una vez instaladas y adaptadas al invernadero, el desarrollo de las plantas de *F. x ananassa* de ambas variedades se monitoreó diariamente, en el cual la temperatura de crecimiento de las plantas osciló entre los 25 a 28 °C de día y 12 a 14 °C de noche. La edad de las plantas obtenidas a partir de estolones de planta madre antes de su adaptación al invernadero era de 3 meses de edad aproximadamente.

Las etapas a las que se llevaron a cabo los estudios fueron: vegetativa, florescencia y frutescencia (Figura 10).

Etapa vegetativa (Septiembre 2016): En esta etapa, las plantas de 3.5 meses de edad, se encontraban visualmente libre de flores y frutos, únicamente con presencia de hojas y tallos.

Etapa de florescencia (Octubre 2016): Las plantas seleccionadas para esta etapa fueron aquellas que tuvieron mínimo una flor, oscilando el número de estas entre una y tres flores por planta, todas compuestas por 6 pétalos blancos, en las cuales el capullo se encontraba totalmente abierto. No había diferencia física de las flores entre ambas variedades.

Etapa de frutescencia (Diciembre 2016): Esta etapa comenzó a los seis meses de edad. Ya que durante este periodo, las plantas tenían tanto flores como frutos, el criterio que se utilizó fue el mismo que en la etapa de frutescencia, tomando solo las plantas que tuvieran por lo menos un fruto maduro y oscilando éstos entre uno y seis. Los frutos colectados, eran muy aromáticos, de epidermis roja característica y en estado completo de maduración.

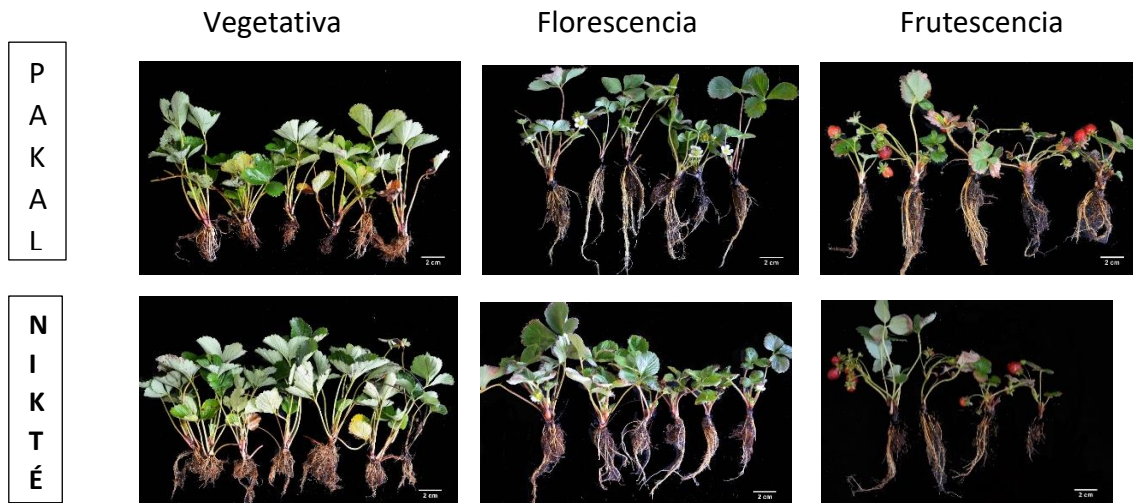


Figura 10. Plantas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté a través de su desarrollo.

VII.1.2. Coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté.

El análisis de varianza mostró que el tamaño de las coronas a través del crecimiento fue significativo en ambas variedades $F(2,15)=51.59$, $p < 0.001$ y $F(2,15)=29.78$, $p < 0.001$ para Pakal y Nikté, respectivamente. El crecimiento de las coronas fue aumentando conforme la planta se iba desarrollando (Figura 11), teniendo un promedio en el largo de corona durante la etapa vegetativa de 1.56 mm y 2.37 mm, llegando hasta 3.92 mm y 3.52 mm en la etapa de fruto para Pakal y Nikté, respectivamente (Tabla 2).

Tamaño de coronas de <i>F. x ananassa</i> variedad Pakal y Nikté a través de su ciclo biológico.			
Variedad	Etapa	Número de muestras	Promedio del largo de la corona (cm)
Pakal *	Vegetativa	6	1.56 ± 0.29
	Flor	6	3.01 ± 0.97
	Fruto	6	3.92 ± 0.73
Nikté*	Vegetativa	6	2.37 ± 0.52
	Flor	6	2.85 ± 0.70
	Fruto	6	3.52 ± 0.59

Tabla 2. Tamaño de coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté a través de su ciclo biológico. Todas las coronas cumplieron con el tamaño mínimo internacional requerido de 8 mm⁶¹.

* $p < 0.001$

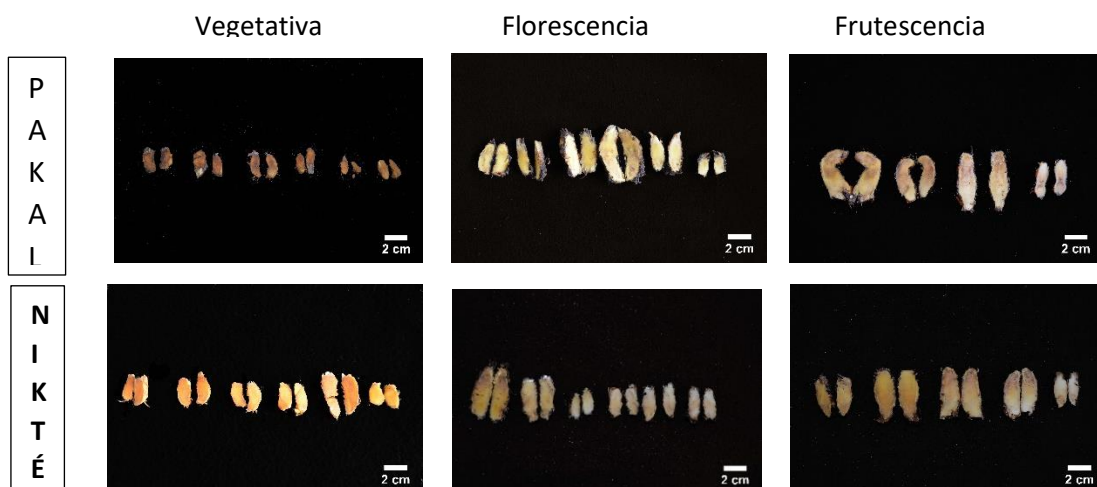


Figura 11. Coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté en diferentes etapas de desarrollo.

VII.1.3. Perfil de carbohidratos en coronas de *F. x ananassa* durante su ciclo biológico.

VII.1.3.1 Extracción térmica de carbohidratos.

Para obtener los carbohidratos presentes en las coronas liofilizadas de *F. x ananassa* variedad Pakal y Nikté se determinó que la mejor extracción fue en un sistema acuoso, durante 15 min a 80°C, con posterior centrifugación y separación de sólidos.

VII.1.3.2 Identificación de carbohidratos por cromatografía de capa fina.

Para conocer el perfil general de carbohidratos presentes en las coronas de *F. x ananassa*, se llevó a cabo un análisis por cromatografía en capa fina (TLC). Los estándares utilizados para la cromatografía fueron la escala de FOS (donde se encuentran los monosacáridos glucosa, fructosa, seguidos de sacarosa, 1-kestosa, 1-nistosa y DP5), la escalera de MOS (glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa, maltohexosa, maltoheptosa) así como fructanos de *A. tequilana* de 4 años de edad, raftilose (fructanos de la serie F) y raftiline.

Los monosacáridos glucosa, fructosa y el disacárido sacarosa se encuentran presentes a lo largo de todas las etapas de desarrollo de Nikté y Pakal, así mismo se observa la presencia de un compuesto de DP=2 que corresponde con el estándar de maltosa. Con mayor intensidad en las etapas de frutescencia y florescencia en ambas variedades se observó la presencia de un compuesto cercano al estándar de 1-nistosa, así como la existencia de compuestos de mayor grado de polimerización sobre la línea base (Figura 12)

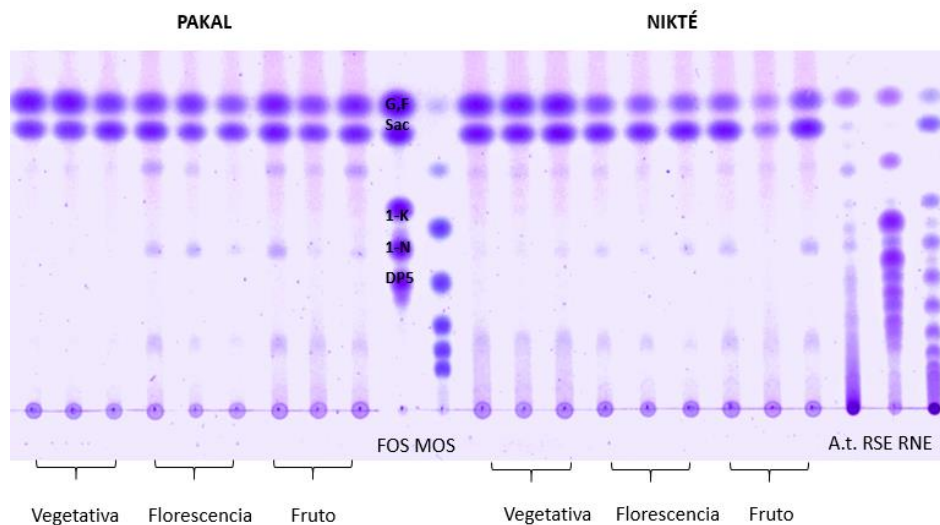


Figura 12. Perfil de carbohidratos de corona de *F. x ananassa* variedad Nikté y Pakal por cromatografía de capa fina (TLC). G: glucosa, F: fructosa, 1-K: kestosa, 1-N: 1-nistosa, DP5: kestopentosa, A.t.: Fructanos de *A. tequilana*, RSE: Raftilose y RNE: Raftiline, revelador de TLC: propanol/butanol/agua, temperatura de revelado: 120 °C.

VII.1.3.3. Cuantificación de carbohidratos solubles.

Para confirmar la presencia de los carbohidratos observados mediante TLC se llevó a cabo un análisis cuantitativo por medio de cromatografía de intercambio aniónico, acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

En las coronas de la variedad Pakal existe una diferencia significativa en la concentración de glucosa y fructosa durante todas las etapas, por otro lado la tendencia de la sacarosa es disminuir conforme la planta va desarrollándose. Con base a los estándares se pudo identificar que la señal del oligosacárido maltosa aumenta de la etapa vegetativa a la reproductiva y que los fructooligosacáridos 1-kestosa, 6-kestosa y 1-nistosa tiene una tendencia variable, sin embargo, están presentes en las tres etapas de crecimiento, así mismo la variación en los datos de concentración de polisacáridos es mayor que para glucosa, fructosa y sacarosa (Figuras 13 y 14). La presencia de otros carbohidratos en las muestras no pudo ser identificada.

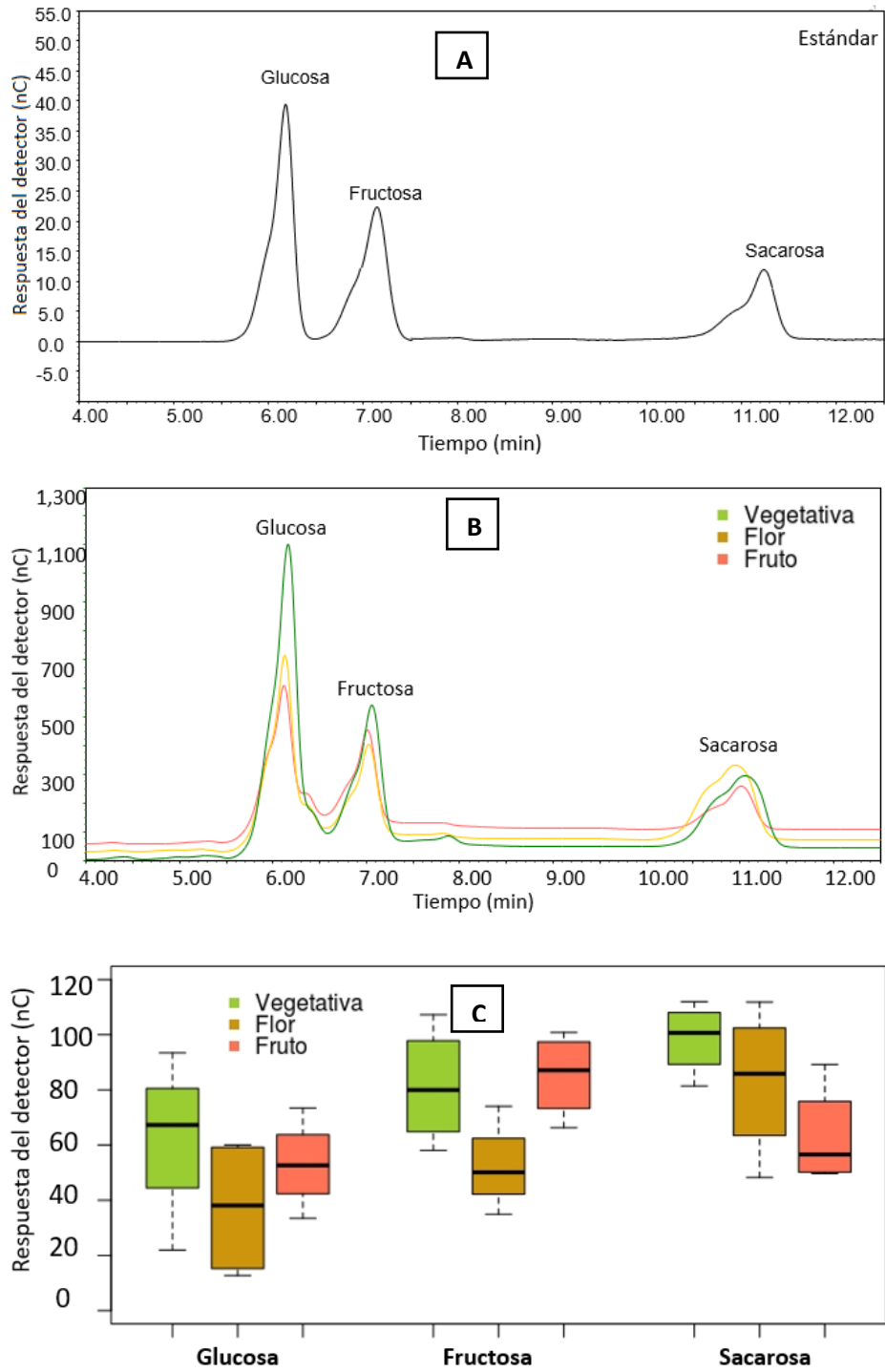


Figura 13. Perfil de glucosa, fructosa y sacarosa en coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal. A) cromatograma de estándares. B) cromatograma de coronas, C) concentraciones en corona. * $p < 0.05$

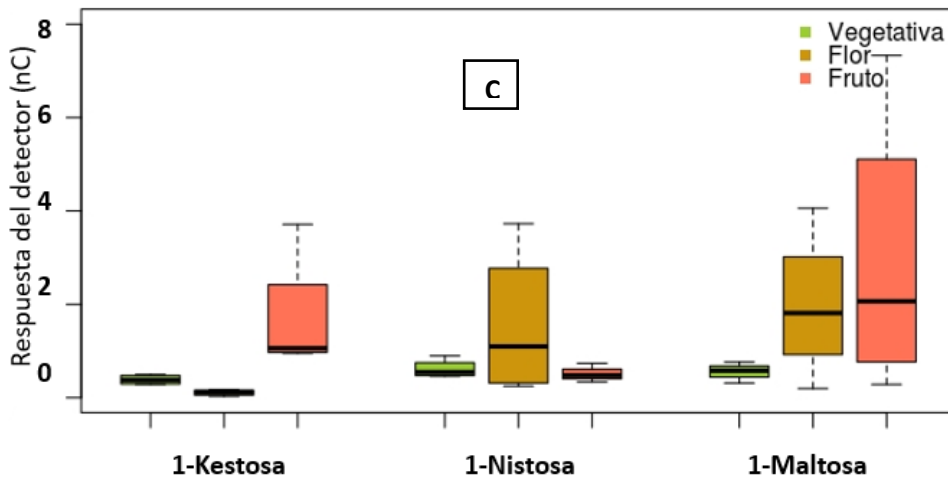
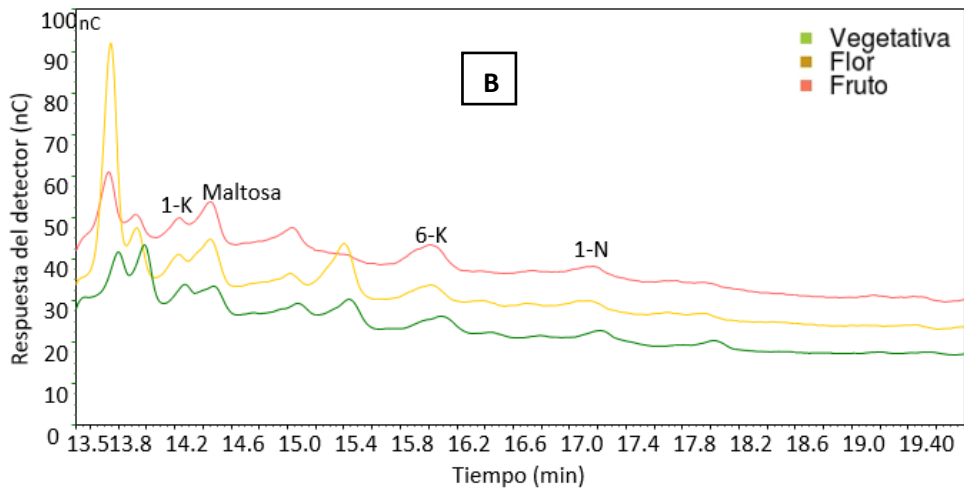
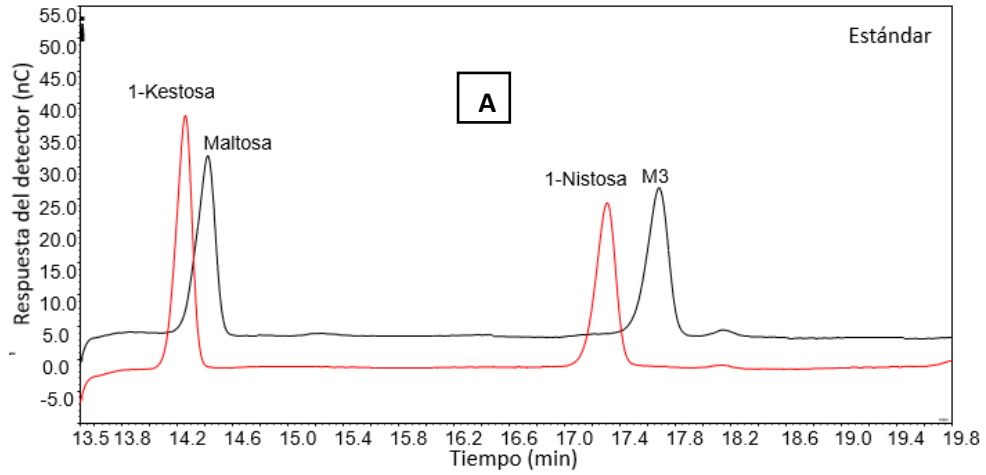


Figura 14. Perfil de FOS y MOS en coronas de *F. x ananassa* variedad Pakal. A) cromatograma de estándares. B) cromatograma de coronas, C) concentraciones en corona. * $p < 0.05$

Las coronas de plantas de *F. x ananassa* variedad Nikté presentaron perfiles diferentes en las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa durante las tres etapas de desarrollo (Figura 15). Por otro lado, se confirmó la presencia de maltosa durante todo el desarrollo. Los fructooligosacáridos presentes en la variedad Nikté fueron 1-kestosa, 1-nistosa y 6-kestosa con una tendencia de concentración variable, pero presente durante las tres etapas de crecimiento, también se observó neo-kestosa solo en algunas muestras, por lo que no fue posible su cuantificación. A diferencia de la variedad Pakal, solo en la variedad Nikté hay presencia de 6-Kestosa (Figura 16).

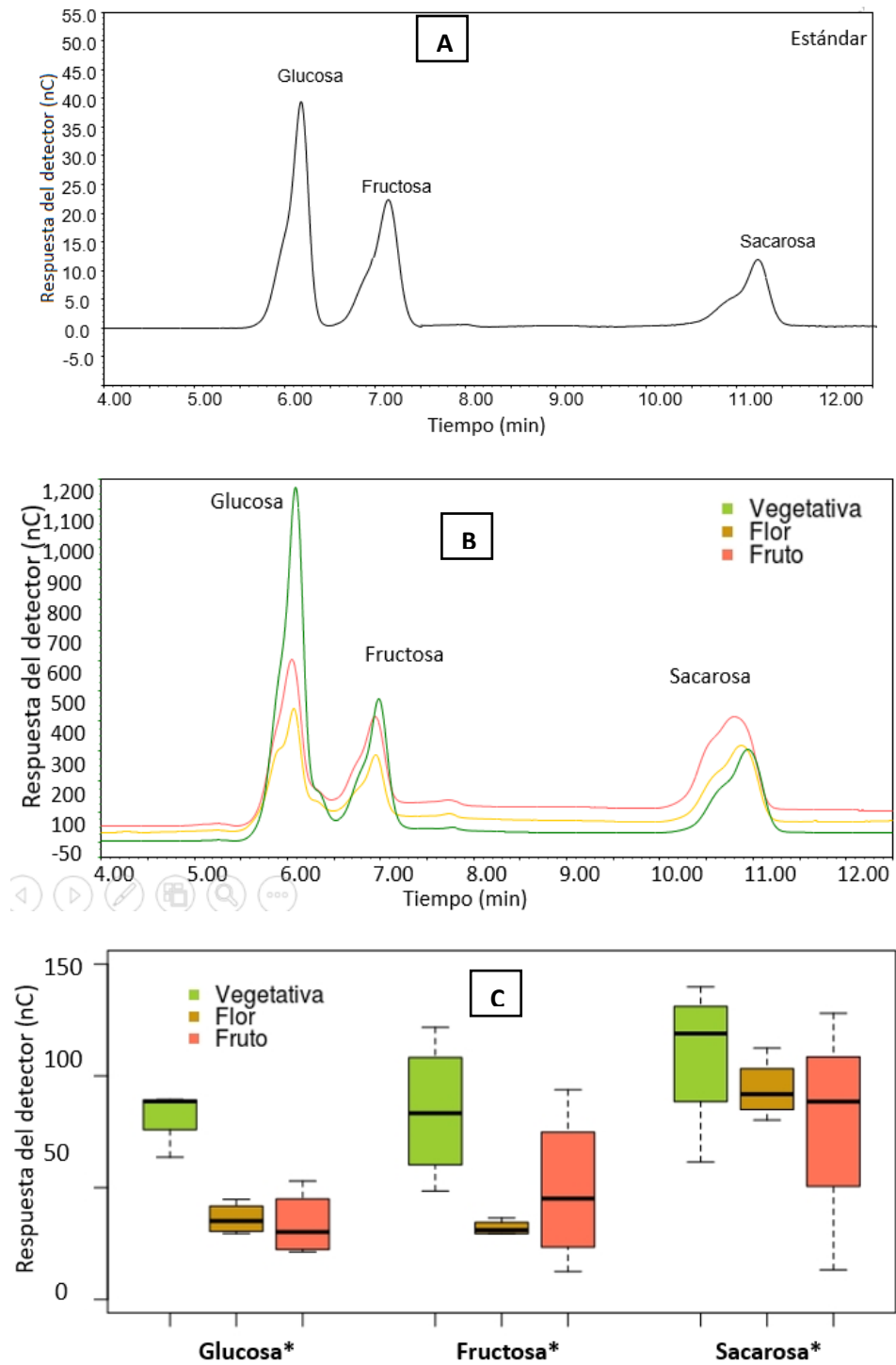


Figura 15. Perfil de glucosa, fructosa y sacarosa en coronas de *F. x ananassa* variedad Nikté. A) cromatograma de estándares. B) cromatograma de coronas, C) concentraciones en corona.

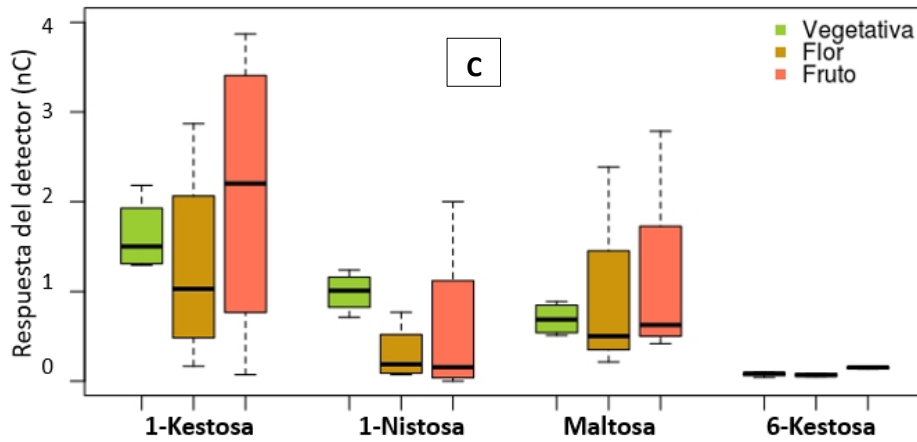
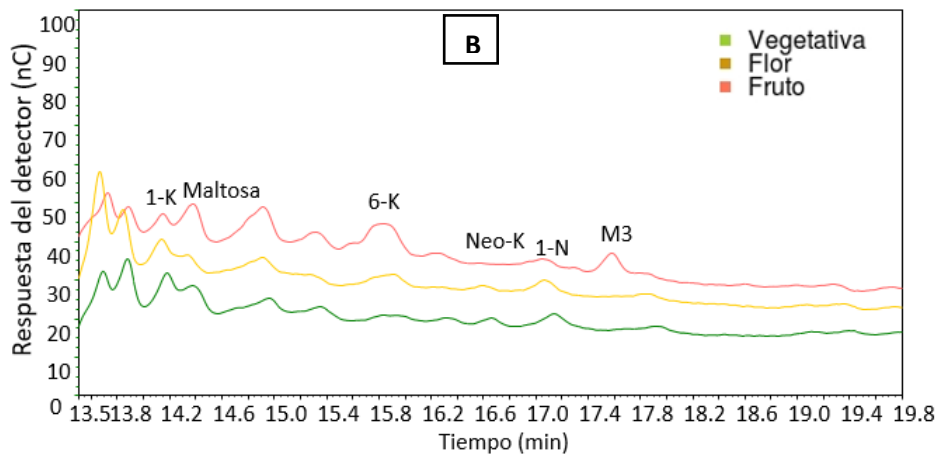
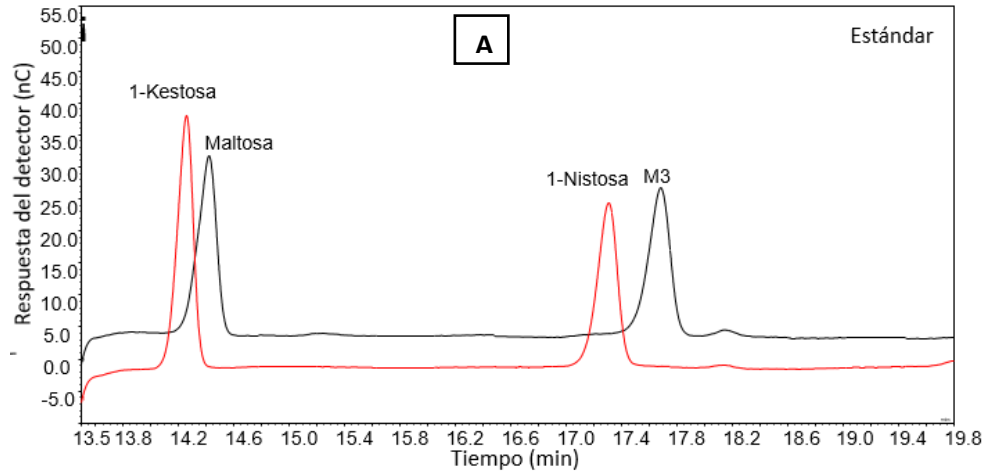


Figura 16. Perfil de FOS y MOS en coronas de *F. x ananassa* variedad Nikté. A) cromatograma de estándares. B) cromatograma de coronas, C) concentraciones en corona.

La cuantificación de carbohidratos presentes en las coronas de *F. x ananassa* permitió calcular el porcentaje total de éstos por gramo de corona liofilizada. La concentración mayor de 1-kestosa fue durante la etapa vegetativa con 16.96 mg/g y 20.86 mg/g de peso seco para Pakal y Nikté, respectivamente. Por otro lado, la concentración de 1-nistosa fue mayor durante la etapa de florescencia con 15.43 mg/g para Pakal y 9.01 mg/g para Nikté.

CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN CORONAS DE <i>F. x ananassa</i>						
Carbohidratos (mg/g)	ETAPA					
	PAKAL			NIKTÉ		
	Vegetativa	Flor	Fruto	Vegetativa	Flor	Fruto
Glucosa	14.152	7.448	10.641	16.512	6.732	7.222
Fructosa	16.384	10.463	17.069	16.841	6.391	9.826
Sacarosa	19.684	16.591	12.603	21.954	18.813	15.906
1-Kestosa	0.81	0.021	0.339	0.323	0.254	0.417
Maltosa	0.118	0.393	0.587	0.198	0.060	0.115
1-Nistosa	0.102	0.308	0.101	0.138	0.180	0.222
6-Kestosa	-	-	-	0.016	0.013	0.031

Tabla 3. Concentración de carbohidratos en coronas de *F. x ananassa* durante el ciclo biológico.

VII.2. Protoplastos de *A. tequilana* Weber var. Azul.

VII.2.1. Obtención de protoplastos.

Para obtener protoplastos de tejido de mesontle de *A. tequilana*, se utilizaron plantas de 3, 4 y 5 años de edad en campo, siendo la planta de 4 años la de mayor tamaño, seguida por la de 3 y la de 5 años de edad (Figura 17).

Una vez realizada la hidrólisis de la pared celular, por medio de microscopía óptica se observó la presencia de células circulares, ausentes de pared, de tonalidad rojiza y tamaño promedio 111 μm , confirmando así la presencia de protoplastos, los cuales corresponden a 2×10^6 células viables/mililitro de solución de protoplastos (Figura 18).

El método de Brandford demostró que la mayor concentración de proteína en los protoplastos, correspondía a los obtenidos a partir de la planta de 4 años de edad con 0.35 mg/ml, criterio que fue tomado para llevar a cabo los estudios de biosíntesis posteriores (Tabla 4).



Figura 17. Mesontle de *A. tequilana* de diferentes edades de La Romita, Guanajuato, México.

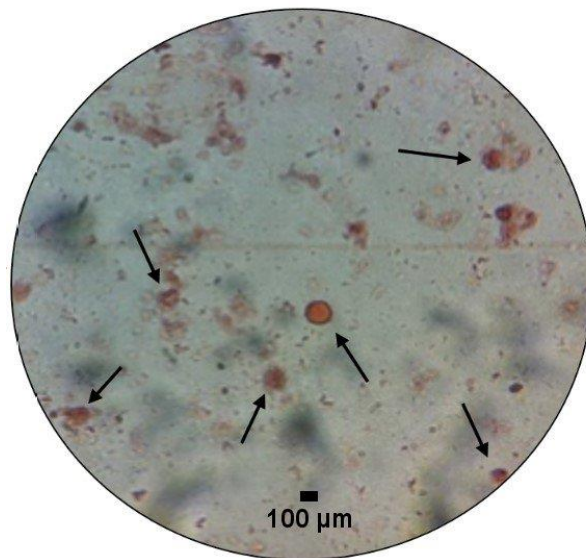


Figura 18. Protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad (Flechas negras)

Edad (años)	Concentración de proteína (mg/ml)
3	0.102
4	0.35
5	0.091

Tabla 4. Concentración de proteína en plantas de *A. tequilana*.

VII.2.2. Actividad FAZY de protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad.

Para confirmar la presencia y actividad de las fructosiltransferasas presentes en los protoplastos, se monitoreó a través del tiempo la formación de productos de la reacción formada por protoplastos más 1-kestosa. A partir de los 30 min de reacción, se observó la formación de 1-Nistosa y las 4 horas la formación de un compuesto de tonalidad rosa posiblemente de la serie Neo de *A. tequilana*, así mismo aumentó la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa (Figura 19).

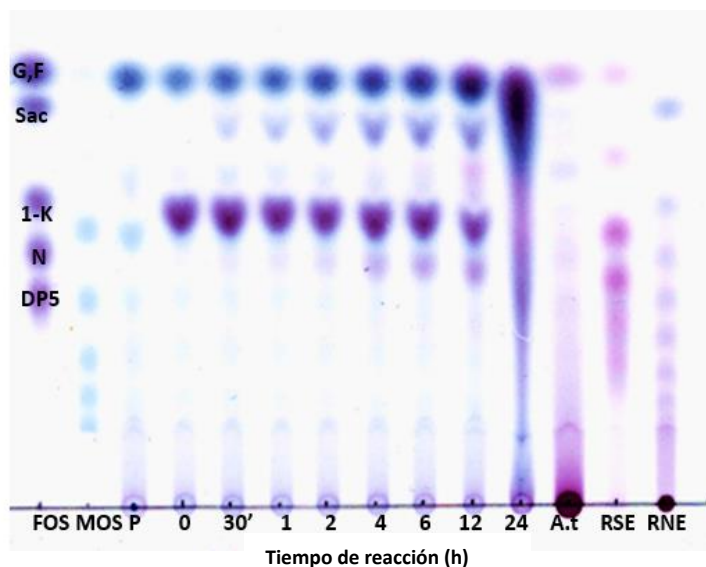


Figura 19. Actividad FAZY de protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad. Sustrato: 1-kestosa (200 mM) al 1%, G: glucosa, F: fructosa, S: sacarosa, 1-K: kestosa, 1-N: 1-nistosa, DP5: kestopentosa, P: protoplastos, A.t: fructanos de *A. tequilana*, RSE: raftilose, RNE: raftiline, temperatura de reacción: 30°C, buffer: CaCl₂, pH: 5.5, revelador de TLC: propanol/butanol/agua, temperatura de revelado: 120°C

VII.3. Biosíntesis de FOS en el sistema *A. tequilana* – *F. x ananassa*

El objetivo de este experimento fue conocer si la biosíntesis de FOS ocurría en el sistema compuesto por enzimas provenientes de los protoplastos de *A. tequilana* mas la extracción de carbohidratos de las coronas de *F. x ananassa* como sustrato.

VII.3.1. Identificación de productos en el sistema *A. tequilana* – *F. ananassa* mediante TLC.

El sistema de biosíntesis se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de sustrato y proteína de protoplastos. La concentración de proteína más adecuada para usar en la reacción fue de 0.15 mg/ml, a la cual se le agregaron concentraciones de sustrato de 3, 5 y 7.5%. La figura 20 mostró la presencia de glucosa y fructosa en todos los tiempos de

reacción, así como la hidrólisis completa de la sacarosa, la cual fue más lenta en la reacción con 7.5% de sustrato, también, y de acuerdo a los estándares se observó la presencia de 1-kestosa en esta reacción.

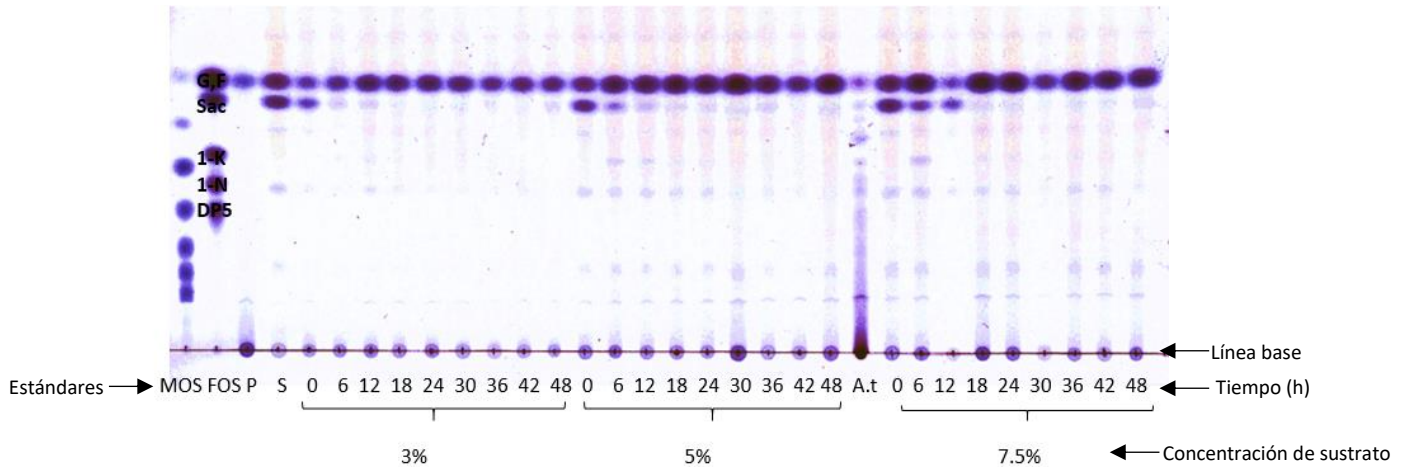


Figura 20. Biosíntesis de fructooligosacáridos a diferentes concentraciones de sustrato. Proteína de protoplastos 0.15 mg/ml., sustrato a 3, 5 y 7.5%, G: glucosa, F: fructosa, 1-k: kestosa, 1-N: 1-nistosa, DP5: kestopentosa, P: protoplastos, S: sustrato, A.t: fructanos de *A. tequilana*, 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h: tiempo de reacción, revelador de TLC: glicoconjugados, temperatura de revelado: 120°C

VII.3.2. Identificación de productos en el sistema *A. tequilana* – *F.x ananassa* mediante HPAEC-PAD.

Para conocer a detalle la formación de los compuestos en la reacción con 7.5% de sustrato, se realizó un análisis de HPAEC-PAD en donde se confirmó de acuerdo a los estándares que los compuestos formados, correspondían a 1-kestosa y 6-kestosa, así mismo se observó que la hidrólisis total de la sacarosa y la maltosa ocurría a las 24 y 6 horas de reacción respectivamente, las señales de glucosa y fructosa eran variables al tiempo de reacción (Figura 21). El resto de los picos formados durante los diferentes tiempos de reacción no coincidieron en tiempos de retención con ninguno de los estándares disponibles, por lo que no fue posible identificarlos.

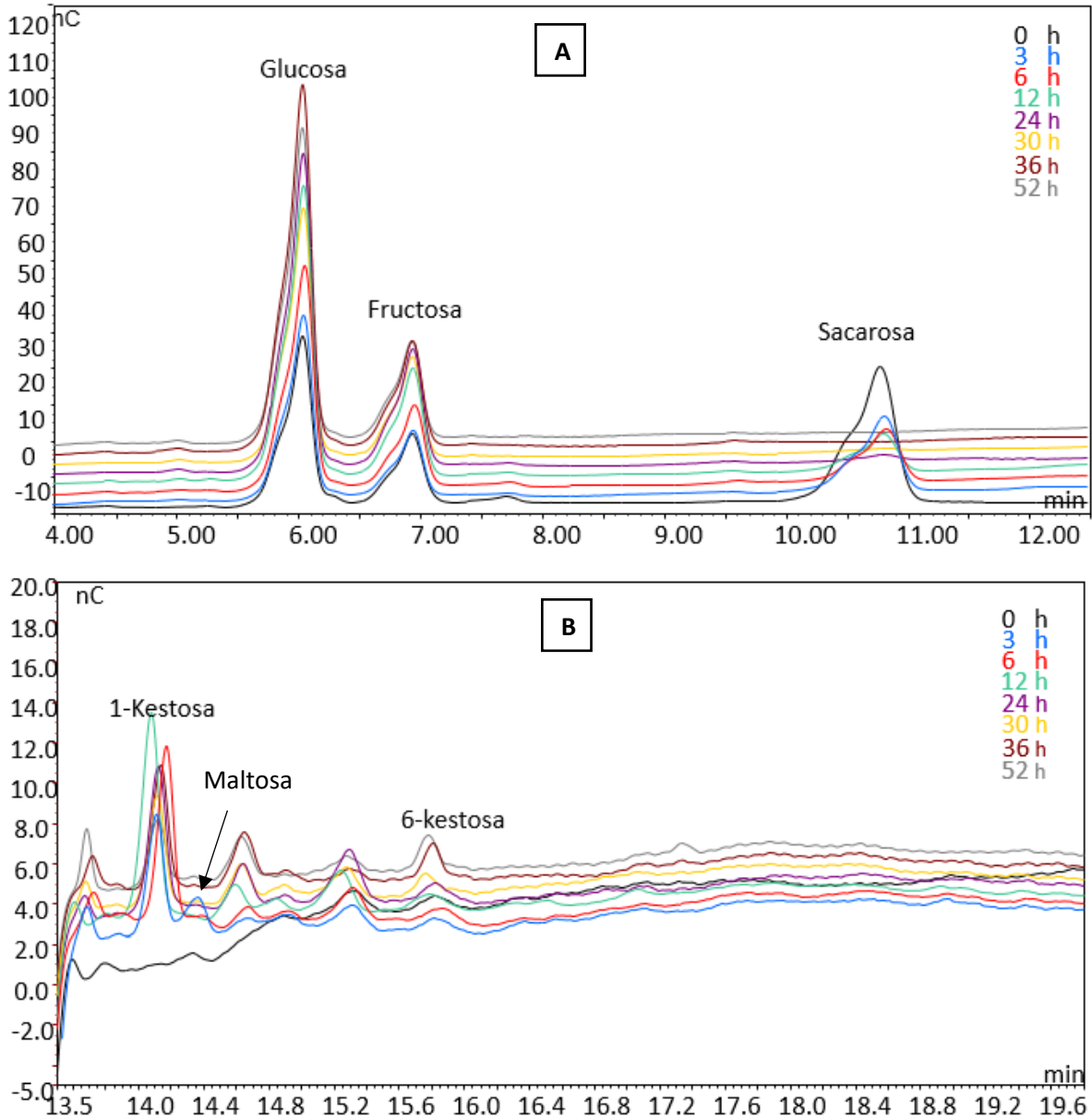


Figura 21. Biosíntesis de FOS en el sistema *A. tequilana* - *F. x ananassa*. A) Perfil de glucosa, fructosa y sacarosa, B) Perfil de MOS y FOS.

La tendencia de los productos en el sistema *A. tequilana* - *F. x ananassa* fue una hidrólisis total de la sacarosa entre las 0 y las 24 horas, un comportamiento similar de aumento y posterior disminución a las 30 horas para glucosa y fructosa, así como la máxima formación de 1-kestosa y 6-kestosa a las 12 y 24 horas respectivamente (Figura 22).

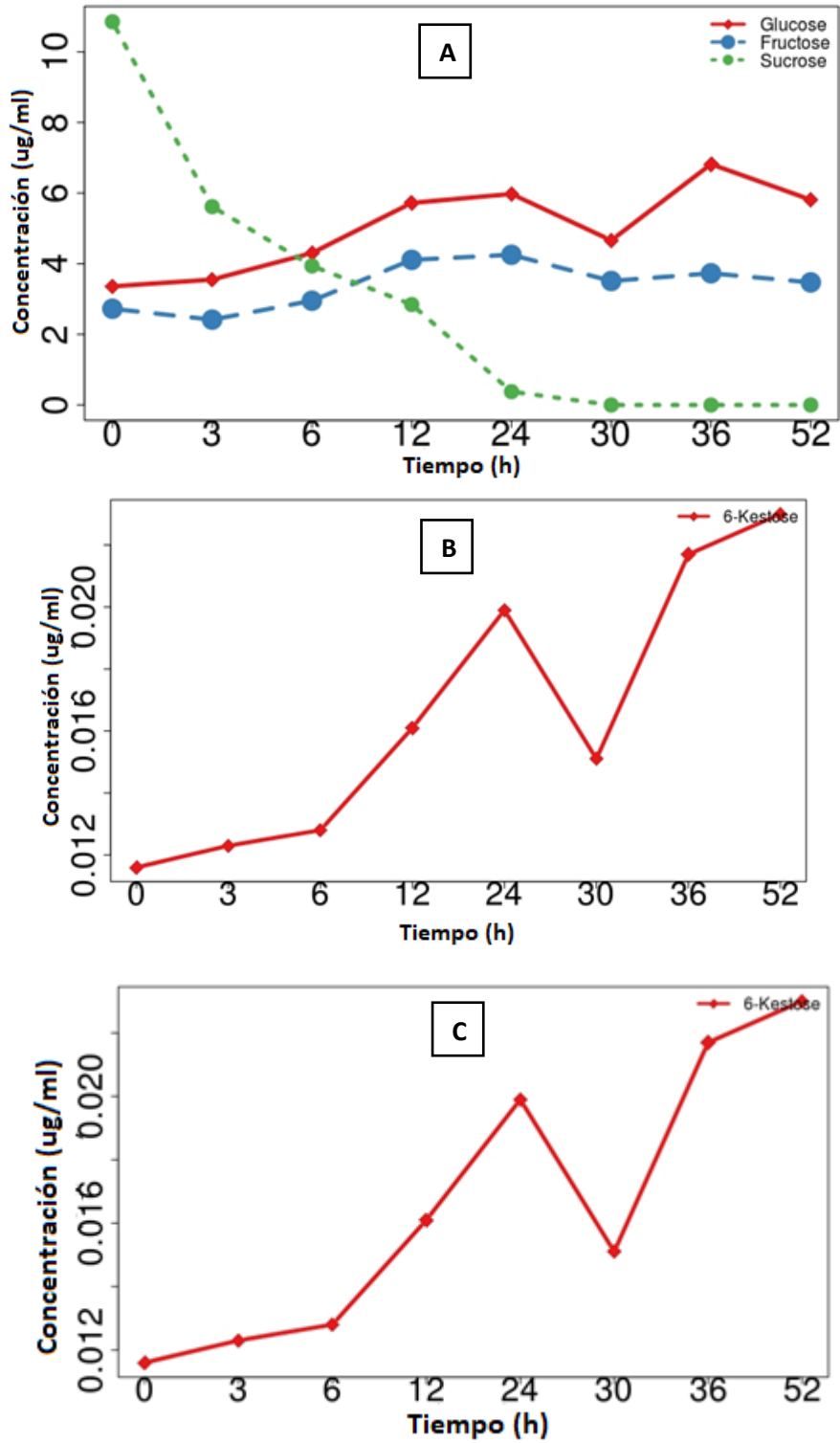


Figura 22. Cinética de formación de productos en sistema *A. tequilana - F. x ananassa*. A) Perfil de Glucosa, Fructosa y Sacarosa. B) Perfil de 1-kestosa. C) Perfil de 6-kestosa

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

VIII.1. *Fragaria x ananassa*.

De la misma forma que otros sistemas vegetales, las coronas de *F. x ananassa* variedad Nikté y Pakal crecen significativamente de tamaño a lo largo del desarrollo de la planta, esto se debe a que al final de la temporada de verano y a principios del otoño, la reducción en las temperaturas y el fotoperiodo favorecen la acumulación de carbohidratos en los órganos de reserva, resultando en un incremento del grosor de la corona y las raíces ⁶².

Los fructooligosacáridos presentes en las coronas de *F. x ananassa* fueron 1-kestosa y 1-nistosa en la variedad Pakal y 1-kestosa, 6-kestosa y 1-nistosa en la variedad Nikté. Al ser la corona un órgano de reserva, se entiende que las concentraciones de FOS en ambas variedades fueron mayores a las anteriormente reportadas en frutos de la especie *Fragaria vesca* en donde 1-kestosa y 1-nistosa presentaron concentraciones por debajo de los 43.85 µg/g ⁴⁴.

Después del trasplante de las plantas, los carbohidratos que se encuentran en los órganos de reserva, juegan un papel fundamental para el crecimiento de éstas, así como para la producción de las primeras flores y los primeros frutos ⁶³, afectando las concentraciones de glucosa, fructosa, sacarosa, MOS y FOS, durante las tres etapas de desarrollo. En ambas variedades se pudo observar una disminución en la concentración de glucosa y fructosa de la etapa vegetativa a la de floración y posterior aumento en la de fruto, esto quiere decir que la acumulación de carbohidratos se lleva a cabo en la etapa vegetativa, los cuales posteriormente son utilizados para dar paso al inicio de la etapa reproductiva (floración) y posteriormente aumentan para poder desarrollar los frutos.

Durante la etapa vegetativa la concentración de sacarosa fue mayor en ambas variedades, disminuyendo conforme la planta se fue desarrollando. Se sabe que la floración es un signo de respuesta hormonal, la cual está mediada por la acumulación de sacarosa en los órganos de reserva ⁶⁴, induciendo así el inicio de la floración, así mismo se sabe, que la sacarosa se almacena en la vacuola y el apoplasto, dependiendo de las necesidades energéticas de la planta ², y que al estar almacenada en la vacuola puede dar paso a la síntesis de fructanos, explicando la presencia de 1-kestosa y 6-kestosa, así como el aumento en las concentraciones de 1-nistosa en ambas variedades.

Una variación mayor de los datos durante la etapa reproductiva puede deberse a que el número de frutos y flores por cada planta seleccionada variaban entre sí, por lo que en la etapa vegetativa esta variación no es tan marcada (Figuras 12c, 13c, 14c y 15c).

Es importante resaltar que la mayor concentración y tipo de fructooligosacáridos se encuentra en la variedad Nikté con variaciones no significativas a través del desarrollo (Tabla 3).

VIII.2. Obtención de protoplastos.

De las plantas muestreadas para la obtención de protoplastos, la de 4 años de edad fue la más grande en comparación con la de 3 y la de 5 años (Figura 16). Se sabe que en *A. tequilana* el tamaño de la planta no es dependiente de la edad. Las prácticas agronómicas actuales, el tipo de suelo e incluso el clima de la región en donde la planta crece, son características que influyen en el crecimiento de esta.

El mayor número de protoplastos viables así como la mayor concentración de proteína se encontró en el mesontle de *A. tequilana* de 4 años de edad, eso se debe a que en plantas de entre 2 y 4 años, la actividad FAZY es mayor que en plantas maduras, así mismo en plantas mayores (5 a 7 años) la actividad FEH aumenta, mientras que la actividad fructosiltransferasa no sufre cambios significativos ³².

Se sabe que las vacuolas están presentes las enzimas necesarias para la síntesis de fructanos en *A. tequilana* ³², sin embargo la obtención de éstas es un proceso complejo. La pared celular de las plantas es una capa extracelular, delgada, fuerte y flexible compuesta de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz hidratada de polisacáridos complejos y en menor cantidad proteínas estructurales ⁶⁵, por lo que a la acción de las enzimas celulasa y pectinasa en el medio de digestión ayudan a degradarla y obtener los protoplastos, los cuales, extraídos de agave, han sido utilizados en estudios previos, indicando que éstos son un buen modelo para la obtención de FAZY ³⁵.

VIII.2.1 Actividad FAZY

Los principales productos de formación en la reacción compuesta por 1-kestosa (200 Mm) y protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad fueron 1-nistosa y neo-kestosa, evidenciando así la presencia de actividad 1-FFT y 6-G-FFT, así mismo el aumento de fructosa y glucosa sugiere la presencia de actividad FEH, o actividad de invertasa vacuolar, de la cual se han identificado los genes que codifican para esta en *A. tequilana* ³⁰, la cual hidroliza sacarosa de manera preferencial, pero también puede hidrolizar otros sustratos donadores como 1-kestosa, rafinosa y estaquiosa ⁶⁶. Esto determinó que los protoplastos extraídos tenían actividad FAZY y podían ser utilizados para los ensayos de biosíntesis posteriores.

VIII.3. Biosíntesis *in-vitro* de FOS.

Se ha reportado la formación de productos tipo FOS al utilizar extractos vacuolares y/o protoplastos de agave y diferentes sustratos específicos, sin embargo no se había realizado una síntesis con sustratos compuestos por una mezcla compleja de carbohidratos.

Los productos principales en el sistema formado por protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad y carbohidratos de corona de *F. x ananassa* como sustrato fueron 1-kestosa y 6

kestosa, así como la hidrólisis de la sacarosa, evidenciando así la presencia de actividad 1-SST y 6-SFT, la cual ha sido previamente reportada en *Agave tequilana*, y se sabe, es la responsable de la formación de las ramificaciones en los fructanos complejos de *A. tequilana* ⁶⁷. Al variar la concentración de sustrato se pudo observar que con concentraciones menores a 7.5 %, la hidrólisis total de la sacarosa se lleva a cabo en un tiempo menor, sugiriendo así que la actividad enzimática de FEH o invertida en protoplastos es muy activa. Debido a que en todas las reacciones fue utilizada la misma concentración de proteína, se decidió aumentar la concentración de sustrato en la reacción, para que las enzimas tuvieran más sustrato disponible y su actividad pudiera observarse mejor, y no únicamente la FEH estuviera compitiendo por los sustratos.

Para confirmar la presencia de actividad fructosiltransferasa, las reacciones con 7.5% de sustrato se analizaron en el HPAEC-PAD en donde se pudo observar que la hidrólisis total de la sacarosa se lleva a cabo a las 24 horas y que posiblemente esta fue usada por las FAZY para la síntesis de 1-kestosa, la cual tiene su máxima concentración a las 12 horas, ya que de haber sido utilizada por la FEH o invertasas la fructosa y la glucosa hubieran aumentado en la misma proporción. Así mismo se observó la presencia de otros picos, los cuales no pudieron ser identificados con los estándares disponibles, pero si evidencian la presencia de otra actividad enzimática, probablemente de formación de fructanos de la serie Fn.

La actividad de la FEH y de invertasa vacuolar puede estar afectando el grado de polimerización de los productos formados, a pesar de que las concentraciones fueron bajas es importante mencionar que a la fecha no existen fructanos de agave *in-vitro* como 6-kestosa, los cuales posteriormente podrían ser purificados de la muestra para usarse con fines académicos y comerciales.

La síntesis de FOS a través del uso de protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad y los carbohidratos extraídos de las coronas de *F. x ananassa* es un sistema complejo que involucra la participación de diferentes enzimas y sustratos. Como perspectiva, se debe profundizar en el estudio del sistema *A. tequilana* – *F. x ananassa*, con el objetivo de que los FOS sintetizados puedan ser redituables.

IX. CONCLUSIONES

1. La mejor etapa durante el desarrollo de las coronas de *F. x ananassa* es la etapa vegetativa correspondiente a la variedad Nikté, ya que en durante esta la concentración y tipo de fructooligosacárido fue mayor, a diferencia de las otras etapas.
2. La acumulación de carbohidratos en las coronas de *F. x ananassa* se lleva a cabo durante la etapa vegetativa y frutescencia teniendo una disminución durante la floración.
3. A mayor concentración de proteína en protoplastos de *A. tequilana*, mayor actividad fructosiltransferasa.
4. Los protoplastos de *A. tequilana* de 4 años de edad, son una fuente importante de fructosiltransferasas para la síntesis de FOS.
5. Los principales productos de la biosíntesis en el sistema *A. tequilana – F. x ananassa* fueron 1-kestosa y 6-kestosa.

X. REFERENCIAS

1. L'homme, C., Peschet, J. L., Puigserver, A. & Biagini, A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **920**, 291–297 (2001).
2. Vijn, I. & Smeekens, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* **120**, 351–360 (1999).
3. Ritsema, T. & Smeekens, S. Fructans: Beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 223–230 (2003).
4. Ishiguro, Y., Ueno, K., Onodera, S., Benkeblia, N. & Shiomi, N. Effect of temperatures on inulobiose and inulooligosaccharides in burdock roots during storage. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 398–401 (2011).
5. Gupta, A. K. & Kaur, N. Fructan metabolism in jerusalem artichoke and chicory. *Dev. Crop Sci.* **26**, 223–248 (2000).
6. Van Laere, A. & Van den Ende, W. Inulin metabolism in dicots: Chicory as a model system. *Plant, Cell Environ.* **25**, 803–813 (2002).
7. Sims, I. M. Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. *Phytochemistry* **63**, 351–359 (2003).
8. Cimini, S. *et al.* Fructan biosynthesis and degradation as part of plant metabolism controlling sugar fluxes during durum wheat kernel maturation. *Front. Plant Sci.* **6**, 1–10 (2015).
9. Fujishima, M. *et al.* Isolation and Structural Analysis In Vivo of Newly Synthesized Fructooligosaccharides in Onion Bulbs Tissues (*Allium cepa* L.) during Storage. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2009**, 1–9 (2009).
10. Shiomi, N. Properties of Fructosyltransferases Involved in the Synthesis of Fructan in Liliaceous Plants. *J. Plant Physiol.* **134**, 151–155 (1989).
11. LIVINGSTON, D. P., CHATTERTON, N. J. & HARRISON, P. A. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol.* **123**, 725–734 (1993).
12. Mancilla-Margalli, N. A. & López, M. G. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7832–7839 (2006).
13. Livingston, D. P., Hinch, D. K. & Heyer, A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2007–2023 (2009).
14. Van den Ende, W. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–11 (2013).
15. Valluru, R., Lammens, W., Claupein, W. & Van den Ende, W. Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends Plant Sci.* **13**, 409–414 (2008).
16. Verhaest, M. *et al.* X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: Fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant J.* **41**, 400–411 (2005).

17. Lammens, W. *et al.* Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. *J. Exp. Bot.* **60**, 727–740 (2009).
18. Lasseur, B. *et al.* Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Exp. Bot.* **57**, 2719–2734 (2006).
19. Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, a, Boller, T. & Wiemken, a. Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11652–6 (1995).
20. Van Den Ende, W. *et al.* Fructan 1-exohydrolases. beta-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiol.* **131**, 621–631 (2003).
21. Good-Avila, S. V, Souza, V., Gaut, B. S. & Eguiarte, L. E. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9124–9129 (2006).
22. García-Mendoza, A. J. Los agaves de México. *Redalyc* **87**, 14–23 (2007).
23. MacNeish, R. S. & Byers, D. S. *The Prehistory of the Tehuacan Valley: Volume One, Environment and Subsistence.* (1966).
24. Escalante, A. *et al.* Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* **124**, 126–134 (2008).
25. Delgado-Lemus, A., Casas, A. & Téllez, O. Distribution, abundance and traditional management of Agave potatorum in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **10**, 63 (2014).
26. Gentry, H. S. *Agaves of Continental North America.* (The University of Arizona Press, 1982).
27. Nobel, P. S. *Environmental Biology of Agaves and Cacti.pdf.* (Cambridge University Press, 1988).
28. Mellado-Mojica, E. & López, M. G. Fructan metabolism in A. tequilana Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11704–11713 (2012).
29. Ávila-Fernández, Á. *et al.* Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from Agave tequilana Weber var. azul. *Plant Sci.* **173**, 478–486 (2007).
30. Cortés-Romero, C., Martínez-Hernández, A., Mellado-Mojica, E., López, M. G. & Simpson, J. Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from Agave tequilana. *PLoS One* **7**, e35878 (2012).
31. Suárez-González, E. M., López, M. G., Délano-Frier, J. P. & Gómez-Leyva, J. F. Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in Agave tequilana and A. inaequidens is differentially induced by diverse (a)biotic-stress related elicitors. *J. Plant Physiol.* **171**, 359–372 (2014).
32. Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. E. & López, M. G. Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of Agave tequilana

- Weber Blue variety plants of different age. *Planta* **245**, 265–281 (2017).
33. Oyarzábal, I. S., Ritsema, T. & Pearce, S. R. Analysis and Characterization of Fructan Oligosaccharides and Enzymatic Activities in the Leaves of Agave tequilana (Weber) var. 'Azul'. *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biology* **3**, 40–51 (2009).
 34. Avila, de D. E., Gomez, V. A. D., Damián, S. M. L. & Simpson, J. New insights into plant glycoside hydrolase family 32 in Agave species. *Front. Plant Sci.* **6**, 594 (2015).
 35. García-Pérez, M. C. & López, M. G. Factors affecting fructosyltransferases and fructan exohydrolase activities in Agave tequilana Weber var. azul. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **25**, 147–154 (2016).
 36. Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B. & Panesar, R. Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 1475–1490 (2015).
 37. Sarup, R., Pal, R. & Kennedy, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **85**, 565–572 (2016).
 38. Fukutomi, D. *et al.* High-level fructooligosaccharide production in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol.* **30**, 77–81 (2013).
 39. Álvaro-Benito, M. *et al.* Characterization of a β -fructofuranosidase from Schwanniomyces occidentalis with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J. Biotechnol.* **132**, 75–81 (2007).
 40. Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C. & López-Munguía, A. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chem.* **129**, 380–386 (2011).
 41. Huazano-García, A. & López, M. G. Enzymatic Hydrolysis of Agavins to Generate Branched Fructooligosaccharides (α -FOS). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1–10 (2017). doi:10.1007/s12010-017-2526-0
 42. Lopes, S. M. S. *et al.* A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of Stevia rebaudiana Bertoni. *Food Chem.* **225**, 154–161 (2017).
 43. Cazetta, M. L., Martins, P. M. M., Monti, R. & Contiero, J. Yacon (Polymnia sanchifolia) extract as a substrate to produce inulinase by Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus. *J. Food Eng.* **66**, 301–305 (2005).
 44. Blanch, M., Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I. & Merodio, C. Characterisation and functionality of fructo-oligosaccharides affecting water status of strawberry fruit (Fragaria vesca cv. Mara de Bois) during postharvest storage. *Food Chem.* **134**, 912–919 (2012).
 45. Liston, A., Cronn, R. & Ashman, T.-L. FRAGARIA : A GENUS WITH DEEP HISTORICAL ROOTS AND RIPE FOR EVOLUTIONARY AND ECOLOGICAL INSIGHTS. *Am. J. Bot.* **101**, 1686–1699 (2014).
 46. Dávalos Gonzáles, P. A., Aguilar García, R., Jofre y Garfias, A. E., Hernández Razo, A. R. & Vázquez Sánchez, M. N. *Tecnología para sembrar viveros de fresa.* (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, 2011).

47. Darrow, G. M. *The Strawberry*. (The New England Institute for Medical Research, 1966).
48. Macías-Rodríguez, L., Quero, E. & López, M. G. Carbohydrate differences in strawberry crowns and fruit (*Fragaria* × *Ananassa*) during plant development. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3317–3321 (2002).
49. Fernández-Lara, R. *et al.* Assessment of the differences in the phenolic composition and color characteristics of new strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars by HPLC-MS and Imaging Tristimulus Colorimetry. *Food Res. Int.* **76**, 645–653 (2015).
50. Dávalos-González, P. A. *et al.* Strawberry breeding for the Central Plateau of México. *Acta Hort.* **708**, 547–552 (2006).
51. Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M. & Teixeira, J. A. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. *Food Bioprocess Technol.* **7**, 324–337 (2014).
52. Gibson, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement of the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 491–502 (2017).
53. Cani, P. D. *et al.* Oligofructose Promotes Satiety in Rats Fed a High-Fat Diet : Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. *Obes. Res.* **13**, 1000–1007 (2005).
54. Marquez-Aguirre, A. L. *et al.* Fructans from Agave tequilana with a Lower Degree of Polymerization Prevent Weight Gain , Hyperglycemia and Liver Steatosis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* **71**, 416–421 (2016).
55. Tochio, T. *et al.* An Alteration in the Cecal Microbiota Composition by Feeding of 1-Kestose Results in a Marked Increase in the Cecal Butyrate Content in Rats. *PLoS One* **11**, 1–11 (2016).
56. Delzenne, N. M. & Kok, N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **73**, 456–458 (2001).
57. Wang, Y. *et al.* Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. *Nutrition* **26**, 305–311 (2010).
58. García-Vieyra, M. I., Del Real, A. & G. López, M. Agave Fructans: Their Effect on Mineral Absorption and Bone Mineral Content. *J. Med. Food* **17**, 1–9 (2014).
59. Kringstad, R., Kenyon, W. H. & Black, C. C. The rapid isolation of vacuoles from leaves of crassulacean Acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **66**, 379–82 (1980).
60. Robert, S., Zouhar, J., Carter, C. & Raikhel, N. Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nat. Protoc.* **2**, 259–262 (2007).
61. COCCO, C., ALDRIHI, M., REISSER JUNIOR, C., MARAFON, A. C. & CORREA ANTUNES, L. E. CARBOHYDRATE CONTENT AND DEVELOPMENT OF STRAWBERRY TRANSPLANTS FROM RIO GRANDE DU SUL AND IMPORTED. *Rev. Bras. Frutic.* **38**, e-581 (2016).
62. Pertuzé, R., Barrueto, M., Díaz, V. & Gambardella, M. Evaluation of strawberry nursery management techniques to improve quality of plants. in *Acta Horticulturae* **708**, 245–248 (2006).

63. Eshghi, S., Tafazoli, E., Dokhani, S., Rahemi, M. & Emam, Y. Changes in carbohydrate contents in shoot tips, leaves and roots of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during flower-bud differentiation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **113**, 255–260 (2007).
64. Kurokura, T., Mimida, N., Battey, N. H. & Hytönen, T. The regulation of seasonal flowering in the Rosaceae. *J. Exp. Bot.* **64**, 4131–4141 (2013).
65. Cosgrove, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850–861 (2005).
66. Lammens, W., Le Roy, K., Van Laere, A., Rabijns, A. & Van den Ende, W. Crystal Structures of *Arabidopsis thaliana* Cell-Wall Invertase Mutants in Complex with Sucrose. *J. Mol. Biol.* **377**, 378–385 (2008).
67. García-Pérez, M. C. Identificación de fructosiltransferasas involucradas en la síntesis de fructanos ramificados de plantas micropropagadas de *A. tequilana* Weber var. Azul. (2017).